

Neuroinflammation in Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Axel Stein

aus Koblenz

Bonn, 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Gieselmann

2. Gutachter: Prof. Dr. N. Koch

Tag der Promotion: 23.10.2015

Erscheinungsjahr: 2016

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-III
Abkürzungsverzeichnis	IV-V
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Lysosomale Speichererkrankungen.....	2
2.2 Metachromatische Leukodystrophie	4
2.3 Therapie-Ansätze bei Lysosomalen Speichererkrankungen.....	7
2.4 Mausmodelle der Metachromatischen Leukodystrophie	8
2.5 Mikroglia	11
2.6 Astroglia.....	13
2.7 Zytokine	14
2.8 Neurodegeneration, Demyelinisierung und Neuroinflammation	16
2.9 Zielsetzung.....	18
3. Material	19
3.1 Geräte	19
3.2 Fertige Reaktionssysteme (Kits).....	21
3.3 Chemikalien	21
3.4 Antikörper	21
3.5 Mauslinien	22
3.6 Verwendete Oligonukleotide für Genotypisierungen	23
4. Methoden.....	24
4.1 Molekularbiologische Methoden	24
4.1.1 Genotypisierung.....	24
4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	25
4.1.3 Agarosegelelektrophorese	26
4.2 Biochemische Methoden.....	27
4.2.1 Indirekter Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay)	27
4.2.2 Multiplex Sandwich-Immunoassay.....	28
4.2.3 Kryogewebeschnitte	29
4.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebe-Schnitten	29
4.2.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	30
4.2.6 Western Blot.....	31
4.2.7 Extraktion von Lipiden aus Mausgeweben	32

4.2.8	<i>Dünnschichtchromatographie</i>	33
4.2.9	<i>Bestimmung von Proteinkonzentrationen</i>	33
4.3	Mäuse	34
4.3.1.	<i>Transkardiale Perfusion von Mäusen</i>	34
4.3.2.	<i>Homogenisierung von Mausgeweben</i>	34
4.3.3.	<i>Anti-inflammatorische Therapie (Simvastatinbehandlung)</i>	36
4.3.4.	<i>Verhaltenstests</i>	36
5.	Ergebnisse	37
5.1	Untersuchungen zur Neuroinflammation in Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie.....	37
5.1.1	Untersuchungen zur Neuroinflammation in ASA -/- Mäusen.....	37
5.1.1.1	<i>Histologische Untersuchungen zur Aktivierung von Astroglia und Mikroglia</i>	37
5.1.1.2	<i>Untersuchungen zur Expression von Zytokinen im Gehirn von ASA -/- Mäusen</i> 41	
5.1.2	Untersuchungen zur Neuroinflammation in PLP-CST ASA -/- Mäusen.....	43
5.1.2.1	<i>Histologische Untersuchungen zur Aktivierung von Astroglia und Mikroglia</i>	43
5.1.2.2	<i>Expression von Zytokinen im Gehirn von PLP-CST ASA -/- Mäusen</i>	46
5.1.2.3	<i>Infiltration von Immunzellen in das Gehirn von PLP-CST ASA -/- Mäusen</i>	47
5.1.2.4	<i>Untersuchungen zur Demyelinisierung im PLP-CST ASA -/- Mausmodell</i>	51
5.1.3	Sulfatid-Akkumulation in Gehirnen von MLD-Mäusen korreliert mit der Expression von inflammatorischen Biomarkern im Gehirn	53
5.1.3.1	<i>Die absolute Sulfatid-Akkumulation korreliert mit der Expression von inflammatorischen Bioindikatoren</i>	53
5.1.3.2	<i>Sulfatid-Akkumulation korreliert regional mit der Expression von MIP-1α</i>	56
5.2	Anti-inflammatorische Therapie von PLP-CST ASA -/- Mäusen	57
5.2.1	Simvastatin-Therapie an 12 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren.....	58
5.2.1.1	<i>Lipid-Analytik</i>	58
5.2.1.2	<i>Verhaltenstests</i>	60
5.2.1.3	<i>Untersuchungen zur Mikrogliose im Gehirn von Simvastatin-behandelten Mäusen</i>	60
5.2.1.4	<i>Zytokin-Expression</i>	62
5.2.2	Simvastatin-Therapie von 16 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren.....	63
5.2.2.1	<i>Zytokin-Expression</i>	64
5.2.2.2	<i>Einfluss der Simvastatinbehandlung auf die Demyelinisierung im ZNS</i>	66
5.2.3	Simvastatin-Therapie von 17 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren.....	69
5.2.3.1	<i>Einfluss der Simvastatinbehandlung auf die Zytokin-Expression im Rückenmark</i>	69

5.2.3.2 Einfluss der Simvastatinbehandlung auf die Demyelinisierung im Rückenmark.	71
6. Diskussion	73
6.1 Neuroinflammation in Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie	73
6.1.1 Lysosomale Speichererkrankungen und Neuroinflammation	73
6.1.2 Neuroinflammation in Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie ...	74
6.1.2.1 Neuroinflammation im ASA -/- Mausmodell	75
6.1.2.2 Neuroinflammation im PLP-CST ASA -/- Mausmodell	76
6.1.2.3 Infiltration von Immunzellen in das ZNS von PLP-CST ASA -/- Mäusen.....	82
6.1.3 Einfluss der Neuroinflammation auf die Pathogenese in Mausmodellen lysosomaler Speichererkrankungen	84
6.2 Anti-inflammatorische Therapie mit PLP-CST ASA -/- Mäusen	88
6.2.1 Simvastatