

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

---

**Therapeutische Anwendung des Progesteronantagonisten  
„Onapriston“ im transgenen Rattenmodell der  
Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A)**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Gerd Meyer zu Hörste  
aus  
Georgsmarienhütte

Göttingen 2005

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Bähr

II. Berichterstatter / in:

III. Berichterstatter / in:

Tag der mündlichen Prüfung:

# *Inhaltsverzeichnis*

1. Einleitung .....	1
1.1 Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung.....	2
1.1.1 Klassifikation der hereditären peripheren Neuropathien.....	2
1.1.2 Klinik der CMT1 .....	5
1.1.3 Die Duplikation 17p11.2-p12 und PMP22 .....	7
1.1.4 Mechanismen der CMT1A .....	11
1.1.5 Therapie der CMT1A .....	14
1.1.6 Tiermodelle der CMT1A .....	15
1.2 Steroidhormone im Nervensystem .....	17
1.2.1 Synthese von Steroidhormonen im Nervensystem.....	17
1.2.2 Neurosteroid im zentralen Nervensystem.....	19
1.2.3 Neurosteroid im peripheren Nervensystem .....	19
1.2.4 Progesteronantagonisten und ihre Anwendung .....	21
1.3 Zielsetzung und Hypothese .....	23
2. Material und Methoden .....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien.....	24
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.3 Geräte .....	26
2.1.4 Lösungen und Puffer .....	27
2.1.5 Enzyme und Reaktionskomplettsysteme.....	29
2.1.6 Nukleinsäuren und Nukleotide .....	29
2.1.7 Radiochemikalien .....	29
2.1.8 Oligonukleotide .....	30
2.1.9 Versuchstiere .....	30
2.1.10 Computersoftware .....	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Manipulation und Analyse von Versuchstieren.....	31
2.2.2 Bestimmung der Pharmakokinetik von Progesteron .....	35
2.2.3 Histologische Methoden.....	37
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	40
2.2.5 Statistische Methoden.....	45

---

3. Ergebnisse.....	47
3.1 Das transgene Rattenmodell der CMT1A .....	47
3.1.1 Beurteilung der CMT-Ratten durch den Stangentest .....	47
3.1.2 Beurteilung der CMT-Ratten durch das Punktesystem .....	49
3.1.3 Variable Muskelatrophie der CMT-Ratten.....	49
3.1.4 Variable Demyelinisierung der CMT-Ratten .....	50
3.1.5 PMP22-Expression im peripheren Nervensystem.....	52
3.2 Behandlung von CMT-Ratten mit Steroiden.....	53
3.2.1 Behandlung mit Progesteron und Onapriston.....	53
3.2.2 Myelingenexpression nach Steroidbehandlung.....	55
3.2.3 Histologie der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung.....	56
3.2.4 Phänotyp der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung.....	59
3.2.5 Korrelation der Ergebnisse .....	62
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	64
4. Diskussion .....	65
4.1 Charakterisierung der CMT-Ratten.....	65
4.1.1 Der klinische Phänotyp der CMT-Ratten.....	65
4.1.2 Histologische Charakteristika der CMT-Ratten .....	66
4.1.3 Expression von PMP22 im peripheren Nervensystem .....	67
4.2 Steroidtherapie der CMT-Ratten .....	68
4.2.1 Charakterisierung der Steroidbehandlung .....	68
4.2.2 Myelingenexpression nach Steroidbehandlung.....	70
4.2.3 Histologie der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung.....	76
4.2.4 Phänotyp der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung.....	79
4.2.5 Korrelation der untersuchten CMT1A-Charakteristika.....	82
4.3 Schlussfolgerungen und Konsequenzen .....	86
5. Zusammenfassung .....	87
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	88
7. Literaturverzeichnis .....	89

# Abkürzungsverzeichnis

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

verwendete SI-Einheiten Präfixe:

Symbol	Faktor	Präfix
k	$10^3$	kilo
c	$10^{-2}$	centi
m	$10^{-3}$	milli
$\mu$	$10^{-6}$	mikro
n	$10^{-9}$	nano

Abb.	Abbildung
AD	autosomal-dominant
AR	autosomal-rezessiv
$3\beta$ HSD	$3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase / $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -Isomerase
bp	Basenpaare
ca.	circa
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalziumchlorid-2-Hydrat
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CHM	kongenitale Hypomyelinisierung
cm	Zentimeter
$\text{cm}^2$	Quadratzentimeter
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CMT1	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1
CMT1A	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A
CMT1A-REP	CMT1A <i>repeat</i> ; Wiederholungs-Sequenzen
CMT-Ratten	PMP22 transgenes Tiermodell der CMT1A
CMTX	X-chromosomal vererbte CMT
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
Ct	Threshold-Cycle
Cx32	Connexin 32 kDa
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DDSA	2-Duodecenylnsuccinicacidanhydrid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
dHMN	distale hereditäre motorische Neuropathie
DH-Progesteron	$5\alpha$ -Dihydroprogesteron
DMP30	2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-Phenol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSS	Dejerine-Sottas-Syndrom
DTT	1,4-Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR2	<i>Early Growth Response 2</i>
EMG	Elektromyographie

---

FAM	6-Carboxy-Fluorescein
f.c.	<i>final concentration</i> ; Endkonzentration
Fwd	<i>Forward</i> ; Vorwärtsprimer
G	<i>Gauge</i> ; Maß des Kanülenaußendurchmessers
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GARS	<i>glycyl-tRNA synthetase</i>
GDAP1	<i>ganglioside-induced differentiation-associated protein 1</i>
HBSS	<i>Hanks Balanced Salts Solution</i> ; Perfusionslösung
HCl	Salzsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HMSN	hereditäre motorisch-sensible Neuropathie
HNPP	hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckpareisen
H <sub>2</sub> O	Wasser
HSAN	hereditäre sensorische autonome Neuropathie
HSP27	<i>heat shock protein 27 kDa</i>
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KIF1Bβ	<i>kinesin family member 1B</i>
L x B x H	Länge mal Höhe mal Breite
LITAF	<i>lipopolysaccharide induced tumornecrosis factor</i>
LMNA	lamin A/C transcript variant 1
M	molar
M.	<i>musculus</i> ; anatomische Muskelbezeichnung
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
MBP	Myelin-basisches Protein
MEZ	mitteleuropäische Zeit
MFN2	Mitofusin 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MNA	Methylnadicanhydrid
MPI	Max-Planck-Institut
MPZ / P0	<i>Myelin Protein Zero</i> ; Myelinprotein Null
mRNA	<i>messenger-</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
MTMR13	Myotubularin-related
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
n	Anzahl
n	nano
N.	<i>nervus</i> ; anatomische Nervenbezeichnung
Na	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	Dinatriumphosphat-2-hydrat

---

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDRG1	<i>N-myc downstream regulated gene 1</i>
NEFL	<i>neurofilament light polypeptide 68 kDa</i>
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
n.s.	nicht signifikant
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLP	Proteolipid-Protein
PMP22	peripheres Myelin-Protein 22 kDa
PNS	peripheres Nervensystem
PRX	Periaxin
P450scc	<i>Cholesterol side-chain cleavage</i> -Enzym
r	Korrelationskoeffizient
RAB7	<i>member RAS oncogene family 7</i>
Rev	<i>Reverse</i> ; Rückwärtsprimer
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RU-486	Mifepriston
s	Sekunde
SMA	spinale Muskelatrophie
s.o.	siehe oben
ssDNA	einzelsträngige DNA
s.u.	siehe unten
TAE	Tris/Acetat-Puffer mit EDTA
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
TE	Puffer mit Tris-Cl und EDTA
TET	Tetrachloro-6-carboxyfluorescein
TH-Progesteron	3 $\alpha$ -,5 $\alpha$ -Tetrahydroprogesteron
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Base
U	<i>Unit</i> ; Enzymeinheit
V	Volt
x	vielfach
XD	X-chromosomal-dominant
XR	X-chromosomal-rezessiv
ZK98299	Onapriston
ZNS	zentrales Nervensystem

# *1. Einleitung*

Das Nervensystem des Menschen steuert die Reaktion auf äußere Reize, verarbeitet Informationen und kontrolliert komplexe Verhaltensweisen. Es gliedert sich in das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und das periphere Nervensystem (PNS). Die mikroskopische Struktur des Nervensystems wird gebildet aus Nervenzellen und Gliazellen. Die einzelne Nervenzelle (Neuron) besteht anatomisch aus einem Zellkörper, mehreren informationsempfangenden Fortsätzen (Dendriten) und einem informationsaussendenden Fortsatz (Axon).

Die Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen sind die Gliazellen des ZNS und die Schwannzellen die des PNS. Diese Gliazellen dienen unter anderem dem Schutz und der Versorgung der Nervenzellen. Darüber hinaus bilden die Schwannzellen im PNS und die Oligodendrozyten im ZNS bei einem Teil der Neurone die so genannte Myelin- oder Markscheide. Diese Myelinscheide besteht aus spezialisierten, konzentrischen Zellmembranschichten der Gliazelle um das Axon. Sie wirkt als Isolator für Ionenströme, wodurch die Entstehung von Aktionspotentialen auf die nicht myelinisierten Abschnitte der Axone (Nodien) beschränkt wird. Durch diese Isolation ist eine schnelle, saltatorische Erregungsleitung im Axon möglich.

Das genetisch bedingte Unvermögen der Schwannzellen, eine geordnete Myelinstruktur zu bilden, definiert die Gruppe der hereditären, peripheren Neuropathien. Unter diesen hereditären Neuropathien hat die Gruppe der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) oder hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (HMSN) die größte Prävalenz. Verschiedene Gendefekte wurden als mögliche Auslöser dieser Erkrankung identifiziert und unterschiedliche Tiermodelle wurden hergestellt, um ihre Pathophysiologie näher zu untersuchen.



## **1.1 Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung**

### ***1.1.1 Klassifikation der hereditären peripheren Neuropathien***

Vererbliche Neuropathien des peripheren Nervensystems gehören zu den häufigsten Erbkrankheiten des Menschen überhaupt. Mit einer geschätzten Prävalenz von bis zu 1:2500 (Skre 1974; Emery 1991) sind sie häufiger als Myasthenia gravis oder die Duchenne'sche Muskeldystrophie (Eagle et al. 2002; Cooper und Stroehla 2003). Zuerst wurde von Charcot und Marie eine hereditäre, langsam progrediente, distal betonte, symmetrische Muskelatrophie der Füße und Beine als eigene Krankheitsentität charakterisiert (Charcot und Marie 1886). Zeitgleich und unabhängig beschrieb Tooth einen peroneal betonten Typ der hereditären, progressiven Muskelatrophie mit essentiell übereinstimmenden klinischen Befunden (Tooth 1886). Obwohl schon früher ähnliche Symptome dargestellt worden waren (Eulenburg 1856), behielt die Krankheit die Eigennamen Charcot, Marie und Tooth (CMT). Klinisch wird sie auch hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (HMSN) genannt. Beide Begriffe werden in dieser Arbeit synonym gebraucht.

<b>Klasse</b>	<b>Gruppe</b>	<b>Merkmale</b>
HMSN	HMSN1	demyelinisierende Form
	HMSN2	axonale, neuronale Form
	HMSN3	Dejerine-Sottas-Syndrom
	HMSN4	M. Refsum
	HMSN5	spastische Paraplegie mit Amyotrophie
	HMSN6	CMT mit optischer Atrophie
	HMSN7	CMT mit Retinitis pigmentosa
Sonderformen	CHN	kongenitale Hypomyelinisierung
	HNPP	hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckpareesen
dHMN	dHMN-2	motorische Ausfälle
	bis	
	dHMN-7	
HSAN	HSAN-1	Sensibilitätsausfälle, autonome Störungen
	bis	
	HSAN-6	

**Tabelle 1: Die hereditären Neuropathien**

Hereditäre Neuropathien werden klinisch klassifiziert nach der primär betroffenen Nervenfasernqualität als motorisch-sensible, motorische und sensibel-autonome Neuropathien (Modifiziert nach Kuhlenbäumer et al. 2002, S. 1632).

Mit der Zeit wurden verschiedene Formen hereditärer Neuropathien beschrieben. Eine Klassifikation nach den betroffenen Nervenfasertypen wurde vorgeschlagen (Dyck und Lambert 1968). Diese unterschied neben der HMSN seltener Klassen hereditärer Neuropathien (Tabelle 1). Stehen klinisch die sensiblen und autonomen Ausfälle im Vordergrund, wird dies als hereditäre sensible und autonome Neuropathie (HSAN) bezeichnet, die in sechs Gruppen weiter unterteilt werden kann (Harding 1993). Neuropathien mit motorischen Defekten werden dementsprechend distale hereditäre motorische Neuropathie (dHMN) oder auch distale spinale Muskelatrophie (SMA) genannt. Vier verschiedene Typen der dHMN wurden definiert (Harding 1993).

Die viel häufigere HMSN wird nach klinischen Gesichtspunkten in sieben Gruppen eingeteilt (Harding 1993) (Tabelle 1). Unter HMSN1 werden die demyelinisierenden Formen der HMSN zusammengefasst, die durch eine verminderte Nervenleitgeschwindigkeit gekennzeichnet sind. Unterschieden wird davon die axonale oder neuronale HMSN2 mit normaler Nervenleitgeschwindigkeit. Die HMSN3 wird auch Dejerine-Sottas-Syndrom genannt und zeigt eine besonders schwere Klinik. Die weiteren Formen der HMSN4-7 sind sehr selten. Darüber hinaus wurden Sonderformen beschrieben, die nicht den Kriterien einer HMSN entsprechen. Dies sind die kongenitale Hypomyelinisierung (CHM) und die hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckpareisen (HNPP).

Diese klinisch orientierte Einteilung hereditärer peripherer Neuropathien wurde in den letzten Jahren zunehmend erweitert durch Erkenntnisse der Molekularbiologie und Genetik. Verschiedene genomische Loci wurden mit hereditären Neuropathien assoziiert und unterschiedliche genetische Defekte wurden als Ursache identifiziert (Tabelle 2). Dabei wurde deutlich, dass klinisch vergleichbare Symptome durch Mutationen in ganz unterschiedlichen Genen verursacht werden können. Umgekehrt können Mutationen im gleichen Gen eine sehr unterschiedliche Klinik hervorrufen. Daher muss eine adäquate Klassifikation der CMT sowohl nach klinischen als auch nach genetischen Kriterien erfolgen (Martini et al. 2000).

Eine regelmäßig aktualisierte Liste der hereditären Neuropathien und der verantwortlichen Mutationen ist verfügbar unter: <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>. An dieser Stelle wird die genetische Unterteilung hereditärer Neuropathien dargestellt (Tabelle 2).

CMT Form	typische Charakteristika	Vererbung	Prävalenz	Locus	mutiertes Gen
<b>CMT1</b>	hypertroph demyelinisierende CMT (mNLG < 38 m/s)	AD			
CMT1A	typische CMT1, Beginn in der 2. Lebensdekade	AD	häufig	17p11.2	PMP22 Duplikation / Punktmutation
HNPP	wiederkehrende schmerzlose Druckpareesen, histologisch: Tomaculae, variabler Beginn	AD	häufig	17p11.2	PMP22 Deletion
CMT1B	wie CMT1A aber schwerere Ausprägung	AD	häufig	1q22-q23	P0 / MPZ
CMT1C	typische CMT1	AD	selten	16p13.1-p12.3	LITAF
CMT1 / CMT1D	wie CMT1A aber oft schwerere und frühere Ausprägung	AD	selten	10q21.1-q22.1	EGR2
<b>CMT4</b>	rezessiv hypertroph demyelinisierende CMT (mNLG < 38 m/s)	AR			
CMT4A	schwere Neuropathie, Beginn in der 1. Lebensdekade, tunesische Familien	AR	selten	8q13-q21	GDAP1
CMT4B1	fokal gefaltetes Myelin, Beginn im Kindesalter, italienische Familien	AR	selten	11q23	MTMR2
CMT4B2	fokal gefaltetes Myelin, Beginn in der 1. oder 2. Lebensdekade, tunesische Familien	AR	selten	11p15	SBF2
CMT4 (C)	CMT1 ähnliche Klinik, Beginn in der 1. oder 2. Lebensdekade, algerische Familien	AR	selten	5q23-q33	unbekannt
CMT4D (HMSN-L)	progressive Taubheit, Beginn in der 1. Lebensdekade, bulgarische Familien	AR	selten	8q24	NDRG1
CMT4E (CHN)	schwere Neuropathie, Hypomyelinisierung, Beginn schon bei Geburt	AR	selten	10q21.1-q22.1	EGR2
CMT4F (DSS)	schwere Neuropathie, Hypomyelinisierung, Beginn in früher Kindheit	AR	selten	19q13.1-q13.3	PRX
CCFDN	kongenitale Katarakte, faziale Dysmorphien, Neuropathie	AR	selten	18q23-qter	unbekannt
HMSN-R	schwere Neuropathie, Beginn in der 1. oder 2. Lebensdekade, bulgarische Familien	AR	selten	10q23	unbekannt, EGR2
<b>DI-CMT</b>	dominant vererbte Zwischenformen, mNLG um 38 m/s	AD			
DI-CMTA	typische CMT, axonale und Myelinpathologie, mNLG um 38 m/s, Beginn in der 1. Lebensdekade	AD	selten	10q24.1-q25.1	unbekannt
DI-CMTB	typische CMT, axonale und Myelinpathologie, mNLG um 38 m/s, Beginn in der 1. Lebensdekade	AD	selten	19p12-p13.2	unbekannt
HMSN-P	proximale CMT, mNLG um 38 m/s, Beginn in der 3. Lebensdekade, rapider Verlauf	AD	selten	3q14.1-q13	unbekannt
<b>CMT2</b>	autosomal dominant vererbte CMT, mNLG > 38 m/s	AD			
CMT2A (1)	ähnlich der klassischen CMT, Beginn im Erwachsenenalter	AD	selten	1p35-p36	KIF1B beta
CMT2A (2)	ähnlich der klassischen CMT, Beginn im Erwachsenenalter	AD	selten	1p35-p36	MFN2
CMT2B	v.a. sensorische Neuropathie, akrale Ulzerationen, Beginn in der 2. oder 3. Lebensdekade	AD	selten	3q13-q22	RAB7
CMT2D	motorische Neuropathie der oberen Extremität, Beginn in der 2. oder 3. Lebensdekade	AD	selten	7p14	GARS
CMT2E	typische CMT, mNLG um 38 m/s, Beginn in der 2. oder 3. Lebensdekade	AD	selten	8p21	NEFL
CMT2F	ähnlich der klassischen CMT, trophische Veränderungen, 2. oder 3. Lebensdekade	AD	selten	7q11-21	HSP27
CMT2	Hörverlust, Pupillendysfunktion, Beginn in der 4. oder 5. Lebensdekade	AD	selten	1q22-q23	P0 / MPZ
<b>CMT4C / AR-CMT2</b>	autosomal rezessive Formen der CMT2	AR			
CMT4C1 (AR-CMT2A)	schwere Neuropathie mit prox. Muskelbeteiligung, Beginn in 2. Lebensdek., marrokanische Familien	AR	selten	1q21.2-q21.3	LMNA
CMT4C2	Beteiligung des 1. Motoneurons, Beginn in 1. Lebensdekade, (entspr. evtl. CMT4C4 oder CMT4A)	AR	selten	8q21.3	unbekannt
CMT4C3	typische CMT, Beginn in der 4. Lebensdekade	AR	selten	19q13.3	unbekannt
CMT4C4	schwere Neuropathie, Beginn in der Kindheit, Stimmbandlähmung	AR	selten	8q21	GDAP1
<b>CMTX</b>	X-chromosomale Formen der CMT, meist mit mNLG um 38 m/s	XR und XD			
CMTX oder CMT1X	klassische X-chromosomale CMT, Frauen weniger stark betroffen	XR/XD	häufig	Xq13.1	Cx32
CMT2X	schwere Behinderungen, Taubheit, mentale Retardierung, früher Beginn	XR	selten	Xq24-q26	unbekannt
CMT3X	mentale Retardierung, früher Beginn	XR	selten	Xp22.2	unbekannt
CMT4X	Pyramidenbahnzeichen, Beginn in der 2. Lebensdekade	XR	selten	Xq26-q28	unbekannt
<b>distale HMN</b>	hereditäre Motorneuropathien, keine sensorischen Ausfälle, normale NLG	AD und AR	selten		
<b>HSAN / HSN</b>	hereditäre sensorische und autonome Neuropathie	AR	selten		

**Tabelle 2: genetische Klassifikation der hereditären Neuropathien:** AD autosomal-dominant, AR autosomal-rezessiv, XD X-chromosomal-dominant, XR X-chromosomal-rezessiv,

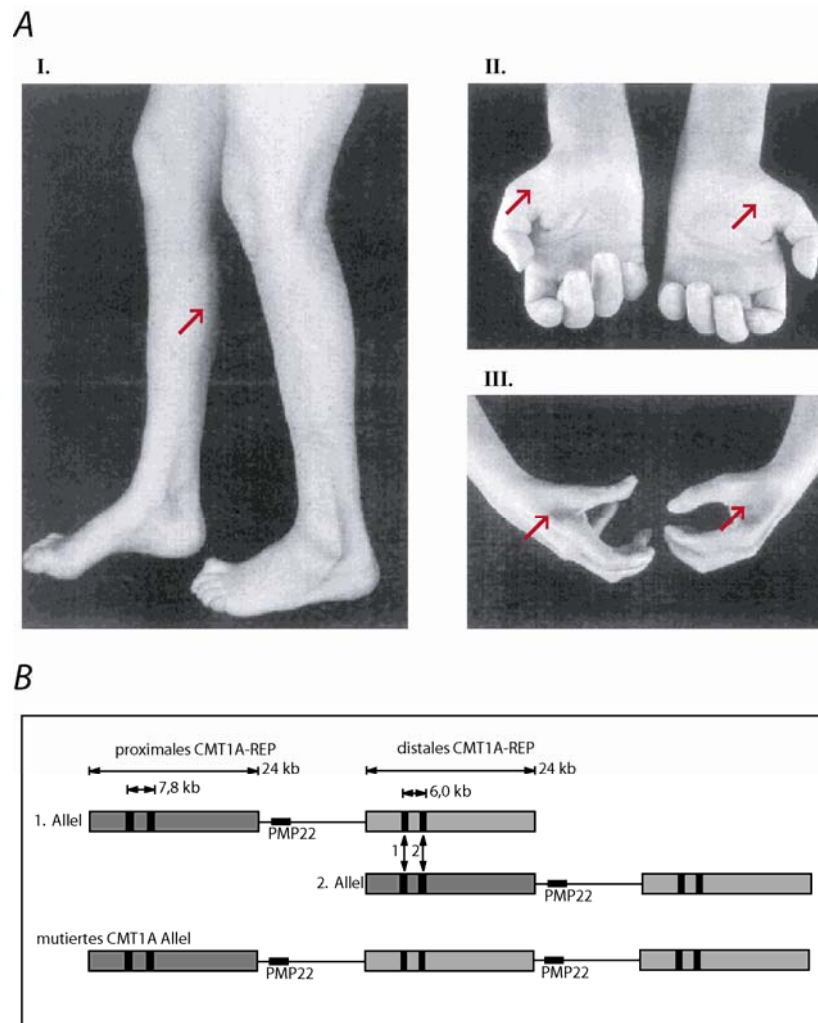
LITAF lipopolysaccharide induced TNF factor, EGR2 Early Growth Response 2, GDAP1 ganglioside-induced differentiation-associated protein 1, MTMR2 myotubularin related protein 2, MTMR13 Myotubularin-related 13, NDRG1 N-myc downstream regulated gene 1, PRX Periaxin, KIF1Bβ kinesin family member 1B, MFN2 Mitofusin 2, RAB7 member RAS oncogene family 7, GARS glycyl-tRNA synthetase, NEFL neurofilament light polypeptide 68kDa, HSP27 heat shock protein 27kDa, LMNA lamin A/C transcript variant 1, Cx32 Connexin 32kDa (Modifiziert nach Kühlenbäumer et al. 2002, S. 1632)

### **1.1.2 Klinik der CMT1**

Durch ihre große Prävalenz sind hauptsächlich CMT Typ 1 und Typ 2 von klinischer Bedeutung. Bei der häufigsten CMT-Form, der demyelinisierenden CMT Typ 1, beeinträchtigt der zu Grunde liegende Gendefekt primär die Schwannzellen. Im Falle der selteneren CMT2 degenerieren initial die Axone (s.u.). Die einzelnen, genetisch definierten Unterformen der CMT **Typ 1** zeigen trotz Variationen der Ausprägung übereinstimmende Symptome. Die Klinik aller genetisch definierten Subtypen der CMT **Typ 1** wird im Folgenden dargestellt.

Klinisches Hauptmerkmal der CMT1 ist eine von distal nach proximal progrediente, symmetrische Muskelatrophie der unteren Extremität. Zunächst wird die Muskulatur im Bereich der Unterschenkel und Füße schwächer mit einer Betonung der „kleinen“ Fußmuskeln sowie der Peroneusmuskeln, was klinisch als „Steppergang“ auffällt (Abbildung 1A). Bei manchen Patienten kann eine distal betonte Atrophie der oberen Extremität hinzukommen (Harding 1993; Birouk et al. 1997). Es bilden sich pathologische Veränderungen der Fußanatomie aus, wie Hohlfuß, Pferdefuß und Hammerzehen (Dyck et al. 1993). Die Muskeleigenreflexe der unteren Extremitäten können teilweise erloschen sein (Garcia et al. 1998). Neben den motorischen Einschränkungen werden in ausgeprägten Fällen der CMT1A auch sensorische Ausfälle vor allem im Bereich der Hände und Füße beschrieben (Dyck et al. 1993).

Die Klinik der CMT-Erkrankung ist durch eine starke Variabilität zwischen verschiedenen Patienten gekennzeichnet. Das Alter beim Auftreten erster vom Patienten wahrgenommener Symptome kann zwischen 10 Jahren und 40 Jahren variieren (Dyck et al. 1993). Auch der Schweregrad der Erkrankung unterscheidet sich zwischen einzelnen Patienten. Einerseits kann die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit trotz gesicherter genetischer Diagnose das einzige Symptom sein (Kaku et al. 1993; Birouk et al. 1997). Andererseits kommen auch Fälle starker körperlicher Behinderung vor, so dass manche Patienten auf einen Rollstuhl angewiesen sind. Interessanterweise bestehen diese Unterschiede auch zwischen Geschwistern (Kaku et al. 1993) und eineiigen Zwillingen (Garcia et al. 1995). Die Ursache dieser Variabilität ist nicht bekannt. Eine Verschlechterung der CMT während der Schwangerschaft wurde beschrieben (Bellina und Deming 1973; Pollock et al. 1982; Rudnik-Schoneborn et al. 1993). Die während der Schwangerschaft veränderte endogene Hormonproduktion wurde als ein möglicher modulierender Faktor der CMT angenommen.



**Abbildung 1: Genetik und Klinik der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1**

**A** Klinische Befunde der CMT1A: Wadenmuskulatur (I.) und Handmuskulatur (II, III.) atrophieren. So genannter "pes cavus" und Hammerzehen sind sichtbar (I.) (rote Pfeile). Die Thenaratrophy (II.) und eingefallene Tabatiere (III.) fallen auf (rote Pfeile) (Modifiziert nach Kuhlenbäumer et al. 2002, S. 1631).

**B** Der CMT1A-Mutations-"hotspot". Das PMP22-Gen wird auf zentromerer und telomerer Seite flankiert von so genannten CMT1A-Wiederholungssequenzen (CMT1A-REP), die zu ca. 98% homologe Sequenzabschnitte enthalten. Diese Homologien begünstigen ein ungleiches "Crossing-Over" während der Meiose, was die hohe Spontaninzidenz der CMT1A-Mutation erklärt (Modifiziert nach Boerkoel et al. 1999, S.24).

Aufgrund der starken Variabilität der CMT1 wurde eine Aufteilung in zwei verschiedene Patientengruppen vorgeschlagen, die jeweils durch einen frühen oder späten Erkrankungsbeginn gekennzeichnet sind (Birouk et al. 1997). Trotz aller interindividuellen Unterschiede in der Ausprägung handelt es sich jedoch immer um eine progrediente Erkrankung. Eine frühe Manifestation von Symptomen wurde als ein negativer prognostischer Faktor für den Verlauf der Erkrankung beschrieben (Birouk et al. 1997).

Neben den klinischen Merkmalen liefern auch elektrophysiologische Untersuchungen wichtige diagnostische Befunde bei der CMT. Durch Messung der Nervenleitgeschwindigkeit wird zwischen den demyelinisierenden (HMSN / CMT 1) und den axonalen (HMSN / CMT 2) hereditären Neuropathien unterschieden (Harding und Thomas 1980). Bei einer deutlich

reduzierten Nervenleitgeschwindigkeit im N. medianus von weniger als 38 m/s, spricht man von einer demyelinisierenden CMT Typ 1 (Dyck et al. 1993) (Thomas et al. 1997). Im Falle der axonalen CMT Typ 2 ist die Nervenleitgeschwindigkeit nicht oder nur wenig reduziert und größer als 38 m/s.

Die Veränderungen der Nervenleitgeschwindigkeit bei der CMT1 sind schon vor den klinischen Symptomen zu detektieren (Nicholson 1991; Garcia et al. 1998) und bleiben im Verlauf des Lebens konstant (Killian et al. 1996; Birouk et al. 1997). Von manchen Autoren wird eine Korrelation der Nervenleitgeschwindigkeit und der Klinik der CMT1 beschrieben (Dyck et al. 1989; Hoogendijk et al. 1994), während andere dies ablehnen (Dyck und Lambert 1968; Harding und Thomas 1980; Bouche et al. 1983). Da die Nervenleitgeschwindigkeit bereits in jungen Patienten verändert ist und dann relativ konstant bleibt, ist sie für eine frühe Diagnose, nicht aber für eine Verlaufsbeurteilung der CMT1 geeignet.

Die Amplitude der Muskelsummenaktionspotentiale korreliert im Gegensatz zur Nervenleitgeschwindigkeit mit der Klinik der CMT1 (Krajewski et al. 2000) und nimmt im Verlaufe der CMT1 ab (Killian et al. 1996). Die Elektromyographie (EMG) zeigt Zeichen einer Denervierung wie pathologische Spontanaktivität in Form von Fibrillationen und positiven scharfen Wellen. Die Muskelpotentiale sind verbreitert, polyphasisch und hochamplitudig bei gelichtetem Interferenzbild (Dyck et al. 1993). Obwohl im Falle der CMT1 der genetische Defekt primär die Schwannzellen betrifft, zeigt die Elektrophysiologie Korrelate eines Axonuntergangs, der die Klinik der CMT1 verursacht (Krajewski et al. 1999; Berciano et al. 2000).

Zu den histologischen Befunden der CMT1 gehören eine segmentale Demyelinisierung von vornehmlich großkalibrigen, motorischen Axonen und die so genannten „Zwiebelschalenformationen“ („onion bulbs“) (Abbildung 4C, D) (Dyck et al. 1993). Diese Strukturen ähneln Zwiebelschalen, weil Axone pathologischerweise nicht von jeweils einer myelinisierenden Schwannzelle umgeben werden, sondern von mehreren Lagen konzentrisch angeordneter Zellen und ihren Fortsätzen. Diese Zellen zeigen Merkmale undifferenzierter, promyelinisierender Schwannzellen (Guenard et al. 1996), was die Folge eines parallel ablaufenden Prozesses von De- und Remyelinisierung sein könnte. Neuropathologische Umbauprozesse lassen Nerven von CMT1-Patienten makroskopisch gelegentlich verdickt erscheinen (Dyck et al. 1993). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es als Folge der Demyelinisierung zu einem Untergang insbesondere großer, motorischer Axone (Lewis et al. 2003).

### **1.1.3 Die Duplikation 17p11.2-p12 und PMP22**

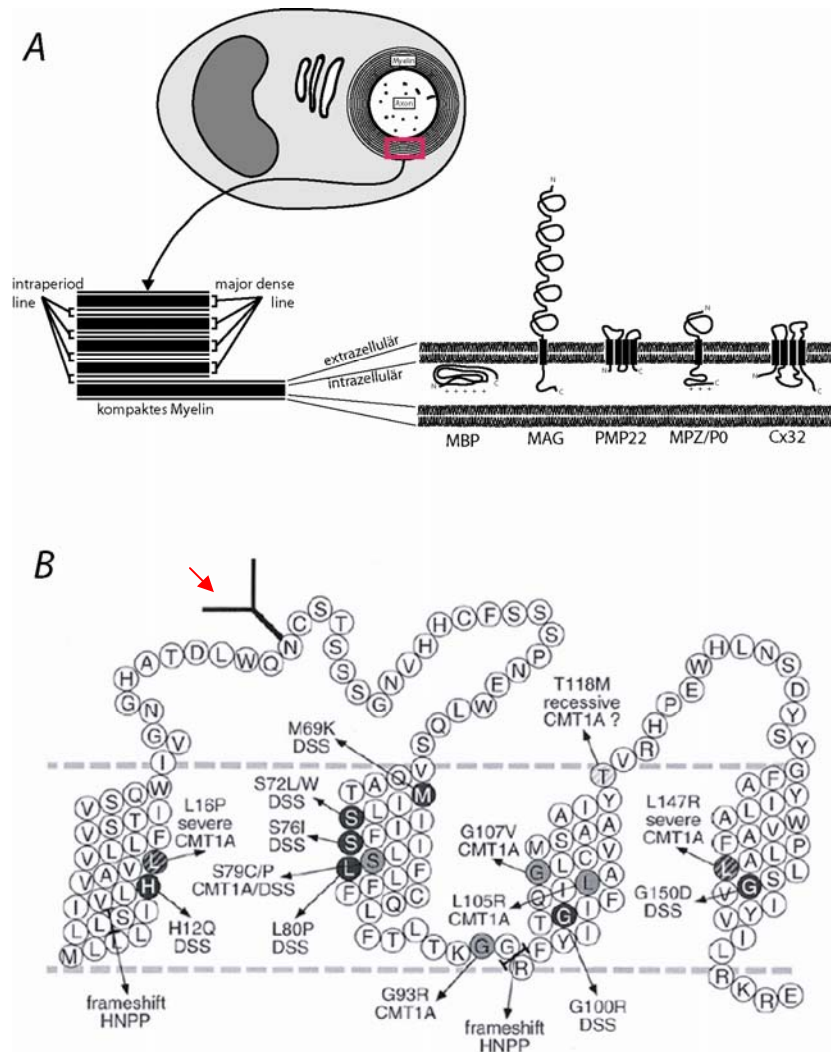
Mit zunehmender Aufklärung der Genetik wurde die CMT1 weiter nach den assoziierten Genloci eingeteilt. Autosomal-dominant vererbt werden die mit Chromosom 17p11.2 assoziierte CMT1A und die mit Chromosom 1q22-q23 assoziierte CMT1B. Eine X-chromosomale Vererbung wird als CMTX bezeichnet.

Es wurde gezeigt, dass die CMT1 in einem Großteil der Fälle durch eine stabile DNA-Duplikation von 1,5 Millionen Basenpaaren Länge auf dem humanen Chromosom 17p11.2-12

verursacht wird (Lupski et al. 1991). Diese DNA-Duplikation entsteht in fast allen Fällen durch ungleiches „Crossing-Over“ während der Spermatogenese (Palau et al. 1993). Die Region wird auf beiden Seiten flankiert durch hochgradig homologe Wiederholungssequenzen, genannt „CMT1A-repeat“ (Abbildung 1B), die das ungleiche „Crossing-Over“ während der Meiose begünstigen (Pentao et al. 1992). Es handelt sich um einen so genannten Mutations-„Hot-Spot“, an welchem *de-novo*-Mutationen bevorzugt auftreten, was die hohe Prävalenz der Duplikation begründet (Boerkoel et al. 1999). Unter den in der genomischen Region enthaltenen und duplizierten Genen wurde das Gen für das periphere Myelin-Protein 22 (PMP22) als verantwortliches Gen für die CMT1A identifiziert (Lupski et al. 1991; Raeymaekers et al. 1991; Matsunami et al. 1992; Timmerman et al. 1992). In 60-70% der Fälle wird die Klinik der CMT1 durch diese PMP22-Duplikation verursacht (Wise et al. 1993; Ionasescu 1995; Kurihara et al. 2002; Morocutti et al. 2002).

Das PMP22-Transkript wurde ursprünglich in zwei verschiedenen Zusammenhängen identifiziert. Als Myelinprotein des PNS, das nach Nervenverletzung herunterreguliert wird (Kitamura et al. 1976; Spreyer et al. 1991; Welcher et al. 1991) und als „Growth-Arrest Gene 3“ (gas-3) in wachstumsarretierten Fibroblasten (Manfioletti et al. 1990). Es ist ein hydrophobes Protein mit vier Transmembrandomänen (Abbildung 2B) und trägt ca. 3-5% zu der Gesamtmenge der Strukturproteine des peripheren Myelins bei (Suter und Snipes 1995; D'Urso und Muller 1997). Es ist es bisher nicht gelungen, die physiologische Rolle von PMP22 aufzuklären (Naef und Suter 1998). Im kompakten Myelin wurde eine Interaktion von PMP22 mit MPZ / P0 mit fraglicher physiologischer Relevanz demonstriert (D'Urso et al. 1999; Hasse et al. 2004). Sowohl eine Aufgabe in der Wachstumsregulation von Schwannzellen, als auch eine strukturelle Funktion im Myelin werden diskutiert (Suter und Scherer 2003).

Die Myelinscheide ist eine multi-lamelläre Spirale hoch spezialisierter Zellmembran, die im PNS von Schwannzellen gebildet wird. Axone mit einem Durchmesser von mehr als einem Mikrometer werden von Myelin umhüllt, während kleinere Axone von nicht-myelinisierenden Schwannzellen umgeben werden (Abbildung 2A). Die Myelinscheide besteht zu ca. 70% aus Lipiden und zu 30% aus Myelinproteinen. Zu den Proteinen des Myelins des peripheren Nervensystems zählen unter anderem das Myelin Protein Zero (MPZ / P0), das periphere Myelin-Protein 22 (PMP22) und Myelin-basisches Protein (MBP) (Abbildung 2A) (Werner et al. 1998).



**Abbildung 2: Myelinproteine des PNS.**

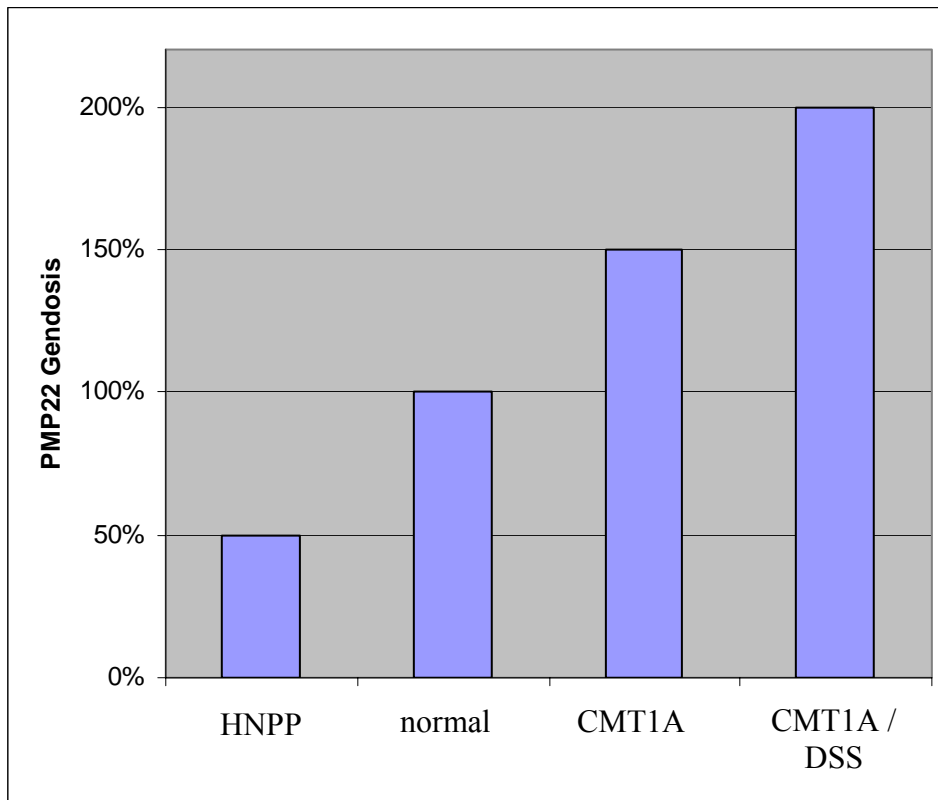
**A** Schematische Darstellung einiger Myelinproteine des peripheren Nervensystems. Das Myelin bildet ultrastrukturell die "intraperiod line", die dem extrazellulären Raum entspricht, und die "major dense line", die durch das kompaktierte Zytoplasma der Schwannzelle gebildet wird. Vor allem in diesen Regionen des kompakten Myelins sind die Myelinproteine MPZ / P0, PMP22 und MBP lokalisiert (Modifiziert nach Werner et al. 1998, S. 772).

**B** Das PMP22-Protein bildet vier transmembranäre Domänen und zwei extrazelluläre Schleifen. Erstere wird glykosiliert (roter Pfeil). Die markierten Punktmutationen verursachen menschliche Erkrankungen (Modifiziert nach Naef und Suter 1998, S. 360).

Entscheidend für das Verständnis der CMT1A-Genetik ist die Tatsache, dass die Art und Schwere der Neuropathie von der Anzahl der genomischen PMP22-Kopien abhängig ist. Der mutationsbedingte Verlust eines funktionellen PMP22-Allels führt zu einer verminderten PMP22-Gendosis (0,5-fach) und zum Krankheitsbild der „hereditären Neuropathie mit Neigung zu Druckpareesen“ (HNPP) im Menschen (Stogbauer et al. 2000) (Abbildung 3). Eine 1,5-fach erhöhte PMP22-Kopienanzahl verursacht die CMT1A. Eine auf beiden Allelen vorhandene PMP22-Duplikation (2,0-fache Gendosis) verschlechtert den Krankheitsverlauf und verursacht in einem Teil der Fälle das „Dejerine-Sottas-Syndrom“ (DSS) (Lupski et al. 1991). Die PMP22-Gendosis korreliert mit der PMP22-mRNA-Expression und mit der Schwere der CMT1A. Tatsächlich konnte in Nervenbiopsien von CMT1A-Patienten eine PMP22-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden (Yoshikawa et al. 1994; Vallat et al. 1996). Ein



normales Gen wird allein durch erhöhte Kopienanzahl und mRNA-Überexpression zum „Krankheitsgen“. Dies wird als Gendosiseffekt bezeichnet. Interessanterweise ist ein solches pathophysiologisches Konzept auch von der Myelinisierung des ZNS bekannt. Veränderte Gendosis des Proteolipid-Proteins (PLP) führt zum Phänotyp der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung (Ellis und Malcolm 1994). Im Vergleich zu PMP22 weist PLP Ähnlichkeiten der Struktur (Popot et al. 1991; Inouye und Kirschner 1994), aber nicht der Sequenz auf (Anderson et al. 1999). Offensichtlich ist für einige Myelinproteine eine veränderte Gendosis fatal. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch bisher ungeklärt.



**Abbildung 3: Gendosiseffekt der PMP22-Duplikation und -Deletion**

Eine verminderte Gendosis von PMP22 (Deletion) führt zur „hereditären Neuropathie mit Neigung zu Druckpareisen“ (HNPP). Umgekehrt verursacht eine erhöhte PMP22-Gendosis die CMT1A. Die PMP22-Gendosis korreliert mit der Schwere der Erkrankung. Eine homozygote PMP22-Duplikation verursacht in einem Teil der Fälle das Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS).

### 1.1.4 Mechanismen der CMT1A

Verschiedene Hypothesen versuchen zu erklären, warum die Überexpression des nicht mutierten PMP22-Gens ausreicht, um eine **demyelinisierende** Neuropathie auszulösen (Abbildung 4A, B). Als mögliche Ursachen für den Myelinscheidenverlust werden eine Fehlregulation der Schwannzellproliferation, des intrazellulären Aufbaus der Schwannzellen und eine gestörte Struktur der Myelinscheide diskutiert. Diese unterschiedlichen Hypothesen werden hier näher dargestellt.

Für das PMP22-Protein werden zwei verschiedene Funktionen angenommen. Einerseits dient das PMP22-Transkript als strukturelles Myelinprotein und andererseits beeinflusst es das Zellwachstum (Bosse et al. 1994). Es existieren für diese beiden Funktionen zwei verschiedene Promotorregionen und zwei verschiedene untranslatierte erste Exone (Suter et al. 1994; van de Wetering et al. 1999).

Eine PMP22-Überexpression im Tiermodell behindert die Differenzierung von Schwannzellen. Diese zeigen Merkmale promyelinisierender Schwannzellen (Magyar et al. 1996). Die Proliferation und Apoptose dieser Zellen wird gesteigert (Sancho et al. 2001). Auch die „Zwiebelschalen“-Formationen der CMT1A können als Zeichen einer Fehldifferenzierung von Schwannzellen interpretiert werden, da die Axone pathologischweise von mehreren Lagen konzentrisch angeordneter Zellen und ihren Fortsätzen umgeben werden (Abbildung 4C, D). Diese Zellen exprimieren zelluläre Marker undifferenzierter, promyelinisierender Schwannzellen (Guenard et al. 1996). Die Ursache der Demyelinisierung infolge der PMP22-Überexpression könnte demnach ein Differenzierungsarrest der Schwannzellen im „Promyelin stadium“ sein.

In Schwannzellkulturen führt die Überexpression von PMP22 zur Bildung von Proteinaggregaten. Diese so genannten Aggresomen zeigen Immunreaktivität gegen PMP22 und proteasomale Marker (Notterpek et al. 1999a). Auch nach Inhibition des proteasomalen Abbauweges normaler Schwannzellen entwickeln sich diese intrazellulären Strukturen (Notterpek et al. 1999a). Darüber hinaus wurde eine vermehrte Expression lysosomaler Marker in Nerven PMP22 überexprimierender Ratten beschrieben (Sereda 1999). Beide Protein abbauenden Systeme der Zelle, Lysosom und Proteasom, werden also durch PMP22-Überexpression aktiviert.

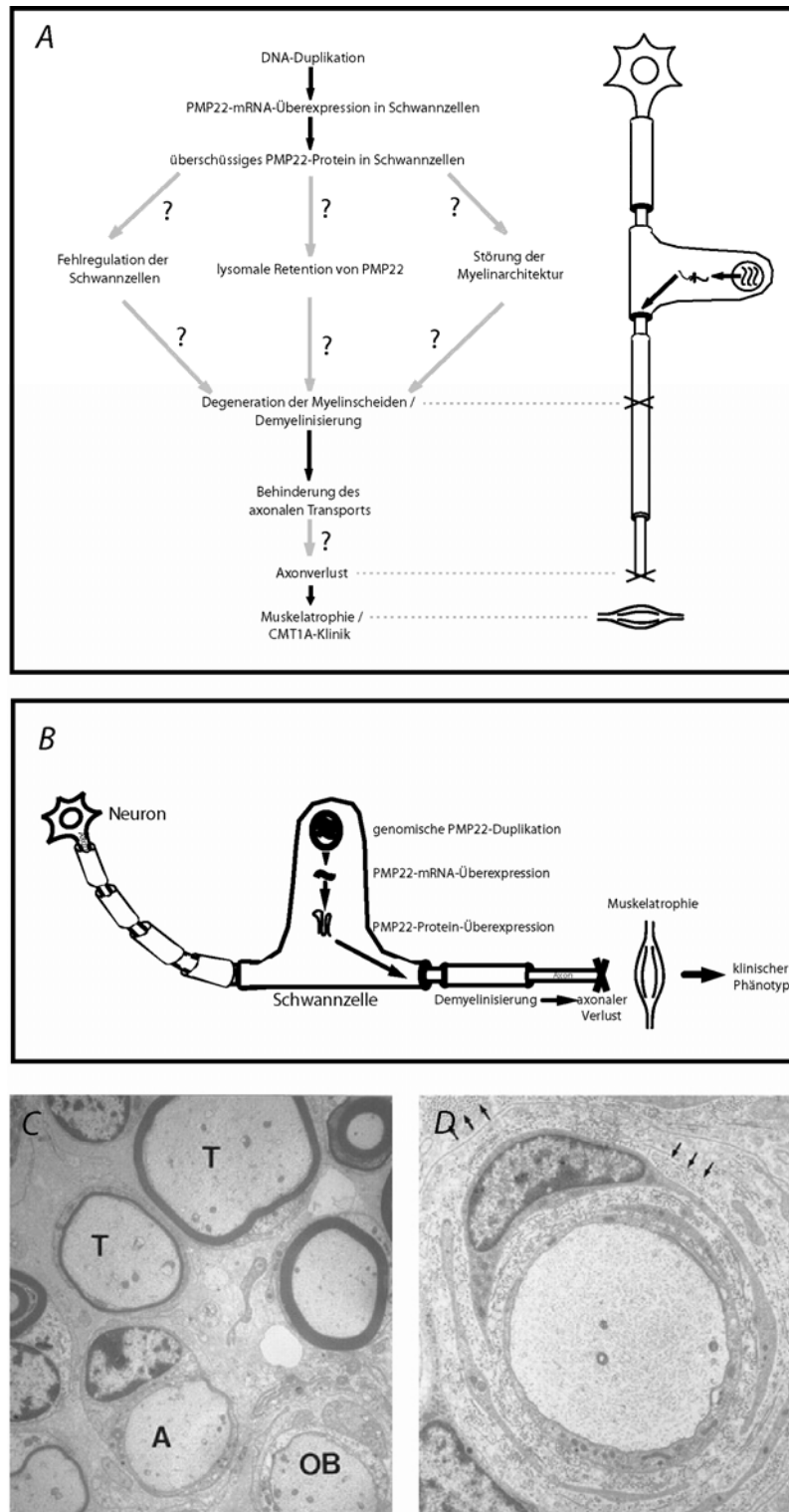
PMP22 wurde mit verschiedenen intrazellulären Sortierungsprozessen assoziiert. In Zellkulturexperimenten akkumuliert das PMP22-Protein nach Überexpression in späten Endosomen (Chies et al. 2003). Ein gestörter intrazellulärer Membrantransport wurde im gleichen Zusammenhang beschrieben. Interessanterweise zeigt ein Strukturprotein der Myelinscheiden des zentralen Nervensystems ein ähnliches Verhalten. Das dem PMP22 strukturell ähnliche Proteolipid-Protein (PLP) akkumuliert bei Überexpression in Lysosomen. Eine zentrale Demyelinisierung ist die Folge (Simons et al. 2002). Eventuell wirken die Proteinaggregate toxisch oder der normale Proteintransport der Schwannzellen wird gestört und dies schädigt sekundär die Myelinscheiden.

Das PMP22-Protein ist eines der Strukturproteine der Myelinscheide des peripheren Nervensystems (Snipes et al. 1992). Elektronenmikroskopisch wurde in den Myelinscheiden von CMT1A-Patienten übermäßig viel PMP22-Protein dargestellt (Vallat et al. 1996). Dies spricht für eine fehlerhaft aufgebaute Myelinscheide. PMP22 interagiert mit dem „Myelin Protein Zero“ (MPZ / P0) (D'Urso et al. 1999; Hasse et al. 2004). Möglicherweise verändert die PMP22-Überexpression das Verhältnis beider Interaktionspartner im Myelin. Strukturelle Defekte könnten die Myelinscheide destabilisieren und zur Demyelinisierung führen.

Demyelinisierung infolge einer PMP22-Überexpression ist das Merkmal der CMT1A. Die Klinik dieser hereditären Neuropathie wird allerdings durch den Verlust der Axone verursacht (s.o.). Die Muskeln erhalten keine Nervensignale und atrophieren. Warum schädigt eine Demyelinisierung die Axone? Eine Reihe kürzlich identifizierter Mutationen hereditärer Neuropathien erlaubt eine mögliche Antwort auf diese Frage und interessante Einblicke in gemeinsame Pathomechanismen der verschiedenen CMT-Formen.

Das Protein Dynactin ist am schnellen retrograden Transport im Axon beteiligt. Die Mutation des Dynactin-Gens (DCTN1) führt zu einer längenabhängigen axonalen Degeneration (Puls et al. 2003) und zu einer hereditären Neuropathie (dHMN). Punktmutationen im Mitofusin 2 - Gen (MFN2) und in einem Kinesin-Gen (KIF1B $\beta$ ) wurden mit der CMT2A assoziiert (Zhao et al. 2001; Zuchner et al. 2004). Beide Gene werden in Neuronen exprimiert und sind am intrazellulären Transport beteiligt. Die Mutation des Mitofusin 2 - Gens beeinträchtigt die Morphologie und den Transport der Mitochondrien am Zytoskelett entlang (Chen et al. 2003). Diese Bewegung der Mitochondrien an den Mikrotubuli ist Teil des schnellen anterograden Transports im Axon. Das intrazelluläre „Motorprotein“ KIF1B $\beta$  transportiert Vorläufer synaptischer Vesikel und Mitochondrien im Axon (Zhao et al. 2001). Es wird vermutet, dass die Transportbehinderung von Mitochondrien zu einem Mangel in der Energieversorgung des distalen Axons und zu dessen Degeneration führt.

Es ist naheliegend, dass Mutationen axonaler Transportproteine die Energieversorgung des Axons einschränken. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass auch primäre Schwannzelldefekte die Struktur und den Transport des Axons beeinträchtigen. In Nerven von so genannten „trembler“-Mäusen, die eine natürlich vorkommende PMP22-Mutation tragen, wurde eine verminderte Phosphorylierung von Neurofilamenten, eine gesteigerte Neurofilamentdichte im Axon und ein reduzierter axonaler Transport gezeigt (de Waegh et al. 1992). In Xenotransplantationsversuchen konnte demonstriert werden, dass Schwannzellen von CMT1A-Patienten die Struktur „gesunder“ Axone verändern (Sahenk et al. 1999). Die Axone zeigten im Abschnitt, der von pathologischen Schwannzellen umgeben war, eine erhöhte Neurofilamentdichte und distal davon eine Degeneration.



**Abbildung 4: Pathomechanismen der CMT1A.**

**A** Verschiedene Hypothesen versuchen zu erklären, wie eine PMP22-Überexpression eine Demyelinisierung verursacht. Auch der Schritt von Myelinverlust zu axonalem Untergang ist unklar.

**B** Schematische Darstellung des Pathomechanismus der CMT1A. Aus der DNA Duplikation resultiert eine PMP22-mRNA-Überexpression. Es folgen Demyelinisierung, axonaler Schaden und Muskelatrophie.

**C** Histologische Merkmale der CMT1A im Tiermodell: demyelinisierte Axone (A), Hypomyelinisierung (T) und Zwiebelschalenformationen (OB) (Modifiziert nach Sereda et al. 1996, S. 1054).

**D** Vergrößerung einer Zwiebelschalenformation. Schwannzellfortsätze umhüllen ein Axon, ohne Myelin zu bilden (Modifiziert nach Sereda et al. 1996, S. 1054).

Ein ähnliches Phänomen wurde in den myelinbildenden Gliazellen des zentralen Nervensystems (Oligodendrozyten) beschrieben. In nullmutanten Mäusen des zentralen Myelinproteins Proteolipid-Protein (PLP) ist der axonale Transport beeinträchtigt und es kommt zu einer längenabhängigen axonalen Degeneration (Edgar et al. 2004). Auch primäre Defekte der Gliazellen können folglich die Ultrastruktur und den intrazellulären Transport des Axons stören. Dieser Pathomechanismus erscheint als gemeinsames Merkmal verschiedener Formen hereditärer Neuropathien.

Dies ist eine mögliche Erklärung für die distale Betonung der Muskelatrophie bei der CMT1A. Durch ihre langen Transportwege sind die langen Axone der distalen Muskeln besonders anfällig für eine Behinderung des axonalen Transports und degenerieren zuerst. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, diese Erkenntnisse zur axonalen Pathologie in therapeutische Konzepte zu übersetzen.

### **1.1.5 Therapie der CMT1A**

Verschiedene Therapiemöglichkeiten sind in Anbetracht der dargestellten Pathophysiologie der CMT1A theoretisch denkbar. Die bisherige Therapie beschränkt sich auf symptomatische Konzepte, wie Physiotherapie und Vermeidung von körperlich belastenden Situationen (Shy 2004). Verschiedene experimentelle Therapiekonzepte wurden angedacht (Young und Suter 2001). Genetisch nicht klassifizierte CMT-Formen wurden mit Glukokortikoiden positiv beeinflusst (Dyck et al. 1982). Immundefizienz führt im Tiermodell der CMT Typ **1B** zu einer deutlich abgeschwächten Neuropathie (Schmid et al. 2000). Das Immunsystem moduliert somit den Verlauf hereditärer Neuropathien. Für die CMT1A ist keine Wirksamkeit belegt und die Anwendung immunmodulatorischer Substanzen in Anbetracht starker Nebenwirkungen kritisch zu beurteilen. Nervenwachstum stimulierende Faktoren (Neurotrophine) wurden in Tiermodellen von Motoneuronenerkrankungen therapeutisch eingesetzt (Haase et al. 1997). Sie könnten den axonalen Verlust bei der CMT1A vermindern, sind von einem tatsächlichen Einsatz aber weit entfernt.

Bei der CMT1A handelt es sich um eine so genannte Gendosiserkrankung. Daher sollte eine mögliche Therapie auf die Normalisierung der PMP22-Expression ausgerichtet sein. Eine genetische Therapie wurde in anderen Zusammenhängen getestet mit Hilfe der so genannten RNA-Interferenz (RNAi). Die Zufuhr kleiner, nicht kodierender RNAs kann dabei die Expression spezifischer Gene vermindern (Soutschek et al. 2004). Diese Technik steht derzeit vor allem vor pharmakologischen Problemen. Außerdem würde selbst eine wirksame Therapie mit RNAi Schwierigkeiten der Dosierung bereiten. Überdosierungen könnten durch verminderte PMP22-Expression zu einem der HNPP ähnlichen Krankheitsbild führen (siehe 1.1.3).

Invasive oder nebenwirkungsreiche Therapien erscheinen im Falle der CMT1A kritisch. Die Erkrankung geht nur in einem Teil der Fälle mit schweren Behinderungen einher und müsste als genetischer Defekt langfristig und konstant behandelt werden. Eine anzustrebende Therapie für CMT1A sollte also insbesondere die Kriterien erfüllen, einerseits langfristig anwendbar zu sein und andererseits möglichst kausal zu wirken, also die PMP22-Überexpression zu senken. Bei

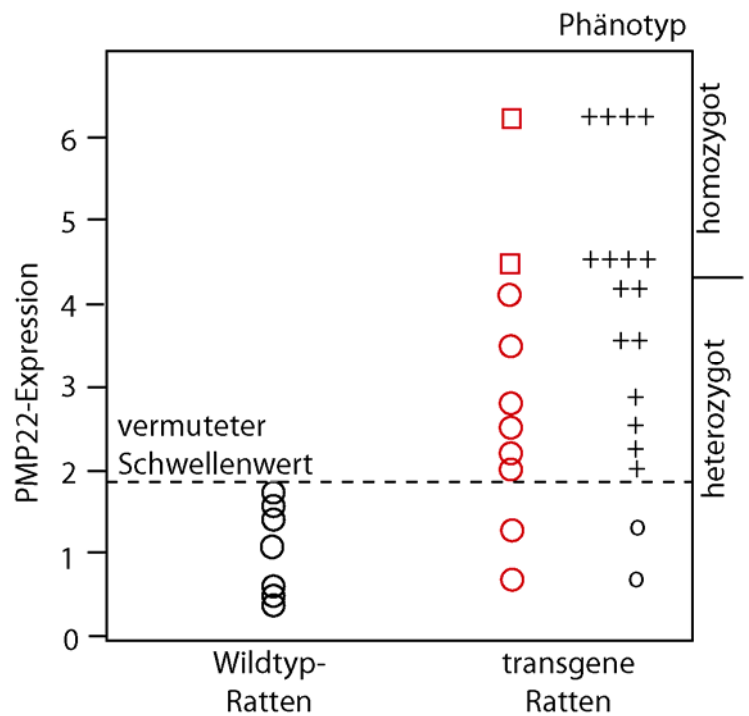
der Erprobung neuer Therapieansätze und -möglichkeiten menschlicher Erkrankungen sind Tiermodelle unverzichtbar geworden.

### **1.1.6 Tiermodelle der CMT1A**

Tiermodelle menschlicher Erkrankungen helfen, deren Pathomechanismen auf zellulärer Ebene besser zu verstehen. Sie erlauben auch, mögliche neue Therapien vor ihrer Anwendung im Menschen auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit zu überprüfen. Es wurden PMP22 transgen überexprimierende Mäuselinien (Huxley et al. 1996; Magyar et al. 1996; Huxley et al. 1998) und eine Rattenlinie (Sereda et al. 1996; Niemann et al. 1999) als Tiermodelle der CMT1A entwickelt.

Gerade Tiermodelle mit einer geringen Überexpression von PMP22 weisen Symptome auf, die denen betroffener Menschen vergleichbar sind (Sereda et al. 1996; Huxley et al. 1998). Stark überexprimierende Tiermodelle bilden teilweise überhaupt kein Myelin, so dass sie nicht als Tiermodell der CMT1A verwendet werden können. Im Modell der PMP22 transgenen **Ratten** („CMT-Ratten“) kommt es bei einer Überexpression von PMP22 in Schwanzzellen zu einer Demyelinisierung (Sereda et al. 1996) mit den histologischen Charakteristika der CMT1A. Ein axonaler Verlust und eine Muskelatrophie vor allem der distalen Extremitäten ist die Folge. Dies ist verbunden mit verringerter Muskelkraft und verminderter motorischer Leistungsfähigkeit der Tiere (Sereda et al. 1996).

Dieser Ablauf ist der menschlichen CMT1A sehr ähnlich. Daher ist die CMT-Ratte von besonderem Interesse für die Analyse des Pathomechanismus und für die Evaluation eventueller Therapiekonzepte der CMT1A. Zu bemerken ist eine der menschlichen Erkrankung ähnliche starke Variabilität in der Krankheitsausprägung zwischen einzelnen Tieren mit gleicher Transgendosis. Die schwankende Ausprägung des Phänotyps wurde mit einer variablen PMP22-Überexpression korreliert, ohne systematisch untersucht zu werden (Abbildung 5) (Sereda et al. 1996). Da sehr schwach überexprimierende CMT-Ratten fast keine Symptome der CMT1A zeigen, wurde ein Schwellenwert der PMP22-mRNA-Überexpression postuliert. Erst wenn dieser erreicht ist, manifestiert sich das klinische Bild der Erkrankung (Abbildung 5). Die genannte Variabilität wurde auch in anderen Tiermodellen der CMT1A beobachtet. In einem CMT1A-Mausmodell wurde eine Aufteilung in schwach und stark betroffene Tiere anhand ihres Krankheitsphänotyps vorgeschlagen (Norreel et al. 2003). Die für die Variabilität der menschlichen CMT1A und des Phänotyps entsprechender Tiermodelle verantwortlichen Mechanismen sind unklar (siehe 1.1.2).



**Abbildung 5: Myeligenexpression im PNS von CMT-Ratten**

Die PMP22-mRNA-Expression im PNS transgener Ratten liegt im Durchschnitt höher als in den Wildtypen bei höherer interindividueller Varianz. Homozygot transgene Ratten zeigen eine noch höhere PMP22-Expression und schwerere CMT1A-Symptome. Der Phänotyp korreliert mit der PMP22-Expression (Modifiziert nach 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 Transgenkopien dargestellt (Huxley et al. 1998). Eine stark erhöhte Gendosis (16-30 Transgenkopien) führt im Mausmodell zu einem äußerst schweren, amyelinisierten Phänotyp (Magyar et al. 1996). Auch in homozygot PMP22 transgenen Ratten sind die Schwanzzellen von Geburt an nicht in der Lage, Myelinscheiden zu bilden (Niemann et al. 2000).

Auf der anderen Seite führt die Deletion eines der Allele von PMP22 in Tiermodellen zu einer Pathologie vergleichbar mit der menschlichen HNPP mit den typischen Befunden von begrenzter Hypermyelinisierung (Tomaculae) und durch mechanische Belastung induzierbarer Demyelinisierung (Adlkofer et al. 1995; Adlkofer et al. 1997). Sowohl Über- als auch Unterexpression von PMP22 führen im Tiermodell zu einer Neuropathie. Offensichtlich existiert auch im Tiermodell die physiologische Notwendigkeit, die PMP22-Expression genau zu regulieren.

Interessanterweise sind die Symptome eines Tiermodells bei Normalisierung der PMP22-Expression im adulten Tier rückläufig (Perea et al. 2001). Die pathologischen Veränderungen der CMT1A sind somit im Prinzip reversibel, wenn die Expression von PMP22 normalisiert wird. Daher sollte eine mögliche Therapie der CMT Typ 1A darauf ausgerichtet sein, die Expression von PMP22 wieder auf ein physiologisches Niveau zu bringen.

## **1.2 Steroidhormone im Nervensystem**

### ***1.2.1 Synthese von Steroidhormonen im Nervensystem***

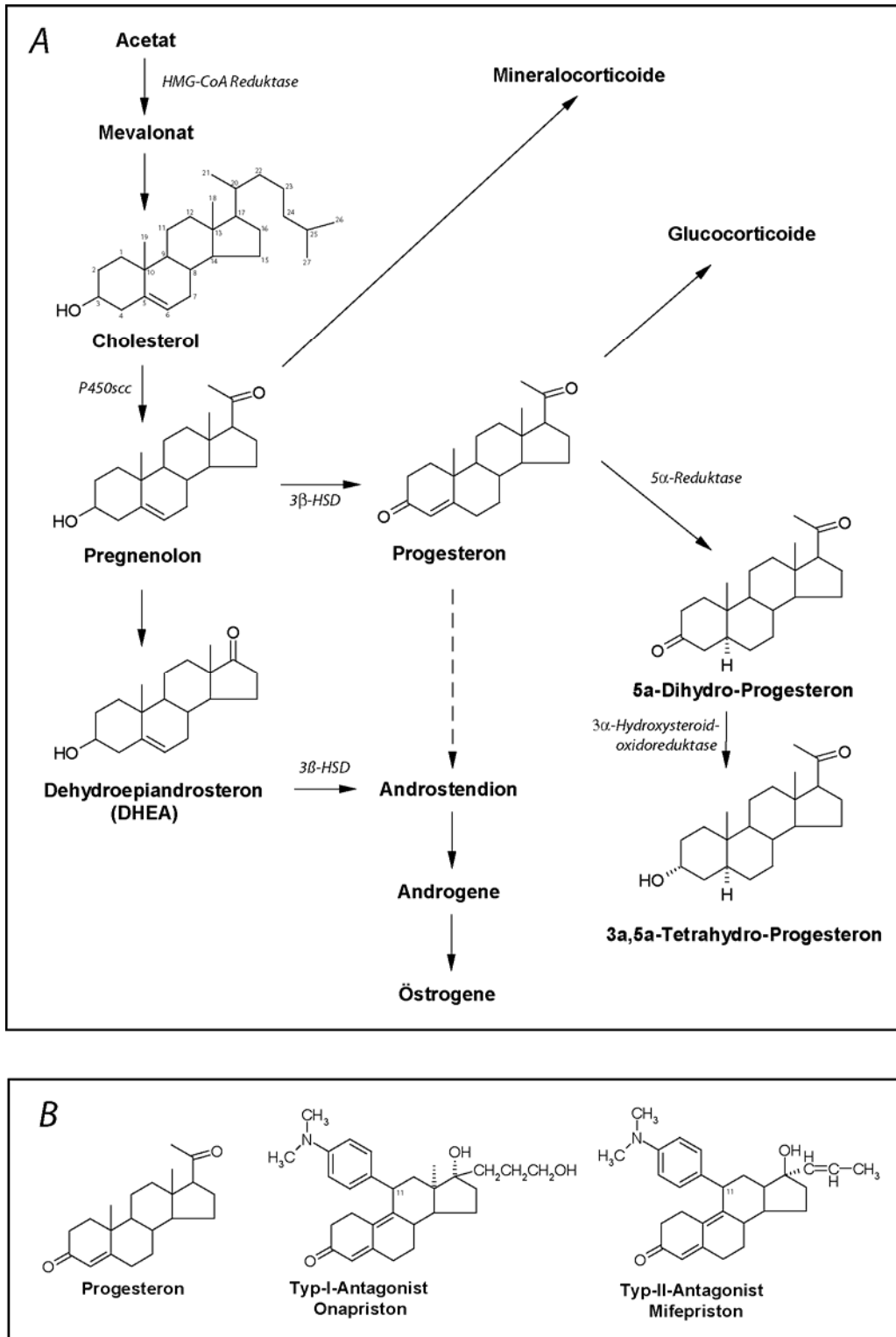
Die Gruppe der auf dem Sterangerüst des Cholesterins basierenden Steroidhormone reguliert wichtige Funktionen des menschlichen Körpers: das Immunsystem (Glukokortikoide), den Wasser- und Elektrolythaushalt (Mineralokortikoide) und die Fortpflanzung (Östrogene, Gestagene und Androgene) (Abbildung 6A) (Löffler 1996b). Produziert werden diese Hormone in der Nebennierenrinde und in den Gonaden.

Neben diesen seit langem bekannten Aufgaben wurden Synthese und Funktion von Steroidhormonen im Nervensystem beschrieben und Steroidhormone mit diesen Charakteristika als „Neurosteroid“ definiert (Baulieu und Robel 1990; Baulieu et al. 2001). Einer ganzen Reihe verschiedener Steroidhormone wurden bisher Effekte im zentralen Nervensystem zugeordnet. Unter anderem gehören Allopregnenolon, Dehydroepiandrosteron, 11-Desoxycorticosteron, Pregnenolon und verschiedene Progesteron-Derivate zu dieser Gruppe (Dubrovsky 2005).

Im zentralen Nervensystem werden Progesteron, Pregnenolon und deren Sulfatester unabhängig vom restlichen Körper aus Cholesterin synthetisiert (Baulieu 1997). Diese Steroide wurden in höheren Konzentrationen als im Plasma aus dem ZNS isoliert (Corpechot et al. 1993; Baulieu et al. 2001) Pregnenolon wird durch das Enzym „Cholesterol side-chain cleavage“ (P450scc) aus Cholesterin synthetisiert. Die Umwandlung in Progesteron wird vermittelt durch die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase /  $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase (3 $\beta$ HSD) (Abbildung 6A). Diese beiden entscheidenden Enzyme der Progesteronsynthese wurden in Gliazellen und Neuronen des zentralen Nervensystems nachgewiesen und sind dort funktionell aktiv (Jung-Testas et al. 1999; Stoffel-Wagner 2001).

Im peripheren Nervensystem wird Progesteron in Schwannzellen synthetisiert. Die notwendigen Enzyme P450scc und 3 $\beta$ HSD werden in Schwannzellen exprimiert (Chan et al. 1998), und die lokale Synthese von Progesteron im peripheren Nerven erfolgt unabhängig vom restlichen Körper (Koenig et al. 1995). In kultivierten Schwannzellen ist dabei die Synthese von Progesteron abhängig vom Kontakt der Gliazellen mit Axonen und zeitlich gekoppelt an die Expression von Myelinen (Robert et al. 2001). Die Wirkung von Progesteron im Nervensystem kann theoretisch über verschiedene Rezeptorsysteme vermittelt werden.





**Abbildung 6: Synthese und Struktur von Steroidhormonen.**

**A** Synthesewege wichtiger Neurosteroide. Pregnenolon ist der gemeinsame Vorläufer aller Steroidhormone. An der Regulation des Nervensystems sind unter anderem Dehydroepiandrosteron (DHEA), Progesteron und dessen reduzierte Metaboliten Di- und Tetrahydroprogesteron beteiligt. Kursiv sind wichtige Enzyme der Neurosteroidsynthese abgebildet. Abkürzungserklärungen im Text (Modifiziert nach Baulieu et al. 2001, S. 5).

**B** Strukturformeln von Progesteron und Progesteronrezeptorantagonisten. Ein para-substituierter Phenylyring am C-Atom 11 ist notwendig für die blockierende Wirkung am Progesteronrezeptor (Neef et al. 1984). Typ-I- und Typ-II-Antagonisten unterscheiden sich in der Art ihrer Rezeptorblockade (siehe Text).

### **1.2.2 Neurosteroid im zentralen Nervensystem**

Bei den Effekten von Neurosteroiden ist zu differenzieren zwischen spezifischen, über den jeweiligen intrazellulären Steroidrezeptor vermittelten Wirkungen und andererseits modulierenden Einflüssen auf Neurotransmitterrezeptoren.

Diese letzteren, nicht-genomischen Mechanismen regulieren unterschiedlichste ZNS-Funktionen (Übersichtsarbeit (Simoncini und Genazzani 2003)). Neurosteroid binden und modulieren unter anderem GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Puia et al. 1990; Puia et al. 1993), nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (Bullock et al. 1997), Glycin aktivierte Chloridkanäle (Prince und Simmonds 1992), NMDA-Glutamat-Rezeptoren, AMPA-Glutamat-Rezeptoren (Wu et al. 1991; Weaver et al. 1997a; Weaver et al. 1997b) und 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren (Wetzel et al. 1998). Diese pharmakologischen Eigenschaften werden als mögliche Grundlage der Schlaf induzierenden, anxiolytischen, antikonvulsiven, antipsychotischen und antidepressiven Wirkungen einzelner Neurosteroid gesehen (Übersichtsarbeit (Rupprecht 2003)).

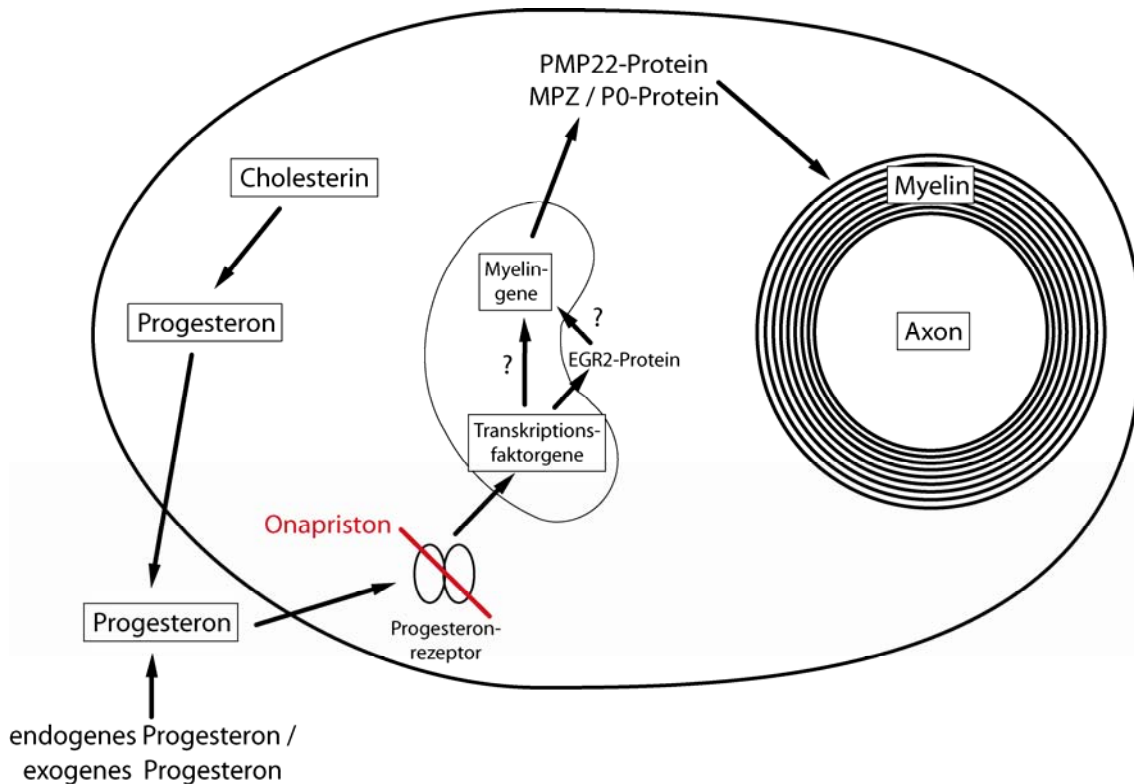
Darüber hinaus vermitteln auch die klassischen, intrazelluläre Steroidrezeptoren Signale im zentralen Nervensystem. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung des entsprechenden Steroids Homodimere bilden. Nach Translokation in den Zellkern erkennen die Liganden-Rezeptor-Komplexe DNA-Abschnitte, so genannte „steroid responsive elements“, in den Promotorregionen spezifischer Gene, deren Transkription sie aktivieren (Beato 1989). Der intrazelluläre Progesteronrezeptor wird exprimiert in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems (MacLusky und McEwen 1980; Lauber et al. 1991; Hagihara et al. 1992; Labombarda et al. 2000). Besonders im Bereich des Hypothalamus, des Hippocampus und in der weißen Substanz ist der Rezeptor funktionell aktiv. Eine vermehrte Steroidproduktion wurde im ZNS von „jimmy“- und „shiverer“-Mausmodellen demonstriert, deren Phänotyp durch eine zentrale Demyelinisierung gekennzeichnet ist (Le Goascogne et al. 2000). Daher wird angenommen, dass Progesteron die zentrale Myelinisierung über den intrazellulären Progesteronrezeptor mitreguliert.

### **1.2.3 Neurosteroid im peripheren Nervensystem**

Im Gegensatz zu der Vielfalt der Neurosteroid des Zentralnervensystems wurden bedeutende Funktionen im peripheren Nervensystem nur für Progesteron demonstriert. Zwei verschiedene Untersuchungsmethoden sind zu unterscheiden. Einerseits wurden Wirkungen von künstlich zugeführtem Progesteron analysiert, andererseits wurde die Rolle von endogen gebildetem Progesteron untersucht.

Endogenes Progesteron wird im peripheren Nerven in Schwannzellen synthetisiert (s.o.). Im Tiermodell einer peripheren Nervenläsion wurde die Funktion von Progesteron bei der Remyelinisierung untersucht. Die Expression der Progesteron bildenden Enzyme P450<sub>scc</sub> und 3βHSD (Abbildung 6A) korreliert dabei zeitlich streng mit der Myelinge (Robert et al. 2001). Erfolgt keine Remyelinisierung im Nerven transektionmodell, so unterbleibt auch die Expression dieser Enzyme (Robert et al. 2001). Die Menge des Progesterons im peripheren

Nerven ist darüber hinaus an die Myelinbildung gekoppelt. In posttraumatisch remyelinisierenden Nerven ist mehr Progesteron vorhanden als in unverletzten (Koenig et al. 1995).



**Abbildung 7: Funktion von Progesteron in Schwanzzellen.**

Progesteron wird in Schwanzzellen aus Cholesterin synthetisiert. Progesteron aus endogener Synthese oder aus exogenen Quellen aktiviert die Transkription der Myelinproteingene PMP22 und MPZ / P0. Eine Signalvermittlung über den intrazellulären Progesteronrezeptor und über den Transkriptionsfaktor EGR2 / Krox-20 wird angenommen.

In Schwanzzell-Neuronen-Kokulturen führt eine Induktion der Myelinisierung zu einer Induktion der Enzyme P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ HSD und des Progesteronrezeptors (Chan et al. 1998). Die 3 $\beta$ HSD wird *in vitro* sowohl in Neuronen als auch in Schwanzzellen exprimiert (Guennoun et al. 1997). Auch im normalen unversehrten Nerven ist dieses Enzym vorhanden (Robert et al. 2001), und die Progesteronsynthese erfolgt dadurch unabhängig vom restlichen Körper (Koenig et al. 1995). In Schwanzzellen des PNS kommt der intrazelluläre Progesteronrezeptor vor und ist dort funktionell aktiv (Jung-Testas et al. 1996). Die strenge zeitliche Korrelation von Myelinisierung und Progesteronsynthese legt eine Funktion von endogenem Progesteron für das Myelin nahe. Daher wird angenommen, dass Progesteron außer der Remyelinisierung auch die normale Myelinentwicklung mitreguliert.

Neben der dargestellten Funktion des im Körper synthetisierten Progesterons nimmt zusätzliche, exogene Zufuhr von Progesteron Einfluss auf die Myelinisierung und Myelingenexpression (Abbildung 7). In Zellkultur stimuliert das Steroidhormon die Promotoren der Myelिंगene MPZ / P0 und PMP22 (Desarnaud et al. 1998). Im Falle von PMP22 gilt dies nur für den Promoter

des myelinspezifischen PMP22-Transkripts (Exon 1A) (Suter et al. 1994; van de Wetering et al. 1999). Nur das für das Myelin bestimmte Genprodukt wird also durch Progesteron reguliert.

In Zellkulturexperimenten steigert die Zufuhr von Progesteron die Expression von PMP22 und MPZ / P0 (Notterpek et al. 1999b). Auch *in vivo* zeigen Ratten, die mit Progesteron behandelt wurden, eine erhöhte Expression von PMP22 und MPZ / P0 im peripheren Nervensystem (Melcangi et al. 1999). In Schwanzzellen des PNS ist der intrazelluläre Progesteronrezeptor funktionell aktiv (Jung-Testas et al. 1996) und die Myelingenexpression wird über diesen Rezeptor mitreguliert. Dafür spricht unter anderem, dass eine Blockade dieses Rezeptors die Myelingenexpression und die Myelinisierung verändert (Koenig et al. 1995; Desarnaud et al. 1998). Von manchen Autoren wurde ein alternativer Wirkmechanismus für Progesteron in Schwanzzellen vorgeschlagen. Progesteron soll die Expression von PMP22 über den GABA<sub>A</sub> Rezeptor durch seinen reduzierten Metaboliten 3 $\alpha$ -,5 $\alpha$ -Tetrahydroprogesteron verändern (Melcangi et al. 1999) (Abbildung 6A).

Es wurde ein Konzept entwickelt, über welche intrazelluläre Signalkaskade Progesteron die Myelinisierung beeinflussen könnte (Abbildung 7). Progesteronzufuhr erhöht die Expression des Transkriptionsfaktors „Early-Growth-Response-2“ (EGR2 / Krox-20) in Schwanzzellen (Guennoun et al. 2001; Mercier et al. 2001). In der Promotorsequenz des EGR2 / Krox-20 wurden Regionen mit hoher Homologie zu den Zielsequenzen des Progesteronrezeptors gefunden (Guennoun et al. 2001). Viral vermittelte Überexpression dieses Transkriptionsfaktors wiederum induziert die Expression aller wichtigen Myelinproteine in Schwanzzellkulturen inklusive PMP22 (Nagarajan et al. 2001). Nullmutante Mäuse für EGR2 / Krox-20 zeigen einen Differenzierungsarrest von Schwanzzellen und eine schwere Dysmyelinisierung im PNS (Topilko et al. 1994; Zorick et al. 1999). Mutationen des menschlichen EGR2 / Krox-20-Gens führen zu bestimmten Formen hereditärer Neuropathien (Warner et al. 1998; Timmerman et al. 1999). Der Signalweg vom Progesteronrezeptor über EGR2 zu den Myelingenen könnte die beschriebenen Wirkungen von Progesteron auf die Myelinisierung erklären.

Die Funktion von Progesteron im peripheren Nervensystem lässt sich folgendermaßen zusammenfassen. Progesteron wird in Schwanzzellen synthetisiert und stimuliert die Myelingenexpression über den Progesteronrezeptor und den Transkriptionsfaktor EGR2 / Krox-20. Die Expression des Myelings PMP22 wird gesteigert und die Myelinisierung wird verstärkt. Die Frage, ob Progesteron bei der Regulation der PMP22-Expression über den intrazellulären Progesteronrezeptor oder über den GABA<sub>A</sub> Rezeptor wirkt, ist für die pharmakologische Beeinflussung von Bedeutung.

#### **1.2.4 Progesteronantagonisten und ihre Anwendung**

Verschiedene Typen von Progesteronantagonisten sind theoretisch denkbar, um die periphere Myelinisierung zu beeinflussen. Zum einen existieren Inhibitoren der Progesteronsynthese, die durch Blockade der Progesteron bildenden Enzyme die Progesteronmenge vermindern, zum

anderen Progesteronrezeptorantagonisten, die allosterisch oder kompetitiv die Wirkung des Progesterons am intrazellulären Rezeptor blockieren.

Der Wirkstoff „Trilostane“ hemmt die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ HSD) und vermindert damit die Progesteronbildung. Da Progesteron jedoch die Synthesestufe für fast alle weiteren Steroidhormone darstellt, ist dieser Effekt nicht spezifisch für Progesteron (Abbildung 6A). In der Gruppe der Progesteronrezeptorantagonisten wurden verschiedene Substanzen entwickelt. Die ursprünglichen Indikationen lagen unter anderem in der Therapie des Mammakarzinoms, der Endometriose und hormonsensibler Meningeome. Außerdem wurden sie für den hormonellen Abort und die hormonelle Kontrazeption erwogen (Jang und Benet 1997). Von den Progesteronrezeptorantagonisten ist bisher nur Mifepriston (RU-486) in die breitere klinische Anwendung beim Menschen gekommen und bekannt geworden als hormonelles Abortivum (Van Look und von Hertzen 1995). Im präklinischen Bereich sind weitere Substanzen entwickelt und charakterisiert worden (Fuhrmann et al. 2000).

Bei normaler Signaltransduktion führt die Bindung von Progesteron an den intrazellulären Rezeptor zu einer Dimerisierung der Rezeptormonomere. Die Progesteron-Rezeptor-Komplexe werden in den Kern transloziert und binden an spezifische DNA Sequenzen (Beato 1989). Diese so genannten „progesterone responsive elements“ liegen in den Promotorregionen bestimmter Gene, deren Transkription aktiviert wird (Jenster et al. 1997). Progesteronrezeptorantagonisten können auf unterschiedliche Weise diesen Ablauf blockieren. Nach dem pharmakologischen Mechanismus der Hemmung werden zwei verschiedene Typen von Progesteronrezeptorantagonisten klassifiziert: Typ-I und Typ-II (Abbildung 6B).

Beide Antagonistenklassen führen zur Dimerisierung der Progesteronrezeptormonomere. Danach stören Typ-I-Antagonisten wie „Onapriston“ (ZK 98299) die Rezeptorbindung an die DNA. Typ-II-Antagonisten wie „Mifepriston“ (RU-486) hingegen fördern die Bindung der Rezeptordimere an die DNA, verhindern dann aber die Transkriptionsaktivierung (Bocquel et al. 1993; Edwards et al. 1995).

Dies ist von Bedeutung, da Typ-II-Progesteronrezeptorantagonisten in *in-vitro*-Modellen durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel und infolgedessen gesteigerte Aktivität der Proteinkinase A zu funktionellen Agonisten werden können (Sartorius et al. 1993; Nordeen et al. 1995). Durch einen „cross-talk“ der Signaltransduktion des Progesteronrezeptors und der Proteinkinase A verlieren die Typ-II-Antagonisten also ihre antagonistische Wirkung und steigern im Gegenteil die Transkription nach Bindung an "progesterone responsive elements" noch. In Schwanzzellkultur aktiviert Mifepriston (RU-486) die Promotoren der Myelinproteine PMP22 und MPZ / P0 bei erhöhten cAMP Spiegeln (Desarnaud et al. 1998). Der klinisch verbreitete Typ-II-Progesteronrezeptorantagonist Mifepriston kann also agonistische Wirkung vermitteln und ist daher für eine spezifische Hemmung der Progesteronwirkung nicht geeignet.

Der selektive Typ-I-Progesteronrezeptorantagonist Onapriston (ZK 98299, Schering) (Abbildung 6B) zeigt keinen partiellen Agonismus (Neef et al. 1984; Edwards et al. 1995). Die Anwendung von Onapriston im Menschen beschränkte sich bisher auf grundlegende pharmakologische und pharmakokinetische Untersuchungen (Jang und Benet 1997), sowie auf

eine Phase II klinische Studie (Robertson JF et al. 1999). In die breite klinische Anwendung kam Onapriston bisher nicht. Dieser Progesteronrezeptorantagonist bietet jedoch die Möglichkeit, die Wirkung von Progesteron auf den intrazellulären Rezeptor selektiv zu blockieren. Dadurch ist eine Untersuchung der Funktionen von Progesteron möglich und im Fall der CMT1A eine Beeinflussung der Schwannzellen.

### **1.3 Zielsetzung und Hypothese**

Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A) ist eine hereditäre Neuropathie des peripheren Nervensystems des Menschen. Sie wird verursacht durch eine DNA Duplikation auf Chromosom 17p11.2-p12, die mit einer erhöhten Gendosis des peripheren Myelin-Proteins 22 (PMP22) einhergeht. Schwannzellen überexprimieren in Folge dessen PMP22 und verlieren die Fähigkeit, adäquate Myelinscheiden zu bilden. Es kommt zu einer Demyelinisierung, zu einem axonalen Verlust und schließlich zu einer Muskelatrophie mit entsprechender Klinik. Steroidhormone nehmen auf vielfältige Weise an der Regulation des Nervensystems teil. Insbesondere Progesteron steuert die Myelinisierung in Schwannzellen und steigert die Expression des PMP22 und anderer Myelinproteine.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit basierte darauf, dass eine Blockade der Progesteronrezeptoren die Expression von PMP22 senken und damit die CMT1A positiv beeinflussen könnte. Ein etabliertes Tiermodell der CMT1A, die CMT-Ratte, wurde mit dem selektiven Progesteronrezeptorantagonisten „Onapriston“ behandelt und auf Veränderungen der PMP22-Expression, der CMT-Pathologie und des Phänotyps untersucht. Als Gegenkontrolle erhielt eine andere Versuchstiergruppe eine Progesteronbehandlung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, eine experimentelle Therapie der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A im transgenen Rattenmodell zu testen und zu etablieren. Es sollte der prinzipielle Beweis geliefert werden, dass über die PMP22-Expression die Ausprägung der CMT1A zu beeinflussen ist und der Progesteronrezeptor hierfür ein mögliches pharmakologisches Ziel ist. Dieser Ansatz der Behandlung hereditärer Neuropathien war gänzlich neu und untersuchte gleichzeitig das Progesteronsignalsystem in Schwannzellen.

## 2. *Material und Methoden*

### 2.1 Material

#### 2.1.1 *Chemikalien und Bioreagenzien*

Agarose	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Azur-II-Farbstoff	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	International Biotechnology Inc.
Chloroform	Merck, Darmstadt
DDSA (2-Duodecenylnsuccinicanhydrid)	Serva, Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DMP30 (2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-Phenol)	Serva, Heidelberg
DTT (1,4-Dithiotreitol)	GibcoBRL, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Eosin Farbstoff	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
„Ficoll (Typ 400)“	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glycidether	Serva, Heidelberg
Haematoxylin	Merck, Darmstadt
HBSS (Hanks Balanced Salts Solution)	GibcoBRL, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Ketamin (Ketanest®)	Parke-Davis, Berlin
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid-2-hydrat (CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Na-Cacodylat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Methylnadicanhydrid (MNA)	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natrium-Cacodylat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-hydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Onapriston	Schering, Berlin
Osmiumtetroxid	Serva, Heidelberg

Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Progesteron	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
RNA-„Leiter“	Agilent-Technologies, Böblingen
Xylazin (Rompun®)	Bayer, Leverkusen
Salzsäure (HCl)	Serva, Heidelberg
Sesamöl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Standard-RNA (eukaryot)	Promega, Mannheim
Szintillationsflüssigkeit „EcoLume“	ICN, Irvine, CA, USA
Taq-Polymerase Puffer	Promega, Mannheim
Tris-HCl Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

CO <sub>2</sub> -Gas	Messer-Griesheim, Krefeld
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen, Größe: 15ml, 50 ml	Becton & Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
Falconröhrchen Rundboden 6 ml	Becton & Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
histologisches Einschlussmittel „Eukitt“	Kindler, Freiburg
Injektionskanülen, Größe: 17G, 20G, 23G	Becton & Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
PCR-Mikrotiterplatten	ABgene, Surrey, UK
PCR-Plattenfolie “Air Pore Sheet”	ABgene, Surrey, UK
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA
Präparationsbesteck	
chirurgische Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg
gerade scharf/stumpfe Schere	Fine Science Tools, Heidelberg
gebogene scharf/scharfe Schere	Fine Science Tools, Heidelberg
Rattenstandarddiät „Ssniff R/M-H V1535“	Ssniff Spezialdiäten, Soest
Serum-Monovette, Größe: 2,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen „NormInjekt“, Größe : 1ml	Henke Saas Wolf, Tuttlingen
Transferpipetten	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Trockeneis	Messer-Griesheim, Krefeld
Weichholzgranulateinstreu „Bedding S8/15“	Ssniff Spezialdiäten, Soest



### 2.1.3 Geräte

ABI Prism 7700 Sequence Det. System	Applied Biosystems
Agarose-Gelkamm	MPI exp. Med. wiss. Werkstatt
Agarose-Gelkammer	MPI exp. Med. wiss. Werkstatt
Agarosegeldokumentation „ImageMaster VDS“	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen
Diamantmesser „Ultrathin Diamond Knife 45°“	Diatome U.S., Fort Washington, PA, USA
Drucker „Apple LaserWriter 16“	Apple Macintosh,
Drucker „Minolta-QMS magicolor 2“	Minolta, München
Feinwaage, digital	Heraeus Instruments, Langenselbold
Fräse für Epon-Präparate	Reichert, Wien, Österreich
Gefrierschrank –20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank –80°C	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Gelladestation für Agilent Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
Gewebe-Einbettautomat „Lynx el“	Vision BioSystems Inc, Norwell, MA USA
Gewebehomogenisierer „Ultraturrax T8“	IKA Labortechnik, Staufen
Gewebeinfiltrationsautomat „Microm HMP 110“	Leica Microsystems, Wetzlar
Glaswaren	Schott, Mainz
Magnetrührer „RCT basic Ikamag“	Omnilab, Bremen
Mikroskop „Leica DM RXA2“	Leica Microsystems, Wetzlar
Paraffin-Ausgießstation „Microm AP 280“	Leica Microsystems, Wetzlar
PCR-Thermocycler „T3“	Biometra, Göttingen
PCR-Versiegler „Combi Thermosealer“	Advanced Biotechnologies, Surrey, UK
Peristaltikpumpe	Heraeus Instruments, Langenselbold
Pipetten, Größen: 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Quarzküvette	Hellma, Müllheim / Baden
Reinstwasseranlage „SeralPur Pro 90 CN“	Seral, Ransbach
Rotationsmikrotom „Leica RM 2155“	Leica Microsystems, Wetzlar
Schlittenmikrotom „Microm HM 400“	Leica Microsystems, Wetzlar
Spannungsgeräte Elektrophorese	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Stangentesteinrichtung	wissenschaftliche Werkstatt des MPI für experimentelle Medizin
Szintillationsmessgerät „TopCount“	Perkin-Elmer Deutschland, Rodgau

Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tierkäfige Ratten	Tecniplast, Buguggiate, Italien
Trocknungszentrifuge „Speed Vac“	Eppendorf, Hamburg
UV-Illuminator	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Videomikroskopie-Kamera	Hamamatsu, Herrsching
Probenmischgerät „Vortexer“	Bender & Hobein, München
Zentrifugen	
„Laboratory Centrifuge 4K15“	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
„Heraeus Biofuge 13“	Heraeus Instruments, Langenselbold

## 2.1.4 Lösungen und Puffer

### 2.1.4.1 Molekularbiologie

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

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

DEPC 1 ml

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

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau 0,25%

Xylencyanol 0,25%

„Ficoll (Typ 400)“ 15% in H<sub>2</sub>O

*Erststrangpuffer* (Teil des Superscript II RT-Kits) GibcoBRL, Karlsruhe

Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben

*PBS (10x Stammlösung, 1000ml)*

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)

*Puffer AE, AL/E, ATL, AW1, AW2* Qiagen, Hilden

(Teile des DNeasy 96 Kit)

Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben

*SDS-DEPC-H<sub>2</sub>O*

Sodium-Dodecyl-Sulfat 10 g

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

*TAE (50x, 1000ml)*

Tris-HCl Base	242 g
Essigsäure 100%	57,1 ml
EDTA (0,5 M pH 8)	100 ml
auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

*TE-Puffer*

Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
EDTA (0,5 M)	1 mM
in H <sub>2</sub> O; für DEPC-TE DEPC-H <sub>2</sub> O verwenden	

**2.1.4.2 Histologie***Fixativ für die Elektronenmikroskopie (Karnovsky 1965)*

Paraformaldehydlösung (8%)	250 ml
Glutardialdehyd (25%)	100 ml
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,33 g
Na-Cacodylat-Puffer (0,08 M)	150 ml

*Fixativ für die Paraffineinbettung*

Paraformaldehyd	40 g (4%)
auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen; auf 60°C erhitzen und tropfenweise 1M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird; 500 ml 0,2 M Sörensenpuffer zugeben; steril filtrieren; auf pH 7,2 einstellen	

*Kunstharzmischung Epon (Luft 1961)**Epon Lösung A*

Glycidether	67,5 g
DDSA	88,2 g

eine Stunde mit Magnetrührer rühren

*Epon Lösung B*

Glycidether	82,3 g
MNA	73,3 g

eine Stunde mit Magnetrührer rühren

*Gebrauchslösung Epon*

Epon Lösungen A + B im Verhältnis 1 : 1 mischen; 1,8% DMP30 zugeben

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

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

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

beide Lösungen in einem Verhältnis von 1 : 1 mischen

Natrium-Cacodylat-Puffer (0,08 M) pH 7,2

Natrium-Cacodylat (8,56 g) auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen; pH 7,2 einstellen; steril filtrieren

*Paraformaldehydlösung (8%)*

Paraformaldehyd (40 g) auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O auf 60°C erhitzen, 1 M NaOH bis zum Aufklaren zusetzen, steril filtrieren, pH 7,2 mit 1 M HCl einstellen

## Sörensenpuffer

*Lösung A*

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 6,9 g (0,2 M)  
in 250 ml H<sub>2</sub>O

*Lösung B*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 28,4 g (0,2 M)  
in 1000 ml H<sub>2</sub>O

Lösung A 196 ml

Lösung B 804 ml

mischen und pH 7,4 einstellen

**2.1.5 Enzyme und Reaktionskomplettsysteme****2.1.5.1 Enzyme**

Proteinase K (Lyophilisat; auf 10 U/μl einstellen)	Boehringer Mannheim
RNase-Inhibitor „RNasin“	Promega, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Boehringer Mannheim

**2.1.5.2 Reaktionskomplettsysteme**

„DNeasy 96“ Kit	Qiagen, Hilden
PCR-Komplettsatz	Promega, Mannheim
Progesterone-II-RIA “Elecsys Analysis E170”	Hoffman-La Roche, Bern
„RNA 6000 Nano“ Assay	Agilent Technologies, Böblingen
„Superscript II RT“-Kit	GibcoBRL, Karlsruhe
„TaqMan“ PCR-Mastermix	Eurogentec, Brüssel, Belgien
„TRIzol“ Reagent	GibcoBRL, Karlsruhe

**2.1.6 Nukleinsäuren und Nukleotide**

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer Mannheim, Mannheim
DNA-Größenmarker „Lambda/HindIII“	Promega, Mannheim
DNA-Größenmarker „PhiX174/HaeIII“	Promega, Mannheim
zufällige Nonamerprimer	F. Benschler, MPI für exp. Med.

**2.1.7 Radiochemikalien**

α[ <sup>32</sup> P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
--	-------------------------------------

### 2.1.8 Oligonukleotide

Primeroligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms DNASTAR SeqMan und Primer Express 1.65 entworfen und von F. Benseler (Abt. 501 des MPI für exp. Medizin, Göttingen) hergestellt. Mit Farbstoffen markierte Sonden wurden von Eurogentec (Brüssel, Belgien) synthetisiert. Als Farbstoffe wurden FAM, TET und TAMRA verwendet. Deren jeweilige Position in der Sonde ist angegeben.

#### *Primer zur Genotypisierung transgener Ratten*

CPMP Fwd 5'-GACAAACCCAGACAGTTG-3'

CPMP Rev 5'-CCAGAAAGCCAGGGAATC-3'

#### *Primer und TaqMan-Sonde von Gesamt-PMP22*

PMP22 Fwd: 5'-TGTACCACATCCGCCTTGG-3'

PMP22 Rev: 5'-GAGCTGGCAGAAGAACAGGAAC-3'

PMP22 Sonde: 5'-FAM-CCATGATCCTGTCTGTCATCTTCAGCGTC-TAMRA-3'

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

Exon1B Fwd: 5'-GCTGTCCCTTTGAACTGAAA-3'

Exon1B Rev: 5'-GAACAGGATCCCCAACAAGAGTAG-3'

Exon1B Sonde: 5'-TET-AGCCCAACTCCAGCCACCATG-TAMRA-3'

#### *Primer und TaqMan-Sonde von $\beta$ -Actin*

$\beta$ -Actin Fwd: 5'-CTCTGAACCCTAAGGCCAACC-3'

$\beta$ -Actin Rev: 5'-GGCATACAGGGACAACACAGC-3'

$\beta$ -Actin Sonde: 5'-TET-ACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACC-TAMRA-3'

#### *Primer und TaqMan-Sonde von MPZ / P0*

MPZ / P0 Fwd: 5'-CACCGGACATAGTGGGCA A-3'

MPZ / P0 Rev: 5'-AGGATGCCACCGATCACG-3'

Sonde: 5'-FAM-ACGTCTCAGGTCACGCTCTATGTCTTTGAAA-TAMRA-3'

### 2.1.9 Versuchstiere

Wildtyp-Ratten vom Stamm Sprague-Dawley.

PMP22-transgene Ratten, „CMT-Ratten“ (Sereda et al. 1996)

### 2.1.10 Computersoftware

DNASTAR SeqMan

DNASTAR Inc., Madison, WI, USA

Excel 2000

Microsoft Europe, Berlin

Illustrator 9.0

Adobe Systems Software,

Saggart, Irland

Openlab 2.1

Improvision, Heidelberg

Photoshop 6.0

Adobe Systems Software,

PrimerExpress v1.65	Saggart, Irland Applied Biosystems Foster City, CA, USA
Scion Image Beta 4.0.2	Scion Corporation U.S., Frederick, MD, USA
Statistica 6.0	StatSoft Europe, Hamburg
Word 2000	Microsoft Europe, Berlin

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Manipulation und Analyse von Versuchstieren**

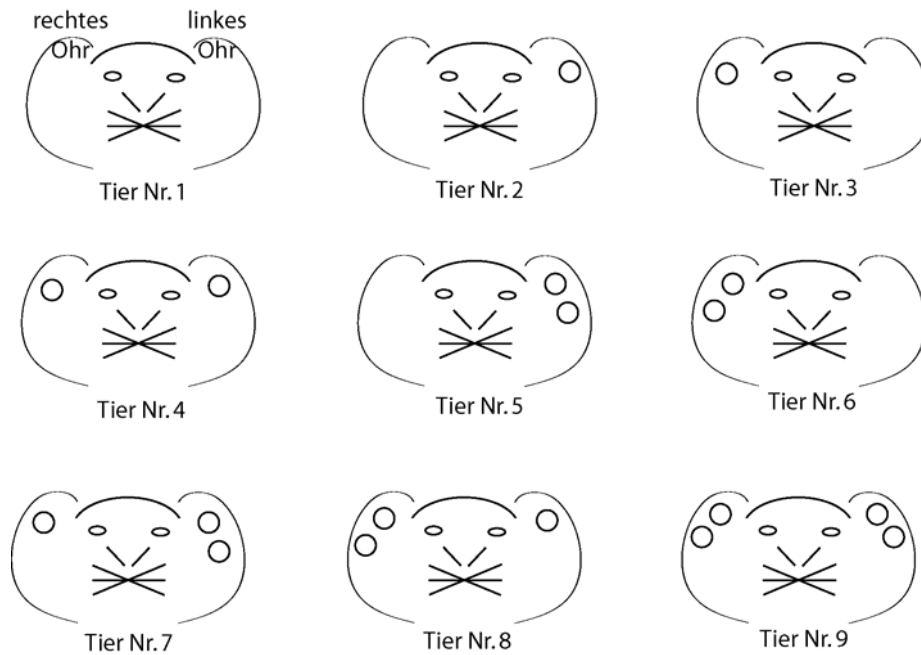
#### **2.2.1.1 Erzeugung von Versuchstieren**

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich männliche Ratten vom Stamm Sprague-Dawley aus der Zucht des MPI für experimentelle Medizin verwendet. Diese Tiere stammten aus heterozygoter Zucht der zuvor generierten und beschriebenen PMP22-transgenen Ratten, im folgenden „CMT-Ratten“ genannt (Sereda et al. 1996). Verwendet wurden Wildtyp-Ratten und heterozygot transgene Ratten, die genotypisiert wurden durch Polymerasekettenreaktion (PCR) auf genomische DNA, die aus Gewebebiopsien der Tiere gewonnen worden war (s.u.)

#### **2.2.1.2 Tierhaltung**

Die Tierhaltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Tierhaus des MPI für experimentelle Medizin (Göttingen) entsprechend den Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde. Die Ratten wurden in Gruppen von 2 bis zu 6 Tieren in Makrolonkäfigen Typ III (Typ III H: 1291H, 425x266x185mm (L x B x H), Grundfläche 800cm<sup>2</sup>) oder IV (Typ IV: 1354G, 595x380x200 mm (L x B x H), Grundfläche 1820cm<sup>2</sup>) je nach Wurfgröße gehalten, die zweimal pro Woche gewechselt wurden. Die Haltung erfolgte auf staubfreiem Weichholzgranulateinstreu (Ssniff Bedding S8/15). Die Ratten wurden mit einer pelletierten Standarddiät gefüttert (Ssniff R/M-H V1535). Futter war zu jeder Zeit *ad libitum* für die Tiere verfügbar. Zur Wasserversorgung wurde Leitungswasser aus Tränkeflaschen ebenfalls *ad libitum* bereitgestellt. Die Raumtemperatur lag für alle Tiere bei 22 ± 1°C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 55 ± 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.

Die Markierung und Identifizierung der einzelnen Tiere erfolgte durch Ohrlochmarkierung (Abbildung 8). Außerdem wurden auf einer individuellen Karte für jedes Tier die fortlaufende Tiernummer, Geschlecht, Geburtsdatum und Nummern der Elterntiere notiert. Die Tieridentifikationskarten wurde für alle Tiere im Käfig von außen am Käfig befestigt.



**Abbildung 8: Ohrlochcode der Rattenzucht.**

Die Identifikation einzelner Ratten ist durch die Tieridentifikationsnummer möglich, die sich aus der Wurfnummer und der oben abgebildeten Tiernummer zusammensetzt.

### 2.2.1.3 Identifikation der Tiere und Schwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurden Schwanzbiopsien entnommen. Diese erfolgten im Alter von drei bis vier Wochen beim Absetzen vom Muttertier unter leichter CO<sub>2</sub>-Narkose (s.u.) gleichzeitig mit der Ohrlochmarkierung und Erstellung der Identifikationskarten. Es wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze mit einer Schere entfernt. Dies wurde danach bis zur weiteren Verarbeitung (s.u.) in einem Eppendorfgefäß bei –20°C gelagert. In einem Zuchtprotokoll wurden für jeden Wurf die Anzahl der Nachkommen, das Geburtsdatum, das Geschlecht der Einzeltiere, die Identifikationsnummern der Elterntiere und eventuelle Auffälligkeiten notiert.

### 2.2.1.4 Narkotisierung und Tötung von Versuchstieren

Zur histologischen Probengewinnung, die eine Perfusionsfixierung erforderte, erhielten die Ratten eine Injektionsnarkose durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus 5 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketanest®) und 2 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun®). Für kleinere Eingriffe wie Schwanzbiopsien erhielten die Ratten eine Inhalationsnarkose mit CO<sub>2</sub> durch kurzes Einbringen in ein mit CO<sub>2</sub> gefülltes Glasgefäß. Für eine Probengewinnung, die keine Perfusion erforderte, wurden die Tiere durch Einleiten von CO<sub>2</sub> in einen gasundurchlässigen Käfig getötet.

### 2.2.1.5 Präparation der Ischiasnerven von Versuchstieren

Um das periphere Nervensystem zu beurteilen, wurde den getöteten Versuchstieren der Nervus ischiadicus, der größte periphere Nerv, entnommen. Zur Präparation wurde die Haut im Bereich der Hüfte und dorsalen Teil der unteren Extremität abpräpariert und die Muskulatur freigelegt (Abbildung 10A). Durch Inzision der Glutealmuskulatur wurde der Nervus ischiadicus freigelegt

und proximal nach Austritt aus dem Foramen infrapiriforme sowie distal auf Höhe der Aufteilung in Nervus tibialis und Nervus peroneus durchtrennt. Nach Resektion wurde der Nerv auf einer sauberen Unterlage mit einer Pinzette von Binde- und Fettgewebe befreit und je nach geplanter Verwendung weiterbehandelt. Nerven, die für die RNA-Extraktion bestimmt waren, wurden sofort auf Trockeneis überführt und dann weiter bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Nerven zur histologischen Analyse wurden nach Ganzkörperfixierung (s.u.) in Fixativ nach Karnovsky auf  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

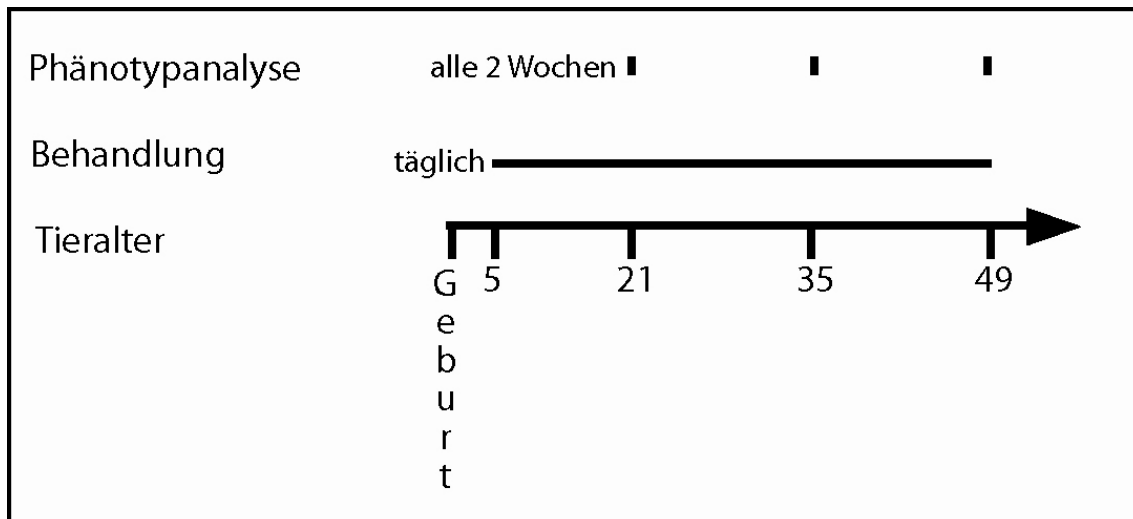
### **2.2.1.6 Subkutane Injektion von Steroidhormonen**

Sowohl Wildtypen als auch heterozygot transgene Tiere erhielten subkutane Injektionen von Onapriston (Schering) oder Progesteron (Sigma-Aldrich) in Sesamöl (Sigma-Aldrich) suspendiert oder Sesamöl allein. Die Behandlung erfolgte dem Injektionsschema entsprechend (Abbildung 9). Innerhalb eines Wurfes wurde zufällig ausgewählt, welche Tiere welche Substanz erhielten. Dazu wurde jedem Versuchstier in der Reihenfolge der Tieridentifikationsnummern eine Zufallszahl zugeordnet anhand einer Liste mit Zufallszahlen von 1 bis 1000. Tiere mit Zufallszahlen kleiner 333 erhielten die Onapristonbehandlung, solche mit Zufallszahlen zwischen 334 und 666 erhielten die Kontrollbehandlung mit Sesamöl alleine. Solche mit Zufallszahlen größer 667 erhielten die Progesteronbehandlung.

Die mit Mörser und Pistill pulverisierten Steroidhormone Progesteron und Onapriston wurden abgewogen und in Sesamöl suspendiert. Dabei wurde eine Stammsuspension von 40 mg / ml erstellt. Diese wurde nach dem Wiegen der Tiere auf einer digitalen Waage (Heraeus Instruments) mit weiterem Sesamöl verdünnt, so dass jedes Tier entsprechend seinem Gewicht eine subkutane Injektion von 20 mg / kg Körpergewicht Steroidhormon immer gelöst in 0,2 ml Sesamöl erhielt. Kontrolltiere erhielten 0,2 ml Sesamöl ohne Steroidzusatz. Die Injektionen erfolgten in allen Gruppen vom 5. postnatalen Tag an täglich am frühen Nachmittag bis zum 49. postnatalen Tag. Die Injektionen wurden mit 1 ml Spritzen „NormInjekt“ durch 17G Injektionskanülen durchgeführt.

Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Braunschweig unter dem Titel „Therapie von PMP22 transgenen Ratten, einem etablierten Tiermodell für die CMT (Charcot-Marie-Tooth) Erkrankung, mit Onapriston (ZK 98.299)“ mit der Genehmigungsnummer „AZ 509.42502/02“ genehmigt.





**Abbildung 9: Zeitschema der Steroidbehandlung**

Vom fünften bis zum 49sten postnatalen Tag wurden Steroide täglich subkutan injiziert. Im Alter von drei, fünf und sieben Wochen erfolgten Phänotypanalysen.

### 2.2.1.7 Beurteilung der Versuchstiere durch den Stangentest

Mit Hilfe des Stangentests wurde die körperliche Leistungsfähigkeit der behandelten Tiere beurteilt. Dies erfolgte nach Blindung des Untersuchers im Alter der Ratten von drei Wochen, fünf Wochen und sieben Wochen immer am frühen Nachmittag. Für die Phänotypuntersuchungen wurden die Tieridentifikationskarten von den Käfigen entfernt. Stattdessen wurden die Käfige von einer versuchsfremden Person mit A, B, C usw. benannt. Der Code, welcher Buchstabe welchen Tieren entsprach wurde notiert und unzugänglich für den Untersucher aufbewahrt. Auf diese Weise geblindet wurde der Phänotyp der Tiere vom immer gleichen Untersucher analysiert.

Beim Stangentest wurden die Ratten in die Mitte einer runden Stange mit rauer Oberfläche ca. 70 cm über dem Boden gesetzt. Die Stange war auf einer Länge von ca. 40 cm für die Ratten begehbar. Die Seiten der Stange waren für die Ratten unüberwindbar abgesperrt. Der Durchmesser der Stange wurde entsprechend dem Alter der Tiere variiert. Im Alter von 3 Wochen betrug er 1,5 cm, im Alter von 5 Wochen 2,5 cm und im Alter von 7 Wochen 3,0 cm. Es wurde mit Hilfe einer Stoppuhr gemessen, wie lange (in Sekunden) sich jede Ratte auf der Stange halten konnte. Insgesamt hatte jedes Tier sechs Versuche, auf der Stange sitzen zu bleiben, wobei ein Versuch nach maximal 300 Sekunden abgebrochen wurde. Die erreichten Sekunden in jedem Versuch wurden notiert und nach der Analyse aller Tiere die Blindung aufgelöst und die erreichten Sekunden den Tiernummern zugeordnet.

### 2.2.1.8 Beurteilung der Versuchstiere durch ein klinisches Punktesystem

Neben dem Stangentest wurde ein klinisches Punktesystem angewendet, um den Phänotyp der CMT-Ratten zu messen. Im Alter von 3, 5 und 7 Wochen wurde jedem Tier vom geblindeten Untersucher eine Zahl zugewiesen als Maß für die Ausprägung der CMT-Erkrankung. Jede Ratte wurde vom Untersucher aufgenommen und für ca. 30 Sekunden in der Hand sitzen lassen.

Bei der Beurteilung wurde die Kraft beim Festhalten auf der Hand des Untersuchers berücksichtigt und die Kraft, mit der sich die Ratte gegen den Zugriff des Untersuchers wehrte. Außerdem wurde die Ratte beobachtet, während sie in einem leeren Käfig für ca. 30 Sekunden frei lief. Hierbei wurden besonders die Ausprägung der Gangbildveränderungen und das spontane Aufrichten an der Käfigwand beurteilt. Den Ratten wurde ein Punktwert zugeteilt auf einer Skala von 10 bis 1. Der Wert 10 entsprach Wildtyp-Niveau und der Wert 1 starker Behinderung (Tabelle 3). Dieser Punktwert wurde in den Altersstufen 3, 5 und 7 Wochen für jedes Tier notiert.

Punktwert	Klinischer Phänotyp
10 - 9	kein sichtbarer Phänotyp
	keine Behinderungen
8 - 7	leichte Kraftminderung
6 - 5	mittlere Beeinträchtigung der Kraft
	Außenrotation der Extremitäten
4 - 3	schwere Behinderung
	noch begrenzt lauffähig
2 - 1	völlige Unfähigkeit, die Extremitäten zu verwenden

**Tabelle 3: Kriterien des klinischen Punktesystems**

### **2.2.1.9 Messung der Muskelmasse der Versuchstiere**

Zur Quantifizierung der Muskelatrophie der CMT-Ratten wurde der Umfang der Hinterbeine im Alter von sieben Wochen gemessen. Den getöteten Versuchstieren wurde dazu die Haut der unteren Extremität abpräpariert und der maximale Umfang des Beines wurde 3,5 cm proximal der Fußspitze, also auf Höhe des Oberschenkels gemessen (Abbildung 10A). Dazu wurde ein Faden um das gestreckte Bein gewickelt und am Faden ein ganzer Beinumfang eingezeichnet. Diese Länge wurde mit einem Lineal gemessen und notiert.

## **2.2.2 Bestimmung der Pharmakokinetik von Progesteron**

### **2.2.2.1 Gewinnung von Blut**

Zur Gewinnung von Blutproben der CMT-Ratten wurde innerhalb einer Minute nach Tötung der Tiere (s.o.) der Thorax eröffnet. Das Herz wurde frei präpariert und aus dem rechten Ventrikel wurde Blut in eine 2,6 ml Serum-Monovette entnommen. Das Blut wurde bei 4°C gelagert und am folgenden Tag gekühlt verschickt zur Bestimmung des Progesterongehalts im Blut.

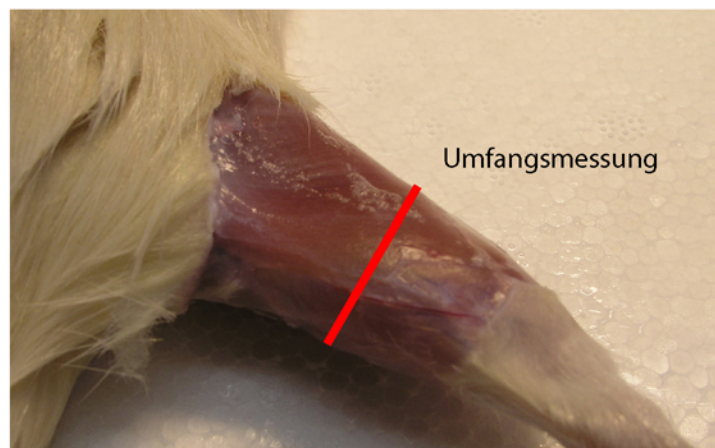
### **2.2.2.2 Bestimmung des Progesterongehalts im Serum**

Die Bestimmung der Progesteronspiegel im Blut der Tiere erfolgte in einem kommerziellen Labor (Labor Prof. Arndt & Partner, Lademannbogen 61-63, 22339 Hamburg) geblindet für die Untersucher. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem Prinzip eines so genannten Radioimmunoassay nach dem ECLIA-Verfahren (= ElektroChemiLumineszenz-ImmunoAssay) im Kompetitionsprinzip.

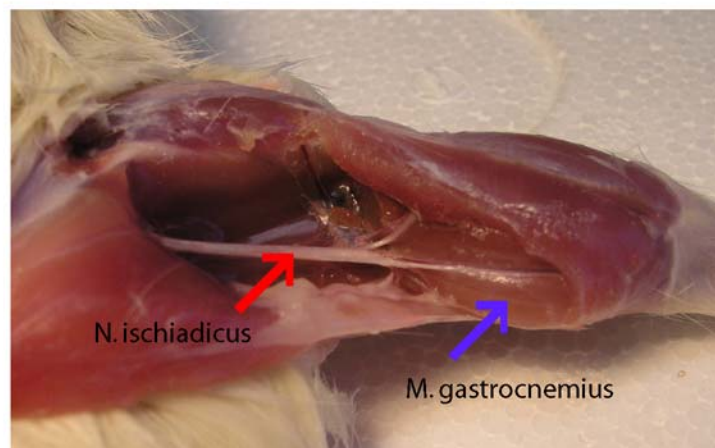
Es wurden 30 µl Serumprobe mit Danazol (zur Freisetzung von Progesteron) in Gegenwart eines biotinylierten monoklonalen für Progesteron spezifischen Antikörpers (Maus) und eines mit Ruthenium-Komplex-markierten Progesteronderivats inkubiert. Probenprogesteron und mit Ruthenium markiertes Progesteron konkurrierten dabei um die Antikörperbindungsstellen. Streptavidin-beschichtete magnetische Mikropartikel wurden zugegeben. Es erfolgte eine „bound-free-Trennung“ durch Fixation der Mikropartikel auf der Oberfläche einer Messelektrode. Die ungebundenen Substanzen wurden durch Puffer abgetrennt. Nach Anlegen einer Spannung wurde die spannungsinduzierten Chemilumineszenz mit dem Photomultiplier gemessen. Die Konzentrationsbestimmung von Progesteron erfolgte anhand einer Kalibrationskurve.

Testname: Progesterone II, Elecsys Systeme Modular Analysis E170, Roche.

A



B



**Abbildung 10: Anatomie des Hinterbeins der Ratte.**

A Das Rattenhinterbein ist nach Entfernung von Haut und Fell in der Ansicht von kranio-dorsal dargestellt. In rot ist die Lokalisation markiert, an welcher der Umfang des Hinterbeins gemessen wurde.

B Präparation des Nervus ischiadicus von dorsal. Der M. gastrocnemius wurde reseziert und histologisch analysiert.

## 2.2.3 Histologische Methoden

### 2.2.3.1 Ganzkörperfixation von Ratten durch Perfusion

Zufällig ausgewählte Tiere aus allen Behandlungsgruppen wurden perfusionsfixiert. Dazu wurde nach tiefer Anästhesie durch intraperitoneale Injektion von Ketamin / Xylazin (s.o.) das Herz der Ratten freipräpariert und eine 23G „Venofix“-Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Die Vena cava inferior gerade distal des rechten Vorhofs wurde eröffnet. Über die Kanüle, verbunden mit einer Peristaltikpumpe (Heraeus SR70, Flussrate 2-5 ml/min), wurde der Kreislauf des Tieres mit 50ml HBSS perfundiert, gefolgt von 50ml Fixativ für Epon- oder Paraffineinbettung (Karnovsky 1965). Der ganze Körper des Versuchstieres wurde dadurch perfusionsfixiert. Darauf folgte eine Immersionsfixierung durch Lagerung im Fixativ für weitere 24 Stunden. Die zu untersuchenden Gewebe wurden entnommen.

### 2.2.3.2 Semidünnschnitte von in Kunstharz eingebetteten Nerven

Die fixierten Ischiasnerven wurden zur Herstellung von Semidünnschnitten in das Kunstharz Epon eingebettet nach der Methode von Luft (1961). Dazu wurden die Ischiasnerven aus den perfundierten Ratten reseziert (s.o.) und ein 0,5 cm langes Stück wurde auf immer gleicher Höhe aus dem Nerven herausgeschnitten. Diese Nervenstücke wurden in gleicher Ausrichtung in vorgefertigte Körbchen des Einbettautomaten „Lynx el“ gelegt und dann mit Epon infiltriert. Dabei wurden die Körbchen bei 4°C nach folgendem Schema in den entsprechenden Lösungen geschwenkt.

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
Na-Cacodylatpuffer	2 x 30 Minuten
1%-OsO <sub>4</sub> / Osmiumtetroxid	2 Stunden
Na-Cacodylatpuffer	2 x 15 Minuten
30%-Ethanol	15 Minuten
50%-Ethanol	15 Minuten
70%-Ethanol	15 Minuten
80%-Ethanol	15 Minuten
90%-Ethanol	15 Minuten
100%-Ethanol	2 x 15 Minuten
Isopropanol	15 Minuten
Propylenoxid	2 x 15 Minuten
Propylenoxid : Epon 2 : 1 Mischung	2 Stunden
Propylenoxid : Epon 1 : 1 Mischung	2 Stunden
Propylenoxid : Epon 1 : 2 Mischung	4 Stunden
Epon	4 Stunden

Nach der Infiltration wurden die Nerven in Epon eingebettet. Dazu wurden sie in Ausgießformen mit reinem Epon gegeben welches durch Erhitzen auf 60°C für 24 Stunden polymerisierte, so dass feste Epon-Kunstharzblöcke entstanden. Die Eponblöcke wurden mit

einer Fräse an der Spitze zu Pyramidenform angeschliffen. Von diesen Eponblöcken wurden an einem Rotationsmikrotom mit einem Diamantmesser 1µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Semidünnschnitte wurden auf Objektträger transferiert und eine Stunde lang getrocknet.

### **2.2.3.3 Methylenblaufärbung von Semidünnschnitten**

Die Semidünnschnitte wurden gefärbt 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 Färbelösung wurde auf die Schnitte der Ischiasnerven gegeben und nach einer Minute bei 60°C mit destilliertem Wasser abgewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und dann mit Eukitt-Kleber eingedeckt.

### **2.2.3.4 Paraffinschnitte von Beinmuskeln**

Nach Ganzkörperfixation von Ratten (s.o.) mit achtprozentiger Paraformaldehydlösung wurde der M. biceps femoris des Unterschenkels freipräpariert und reseziert (Abbildung 10B). Der Muskel wurde mit Hilfe eines Gewebe-Infiltrationsautomaten (Leica Microsystems) paraffiniert. An einer Paraffin-Ausgießstation (Leica Microsystems) wurden die Präparate in Paraffinblöcke ausgegossen. Von den Paraffinblöcken wurden 5 µm dicke Schnitte an einem Schlittenmikrotom (Leica Microsystems) angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und mit Haematoxylin-Eosin gefärbt.

### **2.2.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten**

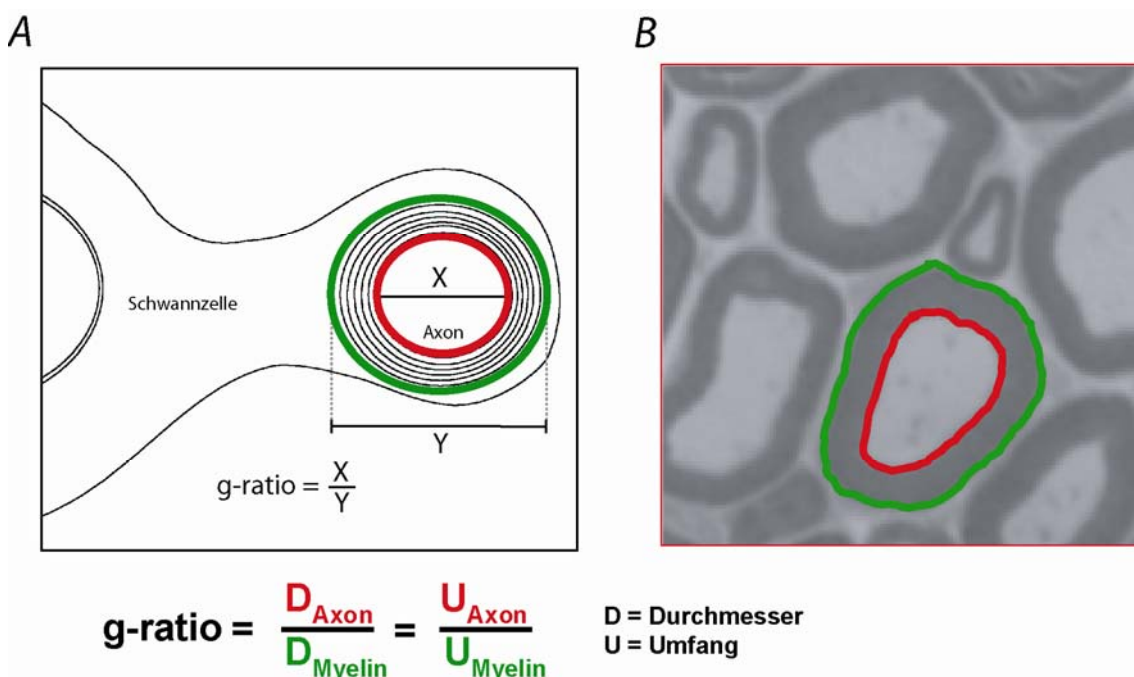
Hämatoxylin ist azidophil und färbt Chromatin in den Zellkernen blau, während Eosin das Zytoplasma rot färbt. Für die Hämatoxylin / Eosin-Färbung wurden Paraffinschnitte bei Raumtemperatur zunächst entparaffiniert, indem die Schnitte zweimal 10 Minuten in Xylol und je zweimal 2 min in 100%, 96% und 70% Ethanol rehydriert wurden. Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst zweimal mit H<sub>2</sub>O gespült und anschließend für 3-5 Minuten in saurem Hämatoxylin gefärbt. Dann wurden die Schnitte 10 Minuten in Leitungswasser gebläut und 5 Minuten in Eosin gefärbt. Zuletzt wurden die Paraffinschnitte mit H<sub>2</sub>O gespült und eine Minute in 50%, eine Minute in 70%, zweimal eine Minute in 80% und zweimal 5 Minuten in 100% Ethanol dehydriert. Nach zweimal 5 Minuten Inkubation in Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt-Kleber eingedeckt. Mikroskopische Bilder der Muskelschnitte wurden an einem Lichtmikroskop (Leica DM RXA2) mit einer Videomikroskopie-Kamera angefertigt. Die weitere Analyse der Fotografien der Präparate erfolgte mit Photoshop 6.0.

### **2.2.3.6 Histologische Analyse von Ischiasnerven**

Im peripheren Nerven von CMT-Ratten lassen sich verschiedene histologische Charakteristika der CMT1A nachweisen. Dazu gehören eine Demyelinisierung und ein axonaler Verlust. Um diese untersuchen zu können, wurden von den Semidünnschnitten der Ischiasnerven mikroskopische Bilder angefertigt. Die Aufnahmen wurden an einem Lichtmikroskop (Leica DM RXA2) mit einer Videomikroskopie-Kamera und dem Programm Openlab 2.0 angefertigt. Die Weiterbearbeitung erfolgte mit den Programmen Photoshop 6.0 und ScionImage.

Die Gesamtzahl aller Axone der Ischiasnerven wurde gezählt. Dazu wurden auf immer gleicher Höhe Gesamtquerschnitte der Ischiasnerven von CMT-Ratten fotografiert. Diese Fotos wurden unterteilt in analysierbare Abschnitte. Nach Blindung wurden alle solche Axone gezählt, die der Größe nach physiologischerweise eine Myelinisierung erwarten ließen, also Axone, mit einem Durchmesser von 1 µm und mehr (Abbildung 21A). Die Gesamtzahl aller in den Ischiasnerven vorhandenen Axone wurde erfasst.

Um den Prozentsatz von unphysiologischerweise unmyelinisierten Axonen feststellen zu können, wurden in Photos einer 40x Vergrößerung der Ischiasnerven die nicht myelinisierten Axone mit Pfeilen markiert (Abbildung 21C). Der gesamte Querschnitt der Nerven wurde auf diese Weise ausgezählt. Aus der Anzahl der demyelinisierten Axone pro Nerv und der Anzahl aller Axone im Nerven ergab sich der Anteil demyelinisierter Axone.



**Abbildung 11: Das "g-ratio" als Maß der Myelindicke.**

**A** Der Quotient aus innerem (X) und äußerem (Y) Durchmesser der Myelinscheide wird als so genanntes "g-ratio" bezeichnet und dient als Maß für die Dicke des Myelins. Bei nicht ganz kreisrunden Myelinscheiden kann der Quotient aus innerem (roter Kreis) und äußerem (grüner Kreis) Umfang als ausreichendes Maß für das Verhältnis der Durchmesser gelten.

**B** Beispiel einer g-ratio-Bestimmung im histologischen Schnitt eines Ischiasnerven. Die Länge des äußeren und inneren Umfangs der Myelinscheide wird gemessen und das Verhältnis aus beiden berechnet.

Als drittes histologisches Kriterium der Krankheitsausprägung der CMT1A wurde die Dicke des verbliebenen Myelins bestimmt. Dazu wurde in 100x Vergrößerungen von Ischiasnerven der innere und der äußere Umfang der Myelinscheide von zufällig ausgewählten Axonen gemessen (Abbildung 11B). Der Quotient aus innerem und äußerem Umfang wurde gebildet. Dieser Quotient wird als g-ratio bezeichnet. Wenn kein Myelin vorhanden ist, ergibt das g-ratio den Wert 1,0. Dickeres Myelin bedeutet ein kleineres g-ratio. Das g-ratio variiert in einzelnen Nerven der Ratte. Als Standardwert für das g-ratio im gemischten Nerven der Ratte gilt ein g-

ratio von ca. 0,68 (Fahrenkamp und Friede 1987). Das g-ratio ist als Quotient aus zwei Längenangaben dimensionslos (Abbildung 11A).

## **2.2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.4.1 Isolation von DNA**

Zur Genotypisierung der gezüchteten Ratten in Wildtyp- oder transgene Tiere wurde genomische DNA der Tiere gewonnen. Mit Hilfe des „DNeasy 96 Kits“ wurde nach dem Protokoll des Herstellers genomische DNA aus den Schwanzbiopsien (s.o.) extrahiert. Die bei -20°C gelagerten Biopsien wurden aufgetaut und eine Mischung aus Puffer ATL (180µl) und Proteinase K (20µl) wurde zugegeben. Nach intensivem Mischen und einer kurzen Zentrifugation bei 3000 rpm in einer „Laboratory Zentrifuge 4K15“ erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 55°C die Lyse des Gewebes durch die Proteinase. Am nächsten Tag wurden 400µl Puffer AL/E zu den lysierten Proben gegeben. Nach Mischen und kurzer Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand (maximal 900 µl) auf die Silicamembran der DNeasy Säulchen pipettiert. Die DNeasy Platte wurde mit einem „Air Pore Tape Sheet“ verschlossen und 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Es folgten 500 µl Puffer AW1 und eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 6000 rpm. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW2 wurde wieder 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und die DNeasy Platte 15 min bei 70°C inkubiert. Zur Elution der DNA, die nun an die Silicamembran der Säulchen gebunden war, wurden 200 µl vorgewärmter Puffer AE auf die Säulchen gegeben, 5 min bei 60°C inkubiert und 2 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der gleiche Vorgang wurde mit weiteren 100 µl Puffer AE wiederholt. Die so eluierte genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

### **2.2.4.2 Isolation von RNA**

Für die Genexpressionsmessung wurde Gesamt-RNA aus Ischiasnerven mit Hilfe von TRIzol Reagenz (GibcoBRL) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Methode basiert auf der sauren Guanidiniumthiocyanat-RNA-Präparation (Chomczynski und Sacchi 1987). Die bei -80°C gelagerten Ischiasnerven (s.o.) wurden in ein 6ml Rundboden Falconröhrchen zusammen mit 1 ml TRIzol Reagenz gegeben und mit Hilfe eines Gewebehomogenisierers „Ultraturrax“ zerkleinert. Zwischen und vor den Homogenisierungen wurde das Gerät mit 1% SDS in DEPC-H<sub>2</sub>O und DEPC-H<sub>2</sub>O allein gespült. Das Homogenisat wurde in Portionen von je 0,5 ml in 2ml-Eppendorfgefäße aufgeteilt (weitere Mengenangaben pro Eppendorfgefäß) und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Chloroform wurden zugegeben und es wurde 15 Sekunden lang mit der Hand geschüttelt. Nach weiteren 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde in einer Tischzentrifuge 15 Minuten bei 4°C und 11'000 rpm zentrifugiert. Die entstandene obere, wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zufuhr von 250 µl Isopropanol wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 4°C und 11'000 rpm zentrifugiert. Durch diese Fällung bildete sich ein weißliches RNA-Präzipitat. Der Überstand wurde mit Transferpipetten abgesaugt und verworfen. Die RNA wurde mit 500 µl 75% Ethanol in DEPC- H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Zentrifugation mit 3'700 rpm für 5 min bei 4°C

wurde der Ethanolüberstand abgesaugt und verworfen. Das RNA-Präzipitat trocknete bei Raumtemperatur und geöffnetem Eppendorfgemäß 10 Minuten lang. Die gewonnene RNA wurde in DEPC-TE für 10 min bei 60°C gelöst und bei -80°C gelagert.

### 2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Lösung wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers durch Messung der Extinktion (optische Dichte / OD) bestimmt. Es wurde dabei die Extinktion einer Nukleinsäurelösung nach Verdünnung (1:1000) in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration ergibt sich nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz:

$$\text{Lambert-Beer-Gesetz: } E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

$E_{\lambda}$  = Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$

$\epsilon_{\lambda}$  = molarer Extinktionkoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$  in  $M^{-1}$

$c$  = Konzentration der Teilchen in der Lösung in mol/l

$d$  = Schichtdicke der durchstrahlten Lösung in cm

Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration lautet die abgeleitete Formel :

$$c = E_{260} \cdot k/d$$

$c$  = Konzentration der Nukleinsäure in  $\mu\text{g/ml}$

$E_{260}$  = Extinktion bei 260 nm

$d = 0,5$  cm (Dicke der verwendeten Quarzglas-Küvette)

$k$  = nukleinsäurespezifischer Koeffizient in  $\mu\text{g/ml}$

Wobei als Werte für  $k$  je nach untersuchter Nukleinsäureart eingesetzt werden:

dsDNA: 50  $\mu\text{g/ml}$

ssDNA: 33  $\mu\text{g/ml}$

RNA: 40  $\mu\text{g/ml}$

Mittels Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm, dem Absorptionsmaximum der meisten Proteine, ließ sich der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  berechnen. Mit diesem kann die Reinheit einer Nukleinsäurelösung beurteilt werden. In weiteren Versuchen wurden nur solche Nukleinsäurelösungen verwendet, deren  $E_{260}/E_{280}$ -Quotient zwischen 1,6 und 2,0 lag.

### 2.2.4.4 Analyse von RNA im Agilent Bioanalyzer

Neben der Konzentration ist die Integrität einer RNA für deren weitere Verwendung von großer Bedeutung. Hierzu wurde die gewonnene RNA im Agilent Bioanalyzer mit dem RNA 6000 Nano Assay untersucht. Das System basiert auf einer kapillären Elektrophorese auf einem Chip, daher werden nur sehr geringe Mengen Proben-RNA benötigt (Mueller et al. 2000). Durch den Vergleich des Laufmusters der RNA mit dem einer Standard-RNA lässt sich eine eventuelle Degradation oder eine Kontamination der RNA ausschließen. Beim Lauf durch das kapilläre Gel bindet die RNA einen fluoreszenten Farbstoff. Aus dem Vergleich der fluoreszenten Signalintensität der Proben-RNA mit der einer Referenz-RNA-Lösung (RNA-Leiter) bekannter Konzentration lässt sich die Konzentration der Proben-RNA bestimmen.

Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurde das Gel-Farbstoffgemisch für den Chip vorbereitet, indem 400  $\mu\text{l}$  RNA Gelmatrix durch ein Zentrifugenfilterröhrchen mit 2500 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert wurden. Nach Zugabe von 130  $\mu\text{l}$  RNA Farbstoff diente diese Gel-Farbstoff-Mischung als Grundlage für das kapilläre Gel. In einer Gelladestation



(Agilent Technologies) wurden 9 µl der Mischung eine Minute lang in die Kapillaren eines RNA-Chips gepresst und bildeten das Gel für die weitere Analyse. Nach Zugabe eines Nano Markers, der als Ausrichtungsreferenz des kapillären Gels diente, wurde die RNA-Leiter als RNA-Mengen- und Größenreferenz zugegeben. Es konnten 12 RNA-Proben pro Chip geladen und analysiert werden. Nur entsprechend dem Laufmuster nicht degradierte und nicht kontaminierte RNA-Proben wurden in den weiteren Versuchen verwendet.

#### 2.2.4.5 Die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA

Durch eine PCR ist es möglich, kleinste DNA-Mengen *in vitro* zu amplifizieren (Mullis et al. 1986). Das Prinzip dieser Reaktion basiert auf der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), die bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C ausgehend von sequenzspezifisch bindenden Oligonukleotiden (Primern) einen DNA-Strang komplementär zum denaturierten Matrizenstrang synthetisiert. Durch zyklisch ablaufende Reaktionsschritte von DNA-Denaturierung bei 95°C, Binden der Primer bei 56°C (Annealing) und Synthese der neuen DNA bei 72°C (Elongation) lassen sich spezifische DNA-Bereiche exponentiell vervielfachen.

Die Standard-PCR wurde zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts verwendet, der spezifisch für das transgene PMP22-Gen der Maus war (Abbildung 16A). Dadurch war eine Unterscheidung der Ratten in transgene und Wildtyp-Tiere möglich (Sereda et al. 1996). Für die Reaktionen wurde ein Reaktionskit (Promega) verwendet in einem Reaktionsvolumen von 50 µl pro DNA-Probe. Der Reaktionsansatz bestand aus:

- 1 µl Matrizen-DNA
- 5 µl 10x PCR-Puffer Promega
- 5 µl dNTPs (je Nukleotid f.c. 200 µM)
- 1 µl CPMP Forward-Primer (f.c. 300 nM)
- 1 µl CPMP Reverse-Primer (f.c. 300 nM)
- 0,3 µl Taq DNA-Polymerase (f.c. 1,6 U / 50 µl)

Die DNA-Amplifikation erfolgte nach folgendem Protokoll:

- 3 min – 95°C
  - 30 s – 56°C
  - 90 s – 72°C
  - 60 s – 95°C
  - 60 s – 55°C
  - 10 min – 72°C
- } 35 Zyklen

#### 2.2.4.6 Agarosegelelektrophorese von PCR Produkten

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen und sichtbar zu machen. Die Auftrennung erfolgte auf 0,7-4%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in 1x TAE Puffer zum Lösen aufgeköcht und nach Zusatz von Ethidiumbromid (f.c. 1 µg/ml) in eine Gelkammer gegossen. Verschiedene Gelkämme, die in

die Agarose ragten, formten beim Erstarren der Agarose Taschen im Gel. Das Gel wurde in einer Laufkammer platziert und mit 1x TAE Laufpuffer überdeckt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Es wurde eine Spannung zwischen 30-180 V (5-10V/cm) angelegt, abhängig von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente und Agarosekonzentration des Gels. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese nach der Elektrophorese auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert werden. Als Größenmarker dienten je nach Größe des untersuchten Fragments entweder 1 µg mit Hind III verdaute DNA des Bakteriophagen λ (0,5-23 kb) (Promega) oder 1 µg mit Hae III verdaute DNA des Phagen φX174 (70-1350 bp) (Promega).

#### 2.2.4.7 Synthese von cDNA durch reverse Transkription von RNA

Die Quantifizierung von RNA-Transkripten ist nach reverser Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) möglich. Die Inkorporation radioaktiver Nukleotide während der reversen Transkription erlaubt die Quantifizierung der Gesamtmenge der cDNA.

cDNA wurde mit dem Superscript-II-Kit (GibcoBRL) synthetisiert. Zu 2 µg isolierter RNA in einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 40 U RNase-Inhibitor RNasin gegeben und 100 pmol zufällige Nonamerprimer (random Nonamers). Nach Auffüllen auf 26 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O wurde 10 min bei 70°C inkubiert und die Probe danach 2 min auf Eis gestellt. Es folgten 8 µl 5x Erststrangpuffer, 10 µl 2,5 mM dNTP-mix und 4 µl 0,1 M DTT und eine fünfminütige Inkubation bei 42°C. Nach Zugabe von 1 µl (1 U) des Enzyms „Superscript II RT“ reverser Transkriptase und 0,3 µl P32-dCTPs wurde gemischt und 10 min bei 25°C inkubiert. Als weitere Temperaturschritte folgten 50 min bei 42°C, 15 min bei 70°C und ca. 5 min auf Eis. Durch Zugabe von 250 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 150 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1050 µl 100% Ethanol wurde ein Gesamtvolumen von 1500 µl erreicht, von dem 5 µl zur ersten Messung im Szintillationsmeßgerät entnommen wurden (s.u.). Nach 30 min bei -20°C zum Fällen der gewonnenen cDNA wurde 10 min auf 4°C bei 13'000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Präzipitat wurde zweimal mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen und anschließend 10 min in einer Trocknungszentrifuge getrocknet. Anschließend wurde es in 100 µl TE-Puffer gelöst, wovon 10 µl zur zweiten Messung im Szintillationsmeßgerät abgenommen wurden (s.u.).

Zur Bestimmung der Konzentration der radioaktiv markierten cDNA wurde die Aktivität für beide entnommenen Proben in einem Szintillationsmeßgerät als so genannte „Cerenkov-Counts“ (Schneider PB 1971) gemessen. Die Messung der ersten Probe diente als Maß für die Gesamtmenge eingesetzter Radioaktivität und die zweite Messung als ein Maß für die in der cDNA gebundene Radioaktivität. Das Verhältnis von „Counts nach der Reaktion“ zu „Counts vor der Reaktion“ entspricht dem Anteil inkorporierter Nukleotide von den Gesamtnukleotiden.

$$\text{Konzentration cDNA} = \frac{\text{inkorporierte Nukleotide}}{\text{Gesamtnukleotide}} \cdot \text{inges. Nukleotidmasse (in ng)}$$

$$\text{Konzentration cDNA} = \frac{\text{Counts nach Reaktion}}{\text{Counts vor Reaktion}} \cdot \text{inges. Nukleotidmasse (in ng)}$$

Da die Masse der eingesetzten Nukleotide und der Anteil der davon inkorporierten Nukleotide bekannt war, ließ sich die Masse der synthetisierten cDNA berechnen. Eine konstante Menge cDNA wurde zur Expressionsmessung in der quantitativen PCR eingesetzt.

#### 2.2.4.8 Quantitative TaqMan-RealTime-PCR

Bei der konventionellen PCR erfolgt der Nachweis der amplifizierten Zielsequenz durch Gel-elektrophorese des PCR Produktes. Die TaqMan-PCR erlaubt darüber hinaus eine Quantifizierung der vorhandenen DNA Transkripte. Das System macht sich die Spaltung fluorogener Sonden (TaqMan-Sonden) durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze (Holland et al. 1991).

Die TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (FAM oder TET; Fluoreszin-Derivate) und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (TAMRA; Rhodamin-Derivat) markiert. Der Quencherfarbstoff verhindert durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) bei räumlicher Nähe zum Reporterfarbstoff dessen Fluoreszenz (Lee et al. 1993), so dass eine intakte TaqMan-Sonde nicht fluoresziert (Abbildung 12A). Erst wenn ein spezifisches PCR-Produkt synthetisiert wird, spaltet die Taq-Polymerase die bereits an die DNA gebundene Sonde. Dadurch kommt es zur räumlichen Trennung beider Farbstoffe und ein Fluoreszenzsignal wird erzeugt. Durch kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensität während der PCR, lässt sich diejenige PCR-Zykluszahl bestimmen, bei der das Fluoreszenzsignal die zehnfache Standardabweichung der Grundaktivität überschreitet (Abbildung 12B). Diese Zykluszahl wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) definiert und ist umso kleiner, je größer die eingesetzte Menge an DNA-Zielsequenz war.

Neben dem zu quantifizierenden Gen wird ein so genanntes „Housekeeping-Gen“ amplifiziert. Dessen Expression wird als konstant in allen untersuchten Proben vorausgesetzt und dient als Maß für die Menge der eingesetzten DNA. Aus der Differenz zwischen dem Ct-Wert der Zielsequenz und dem Ct-Wert des Housekeeping-Gens wird der so genannte  $\Delta$ Ct-Wert berechnet.

$$\Delta\text{Ct-Wert}_{\text{Ziel / Kalibrator}} = \text{Ct}_{\text{Zielsequenz}} - \text{Ct}_{\text{Housekeeping}}$$

Eine der in der PCR amplifizierten Proben dient als relative Referenz (Kalibrator). Deren Expression wird als „1“ definiert. Nach der Formel

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Ziel}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$$

errechnet sich der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert. Dieser gibt die Ct-Wertdifferenz relativ zu einer gewählten Probe an, ergibt also den Unterschied zwischen  $\Delta$ Ct der gesuchten Probe ( $\Delta\text{Ct}_{\text{Ziel}}$ ) und dem  $\Delta$ Ct einer als relative Referenz gewählten Probe ( $\Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$ ). Aus diesem  $\Delta\Delta$ Ct-Wert kann die Expression des Zielgens berechnet werden nach der Formel:

$$\text{mRNA-Konzentration} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Die berechnete Konzentration wurde damit normalisiert auf ein „Housekeeping-Gen“ und ausgedrückt als ein Vielfaches der Expression einer beliebig gewählten Probe.

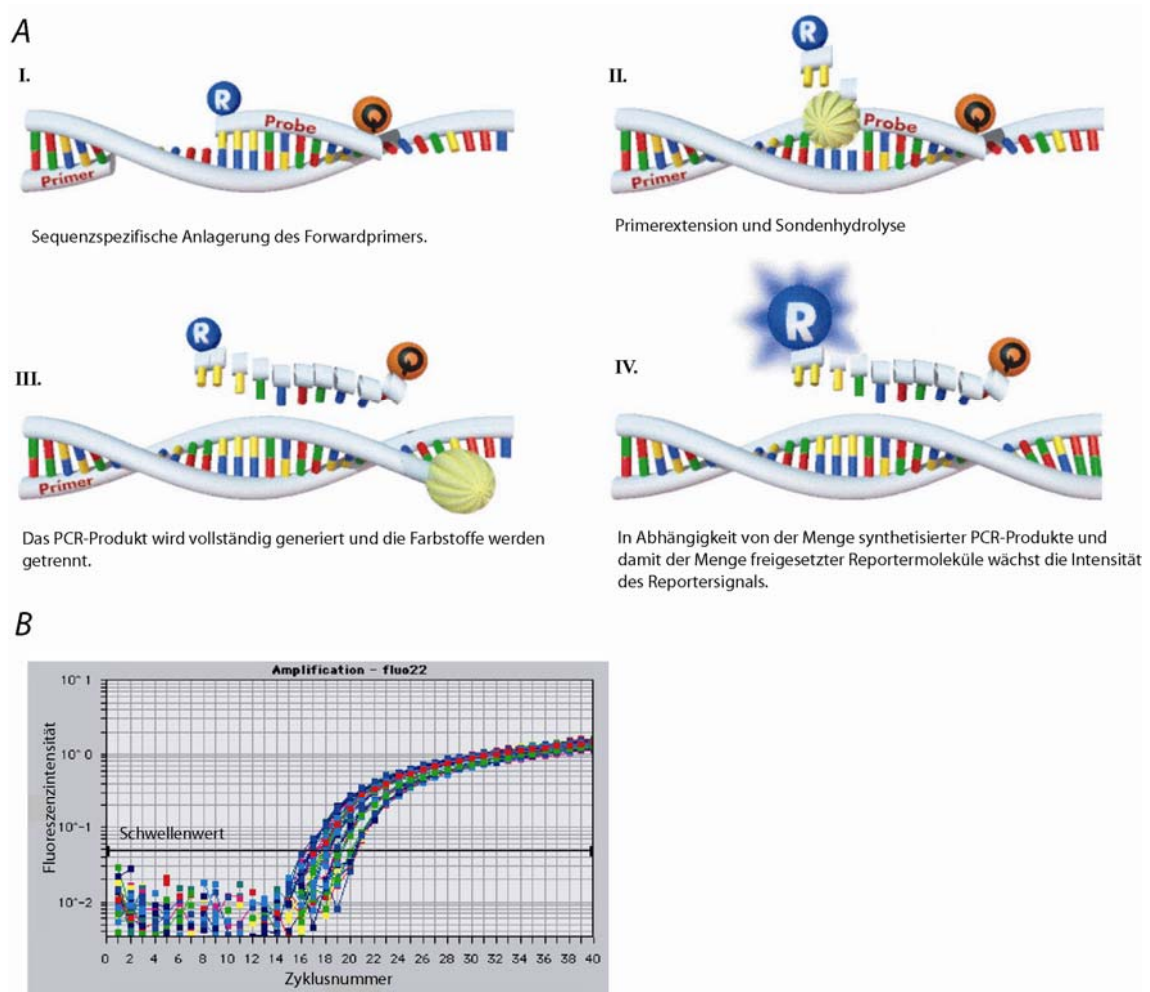
Für die Durchführung der TaqMan-PCR wurden

- 5 µl Mastermix (Eurogentec)
- 1 µl Forwardprimer (f.c. 900nM)
- 1 µl Reverseprimer (f.c. 900nM)
- 0,5 µl TaqMan-Probe (f.c. 250nM)
- 0,5 µl H<sub>2</sub>O
- 2 µl Proben cDNA

eingesetzt. Die Primer und die TaqMan-Sonde waren spezifisch für das zu untersuchende Gentranskript (s.o.). Für jede cDNA-Probe wurde eine Mischung der dreifachen Menge angesetzt und auf drei Reaktionsgefäße verteilt. Der Mittelwert der drei unabhängig gemessenen  $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurde für die weiteren Berechnung verwendet, um Schwankungen innerhalb einer PCR herauszumitteln. Alle quantitativen PCRs wurden zweimal durchgeführt und der Mittelwert der Expression beider Ergebnisse wurde für die weitere Interpretation verwendet. Für alle TaqMan-PCR-Reaktionen wurden folgende Zyklusbedingungen gewählt, die einer sogenannten Zwei-Schritt PCR entsprechen: Präinkubation für 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C zur Aktivierung der „HotStart AmpliTaq Gold Taq Polymerase“ gefolgt von 40 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt für 15 Sekunden bei 95°C und einem kombinierten Annealing- / Extensionsschritt für 60 Sekunden bei 60°C. Die Reaktion wurde im ABI PRISM 7700 Sequence Detector durchgeführt.

### **2.2.5 Statistische Methoden**

Alle in den Analysen erhobenen Daten wurden mit Excel 2000 weiterbearbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Statistica 6.0. Bei der Analyse der Expressionsdaten und der histologischen Ergebnisse wurden die Ergebnisse mit dem Student's t-test für unverbundene Stichproben auf Signifikanz geprüft. Für die Testung der statistischen Signifikanz der Phänotypanalysen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Abweichungen der Behandlungsgruppen von der Kontrollgruppe mit einem  $p < 0,05$  wurden jeweils als signifikant gewertet. Zur Überprüfung der Korrelationen auf Signifikanz wurde Spearman's Rang Korrelationstest verwendet, wobei ein  $p < 0,05$  als signifikant gewertet wurde.



**Abbildung 12: Die quantitative Real-Time PCR nach dem TaqMan-Prinzip**

**A** Schematische Darstellung des Reaktionsablaufs einer TaqMan-PCR. I.: Die mit Reporterfarbstoff (R) markierte, intakte Sonde emittiert bei räumlicher Nähe zum Quencher (Q) kein Signal. II. und III.: Nach Extension des Primers durch die Taq-Polymerase kommt es zur Hydrolyse der Sonde und zur räumlichen Trennung von Fluorogen und Quencher. IV.: Mit der Menge an PCR-Produkt steigt die Fluoreszenzintensität (Modifiziert nach Schild 1999, S. 5).

**B** Beispielhafte graphische Darstellung der Datenerfassung einer TaqMan-PCR. Während der ersten ca. 15 Zyklen bleibt die Intensität der Fluoreszenz unterhalb der Detektionsschwelle. Die Zyklusanzahl, bei welcher die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, wird als sogenannter Ct-Wert bezeichnet und ist ein Maß für Menge der vor der Reaktion vorhandenen cDNA.

## 3. Ergebnisse

### **3.1 Das transgene Rattenmodell der CMT1A**

Die Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1A wird durch eine genetisch bedingte Störung des Aufbaus der Myelinscheiden hervorgerufen. Ihr liegt ursächlich eine Duplikation des Gens des peripheren Myelin-Proteins von 22KDa (PM22) zugrunde. Da drei anstelle von zwei Allelen des Gens vorliegen, spricht man von einer Gendosiserkrankung. In den Schwanzzellen wird PM22 überexprimiert und führt zu einer Demyelinisierung, einem axonalen Verlust und zu einer Muskelatrophie. Tiermodelle der CMT1A helfen, deren molekulare Pathogenese zu verstehen und mögliche Therapien auf Wirksamkeit zu überprüfen.

Es wurden PMP22 transgen überexprimierende Mäuselinien (Huxley et al. 1996; Magyar et al. 1996; Huxley et al. 1998) und eine Rattenlinie (Sereda et al. 1996; Niemann et al. 1999) als Tiermodelle der CMT1A entwickelt. Tiermodelle mit einer geringen Überexpression von PMP22 weisen Symptome auf, die denen von CMT1A-Patienten vergleichbar sind (Huxley et al. 1998). Besonders stark überexprimierende Tiermodelle hingegen bilden fast kein Myelin (Magyar et al. 1996) und sind eher Modelle für das Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS).

Im Modell der PMP22 transgenen **Ratten** („CMT-Ratten“) kommt es bei einer 1,5-fachen Überexpression von PMP22 in Schwanzzellen zu einer Demyelinisierung (Sereda et al. 1996). Es folgen ein axonaler Verlust und eine distal betonte Muskelatrophie (Sereda et al. 1996). Dieser Ablauf ist der menschlichen CMT1A sehr ähnlich, so dass die CMT-Ratte für die Analyse des Pathomechanismus und die Evaluation neuer Therapieoptionen besonders geeignet ist. Das Progesteronsignalsystem ist ein bekannter Regulator der Myelinenexpression in Schwanzzellen *in vitro* und *in vivo*. Ziel dieser Arbeit war es, diesen möglichen Kandidaten einer Therapie der CMT1A im transgenen Rattenmodell der CMT1A auf Wirksamkeit zu überprüfen. Vor der Analyse der Steroidbehandlung in den CMT-Ratten wurde ihr Phänotyp durch verschiedene Testverfahren näher charakterisiert

#### **3.1.1 Beurteilung der CMT-Ratten durch den Stangentest**

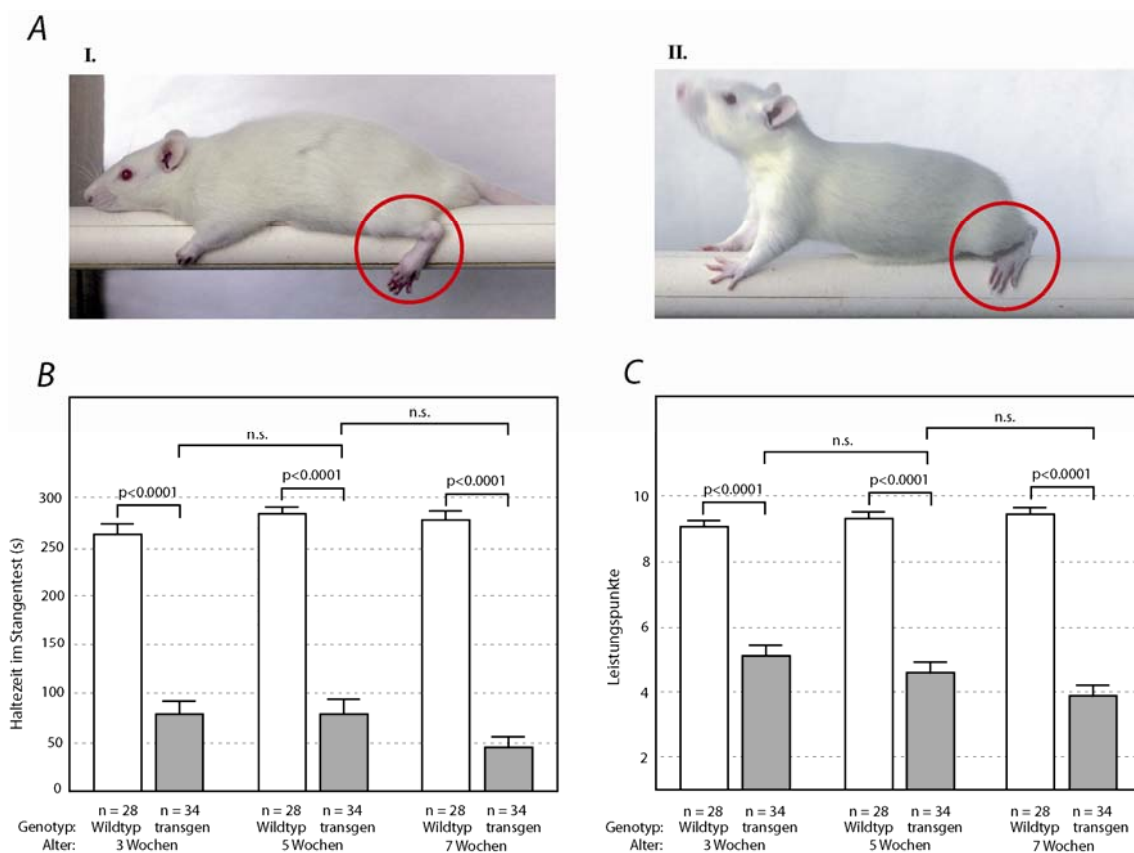
Der Phänotyp der CMT-Ratten wurde mit dem von Wildtyp-Ratten verglichen mit Hilfe des so genannten „Stangentests“, der geblindet und standardisiert durchgeführt wurde. Im Alter von drei, fünf und sieben Wochen wurden die Tiere auf eine runde Stange gesetzt und es wurde gemessen, wie viele Sekunden sie auf der Stange blieben (Abbildung 13A). Jedes Tier hatte sechs Versuche, sich für je maximal 300 Sekunden auf der Stange zu halten.

Wildtyp-Ratten erreichten in allen Alterstufen die maximale Zeit auf der Stange (Abbildung 13B). Nur einzelne Tiere hielten sich in einem der Versuche für weniger als 300 Sekunden, so dass die Schwankungsbreite innerhalb der Wildtypgruppe klein war. Im Altersvergleich von drei zu fünf und zu sieben Wochen nahm die durchschnittliche Haltezeit geringfügig zu (Abbildung 13B).

Die transgenen CMT-Ratten zeigten deutlich geringere Haltezeiten, die sich über den gesamten Skalenbereich (1 – 300 Sekunden) verteilten (Abbildung 13B). Maximale, aber auch minimale

Werte wurden von einzelnen Tieren erreicht, so dass die Schwankungsbreite innerhalb der transgenen Gruppe größer war als in der Wildtypgruppe. Im Durchschnitt erreichten CMT-Ratten geringere Haltezeiten als Wildtyp-Tiere. Im Altersverlauf nahm die Leistung der transgenen Ratten ab, was insbesondere von fünf zu sieben Wochen auffiel. Zum Beobachtungszeitpunkt fünf Wochen teilten sich die Transgenen in eine schwer und eine schwach betroffene Gruppe auf.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe des Stangentests Wildtyp- und transgene Tiere differenziert werden. Letztere zeigten kürzere Haltezeiten, eine größere interindividuelle Varianz und eine mit dem Alter abnehmende Leistung.



### Abbildung 13: Phänotyp der CMT-Ratten:

**A** Die maximale Haltezeit auf einer runden Stange wurde bei Ratten verschiedenen Genotyps und verschiedenen Alters gemessen. Während sich Wildtyp-Ratten nahezu beliebig lange halten konnten, fielen transgene Ratten nach gewisser Zeit von der Stange. In dieser Gruppe bestand eine deutliche interindividuelle Varianz des klinischen Phänotyps. Stark (I.), aber auch schwach betroffene transgene Tiere (II.) wurden beobachtet.

**B** Die durchschnittliche Haltezeit im Stangentest im Alter von drei, fünf und sieben Wochen ist dargestellt. CMT-Ratten zeigten durchgängig kürzere Haltezeiten bei größerer interindividueller Schwankungsbreite. Im Altersverlauf nahm ihre Leistung deutlich ab.

**C** Beim Punktesystem entsprach ein höherer Punktwert größerer Kraft und besserer Bewegungsfähigkeit. Der durchschnittliche Punktwert der CMT-Ratten lag deutlich unter dem der Wildtypen und nahm im Beobachtungszeitraum ab.

### **3.1.2 Beurteilung der CMT-Ratten durch das Punktesystem**

Die motorische Leistungsfähigkeit der CMT-Ratten wurde zusätzlich zum Stangentest durch ein Punktesystem bewertet (Tabelle 3). Auf einer Punkteskala von eins bis zehn entsprachen größere Zahlen mehr Leistung. Die Punkte wurden geblindet, standardisiert und vom gleichen Beobachter verteilt im Alter von drei, fünf und sieben Wochen. Die Ergebnisse waren denen im Stangentest ähnlich.

Fast alle Wildtyp-Tiere erreichten an den drei Untersuchungszeitpunkten die beiden höchsten möglichen Punktwerte von neun und zehn. Die interindividuellen Unterschiede waren gering. Mit zunehmendem Alter nahmen die Werte leicht zu.

Die transgenen Ratten zeigten eine breite Streuung des klinischen Phänotyps. Maximale, aber auch minimale Werte traten auf (Abbildung 13C). Der durchschnittliche Punktwert der transgenen Gruppe war im Vergleich zu Wildtyp-Tieren geringer. Im Verlauf von drei zu fünf und zu sieben Wochen nahm dieser ab. Die Zweiteilung der Gruppe in schwach und stark betroffene Tiere war weniger offensichtlich als beim Stangentest.

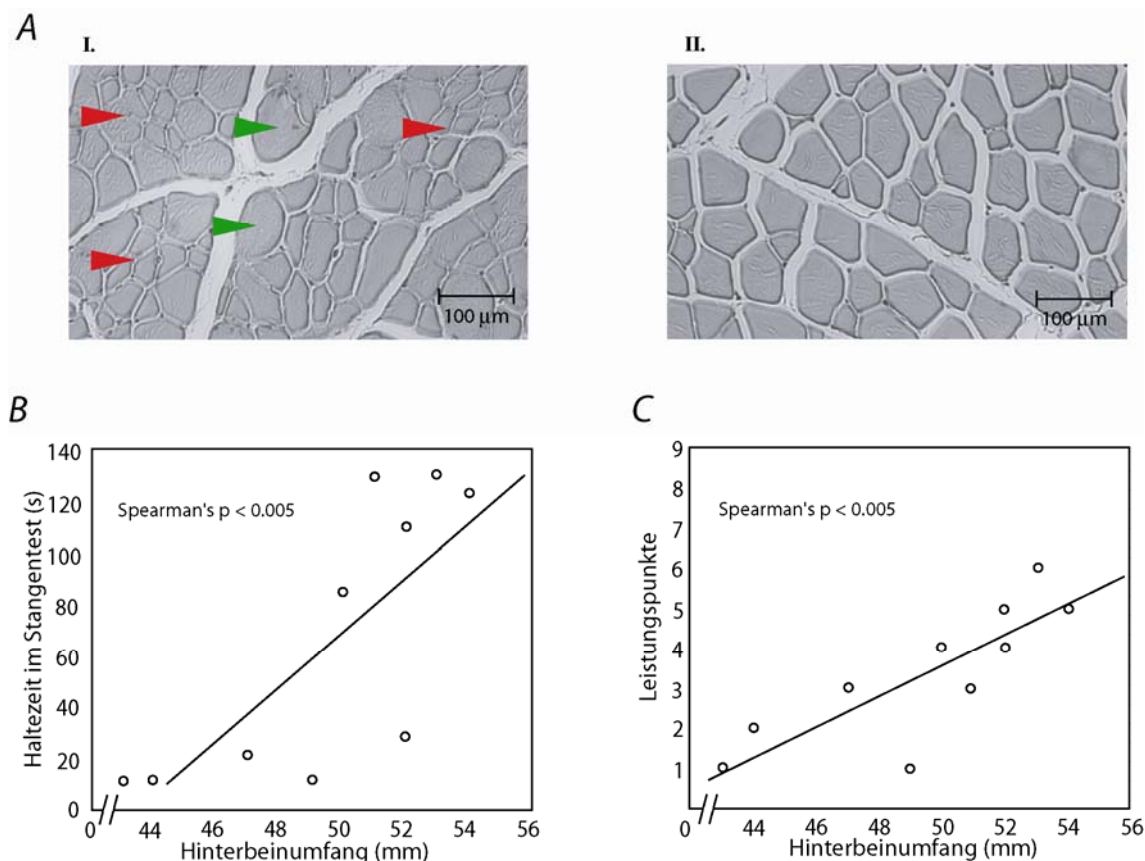
Zusammenfassend demonstrierte das klinische Punktesystem eine schlechtere und abnehmende körperliche Leistungsfähigkeit der transgenen Tiere bei großer Schwankungsbreite innerhalb dieser Gruppe.

### **3.1.3 Variable Muskelatrophie der CMT-Ratten**

Die Muskelatrophie ist ein prominentes Merkmal der menschlichen CMT1A. Daher wurde auch die Muskulatur der CMT-Ratten histologisch untersucht. Transgene Ratten zeigten eine neurogene Muskelatrophie, wobei eine Vielzahl kleiner und atrophierter Muskelfasern einige hypertrophierte Fasern umgab (Abbildung 14A). Diese histologischen Merkmale der CMT1A variierten interindividuell. Die Muskelatrophie war in einzelnen Versuchstieren deutlich ausgeprägt (Abbildung 14Ai.), während sie in anderen nur geringgradig imponierte (Abbildung 14A ii.).

CMT-Ratten mit schlechten Phänotypdaten hatten auch eine histologisch stark atrophie Muskulatur. Umgekehrt erschien die Atrophie gering ausgebildet in klinisch leistungsfähigen Tieren. Die Muskelatrophie korrelierte also mit dem klinischen Phänotyp. Um diesen Zusammenhang auch zu quantifizieren, wurde der Hinterbeinumfang stellvertretend für die gesamte Muskelmasse einzelner transgener Tiere ( $n = 10$ ) gemessen. Sowohl die Ergebnisse des Stangentests ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,005$ ), als auch des Punktwertes ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,005$ ) korrelierten signifikant mit dem gemessenen Hinterbeinumfang (Abbildung 14B, C). Bei schlechten Phänotypwerten kann somit von einer starken Muskelatrophie ausgegangen werden und umgekehrt.





#### Abbildung 14: Muskelatrophie der CMT-Ratten:

**A** Die Muskulatur der Hinterbeine klinisch stark betroffener CMT-Ratten zeigt eine neurogene Muskelatrophie (I). Gruppen atrophierter Muskelfasern (rote Pfeile) liegen neben hypertrophierten Fasern (grüne Pfeile). Ein klinisch schwach betroffenes Tier zeigt histologisch keine Muskelatrophie (II).

**B** Zur Beurteilung der Muskelatrophie wurde der Hinterbeinumfang von CMT-Ratten gemessen. Dieser zeigte eine interindividuelle Schwankung und korrelierte mit der Haltezeit im Stangentest.

**C** Der Hinterbeinumfang korrelierte signifikant mit den Ergebnissen des klinischen Punktesystems.

### 3.1.4 Variable Demyelinisierung der CMT-Ratten

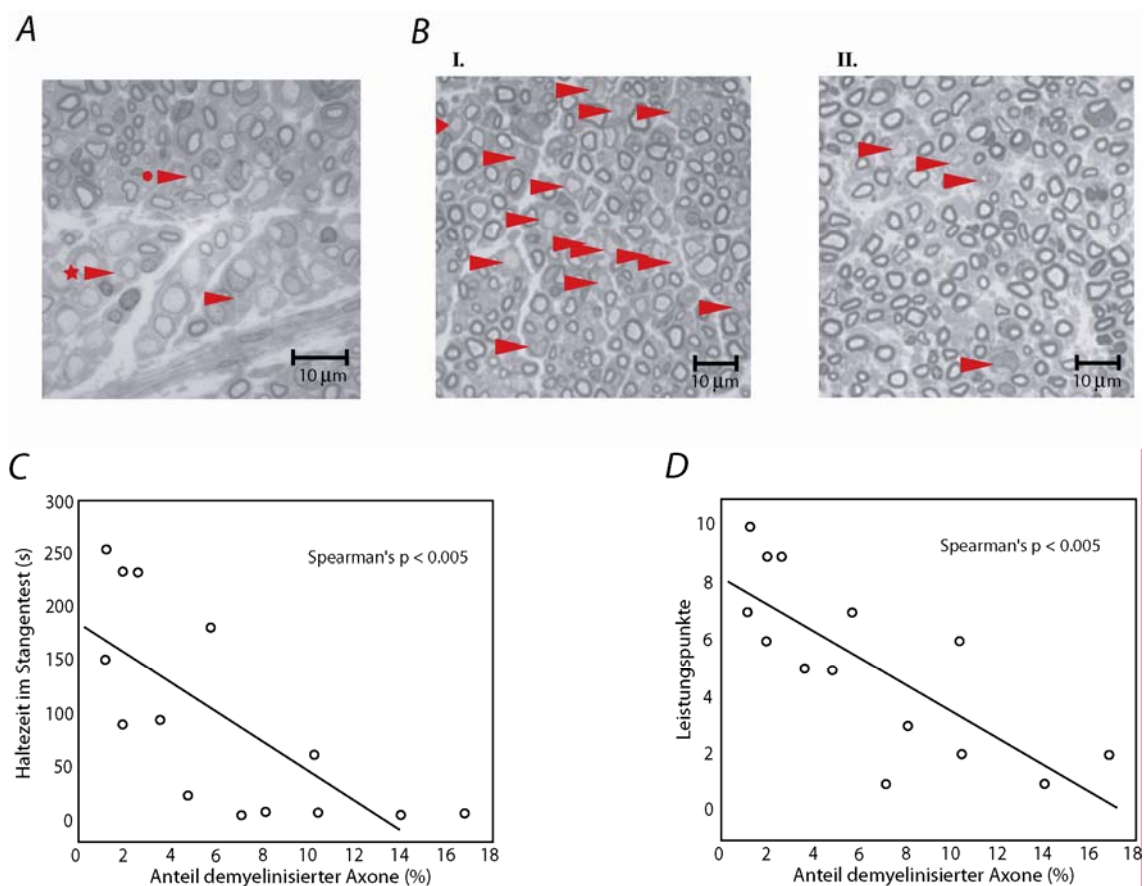
Die menschliche CMT1A ist eine demyelinisierende Neuropathie. Histologisch fallen dünneres oder gänzlich fehlendes Myelin und so genannte „Zwiebelschalenformationen“ auf. Der axonale Schaden und die Muskelatrophie sind Folgen des Myelindefekts. Daher wurden auch die peripheren Nerven von CMT-Ratten histologisch analysiert.

Diese Nerven zeigen eine demyelinisierende Neuropathie mit unphysiologischerweise demyelinisierten Axonen (Abbildung 15A, Stern) neben normal myelinisierten Axonen (Abbildung 15A, Kreis). Die histologischen Charakteristika variierten erheblich zwischen einzelnen Tieren. Eine schwere Demyelinisierung (Abbildung 15B i.), aber auch ein den Wildtypen ähnlicher Phänotyp (Abbildung 15B ii.) kamen vor.

Auch die Demyelinisierung ließ sich in Zusammenhang bringen mit dem klinischen Phänotyp der CMT-Ratten. Dazu wurde der Prozentsatz demyelinisierter Axone in den Ischiasnerven

transgener Ratten ( $n = 14$ ) bestimmt. Zwischen zwei und siebzehn Prozent aller Axone der Nerven waren demyelinisiert. Es ergab sich eine signifikante Korrelation ( $r = -0,75$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen der Leistung im Stangentest und dem Grad der Demyelinisierung (Abbildung 15C). Auch die Werte des klinischen Punktesystems ließen sich signifikant mit der Demyelinisierung korrelieren ( $r = -0,82$ ;  $p < 0,001$ ) (Abbildung 15D).

Zusammenfassend ließen sich die histologischen Merkmale der CMT1A im PNS von CMT-Ratten mit großer interindividueller Varianz nachweisen und sie korrelierten mit dem Phänotyp.



### Abbildung 15: Demyelinisierende Neuropathie der CMT-Ratten.

**A** Demyelinisierende Neuropathie im peripheren Nerven von CMT-Ratten. Charakteristika sind demyelinisierte Axone (Pfeil) und so genannte "Zwiebelschalenformationen" (Stern) neben normal myelinisierten Axonen (Kreis).

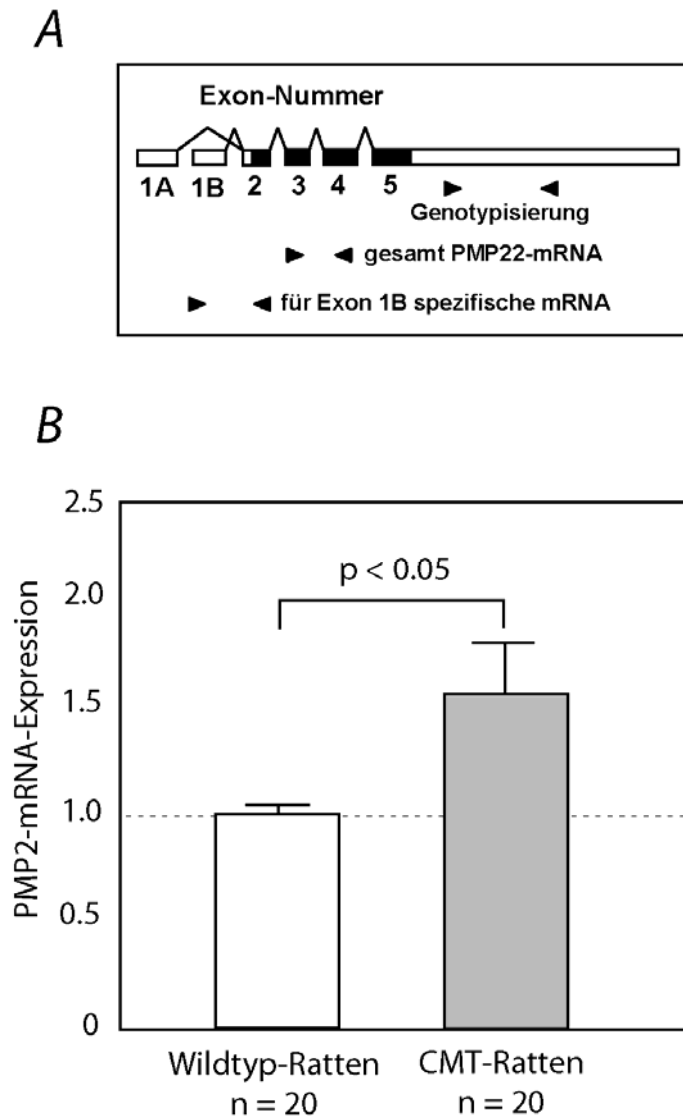
**B** Die Demyelinisierung ist unterschiedlich stark ausgeprägt in einzelnen CMT-Ratten. Periphere Nerven klinisch stark betroffener Tiere zeigen eine Vielzahl demyelinisierter Axone (I.), während diese in klinisch leistungsfähigen Ratten selten sind (II.).

**C** Die Varianz der Demyelinisierung steht in Zusammenhang mit dem klinischen Phänotyp der CMT1A. Die Haltezeit im Stangentest korreliert signifikant mit dem Anteil demyelinisierter Axone.

**D** Die Ergebnisse des Punktesystems korrelieren signifikant mit dem Anteil demyelinisierter Axone.

### 3.1.5 PMP22-Expression im peripheren Nervensystem

Der menschlichen CMT1A liegt eine mRNA-Überexpression des PMP22-Gens zugrunde. Das Rattenmodell der CMT1A überexprimiert PMP22 als Transgen mit einer relativ großen Schwankung zwischen einzelnen Individuen (Sereda et al. 1996), wobei Expression und klinischer Phänotyp korrelieren (Abbildung 5). Die Expression von PMP22 wurde mit Hilfe einer „Realtime-PCR“ nach dem TaqMan-System gemessen (Abbildung 16A) und diese Ergebnisse mit den vorbeschriebenen verglichen.



**Abbildung 16: Myelinenexpression im PNS von CMT-Ratten:**

**A** Schematische Darstellung der Exon- / Intronstruktur des PMP22-Gens. In schwarz die translatierte Region. Die ersten beiden untranslatierten Exone bilden die Grundlage für die gewebsspezifischen mRNA-Transkripte von PMP22. Die durch schwarze Pfeile markierte PCR-Strategie unterscheidet zwischen gesamt und Exon-1B spezifischen PMP22-Transkripten.

**B** Die PMP22-mRNA-Expression von heterozygoten CMT-Ratten wurde im Vergleich zu Wildtyp-Ratten gemessen. CMT-Ratten überexprimierten PMP22 ca. 1,6-fach. Die PMP22-Expression schwankte in der transgenen Gruppe stärker als in der Wildtyp-Gruppe.

Zum Vergleich zwischen Wildtyp- und transgenen Ratten wurde die PMP22-Expression relativ zur Menge von  $\beta$ -Actin mRNA gemessen. Die  $\beta$ -Actin Expression wurde in den einzelnen Tieren als konstant vorausgesetzt und diente als so genanntes „Housekeeping“-Gen. CMT-Ratten ( $n = 20$ ) zeigten eine ungefähr 1,6-fach höhere PMP22-mRNA-Expression als Wildtyp-Ratten ( $n = 20$ ) (Abbildung 16B). Anders als in der homogenen Wildtypgruppe bestanden relativ große interindividuelle Unterschiede in der PMP22-Expression zwischen einzelnen transgenen Tieren. Der PMP22-Expressionsunterschied war nicht in allen transgenen Tieren gegeben, aber statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 16B).

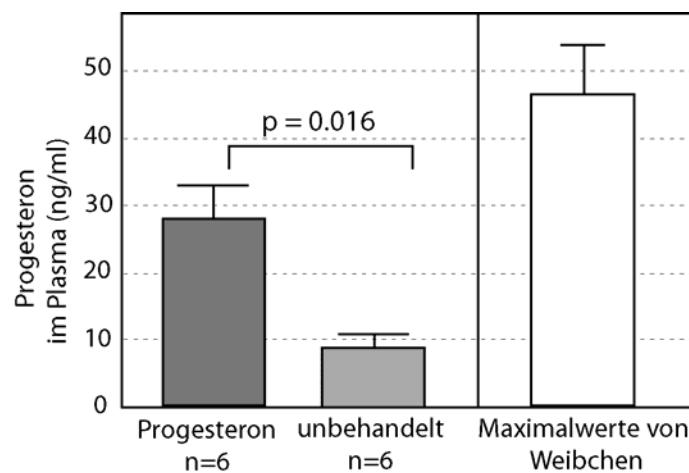
## **3.2 Behandlung von CMT-Ratten mit Steroiden**

Die PMP22-Überexpression in den Schwanzzellen der CMT-Ratten verursacht den CMT1A-ähnlichen Phänotyp. Eine mögliche Therapie der Erkrankung sollte auf die Modulation der PMP22-Expression ausgerichtet sein. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurde eine vermehrte PMP22-Expression durch Zufuhr des so genannten „Neurosteroids“ Progesteron gezeigt. Daher wurde untersucht, ob Progesteron und der selektive Progesteronantagonist „Onapriston“ die PMP22-Expression und damit die Neuropathie der CMT-Ratten gegenläufig beeinflussen können.

### ***3.2.1 Behandlung mit Progesteron und Onapriston***

Männliche CMT-Ratten ( $n = 84$ ) wurden randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt und vom fünften postnatalen Tag an 44 Tage lang mit entweder Progesteron ( $n = 31$ ), Onapriston ( $n = 18$ ) oder der Injektionslösung Sesamöl ( $n = 35$ ) behandelt (Abbildung 9).

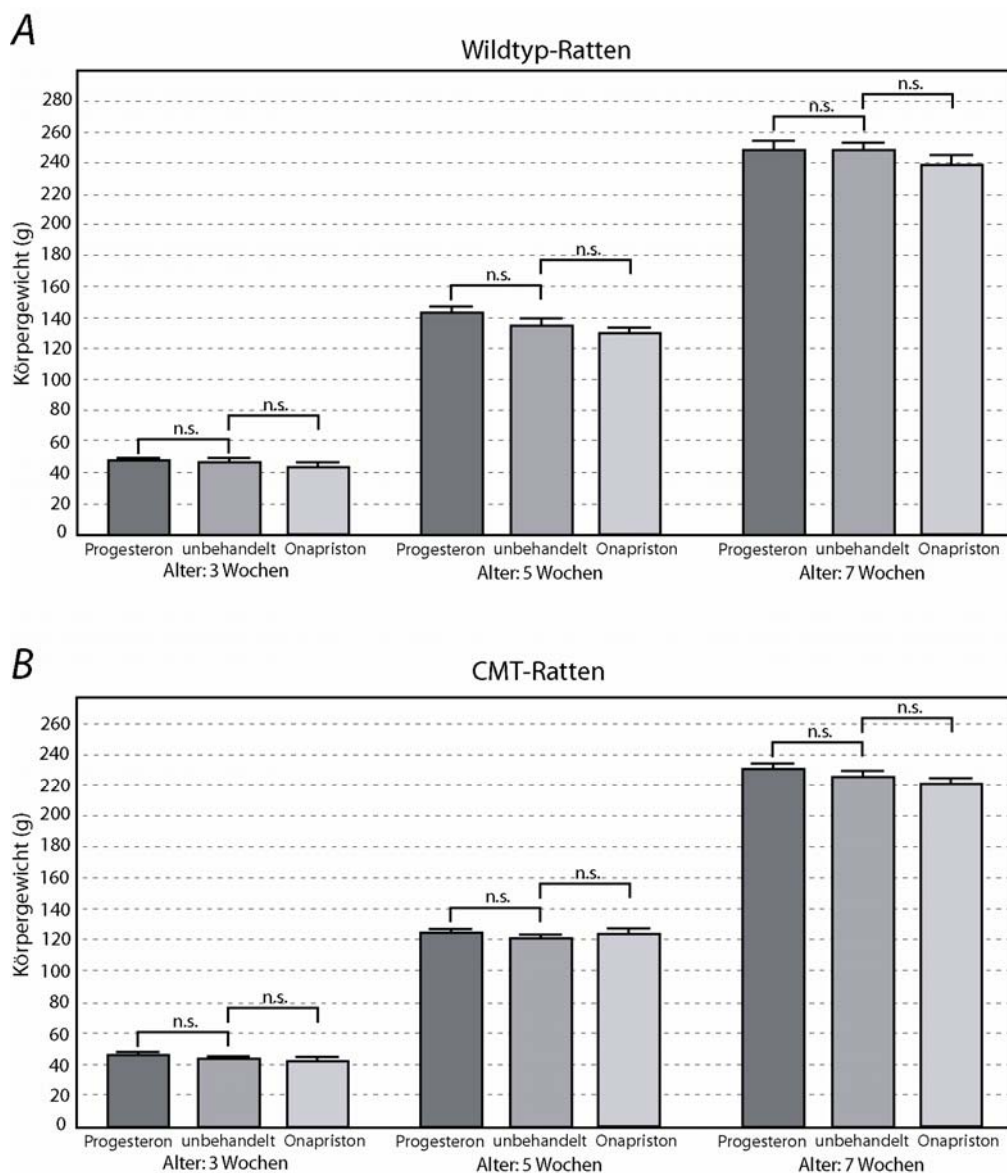
Nach fast siebenwöchiger subkutaner Injektion von Progesteron wurde den CMT-Ratten 24 Stunden nach der letzten Injektion Blut abgenommen. Die Konzentration von Progesteron im Blut wurde mit Hilfe eines „Radioimmunoassays“ bestimmt. Im Blut der mit Sesamöl allein behandelten Ratten ( $n = 6$ ) wurde eine durchschnittliche Konzentration von 8,9 ng/ml Progesteron gefunden. Das Blut der mit Progesteron behandelten Ratten ( $n = 6$ ) zeigte mit durchschnittlich 27,7 ng/ml eine deutlich höhere Konzentration (Abbildung 17). Dieser Unterschied war auch für jedes einzelne Tier gegeben und statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 17: Progesteronkonzentration im Plasma Progesteron-behandelter Ratten**

**Abbildung 17 (fortgesetzt):** Nach siebenwöchiger subkutaner Injektion von Progesteron wurde deutlich mehr Progesteron im Plasma behandelter Tiere gemessen. Die absolute Spitzenkonzentration war vergleichbar mit der, die im Verlauf des Zyklus weiblicher Ratten erreicht wird.

Das Gewicht der Tiere wurde täglich gemessen und notiert. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt veränderte die Behandlung mit Steroidhormonen das Körpergewicht der CMT-Ratten signifikant im Vergleich zu den mit Sesamöl behandelten transgenen Kontrolltieren (Abbildung 18B). Auch die identisch behandelten Wildtyp-Ratten veränderten ihr Gewicht durch die Steroidbehandlung nicht signifikant (Abbildung 18A). Keine sonstigen toxischen Wirkungen der Steroide waren an den CMT-Ratten oder an den Wildtyp-Ratten erkennbar. Der Phänotyp der Wildtyp-Ratten und ihre Leistung im Stangentest oder dem klinischen Punktesystem waren nicht verändert (keine Abbildung).



**Abbildung 18: Körpergewicht der Versuchstiere nach Steroidbehandlung**

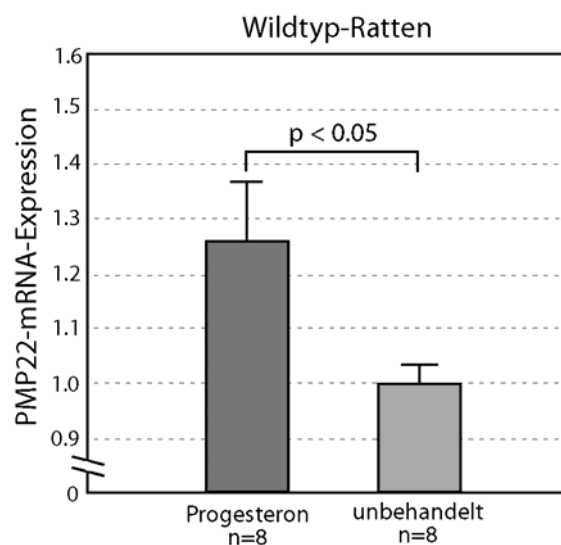
**A** Das Gewicht der Wildtyp-Ratten wurde durch die Steroidbehandlung nicht signifikant verändert. Wildtyp-Ratten hatten ein höheres Gewicht als die CMT-Ratten.

**B** Das Gewicht von CMT-Ratten unterschied sich bei verschiedenen Altersstufen nicht signifikant zwischen den Behandlungsgruppen.

### 3.2.2 Myelingenexpression nach Steroidbehandlung

Die PMP22-Expression im peripheren Nerven nach Steroidbehandlung wurde gemessen. Dazu wurde eine „Realtime-PCR“ nach dem TaqMan-Prinzip etabliert. Als „Housekeeping“-Gen diente das Exon 1B des PMP22-Gens. Dieses wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und ist damit nicht Schwanzzell-spezifisch. Die Expression des Exon 1B wird nicht durch Steroidhormone moduliert (Desarnaud et al. 1998).

Eine siebenwöchige Behandlung von Wildtyp-Ratten ( $n = 8$ ) mit Progesteron führte zu einer um ca. 25% erhöhten Expression von PMP22 ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Ratten ( $n = 8$ ) (Abbildung 19). Progesteron erhöhte somit die PMP22-Expression im Nervensystem von „normalen“ Ratten.

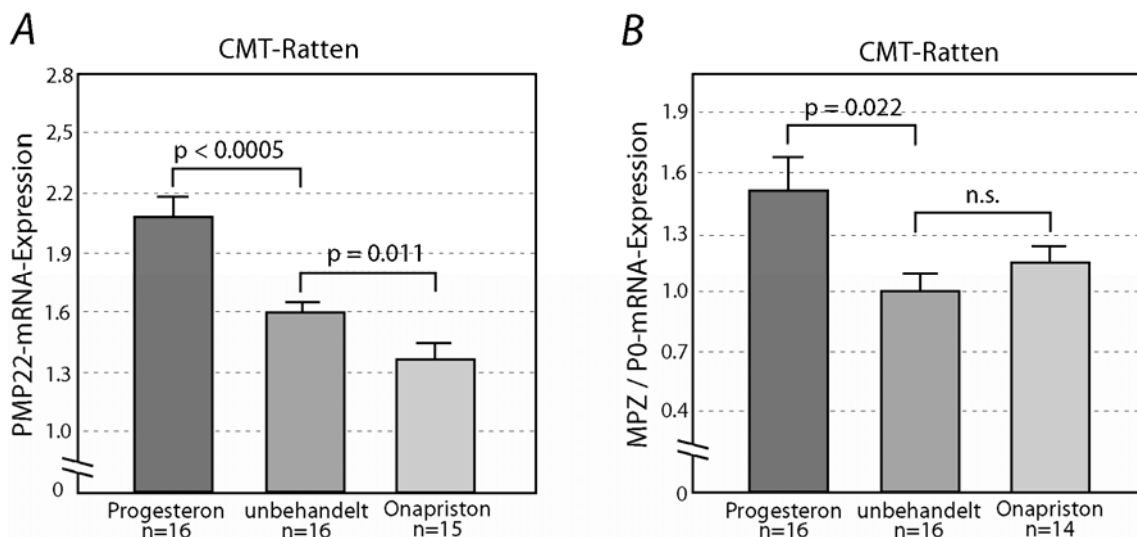


**Abbildung 19: Erhöhte Wildtyp-PMP22-Expression nach Progesteronbehandlung**

Nach diesen Vorergebnissen wurde die PMP22-Expression im peripheren Nerven von transgenen Ratten untersucht. Nach siebenwöchiger Behandlung mit Progesteron zeigten CMT-Ratten ( $n = 16$ ) eine um ca. 30% erhöhte PMP22-Expression im Vergleich zu Sesamöl behandelten CMT-Ratten ( $n = 16$ ) (Abbildung 20A). Dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,0005$ ). Die PMP22-Expression von CMT-Ratten, die sieben Wochen lang mit Onapriston behandelt worden waren ( $n = 16$ ), lag um ca. 15% unter der der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 20A). Trotz der relativ großen Schwankungen, ließ sich die PMP22-Expression im peripheren Nervensystem von CMT-Ratten durch Steroidhormone signifikant modulieren. Progesteron erhöhte die PMP22-Expression und Onapriston senkte sie.

Auch die Expression des Myelinproteins MPZ / P0 („Myelin Protein Zero“) wurde nach Steroidbehandlung im peripheren Nervensystem quantifiziert, da MPZ / P0 ähnlich dem PMP22 reguliert wird. Die Zufuhr von Progesteron ( $n = 16$ ) steigerte die Expression von MPZ / P0 um 50% im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 20B). Die mit Onapriston behandelten Tiere ( $n = 16$ ) zeigten keine signifikant veränderte MPZ / P0-Expression (Abbildung 20B). Das Exon 1B des PMP22-Gens diente auch hier als interner Standard.

Zusammenfassend ließ sich die Myelingenexpression im PNS durch Zufuhr von Steroidhormonen modulieren. Das krankheitsverursachende Gen des PMP22 wird dabei gegenläufig beeinflusst: Progesteron erhöht seine Expression und Onapriston verringert sie. Das nur sekundär, aber nicht kausal an der Erkrankung beteiligte Gen des MPZ / P0 wird nur nach Progesteronzufuhr vermehrt exprimiert. Die Blockade der Progesteronrezeptoren durch Onapriston beeinflusst seine Expression nicht.



**Abbildung 20: Myelingenexpression nach Behandlung mit Steroidhormonen.**

**A** In den CMT-Ratten wurde die 1,6-fache Überexpression (siehe Abbildung 16B) als Ausgangsexpression der unbehandelten Gruppe definiert. Die Behandlung mit Progesteron führte zu einer um ca. 30% höheren Überexpression von PMP22. Onapriston verringerte die Überexpression von PMP22 um ca. 20%.

**B** Die Expression des Myelinproteins MPZ / P0 nicht behandelter CMT-Ratten wurde als 1.0 definiert. Progesteronbehandlung erhöhte die Expression von MPZ / P0 um 50%. Die Zufuhr von Onapriston hatte keinen signifikanten Effekt auf die MPZ / P0-Expression.

### 3.2.3 Histologie der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung

Verschiedene Merkmale sind typisch für die CMT1A. Im peripheren Nerven kommt es zu Demyelinisierung und axonalem Verlust. Der Einfluss der Steroidbehandlung auf diese histologischen Charakteristika wurde untersucht.

Die Dicke des verbliebenen Myelins in den Ischiasnerven behandelter CMT-Ratten wurde bestimmt. Dazu wurden im histologischen Bild der innere und der äußere Umfang der Myelinscheide zufällig ausgewählter Axonen gemessen (Abbildung 21A). Der Quotient aus innerem und äußerem Umfang wurde gebildet: das so genannte „g-ratio“. Ist kein Myelin vorhanden, ergibt das g-ratio den Wert 1,0. Dickeres Myelin bedeutet ein kleineres g-ratio und umgekehrt (Abbildung 11A, B).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 6) zeigten die mit Progesteron behandelten CMT-Ratten (n = 4) eine signifikant (p < 0,001) dünnere Myelinscheide, beziehungsweise ein höheres g-ratio (Abbildung 21B). Die Schwankungsbreite innerhalb dieser Gruppe war deutlich geringer als in den beiden anderen. Die mit Onapriston behandelten CMT-Ratten (n = 5) wiesen keine

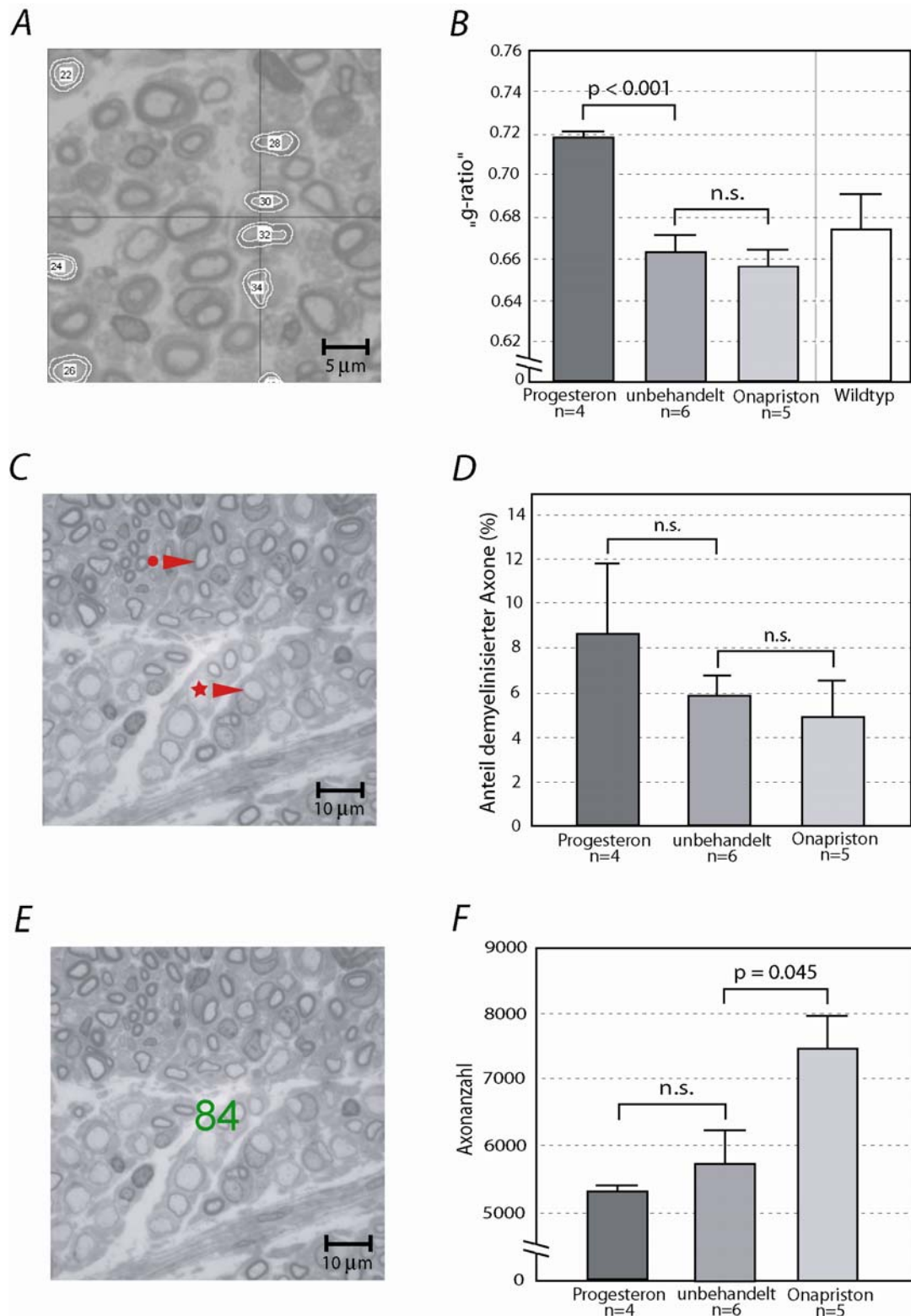
signifikante Veränderung der Myelindicke relativ zu den Kontrollen (n=6) auf. Die Progesteronbehandlung veränderte die Myelindicke der CMT-Ratten, während Onapriston keinen Einfluss hatte.

Neben der Dicke des verbliebenen Myelins wurde der Anteil pathologischerweise nicht myelinisierter Axone gezählt. Dies waren Axone, die ihrer Größe nach eine Myelinscheide erwarten ließen bei einem Durchmesser von mehr als 1 µm, aber nur von Schwannzellfortsätzen und nicht von einer Myelinscheide umgeben waren (Abbildung 21C, Stern). Aus dem Verhältnis von gesamt Axonen zu demyelinisierten Axonen wurde der Prozentsatz der demyelinisierten Axone bestimmt.

Es bestanden deutliche Unterschiede im Prozentsatz demyelinisierter Axone, der zwischen 1,2% und 16,9% variierte (Abbildung 21D). In den Nerven der mit Progesteron behandelten Tiere (n = 4) waren prozentual mehr Axone demyelinisiert als in der Kontrollgruppe (n = 5). Die Onapristontiere (n = 5) zeigten weniger Demyelinisierung (Abbildung 21D). Ein Trend war erkennbar, aber diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Als drittes histologisches Merkmal der CMT1A wurde die Gesamtzahl aller Axone der Ischiasnerven nach Steroidbehandlung untersucht. Es wurden Axone mit einem Durchmesser von über 1 µm gezählt, die der Größe nach physiologischerweise eine Myelinisierung erwarten ließen. (Abbildung 21E). Die Anzahl der Axone variierte zwischen ca. 5000 bis 8000 und unterschied sich nicht signifikant zwischen Progesteron- (n = 4) und Kontrollgruppe (n = 6) (Abbildung 21F). Die mit Onapriston behandelten Tiere (n = 5) zeigten jedoch eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Axonanzahl im Ischiasnerven als die Kontrolltiere (n = 6) (Abbildung 21F).





**Abbildung 21: Histologische Charakteristika der CMT1A nach Steroidbehandlung.**

**A** Die durchschnittliche Dicke des Myelins in den Nerven von CMT-Ratten wurde als so genanntes „g-ratio“ gemessen (siehe 2.2.3.6). Dazu wurde der Quotient aus innerem und äußerem Umfang von zufällig ausgesuchten Myelinscheiden bestimmt. Höheres „g-ratio“ (bis zu 0,72) entspricht einem dünneren Myelin und umgekehrt.

**B** Die „g-ratios“ steroidbehandelter CMT-Ratten sind dargestellt. Das Myelin der Progesterongruppe war signifikant dünner als das der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit Onapriston hatte keine veränderte Myelindicke zur Folge.

**C** Die unphysiologischerweise unmyelinisierten Axone (Stern) wurden gezählt und mit der Anzahl der myelinisierten Axone (Kreis) in Verhältnis gesetzt.

**Abbildung 21 (fortgesetzt):**

**D** Der Anteil demyelinisierter Axone unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen

**E** Die gesamte Axonanzahl im Ischiasnerven behandelte CMT-Ratten wurde bestimmt. Eine beispielhafte Nervenregion ist dargestellt.

**F** Die Axonanzahl auf definierter Höhe im Ischiasnerven von CMT-Ratten variierte zwischen 5000 und 8000 Axonen. Die Progesterongruppe unterschied sich nicht signifikant von der unbehandelten Kontrollgruppe. In den Nerven Onapriston behandelte Ratten waren signifikant mehr Axone vorhanden.

### **3.2.4 Phänotyp der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung**

Die Steroidzufuhr veränderte die PMP22-Expression und die Nervenpathologie der CMT-Ratten. Mit Hilfe der etablierten Testverfahren (s.o.) wurde überprüft, inwieweit dies auch den CMT1A-ähnlichen Phänotyp beeinflusste. Die CMT-Ratten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während ihrer Behandlung mit Hilfe des Stangentests und des klinischen Punktesystems beurteilt (Abbildung 9).

#### **3.2.4.1 Der Stangentest**

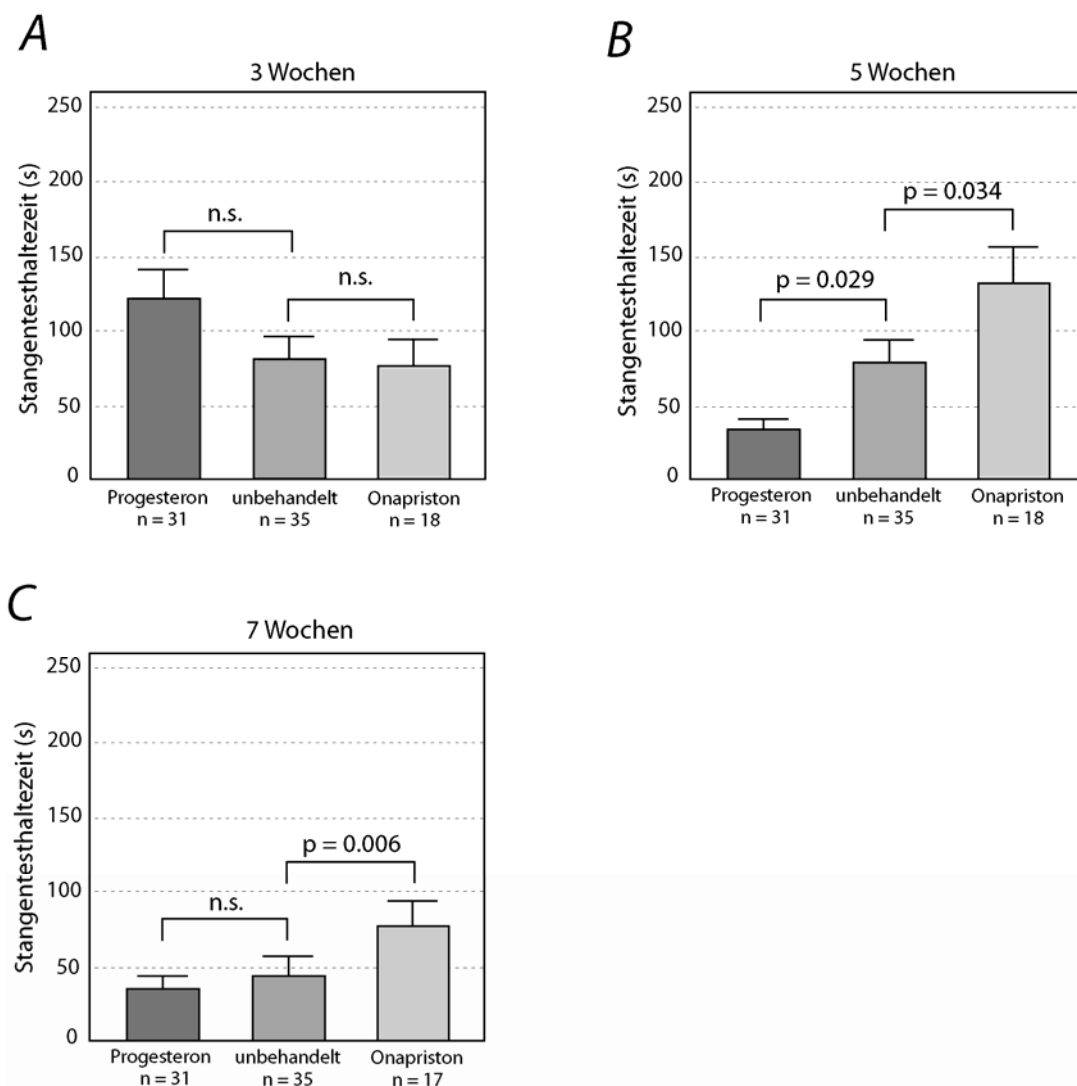
Im Alter von drei Wochen, also nach 16 Tagen Behandlung, unterschied sich die Leistung im Stangentest nicht signifikant zwischen den drei Untersuchungsgruppen (Abbildung 22A). In allen Gruppen schwankte die Haltezeit stark. Maximale, aber auch minimale Leistungswerte wurden von einzelnen Tieren erreicht. Die mit Progesteron behandelte Ratten zeigten eine leichte Tendenz zu höheren Leistungswerten.

Beim Stangentest nach weiteren zwei Wochen, also im Alter von fünf Wochen, lag die Leistung der mit Progesteron behandelte Gruppe ( $n = 31$ ) deutlich und signifikant ( $p < 0,05$ ) unter der der Kontrollgruppe ( $n = 35$ ) (Abbildung 22B). Dabei war sowohl die durchschnittlich erreichte Zeit, als auch die maximal von einem Tier der Gruppe erreichte Zeit geringer als in den Kontrollen.

Die mit Onapriston behandelte CMT-Ratten ( $n = 18$ ) erreichten zu diesem Zeitpunkt eine durchschnittlich höhere Leistung im Stangentest ( $p < 0,05$ ) als die Kontrolltiere (Abbildung 22B). Die Anzahl der Tiere im oberen Leistungsbereich des Tests war in der Onapristongruppe deutlich größer. Die Onapristontiere teilten sich auf in eine Tiergruppe mit längerer ( $>150$  Sekunden) und eine Tiergruppe mit kürzerer ( $<150$  Sekunden) Haltezeit. Die Leistung der Kontrollen verteilte sich über das ganze Spektrum des Tests mit einer Häufung im unteren Skalenbereich.

Die durchschnittlichen Testergebnisse nach sieben Wochen lagen deutlich unter denen nach fünf Wochen (Abbildung 22C). Die maximal und die durchschnittlich erreichte Haltezeit sanken stark ab. Die Progesterongruppe ( $n = 31$ ) unterschied sich beim Stangentest in diesem Alter nicht mehr signifikant von der Kontrollen ( $n = 35$ ), obwohl sie immer noch eine Tendenz zu schwächerer Leistung zeigte. Die mit Onapriston behandelte Gruppe ( $n = 17$ ) erreichte signifikant höhere Werte zu diesem Zeitpunkt ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 22C).

Die Leistung der Ratten im Stangentest nahm also generell, unabhängig von der Behandlung mit Steroidhormonen, deutlich ab. Die Symptome des CMT1A-Tiermodells waren progredient. Ebenfalls unabhängig von der Behandlung war die relativ große Schwankungsbreite in der Haltezeit. Dennoch unterschieden sich die einzelnen Behandlungsgruppen. Bei fünf Wochen zeigte die Progesterongruppe eine verringerte und die Onapristongruppe eine verlängerte durchschnittliche Haltezeit. Nach sieben Wochen war der Unterschied zwischen Progesteron- und Kontrollgruppe nicht mehr signifikant. Die Onapristontiere hielten sich hingegen immer noch deutlich länger.



**Abbildung 22: Stangentestphänotyp nach Steroidbehandlung.**

**A** Die durchschnittliche Haltezeit im Stangentest behandelter CMT-Ratten unterschied sich im Alter von drei Wochen nicht signifikant bei den Behandlungsgruppen. Die Varianz war hoch.

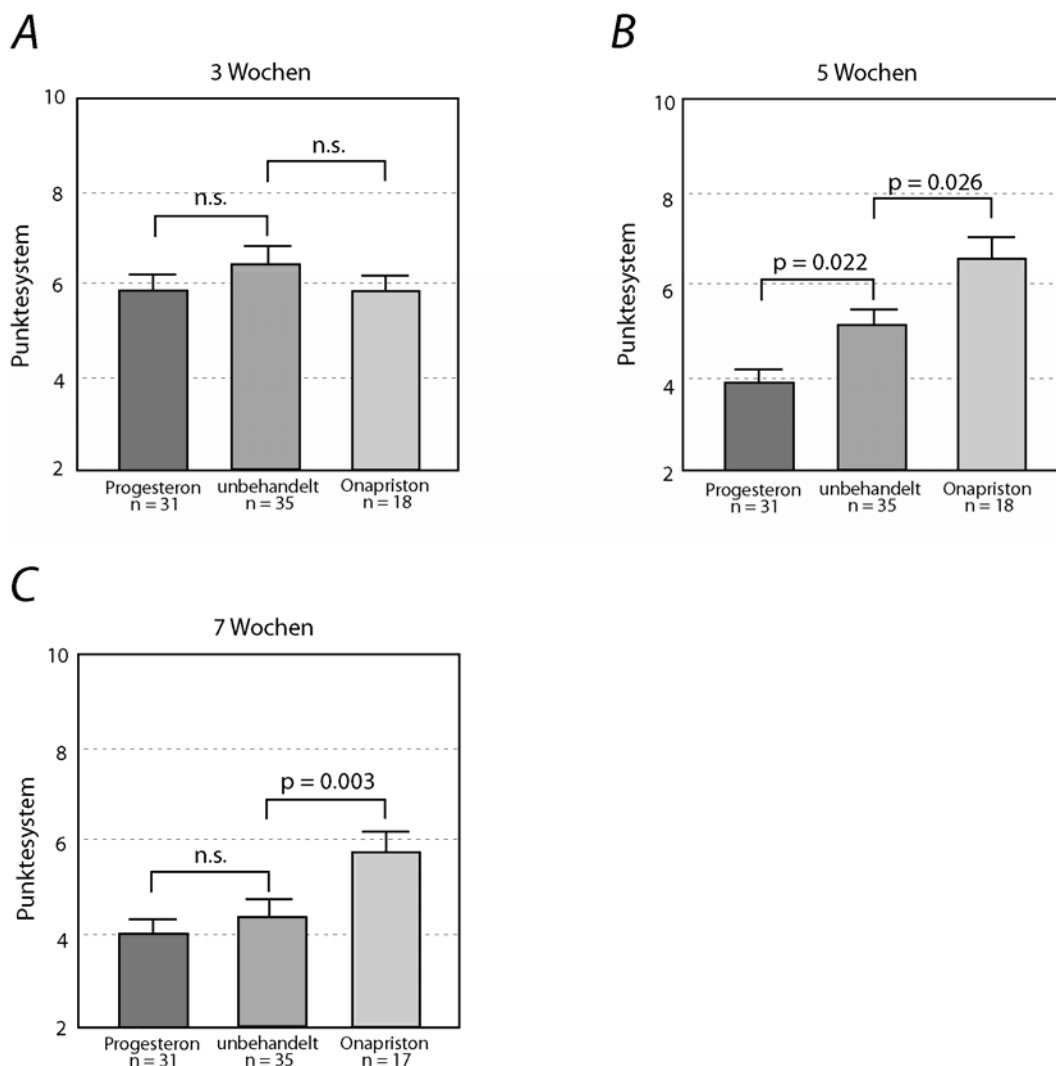
**B** Im Alter von fünf Wochen hielten sich die Progesteron behandelten CMT-Ratten signifikant kürzer als die Kontrollgruppe. Die Leistung dieser Tiere hatte deutlich abgenommen und die gruppeninterne Schwankung war geringer. Die mit Onapriston behandelten Tiere zeigten eine signifikant längere Haltezeit als die Kontrollen.

**C** Nach sieben Wochen hatte die Haltezeit in allen Gruppen deutlich abgenommen. Die Progesterongruppe unterschied sich nicht mehr von den Kontrollen. Die mit Onapriston behandelten Tiere hielten sich signifikant länger als die unbehandelten Ratten.

### 3.2.4.2 Das klinische Punktesystem

Neben dem Stangentest wurde ein klinisches Punktesystem verwendet, um die Ausprägung des Phänotyps der CMT-Ratten während und nach der Behandlung zu quantifizieren (s.o.). Im Alter von drei Wochen unterschieden sich die Behandlungsgruppen bei großer Schwankungsbreite nicht (Abbildung 23A). Mit fünf Wochen häuften sich die Werte der mit Progesteron behandelten Tiere ( $n = 31$ ) im unteren Bereich der Skala und ergaben einen signifikant ( $p < 0,05$ ) reduzierten Punktwert im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n = 35$ ). Die Onapristongruppe ( $n = 18$ ) hatte durchschnittlich höhere Werte ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 23B).

Im Alter von 7 Wochen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Progesterongruppe ( $n = 31$ ) und der Kontrollgruppe ( $n = 35$ ) (Abbildung 23C). Beide Gruppen hatten mit ihren Punktwerten das untere Ende der Skala erreicht. Die mit Onapriston behandelten Tiere ( $n = 18$ ) zeigten signifikant ( $p < 0,005$ ) höhere Werte als die Kontrollen (Abbildung 23C).



**Abbildung 23: Klinischer Phänotyp nach Steroidbehandlung:**

A Die Ausprägung der CMT1A wurde mit Hilfe eines klinischen Punktesystems beurteilt. Ein höherer Punktwert entsprach dabei weniger Krankheitssymptomen. Im Alter von drei Wochen unterschieden sich die Behandlungsgruppen nicht.

**Abbildung 23 (fortgesetzt):**

**B** Im Alter von fünf Wochen erreichte die Progesterongruppe einen geringeren Punktwert und die Onapristongruppe signifikant höhere Werte. Die Durchschnittswerte von Progesteron- und Kontrollgruppe nahmen im Zeitverlauf ab.

**C** Nach sieben Wochen unterschied sich die Progesterongruppe nicht signifikant von der unbehandelten Gruppe. Die Onapristontiere zeigten höhere Punktwerte.

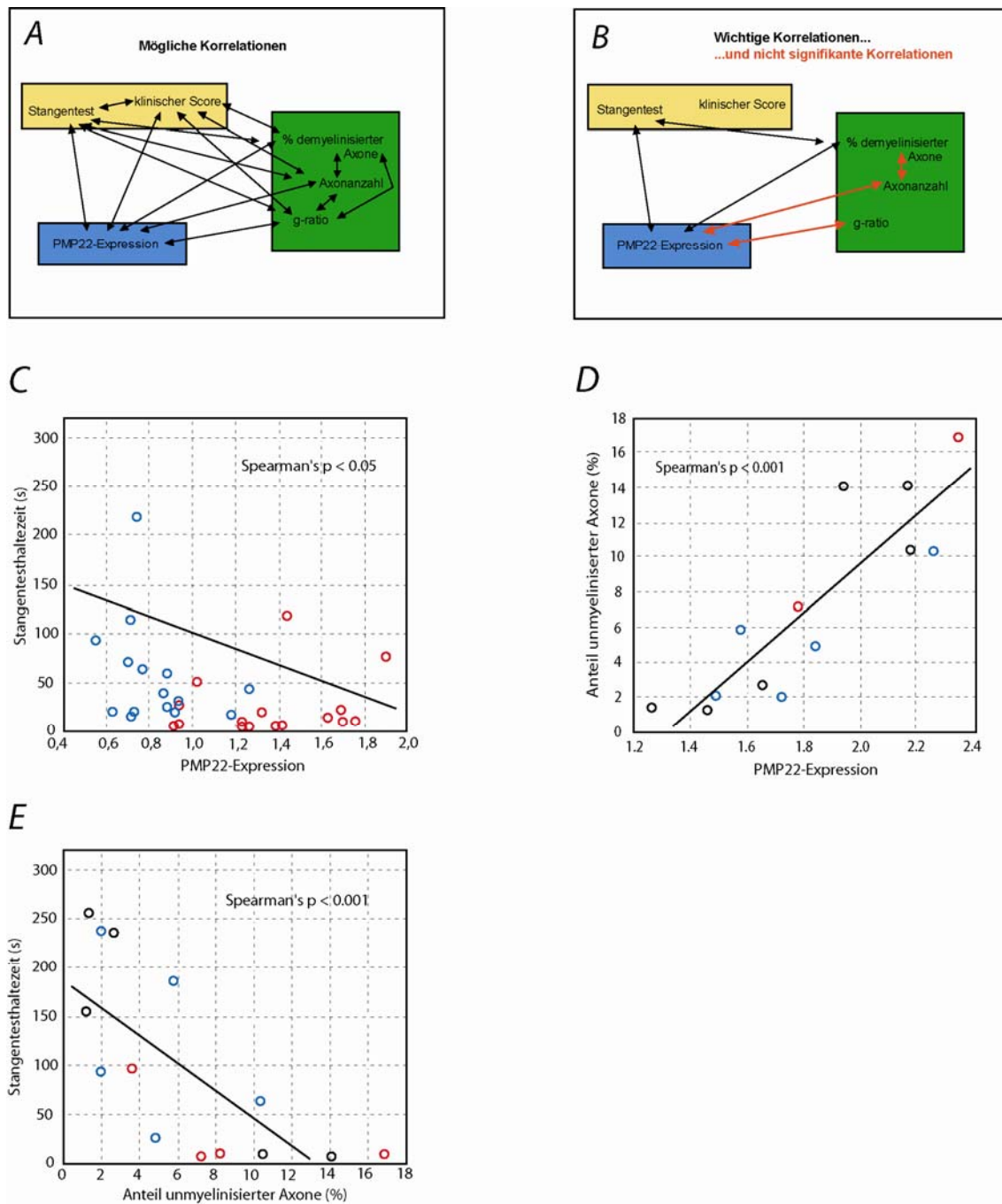
### **3.2.5 Korrelation der Ergebnisse**

Die Ausprägung des CMT1A-ähnlichen Phänotyps des Tiermodells wurde auf mehreren Ebenen quantifiziert. Dazu wurden die Myelinenexpression, verschiedene histologische Parameter und der Phänotyp der CMT-Ratten analysiert. Da alle erfassten Daten numerischen Charakter hatten, konnten sie auf Korrelationen überprüft werden. Es ergaben sich aus den sechs untersuchten Parametern der CMT1A fünfzehn mögliche Korrelationen (Abbildung 24A). Einige dieser Zusammenhänge waren für die Hypothese der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung (Abbildung 24B) und sind daher gesondert dargestellt (Abbildung 24C, D, E). Einzelne Parameter korrelierten nicht signifikant miteinander. Diese sind schematisch in rot dargestellt (Abbildung 24B). Alle in dieser Abbildung in schwarz gezeigten Korrelationen waren signifikant (Abbildung 24B).

Die Ergebnisse der PMP22-Expressionsmessung und des Stangentests bei sieben Wochen korrelierten nicht signifikant in der transgenen unbehandelten Gruppe. Nur die Analyse der Progesteron- und Onapristongruppe zeigte eine signifikante, negative Korrelation zwischen beiden Werten (Abbildung 24C) ( $r = -0,282$ ,  $p < 0,05$ ). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass ein Tier mit vermehrter PMP22-Expression eine schlechtere körperliche Leistung zeigt und umgekehrt. Interessanterweise erreichte auch die Korrelation zwischen der Stangentestleistung im Alter von fünf Wochen und der PMP22-Expression bei sieben Wochen Signifikanz ( $r = -0,369$ ,  $p < 0,05$ ) (keine Abbildung). Offensichtlich weisen Tiere mit einer niedrigen PMP22-Expression im Alter von sieben Wochen auch zu anderen Zeitpunkten einen weniger starken CMT1A-Phänotyp auf.

Die Histologie der CMT1A und der klinische Phänotyp zufällig ausgewählter Tiere aus allen Behandlungsgruppen wurden in Beziehung gesetzt. Die histologisch quantifizierte Demyelinisierung im PNS von steroidbehandelten CMT-Ratten ließ sich mit der Stangentesthaltezeit signifikant korrelieren ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 24D). Tiere mit einer Demyelinisierungsrate zwischen ca. sechs bis ca. achtzehn Prozent demyelinisierter Axone unterscheiden sich fast nicht in Bezug auf ihre Stangentesthaltezeit. Der Stangentest hat eine geringe Trennschärfe im unteren Leistungsbereich.

Auch die PMP22-Expression wurde mit der Histologie der CMT1A korreliert. Der Prozentsatz demyelinisierter Axone korrelierte signifikant ( $p < 0,001$ ) mit der PMP22-Expression in zufällig ausgewählten CMT-Ratten aus allen Behandlungsgruppen (Abbildung 24E).



### Abbildung 24: Korrelation der Untersuchungsergebnisse

**A** Die verschiedenen untersuchten Charakteristika der CMT-Ratten können miteinander korreliert werden. Die fünfzehn theoretischen Möglichkeiten der Korrelation sind dargestellt.

**B** Die drei in rot dargestellten Korrelationen waren nicht signifikant. Alle anderen Korrelationen erreichten Signifikanz, worunter die in schwarz dargestellten Korrelationen von besonderer theoretischer Bedeutung sind.

**C** Die Stangentestergebnisse nach Behandlung mit Onapriston (blau) und Progesteron (rot) korrelierten signifikant mit der PMP22-Expression.

**D** Die signifikante Korrelation zwischen dem Anteil unmyelinisierter Axone und der PMP22-Expression ist dargestellt.

**E** Abgebildet ist die signifikante Korrelation zwischen Haltezeit im Stangentest und dem Anteil unmyelinisierter Axone. Farben markieren Behandlung mit Onapriston (blau), Progesteron (rot) und Kontrolle (schwarz).

### **3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp der PMP22 transgenen CMT-Ratten genauer charakterisiert. Die periphere Demyelinisierung, die Muskelatrophie und die körperlichen Behinderungen variierten erheblich zwischen einzelnen CMT-Ratten. Darüber hinaus korrelierten die einzelnen Parameter signifikant.

Der zweite Teil der Arbeit lieferte den prinzipiellen Beweis, dass das Neurosteroid Progesteron und dessen Antagonist Onapriston die periphere Myelinpathologie der CMT1A modulieren kann. Progesteron steigerte die physiologische, aber auch die pathologisch erhöhte, PMP22-Expression im peripheren Nervensystem, während Onapriston die PMP22-Überexpression verminderte. Progesteron verstärkte die periphere Hypomyelinisierung und Muskelatrophie. Onapriston hingegen reduzierte den axonalen Untergang und das Fortschreiten der klinischen Behinderungen im Tiermodell der CMT1A.

## ***4. Diskussion***

### **4.1 Charakterisierung der CMT-Ratten**

Die häufigste hereditäre periphere Neuropathie des Menschen, die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A), wird verursacht durch Duplikation des Gens des peripheren Myelin-Proteins 22 (PMP22). Transgene Überexpression von PMP22 in der so genannten CMT-Ratte erzeugt eine der menschlichen Erkrankung sehr ähnliche Pathologie. In der vorliegenden Arbeit wurde deren Klinik mit Hilfe phänotypischer, histologischer und molekularbiologischer Methoden genauer charakterisiert und eine experimentelle Therapie der CMT1A in diesem Tiermodell etabliert.

Die menschliche CMT1A zeigt eine distal betonte Atrophie der Muskulatur des Unterschenkels, der Füße und der Hände (Abbildung 1A). Die Behinderungen beginnen meist in der zweiten Lebensdekade und zeigen eine progrediente Verschlechterung (Birouk et al. 1997). Dabei variieren sowohl Patientenalter bei Manifestation, als auch die Intensität der Klinik beträchtlich zwischen einzelnen Patienten (Kaku et al. 1993; Garcia et al. 1995; Thomas et al. 1997). Histologisch kann eine Demyelinisierung der peripheren Nerven nachgewiesen werden (Fabrizi et al. 1998), sowie in der Muskelbiopsie Zeichen der neurogenen Muskelatrophie (Dyck et al. 1993). Die Überexpression von PMP22 lässt sich im peripheren Nerven demonstrieren (Yoshikawa et al. 1994; Vallat et al. 1996).

Diese beim Menschen bekannten Charakteristika der CMT1A werden auf bemerkenswerte Weise in der CMT-Ratte nachgeahmt (Sereda et al. 1996). Der zeitliche Verlauf und die interindividuelle Varianz des Phänotyps der CMT-Ratten war jedoch bisher ungenügend beschrieben worden. Daher wurden diese Parameter im Tiermodell detailliert untersucht.

#### ***4.1.1 Der klinische Phänotyp der CMT-Ratten***

Der Phänotyp der CMT-Ratten wurde zu verschiedenen Alterszeitpunkten mit Hilfe des Stangentests und des klinischen Punktesystems quantifiziert. Die Wildtyp-Ratten erreichten deutlich höhere Leistungsdaten als die CMT-Ratten, die sich im Zeitverlauf verbesserten. In der transgenen Gruppe nahm die Leistung ab und schwankte stärker zwischen einzelnen Tieren. (Abbildung 13B, C).

Normale Ratten haben keine Probleme, sich auf der Stange zu halten und werden mit zunehmendem Alter durch ihr natürliches Wachstum stärker und leistungsfähiger. CMT-Ratten sind schon mit drei Wochen deutlich schwächer. Die weiter abnehmende Leistung dieser Tiere entspricht dem bekannten progredienten Charakter der menschlichen CMT1A (Dyck et al. 1989; Birouk et al. 1997). Das klinische Punktesystem liefert in dieser Hinsicht übereinstimmende Ergebnisse. Die Analysen Stangentest und Punktesystem sind zur Quantifizierung der klinischen Ausprägung der CMT1A geeignet. Während des Stangentests werden vor allem die



Hinterläufe beansprucht, die den Großteil des Körpergewichts tragen (Abbildung 13A). Dementsprechend atrophieren bei CMT1A-Patienten besonders die distalen Anteile der unteren Extremität. Dies Testverfahren quantifiziert somit den Grad der Behinderung der CMT-Ratten, die die menschliche Pathologie nachahmt.

Die starke Schwankung des Phänotyps zwischen einzelnen CMT-Ratten hat ebenfalls ein menschliches Korrelat. Der Krankheitsbeginn (Birouk et al. 1997), der Grad der klinischen Behinderung (Thomas et al. 1997) und auch die histologischen Charakteristika (Gabreels-Festen et al. 1995; Fabrizi et al. 1998) variieren stark zwischen einzelnen Patienten und zwischen betroffenen eineiigen Zwillingen (Garcia et al. 1995). Die Variabilität der CMT1A ist in Bezug auf Elektrophysiologie und Klinik unter Zwillingen genauso hoch wie unter nicht verwandten Patienten (Garcia et al. 1995; Thomas et al. 1997). Nicht genetische („epigenetische“) Ursachen wurden daher unter anderem als Erklärung der Varianz angenommen.

Welche Ursachen den starken Unterschieden zwischen einzelnen CMT-Ratten zu Grunde liegen, ist bisher ungeklärt. Es handelt sich höchstwahrscheinlich nicht um ein Artefakt des transgenen Tiermodells, da ein ähnliches Phänomen von CMT1A-Patienten bekannt ist (s.o.). Auch hier eignet sich die CMT-Ratte zur Analyse des Pathomechanismus der CMT1A. Im Tiermodell können Risikofaktoren einer schwer oder mild verlaufenden Neuropathie identifiziert werden. Als praktische Konsequenz könnte sich hieraus die Möglichkeit bieten, Patienten als Hoch- oder Niedrigrisikopatienten zu einzustufen. Die individuelle Prognose der CMT1A zu kennen, wäre hilfreich für Patienten, aber auch für eventuelle Therapieversuche.

#### **4.1.2 Histologische Charakteristika der CMT-Ratten**

Neben dem klinischen Phänotyp wurden periphere Demyelinisierung und Muskelatrophie der CMT-Ratten quantifiziert, die beide deutlich zwischen einzelnen Tieren variierten (Abbildung 14A, Abbildung 15B). Der Umfang der Hinterbeine als Maß für die Atrophie ließ sich signifikant mit den Ergebnissen in beiden Phänotypentests korrelieren (Abbildung 14B, C). Auch die histologisch bestimmte Demyelinisierung korrelierte mit dem Phänotyp (Abbildung 15C, D).

Ein in den Phänotypanalysen schlecht abschneidendes Tier leidet also auch an einer schweren Muskelatrophie und einem schweren Myelinschaden. Das Umgekehrte gilt für ein leistungsstarkes Tier. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die verwendeten Phänotypentests in der Tat die Ausprägung der CMT1A messen. Würden nur Testartefakte wie Nervosität oder Ungeschicklichkeit der Ratten gemessen, ständen Histologie und Atrophie in keinem Zusammenhang mit den klinischen Daten. Darüber hinaus entspricht die Varianz der Klinik der CMT-Ratten offensichtlich der von Muskelatrophie und Histologie. Auch auf mikroskopischer Ebene imitiert die CMT-Ratte somit die menschliche CMT1A (Thomas et al. 1997; Fabrizi et al. 1998). Die Einflussfaktoren und Ursachen der Varianz bedürfen weiterer Abklärung (s.o.).

### **4.1.3 Expression von PMP22 im peripheren Nervensystem**

Die Duplikation des PMP22-Gens verursacht die CMT1A. Diese geht mit einer relativ milden (durchschnittlich 1,7-fachen) Überexpression von PMP22 auf mRNA-Ebene (Yoshikawa et al. 1994) und histologisch dargestellt auf Proteinebene einher (Vallat et al. 1996; Gabriel et al. 1997). In den CMT-Ratten führt transgene PMP22-Überexpression zu einem CMT1A-ähnlichen Phänotyp. Die PMP22-Expression zeigte eine größere Schwankung in Nerven transgener Ratten und lag ungefähr 60% über der von Wildtyp-Ratten (Abbildung 16B). Eine besonders variable 1,6-fache PMP22-Überexpression war in CMT-Ratten bereits beschrieben worden (Sereda et al. 1996). Auch in Bezug auf PMP22-Expression reproduziert die CMT-Ratte Charakteristika der CMT1A. Die in dieser Arbeit dargestellte PMP22-Überexpression und auch die Varianz zwischen einzelnen Tieren stehen somit in Übereinstimmung mit Daten der Literatur.

Daraus lassen sich methodische Rückschlüsse ziehen. In der verwendeten PCR diente ein so genanntes „Housekeeping“-Gens als Maß der mRNA-Konzentration der analysierten Probe (Schild 1999). Dessen Expression musste als konstant vorausgesetzt werden. Die Auswahl des richtigen „Housekeeping“-Gens wurde in der Literatur diskutiert (Tricarico et al. 2002). Im vorliegenden Fall wurde  $\beta$ -Actin verwendet, welches in ähnlichen Zusammenhängen etabliert wurde (Medhurst et al. 2000). Da die Ergebnisse im erwarteten Bereich liegen, sind methodische Fehler oder Artefakte unwahrscheinlich.

Außerdem liefert dies Ergebnis eine Erklärung für die starke Varianz in den Analysen von Phänotyp und Histologie. Offensichtlich unterscheiden sich einzelne transgene Ratten stark in der Menge ihrer PMP22-Überexpression, was sich entsprechend fortsetzt in die anderen Charakteristika der CMT1A. Ein stark überexprimierendes Tier wird also unter einer schweren Demyelinisierung und Muskelatrophie leiden. Das Gegenteil gilt für eine schwach überexprimierende CMT-Ratte. Diese Korrelation von Phänotyp und PMP22-Expression war bereits zuvor angedeutet worden, ohne systematisch untersucht worden zu sein (Sereda et al. 1996). Sogar ein Schwellenwert der PMP22-Expression wurde vorgeschlagen. Wird dieser theoretisch geforderte Wert überschritten, kommt es zur Manifestation der Krankheitssymptome (Abbildung 5).

Die Ursachen der ausgeprägten Schwankungen der PMP22-Expression in genetisch gleich ausgestatteten Individuen sind unbekannt (s.o.). Jedoch legen die Ergebnisse nahe, dass eine Reduktion der PMP22-Expression unter den geforderten Schwellenwert die Neuropathie positiv beeinflussen kann. Wenn bekannt ist, welche Faktoren die PMP22-Expression in manchen Individuen niedrig hält, könnten diese für experimentelle Therapieansätze der CMT1A verwendet werden. Ein solcher Modulator der PMP22-Expression sind Steroidhormone, die im folgenden Teil untersucht wurden.

## **4.2 Steroidtherapie der CMT-Ratten**

Bisher existiert keine effektive Therapie der CMT1A (Young und Suter 2001). In Anbetracht der Häufigkeit dieser vererblichen Erkrankung (Guzzetta et al. 1995; Blair et al. 1996; Kühlenbaumer et al. 2002; Morocutti et al. 2002) erschien die Möglichkeit, sie in Verlauf und Ausprägung beeinflussen zu können, von großer klinischer und praktischer Relevanz. Diese Gendosiserkrankung wird durch geringe Überexpression eines nicht mutierten Myelins verursacht. Daher sollte das Ziel einer möglichen Therapie die Normalisierung der PMP22-Expression sein.

Progesteron war als Modulator der PMP22-Expression identifiziert worden. Verschiedene Autoren beschrieben eine vermehrte PMP22-Expression im peripheren Nerven nach Zufuhr von Progesteron. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Signalsystem für experimentelle Therapie der CMT1A verwendet.

### **4.2.1 Charakterisierung der Steroidbehandlung**

Vor der Behandlung wurde die Pharmakokinetik der Steroidhormone untersucht. Nach fast siebenwöchiger subkutaner Injektion von Progesteron erreichte dessen Konzentration 24 Stunden nach der letzten Injektion einen dreifach höheren Wert als in der unbehandelten Gruppe (Abbildung 17). Die Konzentration entsprach dabei Maximalwerten während des Zyklus weiblicher Ratten. Die tägliche Behandlung mit Steroidhormonen hatte keine sichtbaren toxischen Effekte. Auch das Gewicht von Wildtyp- und von transgenen Ratten war nicht signifikant verändert durch eine der Behandlungen (Abbildung 18A, B).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Progesteron aus den subkutanen Behandlungsdepots freigesetzt wird und in den Blutkreislauf gelangt. Auch 24 Stunden nach der letzten Injektion ist die Depotwirkung offensichtlich noch ausreichend, um den Plasmaspiegel des Steroids zu erhöhen. Die Aufnahme von Progesteron ins Plasma aus subkutanen Depots wurde nachgewiesen (Warwick und Parkes 1940). Trotz des schnellen Abbaus dieses Steroids (s.u.) ist noch genügend Progesteron vorhanden. Die absoluten Konzentrationen unbehandelter Ratten (ca. 8 ng/ml) liegen dabei im Bereich der in anderen Veröffentlichungen bereits beschriebenen (Butcher et al. 1974; Dohler und Wuttke 1975). Eine korrekte Bestimmung kann somit angenommen werden.

Die verhältnismäßig schnelle Metabolisierung von Progesteron durch die Leber bedingt dessen kurze Halbwertszeit im Serum von ungefähr 20 Minuten (Neumann et al. 1996). Nach Reduktion zu  $3\alpha$ - $20\alpha$ -Pregnandiol und Glukuronierung wird Progesteron im menschlichen Körper vorwiegend renal eliminiert (Taylor W 1971; Neumann et al. 1996). In der Ratte erfolgt eine primär biliäre Ausscheidung über die Fäzes (Shen et al. 1954; Taylor W 1971) mit ebenfalls kurzer Halbwertszeit (ca. 40 Minuten) (Robinson et al. 1981). Es ist somit unwahrscheinlich, dass Progesteron durch die häufige Verabreichung im Körper der Tiere akkumuliert. Sonst wären nach siebenwöchiger Behandlung deutlich höhere Konzentrationen zu erwarten. In der

Literatur werden bei Ratten nach intramuskulärer Injektion von Progesteron höhere Plasmaspiegel erreicht als in der vorliegenden Arbeit, die sich jedoch nach relativ kurzer Zeit wieder normalisieren (Corpechot et al. 1993). Dies ist mit der schnelleren Resorption aus dem Muskel- als aus dem subkutanen Fettgewebe zu erklären.

Da die Progesteronkonzentration nach Behandlung vergleichbar war mit weiblichen Maximalwerten, lag sie folglich nicht in einem für Ratten prinzipiell toxischen Bereich (Butcher et al. 1974) (Abbildung 17). Dies stimmt mit dem klinischen Befund überein, dass keine Nebenwirkungen der Behandlung beobachtet wurden. Offensichtlich lässt sich der CMT1A-Phänotyp schon durch geringfügig, also in einem „physiologischen“ Bereich, erhöhtes Progesteron verändern. Die beobachteten Effekte sind nicht die Folge einer unverhältnismäßig überhöhten Progesteronmenge. Geringe Unterschiede der Progesteronkonzentration können Unterschiede des CMT1A-Phänotyps verursachen. Somit könnte die endogene Progesteronproduktion von CMT1A-Patienten eine Ursache der klinischen Variabilität sein. Eine Korrelation von endogener Steroidproduktion und CMT1A-Phänotyp sollte angestrebt werden.

Die Untersuchung der Pharmakokinetik von Onapriston ist im Gegensatz zu Progesteron nicht möglich, da kein „Radioimmunoassay“ zur Konzentrationsbestimmung existiert. Daher kann man eine Freisetzung aus den subkutanen Depots nur voraussetzen und unterstellen. Für die Aufnahme ins Blut spricht der lipophile Charakter von Onapriston und seine ähnliche Molekülstruktur im Vergleich zu Progesteron (Abbildung 6B). Subkutane Applikation von Onapriston in gleicher (Michna et al. 1996) oder ähnlicher (Schneider MR et al. 1990; Michna et al. 1991; Nishino et al. 1992) Konzentration erzielte in anderen Indikationsgebieten experimentelle Effekte. In Tiermodellen für Brustkrebs wurden Wirkungen von Onapriston nach subkutaner Injektion demonstriert. Die Plasmahalbwertszeit von Onapriston ist mit zwei bis vier Stunden deutlich länger als die von Progesteron (Van Look und Von Hertzen 1993), so dass eine ausreichend hohe Onapristonkonzentration anzunehmen ist. Auch die Aufnahme aus dem Blut in den peripheren Nerven kann nur vorausgesetzt werden entsprechend der ähnlichen Molekülstruktur und Lipophilität von Onapriston (s.o.). Vor einer Anwendung von Onapriston beim Menschen sind weiterführende Untersuchungen zur Pharmakokinetik, insbesondere im Nervensystem, nötig.

Der endgültige Nachweis einer erhöhten Steroidkonzentration im Nerven selbst ist schwierig. Einerseits bestehen die dargestellten Probleme bei der Analyse von Onapriston. Andererseits würde die Progesteronbestimmung an der Interferenz von endogenem Progesteron der Schwanzzellen und zugeführtem Progesteron scheitern. Exogen zugeführtes Progesteron erreicht trotz der Blut-Hirn-Schranke in hoher Konzentration das Gehirn (Corpechot et al. 1993). Das Progesteron im peripheren Nerven stammt sowohl aus der lokalen Synthese im Nerven als auch aus dem Plasma. Die Progesteronkonzentration im Nerven reduziert sich deutlich nach Entfernung der Progesteron produzierenden Gewebe wie Gonaden und Nebennierenrinde (Corpechot et al. 1993; Koenig et al. 1995). Folglich findet ein reger Austausch von Steroidhormonen zwischen Blut und Nerv statt. Die sehr lipophilen Steroidhormone diffundieren relativ frei zwischen Plasma und Nervengewebe. Auf die

Pharmakokinetik von Onapriston kann in diesem Zusammenhang nur geschlossen werden. Der Progesteronantagonist Mifepriston hat eine vergleichbare Molekülstruktur (Abbildung 6B) und reduzierte das Wachstum nicht resektabler, menschlicher Meningeome (Koide 1998). Diese sehr ähnliche Substanz erreicht somit das zentrale Nervensystem, so dass eine Aufnahme von Onapriston ins periphere Nervensystem angenommen werden kann.

Zu den typischen Nebenwirkungen einer längerfristigen Gestagenbehandlung im Rahmen der Kontrazeption gehört im Menschen eine Zunahme des Gewichts (Neumann et al. 1996). Daher wurde täglich das Gewicht der Ratten gemessen. Interessanterweise veränderte Progesteron weder das Gewicht der transgenen noch der Wildtyp-Tiere signifikant (Abbildung 18A, B). Dies könnte an der im Vergleich zur menschlichen hormonellen Kontrazeption geringen Gesamtdauer und Gesamtdosis liegen (Neumann et al. 1996) oder an der ausschließlichen Verwendung von männlichen Ratten. Über Effekte von Progesteron auf den männlichen Organismus ist wenig bekannt.

Auch die Onapristonbehandlung bewirkte keine signifikante Gewichtsveränderung bei beiden Genotypen. In anderen Studien führte verhältnismäßig kurzfristige Behandlung mit Onapriston zu einem verringerten Körpergewicht junger Ratten (van der Schoot et al. 1991). Eventuell handelte es sich dabei um eine nur temporäre Wirkung in der postnatalen Periode. Insgesamt wogen die CMT-Ratten weniger als die Wildtyp-Ratten, was als Korrelat der bekannten Muskelatrophie zu interpretieren ist. Der Gewichtsunterschied zwischen den Genotypen vergrößerte sich mit zunehmendem Alter sowohl absolut als auch prozentual als Zeichen des progressiven Charakters der CMT1A (Abbildung 18A, B). Dies bietet eine andere Erklärung für das unveränderte Gewicht nach Onapriston in den transgenen Tieren. Durch die Behandlung wird die Atrophie der Muskulatur vermindert und dementsprechend das Gewicht der CMT-Ratten erhöht. Es würden sich also Wirkung von Onapriston direkt auf das Gewicht und indirekt über die Pathologie der CMT1A gegenseitig aufheben.

Zusammenfassend sind ausreichende Konzentrationen der Wirkstoffe im Blut ohne bedeutende Nebenwirkungen anzunehmen, die Aufnahme in das Nervensystem muss jedoch vorausgesetzt werden.

#### **4.2.2 Myelinenexpression nach Steroidbehandlung**

Nach der Charakterisierung der Steroidbehandlung wurden deren Effekte in Wildtyp- und CMT-Ratten untersucht. Die mit Progesteron behandelten Wildtyp-Ratten zeigten eine um ca. 25% erhöhte PMP22-Expression im peripheren Nerven im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 19B).

Die Expression zweier wichtiger Myelinproteingene wurde in steroidbehandelten CMT-Ratten gemessen. Progesteron erhöhte die Überexpression von PMP22 weiter, während Onapriston sie senkte (Abbildung 20A). Das Gen des „Myelin Protein Zero“ (MPZ / P0) zeigte ein anderes Verhalten in den transgenen Ratten. Progesteron erhöhte dessen Expression um ca. 50%. Die Blockade des Progesteronrezeptors durch Onapriston hingegen hatte keinen Einfluss auf die MPZ / P0-Expression (Abbildung 20B).

Die Expression der Myelogene wurde relativ zum nicht translatierten Exon 1B des PMP22-Gens gemessen (Abbildung 16A). Die verwendete TaqMan-PCR benötigt dies Referenzgen als Maß für die Menge der Ausgangs-DNA. Jedes „Housekeeping“-Gen könnte durch Steroide oder durch einen veränderten Phänotyp der CMT1A mitreguliert werden. Für das Exon 1B des PMP22-Gens war eine unveränderte Expression nach Progesteron gezeigt worden (Desarnaud et al. 1998) und es war daher als Referenz besonders geeignet.

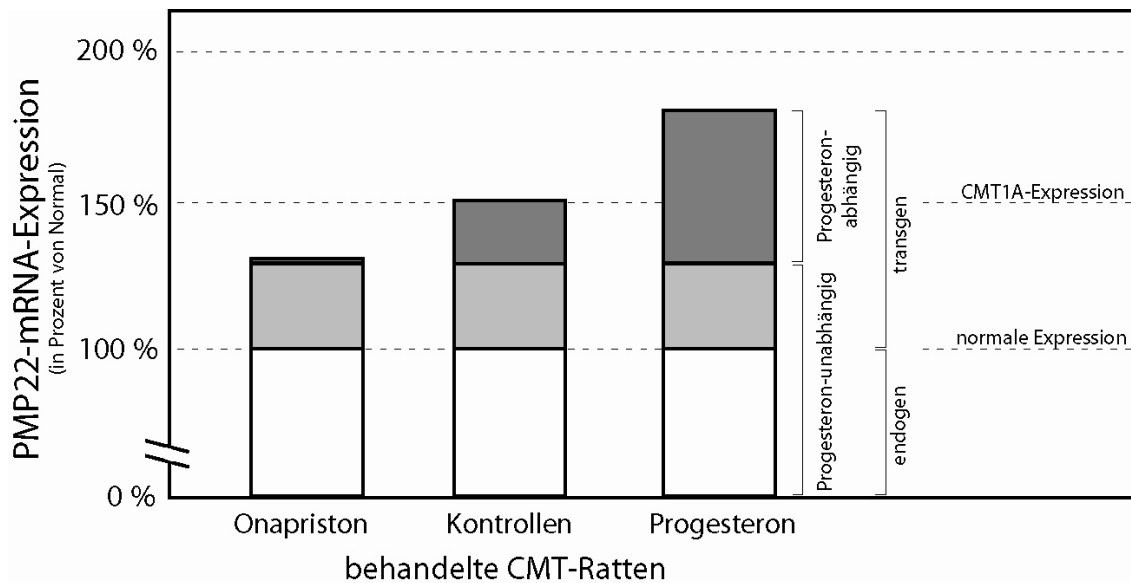
#### **4.2.2.1 Die PMP22-Expression nach Steroidbehandlung**

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen erscheinen gering. Kann eine 15%ige Reduktion der PMP22-Expression Auswirkungen auf die CMT1A-Pathologie haben? Bereits eine ca. 1,5-fache Überexpression von PMP22 führt zur CMT1A (s.o.) und eine Reduktion der Gendosis um 50% zur HNPP (Adlkofer et al. 1995; Schenone et al. 1997a; Schenone et al. 1997b). Veränderungen der PMP22 und MPZ / P0-Expression um bis zu 50% nach Progesterongabe wurden in ähnlicher Form zuvor beschrieben (Melcangi et al. 1999). Somit können bereits geringe Veränderungen der PMP22-Expression zu gravierenden Veränderungen des peripheren Nervensystems führen, wie im vorliegenden Fall gezeigt.

Was sind Schlussfolgerungen aus der veränderten PMP22-Expression? Die PMP22-Überexpression als Ursache der CMT1A ist prinzipiell beeinflussbar und der Progesteronrezeptor ist ein mögliches pharmakologisches Ziel für die Therapie der CMT1A. Die Ursache der CMT1A kann moduliert werden, auch wenn der zugrunde liegende Gendefekt nicht geheilt wird. Einerseits sollten Therapien der CMT1A auf eine Normalisierung der PMP22-Expression ausgelegt sein. Andererseits sollte die Anwendung von Progesteron, zum Beispiel in Form von oralen Kontrazeptiva, in CMT1A-Patienten vermieden werden, um deren PMP22-Expression nicht weiter zu erhöhen. Auch bei anderen Gendosiserkrankungen könnte dieser Strategie anwendbar sein.

Darüber hinaus wird die Rolle des Progesterons in Schwannzellen durch die Resultate hervorgehoben. Dieses Signalsystem ist an der Regulation der Myelingenexpression beteiligt (Desarnaud et al. 1998; Melcangi et al. 1999). Wenn die Blockade der Progesteronrezeptoren die PMP22-Expression senkt, muss Progesteron, neben anderen Signalwegen, für die Aufrechterhaltung eines gewissen Anteils der PMP22-Expression verantwortlich sein (Abbildung 25). Dies gilt zumindest für die pathologische Situation der CMT1A, da schließlich nicht die Wirkung von Progesteron umgekehrt, sondern nur der normale Signalweg blockiert wird. Für die Normalsituation lässt sich dies ebenfalls vermuten.

Umgekehrt ist die pathologische Überexpression von PMP22 noch weiter durch Progesteron zu aktivieren (Abbildung 25). Man hätte annehmen können, dass sich die Schwannzelle durch negative Feedback-Mechanismen vor noch weiterer Erhöhung ihrer übermäßigen Expression schützen kann. Offensichtlich ist dies nicht der Fall und Progesteron kann ihr diesen Effekt „aufzwingen“.



**Abbildung 25: Schematische Darstellung der Auswirkung der Steroidbehandlung.**

Die PMP22-Expression im peripheren Nervensystem der CMT-Ratten setzt sich zusammen aus Wildtyp- und transgener Expression. Die Prozentangaben der Expression sind schematisch. Ein gewisser Anteil der PMP22-Überexpression wird durch Progesteron reguliert. Onapriston kann diesen Teil der PMP22-Expression vermindern und Progesteron kann ihn vergrößern. Eine Reduktion auf Wildtyp-Niveau ist unmöglich.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur lassen sich grundsätzlich *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen unterscheiden, die teilweise variierende Meinungen über Wirkung und Mechanismus von Progesteron in Schwanzzellen vertreten. Nach Progesteronzufuhr wurde in einem *in-vitro*-Promotorassay eine Aktivierung des für Schwanzzellen spezifischen Promoters des PMP22-Gens gezeigt (Desarnaud et al. 1998). In anderen Veröffentlichungen erhöhte Progesteron die PMP22-Expression (Notterpek et al. 1999b). Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchung nach Progesteronzufuhr *in vitro* stehen also in Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Arbeit.

In der Literatur wurde nur der Progesteronantagonist Mifepriston (RU-486) in Schwanzzellen untersucht, der anders als zu erwarten den Promoter des PMP22-Gens noch weiter aktivierte. Das erscheint auf den ersten Blick paradox, ist aber durch das experimentelle Vorgehen zu erklären. In Schwanzzellkulturen wird eine hohe cAMP-Konzentration durch Forskolin erzeugt. Die größere cAMP Menge verwandelt so genannte Typ-I-Antagonisten, wie Mifepriston, nach Bindung des Antagonisten-Rezeptor-Komplexes an die DNA in funktionelle Agonisten (Nordeen et al. 1995). Dies geschieht über eine aktivierende Phosphorylierung des Progesteronrezeptors durch die Proteinkinase A (Pka) (Sartorius et al. 1993; Edwards et al. 1995), die unter dem Einfluss der cAMP-Konzentration steht (Löffler 1996a). Eine solche funktionelle Umwandlung ist von Typ-II-Antagonisten, wie Onapriston, nicht zu erwarten (Sartorius et al. 1993; Edwards et al. 1995), weil sie die Bindung des Progesteronrezeptors an die DNA inhibieren (Bocquel et al. 1993) und folglich nicht nach Bindung phosphoryliert werden können. Daher gilt Onapriston als reiner Antagonist (Typ-II), was die verringerte PMP22-Expression nach Onapristongabe erklärt.

Auch *in vivo* wurde eine vermehrte PMP22-Expression im peripheren Nervensystem nach Progesteronzufuhr gezeigt (Melcangi et al. 1999; Magnaghi et al. 2001), was in Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit steht. Von den Autoren wurde allerdings ein alternativer Signaltransduktionsmechanismus für Progesteron auf die PMP22-Expression gefordert. Demnach soll Progesteron nach Umwandlung in seine reduzierten Metaboliten Di-Hydro-Progesteron (DH-Progesteron) durch die 5 $\alpha$ -Steroidreduktase und weiter in Tetra-Hydro-Progesteron (TH-Progesteron) durch die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (Abbildung 6A) über eine Modulation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors auf die periphere Myelinenexpression wirken. Es wird dabei eine Steigerung der PMP22-Transkription ausschließlich über TH-Progesteron und den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor gefordert. Schlussfolgernd dürfte Onapriston dann als Progesteronrezeptorantagonist keinen Effekt auf die PMP22-Expression haben. In der Tat wurde eine Wirkung von Progesteron und weiteren Neurosteroiden auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor im zentralen Nervensystem im Zusammenhang mit Lern- und Verhaltensregulation beschrieben und untersucht (Engel und Grant 2001; Vallee et al. 2001; Van Broekhoven und Verkes 2003).

Verschiedene Argumente sprechen jedoch gegen diesen Steuerungsmechanismus des peripheren Myelin:

- Erstens wurde in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Effekt von Progesteron selbst auf die PMP22-Expression *in vivo* demonstriert mit verbesserter Messtechnik (Abbildung 19).
- Zweitens wurde die funktionelle Bedeutung der in Schwannzellen exprimierten Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) nicht gezeigt, sondern nur ihre mRNA-Expression durch eine RT-PCR nachgewiesen (Melcangi et al. 1999).
- Drittens kann TH-Progesteron in DH-Progesteron zurückverwandelt werden und somit auch über den intrazellulären Progesteronrezeptor wirken (Abbildung 6A) (Mellon und Vaudry 2001).
- Viertens bindet und aktiviert auch TH-Progesteron den intrazellulären Progesteronrezeptor (Rupprecht et al. 1993).
- Fünftens ist ein Signalweg vom plasmamembranständigen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zum PMP22-Gen unbekannt, ganz im Gegensatz zum Progesteronrezeptor vermittelten Signalweg (s.u.).
- Sechstens wurden in der genannten Veröffentlichung falsche Schlüsse aus den Ergebnissen gezogen. Die PMP22-Expression wurde sowohl von TH-Progesteron, als auch von unmodifiziertem Progesteron und DH-Progesteron erhöht, wobei nur der Effekt von TH-Progesteron Signifikanz erreichte ( $p < 0,01$ ) (Melcangi et al. 1999). Es wurde eine alleinige Expressionserhöhung durch TH-Progesteron gefordert, weil nur diese signifikant war im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Melcangi et al. 1999). Daraus lässt sich jedoch nicht umgekehrt schlussfolgern, dass die mit Progesteron und DH-Progesteron behandelte Gruppe keine erhöhte Expression zeigen oder die TH-Progesteron Gruppe signifikant mehr Wirkung zeigt als die beiden anderen Gruppen. Für solche Schlussfolgerungen wäre ein umgekehrter Versuchsaufbau nötig.

Für eine Regulation der peripheren Myelinisierung über den intrazellulären Progesteronrezeptor spricht außerdem ein bekannter intrazellulärer Signalweg. Progesteron verstärkt über den intrazellulären Rezeptor vermittelt die Expression des Transkriptionsfaktors EGR2 / Krox-20



(Guennoun et al. 2001; Mercier et al. 2001). Dieser wiederum ist von zentraler Bedeutung für die periphere Myelinisierung. Im Tiermodell ohne EGR2 / Krox-20-Expression bleibt die Transkription von Myelinen aus und kein peripheres Myelin wird generiert (Topilko et al. 1994). Mutationen im menschlichen EGR2 / Krox-20-Gen können eine demyelinisierende Neuropathie verursachen (Warner et al. 1998; Bellone et al. 1999; Timmerman et al. 1999). Die Adenovirus vermittelte Überexpression von EGR2 / Krox-20 führt *in vitro* zu einer Expressionssteigerung aller wichtigen Myelinguene, wie MPZ / P0 und auch PMP22 (Nagarajan et al. 2001). Damit ergibt sich eine zusammenhängende Signalkaskade für die Wirkung von Progesteron auf die Myelinguexpression in Schwanzzellen.

Die Vorstellung von Progesteron als Ligand des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in Schwanzzellen ist also nicht in allen Punkten schlüssig. Aber auch die Funktion des Progesteronrezeptors an dieser Stelle bedarf noch weiterer Untersuchung. Die Frage nach dem Wirkmechanismus von Progesteron in Schwanzzellen ist von so großer Bedeutung, weil beide dargestellten Theorien eine unterschiedliche Vorgehensweise zur Behandlung der CMT1A bedingen würden. Einerseits müsste die PMP22-Überexpression durch Modulatoren am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor behandelt werden. Andererseits müssten Antagonisten am klassischen Progesteronrezeptor zur Anwendung kommen.

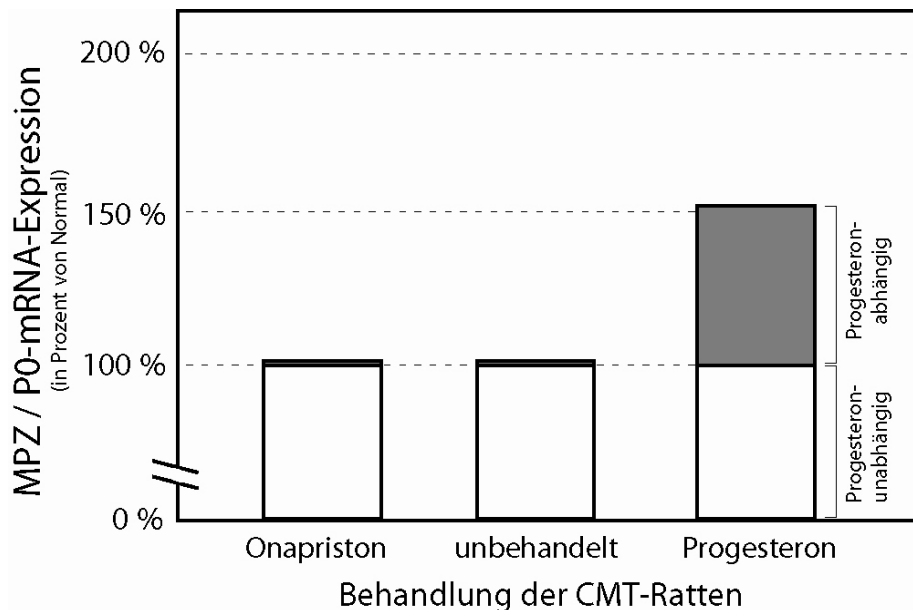
Die beiden Theorien über den Wirkmechanismus von Progesteron in Schwanzzellen müssen sich darüber hinaus nicht gegenseitig ausschließen. Es ist durchaus denkbar, dass sowohl der intrazelluläre Progesteronrezeptor durch Progesteron selbst und der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor durch die Metabolite von Progesteron aktiviert werden. Beide könnten simultan oder zumindest synergistisch auf PMP22 wirken. Dies könnte ein neues hypothetisches Konzept für die Rolle von Progesteron in Schwanzzellen bilden, in dem dasselbe Hormon über verschiedene Rezeptorsysteme auf dasselbe Zielgen wirkt.

#### **4.2.2.1 Die MPZ / P0-Expression nach Steroidbehandlung**

Die Expression des Myelinproteins MPZ / P0 reagierte anders als die von PMP22 auf die Steroidzufuhr. Nach Progesteronbehandlung der CMT-Ratten zeigten diese eine um ca. 50% erhöhte MPZ / P0-Expression (Abbildung 20B). Die Tiere, die Onapriston erhalten hatten, veränderten ihre MPZ / P0-Expression nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es wurde wie zur Quantifizierung der PMP22-Expression der nicht steroidregulierte Teil des PMP22-Gens als Referenz verwendet.

Offensichtlich reguliert exogen zugeführtes Progesteron auch die Expression von MPZ / P0. In der Promotorsequenz von MPZ / P0 existiert eine Sequenz, die eine 50-prozentige Homologie zu dem so genannten „progesterone responsive element“ zeigt (Magnaghi et al. 1999). Außerdem könnte über den oben beschriebenen Signalweg des Transkriptionsfaktors EGR2 / Krox-20 auch die MPZ / P0-Expression mitreguliert werden (s.o.). Verschiedenen Autoren beschrieben sowohl *in vitro* (Chan et al. 1998; Desarnaud et al. 1998; Jung-Testas et al. 1999)

als auch *in vivo* (Melcangi et al. 1999) eine erhöhte MPZ / P0-Expression durch Progesteron. Das Ergebnis ist also mit der Literatur vereinbar.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der MPZ / P0-Expression nach Steroidbehandlung**

Die MPZ / P0-Expression wird durch Progesteron erhöht, durch Onapriston aber nicht vermindert. Somit ist Progesteron nicht notwendig für die MPZ / P0-Expression im unbehandelten Zustand.

Anders als beim PMP22 ist die Steroidwirkung jedoch offensichtlich nicht für die „steady-state“ Grundexpression von MPZ / P0 notwendig. Sonst würde die Blockade des Systems durch Onapriston die Expression von MPZ / P0 verringern (Abbildung 26). Onapriston kann nur eine transgene Überexpression des PMP22-Gens, nicht aber eine „normale“ Expression des MPZ / P0-Gens reduzieren. Eventuell ist eine Myeligenüberexpression leichter oder durch andere Mechanismen zu vermindern als die Normalexpression.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass sich der positive Effekt der Onapristonbehandlung auf die Nervenpathologie und der senkende Effekt auf die Expression von MPZ / P0 gegenseitig aufheben. Ein PMP22 transgenes Mausmodell zeigt eine verringerte MPZ / P0-Expression (Magyar et al. 1996). Der Verlust der Myelinscheiden könnte die Expression der Myelinbausteine reduzieren. Weniger Myelin bedeutet weniger Myeligenexpression. Somit bedeutet mehr Myelin nach Onapristonbehandlung (s.u.) auch mehr Myeligenexpression, die den vermuteten vermindernenden Effekt von Onapriston auf MPZ aufheben könnte.

Aus der Literatur ist wenig bekannt zur MPZ / P0-Expression nach Blockade von Progesteronrezeptoren. *In vitro* führte der Typ-II-Progesteronantagonist Mifepriston (s.o.) zu einer erhöhten MPZ / P0-Expression. Dies ist wieder durch die partiell agonistische Wirkung von Mifepriston zu erklären (s.o.). Analysen zur MPZ / P0-Expression *in vivo* nach Behandlung mit einem Progesteronantagonisten wurden nicht veröffentlicht.

### **4.2.3 Histologie der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung**

Die Auswirkungen der Steroide auf die CMT1A wurden auf histologischer Ebene weiter untersucht. Drei verschiedene Charakteristika der Pathologie der peripheren Nerven wurden quantifiziert (Abbildung 21A, C, E). Zwischen g-ratio und Demyelinisierung muss dabei genau unterschieden werden. Das g-ratio dient als Maß der Myelindicke von „immer noch“ myelinisierten Axonen (Abbildung 11A, B). Ein erhöhtes g-ratio ist also Zeichen einer **Hypomyelinisierung**. Für die Analyse der **Demyelinisierung** wurden Axone gezählt, die keine Myelinscheide mehr aufwiesen.

Die Dicke des noch vorhandenen Myelins, gemessen als „g-ratio“, war nach Behandlung mit Progesteron deutlich geringer als in den Kontrollen. Die mit Onapriston behandelten CMT-Ratten zeigten keine veränderte Myelindicke (Abbildung 21B). Die Schwankung zwischen Einzeltieren in Onapriston- und Kontrollgruppe war sehr groß und in der Progesterongruppe deutlich kleiner. Darüber hinaus entsprachen die g-ratios in Kontroll- und Onapristongruppen denen in Wildtyp-Ratten.

Der Anteil nicht myelinisierter Axone zeigte ebenfalls eine große Varianz zwischen individuellen Tieren, wobei sich jedoch keine signifikanten Veränderungen durch die Steroide nachweisen ließen (Abbildung 21D). Ein Trend zu mehr Demyelinisierung in der Progesteron- und weniger in der Onapristongruppe war zu verzeichnen.

Die Gesamtanzahl aller Axone in den Ischiasnerven lag zwischen 5000 und 8000 mit geringster Schwankung in der Progesterongruppe. Dabei zeigten die mit Onapriston behandelten Tiere signifikant mehr Axone als die Kontrollen, während sich die Tiere der Progesterongruppe nicht unterschieden (Abbildung 21F). Zusammenfassend führte die Behandlung mit Onapriston zu mehr Axonen und die Behandlung mit Progesteron zu dünnerem Myelin in Ischiasnerven der CMT-Ratten.

#### **4.2.3.1 Hypomyelinisierung durch Progesteron**

Warum verstärkt die durch Progesteron erhöhte PMP22-Expression selektiv die Hypomyelinisierung, aber nicht die Demyelinisierung und den axonalen Verlust? Warum reduziert Onapriston zwar den axonalen Verlust, hat aber auf die Myelindicke und die Demyelinisierung keinen Einfluss? Obwohl also beide Steroide den Phänotyp und die PMP22-Expression gegensinnig verändern, modulieren sie nicht die Histologie. Eine Schlussfolgerung könnte sein, dass Steroide auf die Histologie der CMT1A anders wirken als auf die anderen Krankheitsparameter. Für PMP22 wurde eine duale Funktion in der Myelinisierung und Schwanzelldifferenzierung vorgeschlagen (Suter et al. 1994; Suter und Snipes 1995; Taylor V et al. 1995). Eventuell beeinflussen Onapriston und Progesteron unterschiedliche Funktionen von PMP22. Möglicherweise wird der Einfluss auf die g-ratios nicht über die PMP22-Expression vermittelt, sondern über andere, unbekannte Signalwege. Es könnte sich darüber hinaus um Artefakte der geringen Tierzahlen in allen Gruppen handeln.

Die Degeneration von Myelinscheiden ist ein entscheidendes Charakteristikum der menschlichen CMT1A. Die Dicke des noch vorhandenen Myelins wurde in CMT1A-Patienten untersucht und korreliert mit deren Alter, aber nicht mit ihrer Klinik (Fabrizi et al. 1998). Das g-

ratio könnte also zur Charakterisierung der CMT1A ungeeignet sein. Die Mischung von Hypo- / und Hypermyelinisierung einzelner Axone (Gabreels-Festen et al. 1995) könnte im Durchschnitt das g-ratios ausgleichen. Sogar dickere Myelinscheiden wurden in einigen CMT1A-Patienten beschrieben (Gabreels-Festen et al. 1995). Dickeres Myelin wurde in CMT1A-Mausmodellen beschrieben (Norreel et al. 2003) und von anderen Untersuchern eine im Durchschnitt normale Myelindicke gefunden (Sancho et al. 1999). Auch das Rattenmodell der CMT1A zeigt eine Mischung aus Hypo- / und Hypermyelinisierung (Sereda et al. 1996). Zusammenfassend existieren in der Literatur allein schon für den Vergleich zwischen normaler und CMT1A-Situation in Tieren bzw. Patienten sehr widersprüchliche Angaben. Teilweise dickeres, normales oder dünneres Myelin. Die verwendete Methode ist also kritisch zu beurteilen und eventuell ungeeignet für die Quantifizierung der Klinik der CMT1A nach Behandlung mit Steroiden.

#### **4.2.3.2 Unveränderte Demyelinisierung**

Warum gibt es einen Trend aber keine signifikante Veränderung des Anteils demyelinisierter Axone nach Steroidbehandlung in den CMT-Ratten? Aus der Histologie von CMT-Tiermodellen sind unterschiedliche Ausprägungen der Demyelinisierung bekannt (Huxley et al. 1996; Sereda et al. 1996; Robertson AM et al. 2002). Die Vergleichsdaten für den Prozentsatz demyelinisierter Axone sind schwierig einzuordnen, da die generierten transgenen Tiermodelle eine jeweils unterschiedliche PMP22-Überexpression aufweisen (Huxley et al. 1998). Ähnliche (Norreel et al. 2003), aber auch unterschiedliche (Robertson AM et al. 2002) Anteile demyelinisierter Axone im peripheren Nerven wurden vorbeschrieben. Auch der Vergleich mit menschlichen Werten liefert variierende Ergebnisse. Einerseits wurden in CMT1A-Patienten übereinstimmende Prozentzahlen demyelinisierter Axone (Fabrizi et al. 1998), aber auch gänzlich andere Werte beschrieben (Gabreels-Festen et al. 1995).

Die große interindividuelle Varianz der Demyelinisierung ist vergleichbar mit den Expressions- und Phänotypanalysen. Aus den histologischen Analysen menschlicher Nervenbiopsien (Gabreels-Festen et al. 1995; Fabrizi et al. 1998) und von CMT-Tiermodellen (Robertson AM et al. 2002; Norreel et al. 2003) sind ebenfalls starke Schwankungen der Histologie bekannt (s.o.). Um einen Effekt der Behandlung darstellen zu können, wurden in anderen Untersuchungsmethoden große Tierzahlen (n = 14 - 35 pro Gruppe) verwendet. Die histologische Untersuchung zeigt einen Trend zu verstärkter Demyelinisierung durch Progesteron und verringerter Demyelinisierung durch Onapriston. Dieser Trend spricht für ungenügend große Tierzahlen bei den histologischen Analysen (n = 4 - 6 pro Gruppe). Erweiterte Gruppengrößen hätten die Steroidwirkung deutlicher werden lassen.

Der Anteil demyelinisierter Axone könnte darüber hinaus zu diesem Zeitpunkt auch das falsche Maß der Ausprägung der CMT1A sein. Die Demyelinisierung könnte bereits zu einem früheren Zeitpunkt abgelaufen sein und im Alter von sieben Wochen in allen Gruppen ihren Endpunkt erreicht haben. Auch könnten die Axone, die demyelinisiert waren, bereits abgestorben sein (s.u.). Dann wären vor allem die myelinisierten Axone im Alter von sieben Wochen übrig und

ein Unterschied nicht mehr sichtbar. Schlussfolgern könnte man andererseits auch, dass Steroidhormone keinen Einfluss auf den Prozentsatz demyelinisierter Axone haben und nur die Myelingenexpression, den axonalen Verlust und den klinischen Phänotyp verändern. Dies erscheint jedoch wenig nahe liegend.

In der Literatur zum Einfluss von Progesteron auf das periphere Myelin steigert Progesteronzufuhr die Remyelinisierung nach Kryoläsion (Koenig et al. 1995). Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zum Ergebnis, dass Progesteron im vorliegenden Fall tendenziell die Hypomyelinisierung verstärkt (Abbildung 21B). Der Unterschied zwischen beiden Systemen ist dabei die eigentliche Ursache des Myelinuntergangs. Nach Kryoläsion ist eine vermehrte Expression aller Myelogene von Vorteil und die Remyelinisierung wird beschleunigt (Koenig et al. 1995; Chan et al. 1998). Im vorliegenden Fall einer hereditären Neuropathie ist jedoch gerade die Überexpression von PMP22 der krankheitsauslösende Faktor (Lupski et al. 1991; Yoshikawa et al. 1994; Vallat et al. 1996). Dementsprechend muss noch mehr PMP22 nach Progesteron negativ wirken, während es im Kryoläsionsmodell positive Effekte hat.

#### **4.2.3.3 Reduzierter axonaler Verlust durch Onapriston**

Warum zeigen die mit Onapriston behandelten CMT-Ratten mehr Axone in ihren Ischiasnerven als die Kontrolltiere? Vermutlich wird der axonale Untergang durch Onapriston verringert. Ein vermehrtes Auswachsen von Axonen durch Onapriston, was die andere theoretische Erklärungsmöglichkeit wäre, dürfte so gut wie ausgeschlossen sein. Die direkte Zählung aller Axone in den Ischiasnerven sollte dabei ein exaktes Maß des axonalen Verlustes liefern. Eine Normalisierung der PMP22-Expression (s.o.) führt zu einem reduzierten Absterben der Axone.

Die Demyelinisierung der CMT1A verursacht über unbekannte Mechanismen den Untergang der Axone. Die Reduktion der Axonanzahl wurde in CMT1A-Patienten indirekt nachgewiesen durch die Messung der Muskelsummenaktionspotentiale (Dyck et al. 1993; Krajewski et al. 2000) und die Schätzung motorischer Einheiten in der Hypothenarmuskulatur (Lewis et al. 2003). Dieser axonale Verlust korreliert mit der Klinik der CMT1A (Krajewski et al. 1999). Auch ein CMT1A-Mausmodell reproduziert dieses Symptom im peripheren Nerven (Sancho et al. 1999), das mit einem Untergang der Neurone im Rückenmark assoziiert ist (Norreel et al. 2003). Der axonale Verlust ist also typisches Merkmal der CMT1A und wird in CMT-Ratten durch die Zufuhr von Onapriston verringert. Da Progesteron nicht zu einer weiteren Abnahme der Axonanzahl führt, ist dieser Prozess offensichtlich nicht noch weiter zu beschleunigen.

Bei der CMT1A wurde ein behinderter axonaler Transport als einer der zugrunde liegenden Mechanismen des axonalen Verlustes identifiziert (Sahenk et al. 1999). Auch primäre Schwannzelldefekte wie PMP22-Überexpression und Demyelinisierung können somit den Aufbau des Axons und dessen intrazellulären Transport behindern. Die Ergebnisse der Steroidbehandlung lassen nun annehmen, dass die Schwannzellpathologie der Myelinscheide und die axonale Pathologie jeweils anderen Regulationsvorgängen unterliegen. Bisher wurde

angenommen, dass die De- und Hypomyelinisierung das Axon schädigt. Einerseits beeinträchtigt erhöhte PMP22-Expression durch Progesteron jedoch die Myelinscheide, nicht aber die Axone. Andererseits mildert erniedrigte PMP22-Expression durch Onapriston die axonale Pathologie, nicht aber den Myelindeфекt selbst. Offensichtlich laufen Myelin- und Axonschaden getrennt von einander ab und eventuell beruhen beide auf unterschiedlichen Wirkungen von PMP22.

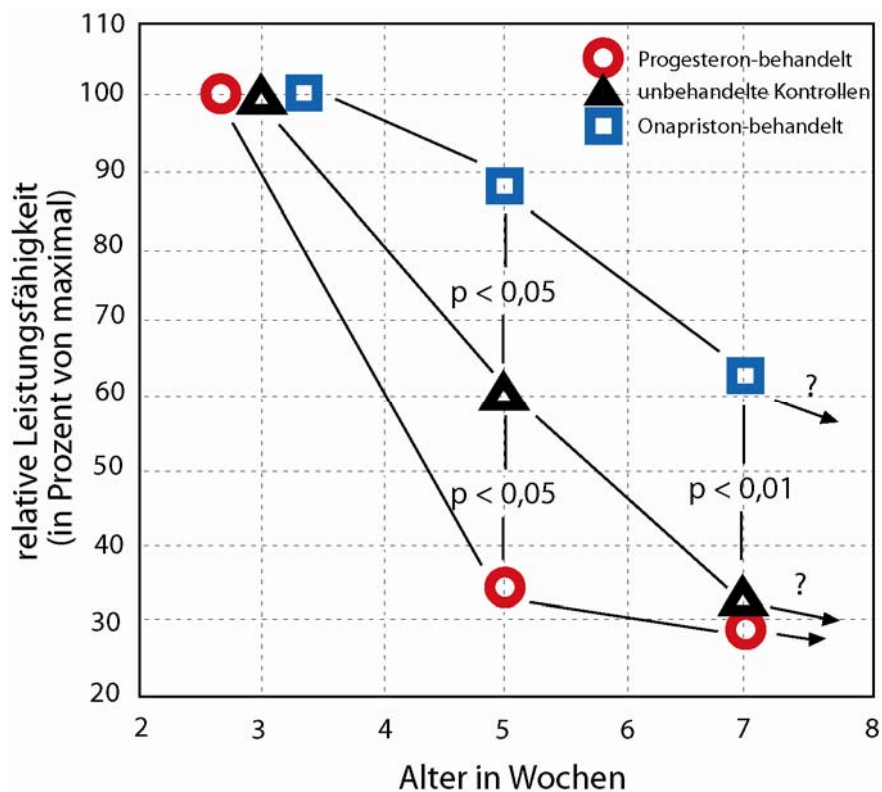
Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt der Progesteronbehandlung auf die Axonanzahl könnte eine „Sättigung“ der Pathologie sein. Eventuell sind bereits in den unbehandelten CMT-Ratten alle Axone abgestorben, die degenerieren können. Übereinstimmend damit unterscheidet sich der klinische Phänotyp der Progesteron- und Kontrollgruppe nicht. Dies legt ebenfalls die Vermutung nahe, dass nur das Fortschreiten der CMT1A durch Progesteron beschleunigt wird, der Endpunkt im Alter von sieben Wochen aber bereits erreicht ist und deshalb unverändert bleibt (Abbildung 27).

#### **4.2.4 Phänotyp der CMT-Ratten nach Steroidbehandlung**

Die Auswirkung der Steroidbehandlung auf den Phänotyp wurde mit Hilfe des Stangentests und des klinischen Punktesystems beurteilt. Insgesamt verschlechterte sich der Phänotyp in allen Gruppen im Laufe der Zeit.

Die drei Gruppen behandelter CMT-Ratten zeigten im Alter von drei Wochen keine Phänotypunterschiede (Abbildung 22A, Abbildung 23A). Möglicherweise ist die Evaluation des klinischen Phänotyps von CMT-Ratten durch den Stangentest in diesem jungen Alter ungenügend, weil die Ratten wegen ihres geringen Körpergewichts nicht ausreichend beansprucht werden, um auffällig zu werden. Auch könnte der CMT1A-Phänotyp noch nicht ausreichend entwickelt sein, um Effekte der Behandlung darzustellen. Die Unterschiede in den Phänotypanalysen zwischen transgenen und Wildtyp-Ratten nehmen im Zeitverlauf zu (Abbildung 22B, Abbildung 23B). Erst wenn sie fortgeschritten sind, trennen sich die Gruppen ausreichend auf. Außerdem wird die mRNA-Expression der CMT-Ratten therapeutisch beeinflusst, während die Klinik als „Read-Out“ dient. Während die mRNA kurzfristig reguliert wird, muss sich der Effekt der Therapie über axonalen Verlust und Muskelatrophie erst in die Klinik fortsetzen.

Im Alter von fünf Wochen schneidet die Progesteron behandelte Gruppe signifikant schlechter ab in beiden Analysen (Abbildung 22B, Abbildung 23B). In dieser Gruppe treten keine Tiere im oberen Bereich der Leistungsskala auf. Durch ihre erhöhte PMP22-Expression entwickeln die CMT-Ratten eine schwerer verlaufende Neuropathie, die zu einer stärkeren klinischen Behinderung führt. Es wurde vorgeschlagen, dass die CMT1A zum Ausbruch kommt, sobald die PMP22-Expression einen gewissen Schwellenwert überschreitet (Abbildung 5) (Sereda et al. 1996). Die Progesteronbehandlung „hebt“ alle Tiere über diesen Wert und erzeugt damit bereits im Alter von fünf Wochen eine schwere Beeinträchtigung. Der Effekt von transgener Überexpression und Progesteron induzierter Überexpression addieren sich und führen zu einer stärkeren und früheren Ausprägung der Symptome (Abbildung 25).



**Abbildung 27: Schematische Darstellung des Phänotyps der CMT-Ratten**

Schematische Darstellung der Entwicklung des CMT1A-Phänotyps während der Behandlung mit Steroidhormonen. Die Verbindungen zwischen den Zeitpunkten und die relative Leistung sind hypothetisch gewählt. Im Alter von drei Wochen unterscheiden sich die Behandlungsgruppen nicht voneinander. Die Progesteronbehandlung beschleunigt die progrediente Verschlechterung des Phänotyps. Onapriston verlangsamt sie. Nach sieben Wochen haben auch die Kontrolltiere den erfassbaren klinischen Endpunkt erreicht. Daher unterscheiden sich Progesteron- und Kontrollgruppe nicht mehr. Die Onapristongruppe zeigt immer noch eine deutlich höhere Leistungsfähigkeit. Vermutlich würden alle Tiere die maximale Ausprägung der Neuropathie erreichen bei weiterer Fortsetzung der Analysen.

Demgegenüber zeigte die Onapristongruppe im gleichen Alter bessere Stangentestleistung und bessere klinische Punktwerte (Abbildung 22B, Abbildung 23B). Die verminderte PMP22-Expression lässt den CMT1A-ähnlichen Phänotyp nur abgeschwächt zum Ausbruch kommen. Offensichtlich wird durch die Onapristonbehandlung die Erkrankung hinausgezögert, während sie durch Progesteron früher auffällig wird. Der Effekt der Behandlung ist nur modulierend und nicht alle Tiere zeigen einen besseren Phänotyp (Abbildung 22B, Abbildung 23B). Die CMT1A wird nicht geheilt, sondern nur positiv beeinflusst.

Die Ausprägung der CMT1A ist im Tiermodell derart variabel, dass PMP22 transgene Mäuse nach phänotypischen Kriterien in eine schwach und eine stark betroffene Gruppe eingeteilt wurden (Norreel et al. 2003). Auch transgene Ratten bilden eine Gruppe mit von Anfang an tendenziell niedrigerer und eine mit höherer PMP22-Expression (Abbildung 5, Abbildung 16B). Nach Onapristongabe erhöht sich die Anzahl der Tiere, die weniger PMP22 exprimieren und geringe Behinderungen zeigen. Es sprechen also nicht alle Tiere auf Onapriston an. Eventuell könnte es nützlich sein, noch vor Manifestation der Klinik der CMT1A-Individuen aufzuteilen

anhand ihrer PMP22-Expression und somit diejenigen zu identifizieren, die besonders gut auf eine Behandlung ansprechen würden. Konstitutionelle „PMP22-Wenig-Expriemierer“ hätten möglicherweise eine höhere Chance einer effektiven Krankheitsbeeinflussung. Prognostische und therapeutische Aussagen wären also möglich durch Messung der PMP22-Expression am Beginn der Erkrankung.

Im Verlauf von fünf zu sieben Wochen reduzieren sich Stangentestleistung und Punktwerte in allen Behandlungsgruppen deutlich. Die Neuropathie behält ihren progredienten Charakter. Die mit Progesteron behandelten Ratten unterscheiden sich im Alter von sieben Wochen in beiden Analysen nicht mehr von den Kontrolltieren (Abbildung 22C, Abbildung 23C). Der Phänotyp der unbehandelten Tiere hat sich so stark verschlechtert, dass kein Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen detektierbar ist. Beide haben das untere Ende der Testskala erreicht. Entweder sind die verwendeten Methoden im unteren Skalenbereich nicht mehr trennscharf oder die CMT1A hat bereits zu diesem Zeitpunkt ihre maximale Ausprägung erreicht. Für ein methodisches Problem spricht die menschliche Pathologie, die in unterschiedlicher Geschwindigkeit, aber doch kontinuierlich immer weiter fortschreitet (Dyck et al. 1993). Andererseits unterscheidet sich die Axonanzahl bei sieben Wochen ebenfalls nicht zwischen Progesteron- und Kontrollgruppe und könnte als Maß der CMT1A ein Maximum erreicht haben.

Im Vergleich zu den Kontrollen erreichen die Onapriston behandelten Ratten im Alter von sieben Wochen höhere Ergebnisse, obwohl auch ihre Leistung abgenommen hat (Abbildung 22C, Abbildung 23C). Der Krankheitsausbruch der CMT1A wird durch Onapriston hinausgezögert und die Symptome relativ verbessert.

Somit ist anzunehmen, dass auch CMT1A-Patienten von einer Onapristonbehandlung profitieren könnten. Bisher wurde Onapriston nur in einer Phase II klinischen Studie zur Therapie des Mammakarzinoms getestet (Robertson JF et al. 1999). Dabei wurden transiente Leberenzym erhöhungen festgestellt. Insbesondere bei Frauen hätte außerdem ein derart schwerer Eingriff in den Hormonhaushalt weit reichende Folgen (Jang und Benet 1997). Im Falle von Mifepriston führte die langfristige Anwendung zu einer Störung der Nebennierenrinden- und Schilddrüsenfunktion (Heikinheimo et al. 1997). Unter anderem sind Amenorrhoe, Zyklusdysregulationen und unerwünschte Kontrazeption als Folgen anzunehmen. Eine langfristige Behandlung von CMT1A-Patienten könnte durch diese schlecht abschätzbaren Nebenwirkungen erschwert werden. Generell stellt sich für Therapien der CMT1A die Frage der Verhältnismäßigkeit. Da es sich um einen genetischen Defekt handelt, ist eine wirkliche „Heilung“ bisher nicht möglich. Die nur teilweise schwer verlaufende Erkrankung aggressiv zu behandeln, ist kritisch zu beurteilen. Neue Hoffnung weckt in diesem Zusammenhang ein neu entwickelter Progesteronrezeptorantagonist (ZK230211) (Fuhrmann et al. 2000) mit verbesserter Verträglichkeit.

Ein nahe liegender Schluss aus der vorliegenden Arbeit wäre der Verzicht auf Progesteron in CMT1A-Patienten. Exogenes Progesteron verschlechtert den Verlauf und die Ausprägung der Neuropathiesymptome im Tiermodell (Abbildung 27). Vor allem in oralen Kontrazeptiva wird



regelmäßig Progesteron angewendet (Neumann et al. 1996), so dass deren Anwendung bei CMT1A-Patienten eingeschränkt werden sollte. Ist diese Theorie korrekt, müssten Frauen stärker von der CMT1A betroffen sein. Dies ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden (Hoogendijk et al. 1994; Killian et al. 1996; Birouk et al. 1997), wird aber von einigen Untersuchern in persönlicher Korrespondenz bestätigt (persönliche Korrespondenz mit C. Verhamme (Amsterdam)). Auch die deutliche Verschlechterung der CMT1 und CMT1A in der Schwangerschaft, die mit vielfach erhöhter Progesteronkonzentration einhergeht (Neumann et al. 1996), spricht für diesen Mechanismus (Bellina und Deming 1973; Pollock et al. 1982; Rudnik-Schoneborn et al. 1993). CMT-Ratten zeigen keine offensichtlichen Geschlechtsunterschiede im Phänotyp. Es könnten jedoch zur Verschlechterung der CMT1A höhere Progesterondosen nötig sein, als während des normalen reproduktiven Zyklus freigesetzt werden, und diese erst in der Schwangerschaft erreicht werden.

#### **4.2.5 Korrelation der untersuchten CMT1A-Charakteristika**

Eine signifikante Korrelation ist kein Beweis für einen kausalen Zusammenhang. Sie erklärt nur einen gewissen Anteil der Varianz des einen Merkmals durch die Varianz des anderen. Oder anders formuliert gibt sie eine Wahrscheinlichkeit an, mit der bei bekanntem x-Wert ein gewisser y-Wert erwartet werden kann. Eine signifikante Korrelation kann daher nur die Hypothese unterstützen, dass die beobachtete Veränderung eines Wertes auf die ebenfalls beobachtete Veränderung eines anderen Wertes zurückzuführen ist. Eine Kausalität dieses Zusammenhangs muss entweder vorausgesetzt werden oder in anderen Untersuchungen bewiesen werden. Es war anzunehmen, dass eine CMT-Ratte mit hoher PMP22-Expression auch schwere klinische und histologische Zeichen der Neuropathie aufweist und das Umgekehrte für ein Tier mit geringer PMP22-Expression gilt. Die analysierten Krankheitsparameter wurden daher auf Korrelationen überprüft.

Aus den sechs untersuchten Charakteristika der CMT1A, die MPZ / P0-Expression ausgenommen, ergeben sich fünfzehn mögliche Korrelationen. Die Befunde sind sinngemäß aufteilbar in die drei Klassen Expression, Histologie und Phänotyp (Abbildung 24A). Zuerst werden hier die Korrelationen innerhalb dieser Klassen besprochen. Die Ergebnisse der beiden Phänotypentests und der drei histologischen Untersuchungen werden jeweils untereinander verglichen. Danach werden die Resultate der verschiedenen Ebenen der Pathologie gegenübergestellt.

Die beiden phänotypischen Analysen lassen sich sehr eindeutig miteinander korrelieren. Daher lässt sich vermuten, dass beide Tests auf ähnliche Weise die Merkmale der Neuropathie messen. Es ist nahe liegend, dass der klinische Aspekt eines einzelnen Tieres mit seiner Kraft beim Halten auf einer Stange zusammenhängt. Beide Testmethoden werden dadurch gegenseitig überprüft. Entsprechend lassen sich die Konsequenzen der Steroidbehandlung mit beiden Verfahren deutlich darstellen (Abbildung 22B, Abbildung 23B).

Innerhalb der Histologie lässt sich der Anteil demyelinisierter Axone nicht signifikant mit der Gesamtaxonanzahl korrelieren (Abbildung 24B). Es haben also Tiere mit ausgeprägtem Myelinverlust nicht unbedingt wenig Axone, wie zu erwarten gewesen wäre. Hieraus lässt sich

möglicherweise schlussfolgern, dass die Demyelinisierung nicht der direkte Vorläufer des axonalen Untergangs ist. Insbesondere verändert Onapriston die Axonanzahl, aber nicht die Demyelinisierung signifikant (siehe 4.2.3). Beide Folgen der Überexpression, Myelinverlust und Axonuntergang, könnten unabhängig voneinander verursacht werden. Eine andere eventuelle Erklärung der Befunde wäre, dass zum Untersuchungszeitpunkt die ursprünglich besonders demyelinisierten Axone bereits abgestorben sind. Somit wären die Messungen sozusagen durch den Krankheitsverlauf selbst verändert worden und nicht mehr repräsentativ für den eigentlichen Zustand. Dies könnte sich in jüngeren CMT-Ratten anders darstellen.

Diese zweite Begründung wird unterstützt durch die signifikante Korrelation von gemessener Myelindicke (g-ratio) und der Axonanzahl. Folglich haben behandelte CMT-Ratten mit wenig verbliebenem Restmyelin auch wenige Axone. Warum hat ein Myelinscheidenverlust keinen Einfluss auf den axonalen Verlust, auf die Myelindicke aber schon? Eventuell verändert der axonale Verlust die Ergebnisse beider Untersuchungen.

Die Myelindicke (g-ratio) und der Anteil nicht myelinisierter Axone korrelieren. Tiere mit vielen überhaupt nicht myelinisierten Axonen haben also auch dünne verbliebene Myelinscheiden. Dies ist verständlich und einleuchtend, steht aber in Konflikt mit den Ergebnissen der Behandlung. Progesteron beeinflusst eben nur die Dicke des verbliebenen Myelins (Abbildung 21B), aber nicht den Anteil demyelinisierter Axone (Abbildung 21D). Warum korrelieren beide Parameter, werden aber nicht in gleicher Weise durch Progesteron verändert? Die nahe liegende Erklärung dürfte die zu geringe Probenanzahl in den Behandlungsgruppen sein. Der Effekt auf die Myelindicke könnte stärker sein als auf den Prozentsatz demyelinisierter Axone und somit leichter zu detektieren. Daher würden beide Parameter korrelieren und beide auf Progesteron reagieren, aber der Behandlungseffekt in der Varianz untergehen.

Zu diskutieren sind neben den Vergleichen innerhalb der Histologie und des Phänotyps auch die Korrelationen zwischen den pathophysiologischen Ebenen der CMT1A. Zuerst werden diejenigen Befunde erörtert, die sich nicht signifikant korrelieren lassen. Die PMP22-Expression steht mit der Axonanzahl in den Ischiasnerven und der Dicke des verbliebenen Myelins nicht in signifikantem Zusammenhang (Abbildung 24B). Eine mögliche Begründung könnte die kurzfristige Regulation der PMP22-Expression im Vergleich zur Histologie sein. Die mRNA einer Zelle wird kurzfristig reguliert und metabolisiert. Die Dicke des Myelins und die Anzahl aller Axone hingegen sind langfristige Resultate der PMP22-Expressionsregulation im Verlauf der CMT1A. Eine andere Erklärung wären wiederum die geringen Tierzahlen der histologischen Analysen. Die inhaltlich bedeutendsten und signifikanten Korrelationen zwischen Phänotyp, Histologie und PMP22-Expression werden im folgenden Teil dargestellt.

#### **4.2.5.1 Korrelation von PMP22-Expression und Phänotyp**

Die in den Ischiasnerven der CMT-Ratten gemessene PMP22-Expression korreliert signifikant mit dem Phänotyp der Tiere beurteilt durch zwei klinische Untersuchungsmethoden. Zur Vereinfachung ist nur die Korrelation von Stangentest und Expression abgebildet (Abbildung

24C). Interessanterweise waren diese Korrelationen nur innerhalb der mit Progesteron und Onapriston behandelten Gruppen herzustellen. Erst die Modulation der PMP22-Expression erzeugt also einen Zusammenhang zwischen Expression und Klinik. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Klinik der CMT1A über eine veränderte PMP22-Expression moduliert wird.

Die nicht signifikante Korrelation in der unbehandelten Gruppe ist erklärbar durch die lange Kette von Ereignissen, die zwischen der PMP22-Expression und der Ausprägung der Klinik von CMT1A steht. Sowohl experimentell als auch biologisch existieren viele Variablen von der PMP22-Expression über Demyelinisierung, axonalen Verlust und die Muskelatrophie bis zur Klinik. Die Korrelation zwischen Expression und Klinik wird durch die biologische Varianz schwieriger zu detektieren und erst in den Extremsituationen deutlich, nachdem die Behandlung die Expression deutlich angehoben oder gesenkt hat.

Ein Zusammenhang zwischen Klinik und PMP22-Expression wurde in der CMT-Ratte bereits beschrieben (Sereda et al. 1996). Auch in einem Mausmodell, das eine pharmakologisch regulierte PMP22-Überexpression ermöglicht, konnte der direkte Zusammenhang zwischen PMP22-Expression und den Merkmalen der CMT1A gezeigt werden (Perea et al. 2001). Mauslinien mit unterschiedlicher PMP22-Transgenanzahl zeigen eine Korrelation zwischen PMP22-Expression und Klinik (Huxley et al. 1998). Die Ergebnisse bestätigen das Konzept der CMT1A als Gendosierkrankung und den kausalen Zusammenhang zwischen Veränderungen der PMP22-Expression und der Klinik der CMT1A nach Steroidbehandlung.

#### **4.2.5.2 Korrelation von PMP22-Expression und Histologie**

Die PMP22-Expression wurde signifikant mit dem Anteil demyelinisierter Axone korreliert (Abbildung 24D). Dies weist darauf hin, dass die PMP22-Überexpression den Schwanzzellschaden und die Demyelinisierung bedingt, auch wenn die Demyelinisierung nicht signifikant durch die Steroidbehandlung beeinflusst werden konnte. Offensichtlich ist der Grad der Überexpression zum Myelinschaden proportional. Dies bestätigt auch den Zusammenhang zwischen beiden. Die menschliche PMP22-mRNA-Überexpression wurde ebenfalls mit dem Grad der Demyelinisierung korreliert (Yoshikawa et al. 1994), aber nicht eindeutig mit der Klinik (Hanemann et al. 1994).

#### **4.2.5.3 Korrelation von Phänotyp und Histologie**

Einerseits sollte überprüft werden, inwieweit die Phänotypanalysen tatsächlich die Ausprägung der CMT1A messen. Andererseits sollte nachvollzogen werden, wie die Klinik der behandelten CMT-Ratten mit der Histologie der CMT1A in Zusammenhang steht. Beide Phänotypanalysen korrelierten signifikant mit dem Prozentsatz demyelinisierter Axone (Abbildung 24E). Zur Vereinfachung ist nur die erste Korrelation abgebildet.

Offensichtlich bietet der Stangentests im unteren Skalenbereich (<50 Sekunden) nur eine geringe Trennschärfe. Unter den Tieren, die weniger als 50 Sekunden im Stangentest erreichen, verbergen sich solche mit 5% aber auch solche mit 17% demyelinisierten Axonen. Das klinische Punktesystem zeigt ein ähnliches Problem. Möglicherweise unterscheidet sich die

Progesterongruppe im Alter von sieben Wochen klinisch nicht mehr von den Kontrollen, weil die Analysemethoden für besonders schwer betroffene CMT-Ratten ungenügend sind. Trotz dieser Einschränkung bestätigt die Korrelation mit der Histologie die Phänotypenanalysen als Maß der CMT1A. Die Klinik der CMT-Ratten kann im Gegensatz zur Histologie zu jedem Zeitpunkt im Verlauf der Erkrankung beurteilt werden. Die Demyelinisierung kann erst nach dem Tod der CMT-Ratten gemessen werden. Die veränderte Klinik ist ein Resultat der veränderten Demyelinisierung im peripheren Nerven. Die klinischen Analysen wurden also sowohl methodisch, als auch inhaltlich überprüft.

Neben der Demyelinisierung verursacht der axonale Verlust die Symptome der CMT1A. Sowohl der Stangentest als auch das klinische Punktesystem ließen sich signifikant mit der Axonanzahl in den Ischiasnerven korrelieren. Da die Ergebnisse grundsätzlich vergleichbar waren mit denen der Demyelinisierung, ist zur Vereinfachung keine Abbildung eingefügt. Behandelte CMT-Ratten mit vielen Axonen in den Ischiasnerven sind also besonders leistungsfähig im Stangentest und klinischen Punktesystem. Dies bestätigt den Zusammenhang zwischen axonalem Untergang und der Klinik der Neuropathie. In Übereinstimmung damit werden im Alter von sieben Wochen Axonanzahl und Phänotyp auf gleiche Weise durch Onapriston moduliert (Abbildung 21F, Abbildung 22C, Abbildung 23C). Beide Parameter der CMT1A stehen augenscheinlich in Zusammenhang.

In anderen Arbeiten wurde für CMT1A-Patienten eine Korrelation zwischen Demyelinisierung und Klinik gezeigt (Thomas et al. 1997). Vor allem die Nervenleitgeschwindigkeit wurde als Maß des Myelinverlusts herangezogen (Hoogendijk et al. 1994; Birouk et al. 1997). Dennoch korreliert der axonale Verlust und die folgende Muskelatrophie stärker als die Demyelinisierung mit dem Phänotyp (Krajewski et al. 1999; Krajewski et al. 2000; Lewis et al. 2003). Teilweise konnte die histologisch gemessene Demyelinisierung nicht mit der klinischen Ausprägung der CMT1A korreliert werden (Krajewski et al. 1999). Stattdessen findet sich eine deutlichere Korrelation zwischen jeweils dem axonalen Verlust und der folgenden Muskelatrophie mit den klinischen Ausprägungen. Offensichtlich verursacht nicht die Demyelinisierung und die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit die eigentlichen Symptome, sondern erst die Muskelatrophie. Diese Befunde stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen überein. Sowohl die Demyelinisierung, als auch der axonale Verlust korrelieren in der vorliegenden Arbeit mit dem Phänotyp. Zusammenfassend können die Ergebnisse der phänotypischen Analysen sehr deutlich mit denen der Histologie korreliert werden. Dies bestätigt einerseits die Verwendung der klinischen Testmethoden. Andererseits spricht es für einen kausalen Zusammenhang zwischen der histologischen und der klinischen Ausprägung der CMT1A.

### **4.3 Schlussfolgerungen und Konsequenzen**

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich verschiedene Erkenntnisse über die hereditäre Neuropathie CMT1A und über die Rolle von Progesteron im peripheren Nervensystem.

Dieses steroidbasierte Signalsystem reguliert die Myelinenexpression. Progesteron ist in der pathologischen Situation der CMT1A für die Aufrechterhaltung eines gewissen Anteils der PMP22-Expression verantwortlich. Darüber hinaus kann die PMP22-Expression durch Progesteron aktiviert werden. Dies gilt sowohl für die Wildtyp- als auch für die transgene Situation. Auch das Myelinprotein MPZ / P0 wird auf diese Weise beeinflusst. Offensichtlich ist Progesteron ein wichtiger Regulator der Myelinenexpression, wobei zusätzliches Progesteron weiter reichende Effekte hat als die Blockade der Steroidrezeptoren.

Wie bereits demonstriert, ist die Rate der Überexpression von PMP22 proportional zur Schwere der CMT1A. Einerseits wurde somit die durch eine chromosomale Duplikation verursachte PMP22-Überexpression als Ursache der CMT1A wiederum bestätigt. Andererseits wurde die in vielen Studien demonstrierte Variation in der Klinik von CMT1A auf eine Variation in der PMP22-Expression zurückgeführt. Dies erklärt die Schwere der Klinik als quantitatives Resultat der PMP22-Expression. Möglicherweise begründen individuelle Unterschiede der Hormonproduktion die Varianz zwischen einzelnen CMT1A-Patienten. Die genauen Mechanismen der Varianz bleiben jedoch unklar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen einerseits nahe, dass die Anwendung von Progesteron oder entsprechenden Agonisten in CMT1A-Patienten vermieden werden sollte. Andererseits sollte in einer experimentellen Therapie der CMT1A die Modulation der PMP22-Expression primäres Ziel sein. Die PMP22-Expression transgener Ratten wurde durch Progesteron gesteigert und durch Onapriston vermindert. Dieser Effekt setzte sich fort in den CMT1A-ähnlichen Phänotyp. Progesteron beschleunigte die Progression der hereditären Neuropathie, während Onapriston sie verlangsamte und abschwächte. Hier wurde somit zum ersten Mal die prinzipielle Wirkung einer experimentellen Therapie der CMT1A im Tiermodell bewiesen. Das Progesteronsignalsystem ist dabei ein viel versprechendes pharmakologisches Ziel.

## 5. Zusammenfassung

Die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) ist die häufigste vererbliche Neuropathie des Menschen und im Großteil der Fälle (60-70%) mit einer partiellen Duplikation des Chromosoms 17p11.2 assoziiert (CMT Typ 1A). Das in dieser Region lokalisierte Gen des peripheren Myelin-Proteins 22 (PMP22) wird in Schwannzellen überexprimiert, was zu einem Verlust der Myelinscheiden des peripheren Nervensystems führt. Der resultierende axonale Schaden bedingt die progrediente, distal betonte Muskelatrophie der CMT1A. Diese Symptome werden durch transgene Überexpression von PMP22 im Rattenmodell (CMT-Ratten) zutreffend imitiert. Die CMT-Ratte ist dank ihrer geringen PMP22-Transgendosis besonders geeignet für die Analyse des Pathomechanismus und möglicher experimenteller Therapien der CMT1A. Progesteron ist ein bekannter Regulator des peripheren Myelins. Exogen zugeführtes Progesteron steigert die PMP22-mRNA-Expression in Schwannzellen *in vitro* und *in vivo*.

Daher wurde dieses Signalsystem in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt, um auf die CMT1A-Pathologie Einfluss zu nehmen. Die PMP22-mRNA-Überexpression der CMT-Ratten konnte durch Anwendung des Progesteronantagonisten Onapriston reduziert werden. Dies verringerte den axonalen Verlust und verlangsamte die klinische Progredienz der CMT1A. Im Gegensatz dazu erhöhte Progesteron selbst die PMP22-mRNA-Expression. Die Hypomyelinisierung wurde dadurch verstärkt und der neuropathische Phänotyp der CMT-Ratten entwickelte sich früher und stärker. Die Veränderung und die Varianz der Klinik wurden dabei als Ergebnis einer veränderten und individuell unterschiedlichen PMP22-Expression interpretiert. Dies lieferte den prinzipiellen experimentellen Beweis, dass die CMT1A im Tiermodell therapeutisch beeinflusst werden kann. Der Progesteronrezeptor ist ein viel versprechendes pharmakologisches Ziel einer Therapie dieser Gendosiserkrankung.

## ***6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis***

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Genetik und Klinik der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1 .....	6
Abbildung 2: Myelinproteine des PNS.....	9
Abbildung 3: Gendosiseffekt der PMP22-Duplikation und -Deletion .....	10
Abbildung 4: Pathomechanismen der CMT1A. ....	13
Abbildung 5: Myeligenexpression im PNS von CMT-Ratten .....	16
Abbildung 6: Synthese und Struktur von Steroidhormonen.....	18
Abbildung 7: Funktion von Progesteron in Schwanzzellen. ....	20
Abbildung 8: Ohrlochcode der Rattenzucht. ....	32
Abbildung 9: Zeitschema der Steroidbehandlung .....	34
Abbildung 10: Anatomie des Hinterbeins der Ratte.....	36
Abbildung 11: Das "g-ratio" als Maß der Myelindicke.....	39
Abbildung 12: Die quantitative Real-Time PCR nach dem TaqMan-Prinzip.....	46
Abbildung 13: Phänotyp der CMT-Ratten: .....	48
Abbildung 14: Muskelatrophie der CMT-Ratten: .....	50
Abbildung 15: Demyelinisierende Neuropathie der CMT-Ratten. ....	51
Abbildung 16: Myeligenexpression im PNS von CMT-Ratten: .....	52
Abbildung 17: Progesteronkonzentration im Plasma Progesteron behandelter Ratten..	53
Abbildung 18: Körpergewicht der Versuchstiere nach Steroidbehandlung .....	54
Abbildung 19: Erhöhte Wildtyp-PMP22-Expression nach Progesteronbehandlung .....	55
Abbildung 20: Myeligenexpression nach Behandlung mit Steroidhormonen.....	56
Abbildung 21: Histologische Charakteristika der CMT1A nach Steroidbehandlung. ....	58
Abbildung 22: Stangentestphänotyp nach Steroidbehandlung.....	60
Abbildung 23: Klinischer Phänotyp nach Steroidbehandlung: .....	61
Abbildung 24: Korrelation der Untersuchungsergebnisse .....	63
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Auswirkung der Steroidbehandlung. ....	72
Abbildung 26: Schemat. Darstellung der MPZ / P0-Expression nach Steroidbeh.....	75
Abbildung 27: Schematische Darstellung des Phänotyps der CMT-Ratten.....	80

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Die hereditären Neuropathien.....	2
Tabelle 2: genetische Klassifikation der hereditären Neuropathien:.....	4
Tabelle 3: Kriterien des klinischen Punktesystems .....	35

## 7. Literaturverzeichnis

- Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV und Suter U (1995): Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet* 11(3): 274-80.
- Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH, Zielasek J, Toyka KV und Suter U (1997): Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy. *J Neurosci* 17(12): 4662-71.
- Anderson TJ, Klugmann M, Thomson CE, Schneider A, Readhead C, Nave KA und Griffiths IR (1999): Distinct phenotypes associated with increasing dosage of the PLP gene: implications for CMT1A due to PMP22 gene duplication. *Ann N Y Acad Sci* 883: 234-46.
- Baulieu EE und Robel P (1990): Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(3): 395-403.
- Baulieu EE (1997): Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52: 1-32.
- Baulieu EE, Robel P und Schumacher M (2001): Neurosteroids: beginning of the story. *Int Rev Neurobiol* 46: 1-32.
- Beato M (1989): Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56(3): 335-44.
- Bellina JH und Deming B (1973): Charcot-Marie-Tooth disease and pregnancy: report of a case. *J La State Med Soc* 125(11): 393-5.
- Bellone E, Di Maria E, Soriani S, Varese A, Doria LL, Ajmar F und Mandich P (1999): A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum Mutat* 14(4): 353-4.
- Berciano J, Garcia A, Calleja J und Combarros O (2000): Clinico-electrophysiological correlation of extensor digitorum brevis muscle atrophy in children with charcot-marie-tooth disease 1A duplication. *Neuromuscul Disord* 10(6): 419-24.
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, Le Forestier N, Agid Y, Brice A und Bouche P (1997): 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 (Pt 5): 813-23.
- Blair IP, Nash J, Gordon MJ und Nicholson GA (1996): Prevalence and origin of de novo duplications in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: first report of a de novo duplication with a maternal origin. *Am J Hum Genet* 58(3): 472-6.
- Bocquel MT, Ji J, Ylikomi T, Benhamou B, Vergez A, Chambon P und Gronemeyer H (1993): Type II antagonists impair the DNA binding of steroid hormone receptors without affecting dimerization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45(4): 205-15.
- Boerkoel CF, Inoue K, Reiter LT, Warner LE und Lupski JR (1999): Molecular mechanisms for CMT1A duplication and HNPP deletion. *Ann N Y Acad Sci* 883: 22-35.
- Bosse F, Zoidl G, Wilms S, Gillen CP, Kuhn HG und Muller HW (1994): Differential expression of two mRNA species indicates a dual function of peripheral myelin protein PMP22 in cell growth and myelination. *J Neurosci Res* 37(4): 529-37.
- Bouche P, Gherardi R, Cathala HP, Lhermitte F und Castaigne P (1983): Peroneal muscular atrophy. Part 1. Clinical and electrophysiological study. *J Neurol Sci* 61(3): 389-99.
- Bullock AE, Clark AL, Grady SR, Robinson SF, Slobe BS, Marks MJ und Collins AC (1997): Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *J Neurochem* 68(6): 2412-23.
- Butcher RL, Collins WE und Fugo NW (1974): Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94(6): 1704-1708.
- Chan JR, Phillips LJ, 2nd und Glaser M (1998): Glucocorticoids and progestins signal the initiation and enhance the rate of myelin formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10459-64.
- Charcot JM und Marie P (1886): Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Méd (Paris)* 6: 97-138.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE und Chan DC (2003): Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160(2): 189-200.
- Chies R, Nobbio L, Edomi P, Schenone A, Schneider C und Brancolini C (2003): Alterations in the Arf6-regulated plasma membrane endosomal recycling pathway in cells overexpressing the tetraspan protein Gas3/PMP22. *J Cell Sci* 116(Pt 6): 987-999.



- Chomczynski P und Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Cooper GS und Stroehla BC (2003): The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2(3): 119-25.
- Corpechot C, Young J, Calvel M, Wehrey C, Veltz JN, Touyer G, Mouren M, Prasad VV, Banner C, Sjoval J und et al. (1993): Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 133(3): 1003-9.
- Desarnaud F, Do Thi AN, Brown AM, Lemke G, Suter U, Baulieu EE und Schumacher M (1998): Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J Neurochem* 71(4): 1765-8.
- de Waegh SM, Lee VM und Brady ST (1992): Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68(3): 451-63.
- Dohler KD und Wuttke W (1975): Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97(4): 898-907.
- Dubrovsky BO (2005): Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(2): 169-92.
- D'Urso D und Muller HW (1997): Ins and outs of peripheral myelin protein-22: mapping transmembrane topology and intracellular sorting. *J Neurosci Res* 49(5): 551-62.
- D'Urso D, Ehrhardt P und Muller HW (1999): Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J Neurosci* 19(9): 3396-403.
- Dyck PJ und Lambert EH (1968): Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol* 18(6): 603-18.
- Dyck PJ, Swanson CJ, Low PA, Bartleson JD und Lambert EH (1982): Prednisone-responsive hereditary motor and sensory neuropathy. *Mayo Clin Proc* 57(4): 239-46.
- Dyck PJ, Karnes JL und Lambert EH (1989): Longitudinal study of neuropathic deficits and nerve conduction abnormalities in hereditary motor and sensory neuropathy type 1. *Neurology* 39(10): 1302-8.
- Dyck PJ, Chance P, Lebo R und Carney JA. Hereditary Motor and Sensory Neuropathy. In: Peripheral Neuropathy. Vol. 2. Dyck PJ und Thomas PK. Saunders. Philadelphia 1993, 1094-1136.
- Eagle M, Baudouin SV, Chandler C, Giddings DR, Bullock R und Bushby K (2002): Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord* 12(10): 926-9.
- Edgar JM, McLaughlin M, Yool D, Zhang SC, Fowler JH, Montague P, Barrie JA, McCulloch MC, Duncan ID, Garbern J, Nave KA und Griffiths IR (2004): Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 166(1): 121-31.
- Edwards DP, Altmann M, DeMarzo A, Zhang Y, Weigel NL und Beck CA (1995): Progesterone receptor and the mechanism of action of progesterone antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 449-58.
- Ellis D und Malcolm S (1994): Proteolipid protein gene dosage effect in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nat Genet* 6(4): 333-4.
- Emery AE (1991): Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1(1): 19-29.
- Engel SR und Grant KA (2001): Neurosteroids and behavior. *Int Rev Neurobiol* 46: 321-48.
- Eulenburg M (1856): Über progressive Muskelatrophie. *Dtsch Klin (Berlin)* 8: 129-131.
- Fabrizi GM, Simonati A, Morbin M, Cavallaro T, Taioli F, Benedetti MD, Edomi P und Rizzuto N (1998): Clinical and pathological correlations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A with the 17p11.2p12 duplication: a cross-sectional morphometric and immunohistochemical study in twenty cases. *Muscle Nerve* 21(7): 869-77.
- Fahrenkamp I und Friede RL (1987): Characteristic variations of relative myelin sheath thickness in 11 nerves of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 177(2): 115-21.
- Fuhrmann U, Hess-Stumpff H, Cleve A, Neef G, Schwede W, Hoffmann J, Fritzeimer KH und Chwalisz K (2000): Synthesis and biological activity of a novel, highly potent progesterone receptor antagonist. *J Med Chem* 43(26): 5010-6.
- Gabreels-Festen AA, Bolhuis PA, Hoogendijk JE, Valentijn LJ, Eshuis EJ und Gabreels FJ (1995): Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: morphological phenotype of the 17p duplication versus PMP22 point mutations. *Acta Neuropathol (Berl)* 90(6): 645-9.
- Gabriel JM, Erne B, Pareyson D, Sghirlanzoni A, Taroni F und Steck AJ (1997): Gene dosage effects in hereditary peripheral neuropathy. Expression of peripheral myelin protein 22 in Charcot-

- Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies nerve biopsies. *Neurology* **49**(6): 1635-40.
- Garcia A, Malamut RE, England JD, Parry GS, Liu P und Lupski JR (1995): Clinical variability in two pairs of identical twins with the Charcot- Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Neurology* **45**(11): 2090-2093.
- Garcia A, Combarros O, Calleja J und Berciano J (1998): Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p duplication in infancy and early childhood: a longitudinal clinical and electrophysiologic study. *Neurology* **50**(4): 1061-7.
- Guenard V, Montag D, Schachner M und Martini R (1996): Onion bulb cells in mice deficient for myelin genes share molecular properties with immature, differentiated non-myelinating, and denervated Schwann cells. *Glia* **18**(1): 27-38.
- Guennoun R, Schumacher M, Robert F, Delespierre B, Gouezou M, Eychenne B, Akwa Y, Robel P und Baulieu EE (1997): Neurosteroids: expression of functional 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase by rat sensory neurons and Schwann cells. *Eur J Neurosci* **9**(11): 2236-47.
- Guennoun R, Benmessahel Y, Delespierre B, Gouezou M, Rajkowski KM, Baulieu EE und Schumacher M (2001): Progesterone stimulates Krox-20 gene expression in Schwann cells. *Brain Res Mol Brain Res* **90**(1): 75-82.
- Guzzetta V, Santoro L, Gasparo-Rippa P, Ragno M, Vita G, Caruso G und Andria G (1995): Charcot-Marie-Tooth disease: molecular characterization of patients from central and southern Italy. *Clin Genet* **47**(1): 27-32.
- Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, Schmalbruch H und Kahn A (1997): Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med* **3**(4): 429-36.
- Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M und Kato J (1992): Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* **14**(3): 239-49.
- Hanemann CO, Stoll G, D'Urso D, Fricke W, Martin JJ, Van Broeckhoven C, Mancardi GL, Bartke I und Muller HW (1994): Peripheral myelin protein-22 expression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1a sural nerve biopsies. *J Neurosci Res* **37**(5): 654-9.
- Harding AE und Thomas PK (1980): The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* **103**(2): 259-80.
- Harding AE. Inherited neuronal atrophy and degeneration predominantly of lower motor neurons. In: Peripheral Neuropathy. Vol. 2. Dyck PJ und Thomas PK. Saunders. Philadelphia 1993, 1051-1063
- Hasse B, Bosse F, Hanenberg H und Muller HW (2004): Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: domain specific trans-interactions. *Mol Cell Neurosci* **27**(4): 370-8.
- Heikinheimo O, Ranta S, Grunberg S, Lahteenmaki P und Spitz IM (1997): Alterations in the pituitary-thyroid and pituitary-adrenal axes--consequences of long-term mifepristone treatment. *Metabolism* **46**(3): 292-6.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R und Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7276-80.
- Hoogendijk JE, De Visser M, Bolhuis PA, Hart AA und Ongerboer de Visser BW (1994): Hereditary motor and sensory neuropathy type I: clinical and neurographical features of the 17p duplication subtype. *Muscle Nerve* **17**(1): 85-90.
- Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-Branger D, Pellissier JF und Fontes M (1996): Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. *Hum Mol Genet* **5**(5): 563-9.
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Saberan-Djoniedi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK und Fontes M (1998): Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **7**(3): 449-58.
- Inouye H und Kirschner DA (1994): Membrane topology of PLP in CNS myelin: evaluation of models. *Neurochem Res* **19**(8): 975-81.
- Ionasescu VV (1995): Charcot-Marie-Tooth neuropathies: from clinical description to molecular genetics. *Muscle Nerve* **18**(3): 267-75.
- Jang GR und Benet LZ (1997): Antiprogesterin pharmacodynamics, pharmacokinetics, and metabolism: implications for their long-term use. *J Pharmacokinetic Biopharmacol* **25**(6): 647-72.
- Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ und O'Malley BW (1997): Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 7879-84.

- Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P und Baulieu EE (1996): Demonstration of progesterone receptors in rat Schwann cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58(1): 77-82.
- Jung-Testas I, Do Thi A, Koenig H, Desarnaud F, Shazand K, Schumacher M und Baulieu EE (1999): Progesterone as a neurosteroid: synthesis and actions in rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6): 97-107.
- Kaku DA, Parry GJ, Malamut R, Lupski JR und Garcia CA (1993): Nerve conduction studies in Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy associated with a segmental duplication of chromosome 17. *Neurology* 43(9): 1806-8.
- Karnovsky MJ (1965): A formaldehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137A.
- Killian JM, Tiwari PS, Jacobson S, Jackson RD und Lupski JR (1996): Longitudinal studies of the duplication form of Charcot-Marie-Tooth polyneuropathy. *Muscle Nerve* 19(1): 74-8.
- Kitamura K, Suzuki M und Uyemura K (1976): Purification and partial characterization of two glycoproteins in bovine peripheral nerve myelin membrane. *Biochim Biophys Acta* 455(3): 806-16.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressousches A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y und Baulieu EE (1995): Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 268(5216): 1500-3.
- Koide SS (1998): Mifepristone. Auxiliary therapeutic use in cancer and related disorders. *J Reprod Med* 43(7): 551-60.
- Krajewski K, Turansky C, Lewis R, Garbern J, Hinderer S, Kamholz J und Shy ME (1999): Correlation between weakness and axonal loss in patients with CMT1A. *Ann N Y Acad Sci* 883: 490-2.
- Krajewski K, Lewis RA, Fuerst DR, Turansky C, Hinderer SR, Garbern J, Kamholz J und Shy ME (2000): Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 123 (Pt 7): 1516-27.
- Kuhlenbaumer G, Young P, Hunermund G, Ringelstein B und Stogbauer F (2002): Clinical features and molecular genetics of hereditary peripheral neuropathies. *J Neurol* 249(12): 1629-50.
- Kurihara S, Adachi Y, Wada K, Awaki E, Harada H und Nakashima K (2002): An epidemiological genetic study of Charcot-Marie-Tooth disease in Western Japan. *Neuroepidemiology* 21(5): 246-50.
- Labombarda F, Guennoun R, Gonzalez S, Roig P, Lima A, Schumacher M und De Nicola AF (2000): Immunocytochemical evidence for a progesterone receptor in neurons and glial cells of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 288(1): 29-32.
- Lauber AH, Romano GJ und Pfaff DW (1991): Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40(1-3): 53-62.
- Le Goascogne C, Eychenne B, Tonon MC, Lachapelle F, Baumann N und Robel P (2000): Neurosteroid progesterone is up-regulated in the brain of jimpy and shiverer mice. *Glia* 29(1): 14-24.
- Lee LG, Connell CR und Bloch W (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21(16): 3761-6.
- Lewis RA, Li J, Fuerst DR, Shy ME und Krajewski K (2003): Motor unit number estimate of distal and proximal muscles in Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle Nerve* 28(2): 161-7.
- Löffler G. Endokrine Gewebe I: Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen. In: Biochemie und Pathobiochemie. Löffler G und Petrides PE. Springer. Berlin Heidelberg New York 1996a, 762-784.
- Löffler G. Endokrine Gewebe III: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. In: Biochemie und Pathobiochemie. Löffler G und Petrides PE. Springer. Berlin Heidelberg New York 1996b, 814-854.
- Luft JH (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 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 und et al. (1991): DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66(2): 219-32.
- MacLusky NJ und McEwen BS (1980): Progesterone receptors in rat brain: distribution and properties of cytoplasmic progesterone-binding sites. *Endocrinology* 106(1): 192-202.
- Magnaghi V, Cavarretta I, Zucchi I, Susani L, Rupprecht R, Hermann B, Martini L und Melcangi RC (1999): Po gene expression is modulated by androgens in the sciatic nerve of adult male rats. *Brain Res Mol Brain Res* 70(1): 36-44.

- Magnaghi V, Cavarretta I, Galbiati M, Martini L und Melcangi RC (2001): Neuroactive steroids and peripheral myelin proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3): 360-71.
- Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka KV und Suter U (1996): Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J Neurosci* 16(17): 5351-60.
- Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L und Schneider C (1990): A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol* 10(6): 2924-30.
- Martini R, Berciano J und Van Broeckhoven C (2000): 5th Workshop of the European CMT Consortium, 69th ENMC International Workshop: therapeutic approaches in CMT neuropathies and related disorders 23-25 April 1999, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 10(1): 69-74.
- Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson AM, Albertsen H, Hanemann CO, Muller HW, Bird TD, White R und et al. (1992): Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet* 1(3): 176-9.
- Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ und Pangalos MN (2000): The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 98(1): 9-20.
- Melcangi RC, Magnaghi V, Cavarretta I, Zucchi I, Bovolini P, D'Urso D und Martini L (1999): Progesterone derivatives are able to influence peripheral myelin protein 22 and P0 gene expression: possible mechanisms of action. *J Neurosci Res* 56(4): 349-57.
- Mellon SH und Vaudry H (2001): Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *Int Rev Neurobiol* 46: 33-78.
- Mercier G, Turque N und Schumacher M (2001): Early activation of transcription factor expression in Schwann cells by progesterone. *Brain Res Mol Brain Res* 97(2): 137-48.
- Michna H, Nishino Y, Schneider MR, Louton T und el Etreby MF (1991): A bioassay for the evaluation of antiproliferative potencies of progesterone antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38(3): 359-65.
- Michna H, Fritzemeier KH, Parczyk K, Nishino Y und Schneider MR (1996): Antiprogestin-progesterone interactions. *Cancer Treat Res* 83: 191-212.
- Morocutti C, Colazza GB, Soldati G, D'Alessio C, Damiano M, Casali C und Pierelli F (2002): Charcot-Marie-Tooth disease in Molise, a central-southern region of Italy: an epidemiological study. *Neuroepidemiology* 21(5): 241-5.
- Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R und Ilsley D (2000): A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21(1): 128-34.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Naef R und Suter U (1998): Many facets of the peripheral myelin protein PMP22 in myelination and disease. *Microsc Res Tech* 41(5): 359-71.
- Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M und Milbrandt J (2001): EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 30(2): 355-68.
- Neef G, Beier S, Elger W, Henderson D und Wiechert R (1984): New steroids with antiprogestational and antigluocorticoid activities. *Steroids* 44(4): 349-72.
- Neumann F, Schenk B, Schleusener H und Schweikert HU. Pharmakotherapie mit Hormonen. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxologie. Forth W, Henschler D, Rummel W und Starke K. Spektrum. Heidelberg Berlin Oxford 1996, 851-54.
- Nicholson GA (1991): Penetrance of the hereditary motor and sensory neuropathy Ia mutation: assessment by nerve conduction studies. *Neurology* 41(4): 547-52.
- Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinck HM, Griffiths IR und Nave KA (1999): The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann N Y Acad Sci* 883: 254-61.
- Niemann S, Sereda MW, Suter U, Griffiths IR und Nave KA (2000): Uncoupling of myelin assembly and schwann cell differentiation by transgenic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci* 20(11): 4120-8.
- Nishino Y, Michna H, Hasan SH und Schneider MR (1992): Involvement of the adrenal glands in the prolactin rise induced in the female rat by an antiprogestin, onapristone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41(3-8): 841-5.

- Nordeen SK, Bona BJ, Beck CA, Edwards DP, Borrer KC und DeFranco DB (1995): The two faces of a steroid antagonist: when an antagonist isn't. *Steroids* 60(1): 97-104.
- Norreel JC, Vinay L, Fontes M und Clarac F (2003): Close relationship between motor impairments and loss of functional motoneurons in a Charcot-Marie-Tooth type 1A model. *Neuroscience* 116(3): 695-703.
- Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR und Shooter EM (1999a): PMP22 accumulation in aggregates: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis* 6(5): 450-60.
- Notterpek L, Snipes GJ und Shooter EM (1999b): Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination. *Glia* 25(4): 358-69.
- Palau F, Lofgren A, De Jonghe P, Bort S, Nelis E, Sevilla T, Martin JJ, Vilchez J, Prieto F und Van Broeckhoven C (1993): Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2(12): 2031-5.
- Pentao L, Wise CA, Chinault AC, Patel PI und Lupski JR (1992): Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet* 2(4): 292-300.
- Perea J, Robertson AM, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK und Huxley C (2001): Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet* 10(10): 1007-18.
- Pollock M, Nukada H und Kritchinsky M (1982): Exacerbation of Charcot-Marie-tooth disease in pregnancy. *Neurology* 32(11): 1311-4.
- Popot JL, Pham Dinh D und Dautigny A (1991): Major Myelin proteolipid: the 4-alpha-helix topology. *J Membr Biol* 120(3): 233-46.
- Prince RJ und Simmonds MA (1992): Steroid modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor. *Neuropharmacology* 31(3): 201-5.
- Puia G, Santi MR, Vicini S, Pritchett DB, Purdy RH, Paul SM, Seeburg PH und Costa E (1990): Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors. *Neuron* 4(5): 759-65.
- Puia G, Ducic I, Vicini S und Costa E (1993): Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABAA receptor subunit composition? *Receptors Channels* 1(2): 135-42.
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH, Jr., Ludlow CL und Fischbeck KH (2003): Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33(4): 455-6.
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, Barker DF, Martin JJ, De Visser M, Bolhuis PA und et al. (1991): Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1(2): 93-7.
- Richardson KC, Jarett L und Finke EH (1960): Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Techn* 35: 313-323.
- Robert F, Guennoun R, Desarnaud F, Do-Thi A, Benmessahel Y, Baulieu EE und Schumacher M (2001): Synthesis of progesterone in Schwann cells: regulation by sensory neurons. *Eur J Neurosci* 13(5): 916-24.
- Robertson AM, Perea J, McGuigan A, King RH, Muddle JR, Gabreels-Festen AA, Thomas PK und Huxley C (2002): Comparison of a new pmp22 transgenic mouse line with other mouse models and human patients with CMT1A. *J Anat* 200(4): 377-90.
- Robertson JF, Willsher PC, Winterbottom L, Blamey RW und Thorpe S (1999): Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *Eur J Cancer* 35(2): 214-8.
- Robinson J, Merry BJ, Lightfoot ME und Hall AK (1981): Dynamics of progesterone metabolism in the pseudopregnant rat. *J Endocrinol* 90(3): 359-66.
- Rudnik-Schoneborn S, Rohrig D, Nicholson G und Zerres K (1993): Pregnancy and delivery in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Neurology* 43(10): 2011-6.
- Rupprecht R, Reul JM, Trapp T, van Steensel B, Wetzel C, Damm K, Zieglansberger W und Holsboer F (1993): Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* 11(3): 523-30.
- Rupprecht R (2003): Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology* 28(2): 139-68.
- Sahenk Z, Chen L und Mendell JR (1999): Effects of PMP22 duplication and deletions on the axonal cytoskeleton. *Ann Neurol* 45(1): 16-24.
- Sancho S, Magyar JP, Aguzzi A und Suter U (1999): Distal axonopathy in peripheral nerves of PMP22-mutant mice. *Brain* 122 (Pt 8): 1563-77.

- Sancho S, Young P und Suter U (2001): Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 124(Pt 11): 2177-87.
- Sartorius CA, Tung L, Takimoto GS und Horwitz KB (1993): Antagonist-occupied human progesterone receptors bound to DNA are functionally switched to transcriptional agonists by cAMP. *J Biol Chem* 268(13): 9262-6.
- Schenone A, Nobbio L, Caponnetto C, Abbruzzese M, Mandich P, Bellone E, Ajmar F, Gherardi G, Windebank AJ und Mancardi G (1997a): Correlation between PMP-22 messenger RNA expression and phenotype in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Ann Neurol* 42(6): 866-72.
- Schenone A, Nobbio L, Mandich P, Bellone E, Abbruzzese M, Aymar F, Mancardi GL und Windebank AJ (1997b): Underexpression of messenger RNA for peripheral myelin protein 22 in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Neurology* 48(2): 445-9.
- Schild TA. Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. Applied Biosystems. Weiterstadt. 1999.
- Schmid CD, Stienekemeier M, Oehen S, Bootz F, Zielasek J, Gold R, Toyka KV, Schachner M und Martini R (2000): Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *J Neurosci* 20(2): 729-35.
- Schneider MR, Michna H, Nishino Y, Neef G und el Etreby MF (1990): Tumor-inhibiting potential of ZK 112.993, a new progesterone antagonist, in hormone-sensitive, experimental rodent and human mammary tumors. *Anticancer Res* 10(3): 683-7.
- Schneider PB (1971): Determination of specific activity of <sup>32</sup>P-labeled compounds using Cerenkov counting. *J Nucl Med* 12(1): 14-6.
- Sereda MW (1999): Altered protein synthesis in sciatic nerve by transgenic overexpression of PMP22 in the CMT rat. *Ann N Y Acad Sci* 883: 530-2.
- Sereda MW, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, Suter U und Nave KA (1996): A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 16(5): 1049-60.
- Shen NH, Elliot WH, Doisy EAJ und Doisy EA (1954): The excretion of metabolites of progesterone-21-C<sub>14</sub> after intragastric administration to rats. *J Biol Chem* 208: 133-137.
- Shy ME (2004): Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol* 17(5): 579-85.
- Simoncini T und Genazzani AR (2003): Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* 148(3): 281-92.
- Simons M, Kramer EM, Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA und Schulz JB (2002): Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Cell Biol* 157(2): 327-36.
- Skre H (1974): Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 6(2): 98-118.
- Snipes GJ, Suter U, Welcher AA und Shooter EM (1992): Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol* 117(1): 225-38.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M und Vornlocher HP (2004): Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432(7014): 173-8.
- Spreyer P, Kuhn G, Hanemann CO, Gillen C, Schaal H, Kuhn R, Lemke G und Muller HW (1991): Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene. *Embo J* 10(12): 3661-8.
- Stoffel-Wagner B (2001): Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol* 145(6): 669-79.
- Stogbauer F, Young P, Kuhlenbaumer G, De Jonghe P und Timmerman V (2000): Hereditary recurrent focal neuropathies: clinical and molecular features. *Neurology* 54(3): 546-51.
- Suter U und Snipes GJ (1995): Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res* 40(2): 145-51.
- Suter U und Scherer SS (2003): Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci* 4(9): 714-26.
- Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, Murphy RA, Shooter EM und Patel PI (1994): Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J Biol Chem* 269(41): 25795-808.

- Taylor V, Welcher AA, Program AE und 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(48): 28824-33.
- Taylor W (1971): The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitam Horm* 29: 201-85.
- Thomas PK, Marques W, Jr., Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL, Muddle JR, Tyson J, Malcolm S und Harding AE (1997): The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 120 (Pt 3): 465-78.
- Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Ben Othman K, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO und et al. (1992): The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nat Genet* 1(3): 171-5.
- Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, De Vriendt E, Lofgren A, Nelis E, Warner LE, Lupski JR, Martin JJ und Van Broeckhoven C (1999): Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology* 52(9): 1827-32.
- Tooth HH. The peroneal type of progressive muscular atrophy. Lewis. London, 1886.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C und Charnay P (1994): Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371(6500): 796-9.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA und Orlando C (2002): Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 309(2): 293-300.
- Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, LeGuern E und Brice A (1996): Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 39(6): 813-7.
- Vallee M, Mayo W, Koob GF und Le Moal M (2001): Neurosteroids in learning and memory processes. *Int Rev Neurobiol* 46: 273-320.
- Van Broeckhoven F und Verkes RJ (2003): Neurosteroids in depression: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 165(2): 97-110.
- van de Wetering RA, Gabreels-Festen AA, Kremer H, Kalscheuer VM, Gabreels FJ und Mariman EC (1999): Regulation and expression of the murine PMP22 gene. *Mamm Genome* 10(4): 419-22.
- van der Schoot P, Zeegers TA, Muskiet FA und Slappendel EJ (1991): Reduction of the intake of food and water is responsible for reduction of litter growth when dams are treated with a progesterone antagonist. *Br J Nutr* 66(1): 17-26.
- van Look PF und von Hertzen H (1995): Clinical uses of antiprogestogens. *Hum Reprod Update* 1(1): 19-34.
- van Look PF und von Hertzen H. Antiprogestins: Perspectives for a Global Research Program. In: Clinical Applications of Mifepristone (RU 486) and Other Antiprogestins. Dorflinger L, Brown SS und Benet LZ. National Academy Press. Washington, DC 1993, 253-277.
- Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG und Lupski JR (1998): Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18(4): 382-4.
- Warwick MH und Parkes AS (1940): Absorption of progesterone and desoxycorticosterone. *Lancet* 1940 I: 406-408.
- Weaver CE, Marek P, Park-Chung M, Tam SW und Farb DH (1997a): Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10450-4.
- Weaver CE, Park-Chung M, Gibbs TT und Farb DH (1997b): 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res* 761(2): 338-41.
- Welcher AA, Suter U, De Leon M, Snipes GJ und Shooter EM (1991): A myelin protein is encoded by the homologue of a growth arrest-specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7195-9.
- Werner H, Jung M, Klugmann M, Sereda MW, Griffiths IR und Nave KA (1998): Mouse models of myelin diseases. *Brain Pathol* 8(4): 771-93.
- Wetzel CH, Hermann B, Behl C, Pestel E, Rammes G, Zieglgansberger W, Holsboer F und Rupprecht R (1998): Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol* 12(9): 1441-51.

- Wise CA, Garcia CA, Davis SN, Heju Z, Pentao L, Patel PI und Lupski JR (1993): Molecular analyses of unrelated Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease patients suggest a high frequency of the CMT1A duplication. *Am J Hum Genet* 53(4): 853-63.
- Wu FS, Gibbs TT und Farb DH (1991): Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40(3): 333-6.
- Yoshikawa H, Nishimura T, Nakatsuji Y, Fujimura H, Himoro M, Hayasaka K, Sakoda S und Yanagihara T (1994): Elevated expression of messenger RNA for peripheral myelin protein 22 in biopsied peripheral nerves of patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Ann Neurol* 35(4): 445-50.
- Young P und Suter U (2001): Disease mechanisms and potential therapeutic strategies in Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Brain Res Rev* 36(2-3): 213-21.
- Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y und Hirokawa N (2001): Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105(5): 587-97.
- Zorick TS, Syroid DE, Brown A, Gridley T und Lemke G (1999): Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development* 126(7): 1397-406.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM und Vance JM (2004): Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36(5): 449-51.



# *Danksagung*

Ich danke Prof. Dr. rer. nat. K.-A. Nave für seine umfassende Unterstützung, sein Vertrauen und die wissenschaftliche Konzeption der Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. med. M. Bähr für die Organisation und Vertretung der Arbeit.

Herrn Dr. M. W. Sereda danke ich für die Betreuung, Motivation und Hilfe bei der Umsetzung der Arbeit.

Den Kollegen der Abteilung Neurogenetik danke ich für unsere fachlichen Diskussionen und ihre methodischen Anregungen. Insbesondere danke ich in diesem Zusammenhang Naureen Uzma, Galin Michailov, Thomas Prukop, Bastian Brinkmann und Ruth Stassart.

Ulrike Bode und Carolin Stünkel danke ich für die Hilfe bei der molekularbiologischen Arbeit mit DNA und RNA. Annette Fahrenholz und Eva Nicksch danke ich für die Unterstützung bei histologischer Methodik.

Frau Dr. rer. nat. L. Dimou und Galin Michailov danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der subkutanen Injektionen. Melissa Thanos danke ich für die kritische Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. med. Dr. med. vet. S. Hillejahn und Herrn C.-H. Schälicke danke ich für die Unterstützung bei der Zeitplanung der Arbeit.

# Lebenslauf

Am 19.5.1978 wurde ich in Georgsmarienhütte geboren. Meine schulische Ausbildung beendete ich nach Besuch des Gymnasiums Burgdorf am 9.6.1997 mit dem Erhalt der allgemeinen Hochschulreife.

Das Medizinstudium begann ich zum Wintersemester 1998/99 in Göttingen. Nach Abschluss der ärztlichen Vorprüfung am 18.9.2000 und des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung am 17.9.2001 absolvierte ich am 23.3.2004 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Meine wissenschaftliche Arbeit begann ich im Jahre 2001 in der Abteilung Neurogenetik von Prof. Dr. rer. nat. K.-A. Nave am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen. Im Rahmen meiner Promotion mit dem Thema „Therapeutische Anwendung des Progesteronantagonisten „Onapriston“ im transgenen Rattenmodell der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1A (CMT1A)“ wurden folgende eigene Veröffentlichungen erstellt:

## Originalarbeit:

Sereda MW\*, **Meyer zu Hörste G\***, Suter U, Uzma N und Nave KA (2003): Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 9(12): 1533-7.

\* gleichberechtigte Erstautorenschaft

## Übersichtsarbeit:

**Meyer zu Hörste G** und Sereda MW (2005): Genetic defects of myelination: molecular pathogenesis of the Charcot-Marie-Tooth disease (CMT1A). *Neuroforum* 1: 25-30.

## Poster / Präsentationen / Abstracts:

Sereda MW, **Meyer zu Hörste G**, Prukop T und Nave KA. Long-term administration of progesterone antagonist in a PMP22-transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A (CMT1A). *Steroids and Nervous System, Satellite Symposium – Neuroprotective effects of steroids in the spinal cord and peripheral nervous system*, Torino, Italy, 2005.

**Meyer zu Hörste G**, Nave KA und Sereda MW. PMP22 expression in skin biopsies: towards a marker of disease severity in a model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A (CMT1A). *European and North American CMT Consortium Meeting*, Antwerpen, Belgium, 2004.

Sereda MW, **Meyer zu Hörste G** und Nave KA. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a PMP22-transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A (CMT1A). *European and North American CMT Consortium Meeting*, Antwerpen, Belgium, 2004.

**Meyer zu Hörste G**, Sereda MW und Nave KA. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a PMP22-transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A (CMT1A). *FENS Summer School – Peripheral Nervous System: From biology to disease*, Porto, Portugal, 2003.

Sereda MW, **Meyer zu Hörste G** und Nave KA. Therapeutic clues from animal models of hereditary neuropathies., *European Federation of Neurological Societies (EFNS)*, Helsinki, Finland, 2003.

Sereda MW, **Meyer zu Hörste G** und Nave KA. Modulation of peripheral demyelination by progesterone and anti-progesterone in a PMP22-transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A., *75. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)*, Mannheim, Deutschland, 2002.

# *Abstract*

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most frequent inherited neuropathy. The predominant subtype CMT1A accounts for more than 60% of all patients and is associated with a chromosomal duplication of 17p12. This region contains the responsible disease gene encoding the peripheral myelin protein of 22 kDa (PMP22). Patients are affected by myelin degeneration, axonal loss and slowly progressive, distally pronounced muscle atrophy. Transgenic rats carrying extra copies of PMP22 appropriately reproduce these clinical symptoms.

Here, we utilized this model to test whether progesterone, a known regulator of the myelin genes PMP22 and MPZ / P0, can modulate the progressive neuropathy. Administration of the selective progesterone receptor antagonist “Onapristone” reduced overexpression of PMP22 and improved the CMT phenotype. Disease progression was decelerated and axonal loss was reduced. In contrast, progesterone itself elevated the steady-state levels of PMP22 mRNA and MPZ / P0 mRNA in the sciatic nerve, resulting in enhanced Schwann cell pathology and a more progressive clinical neuropathy. Taken together, this provides proof-of-principle that the progesterone receptor of myelin-forming Schwann cells is a promising pharmacological target in the search for a therapy of CMT1A.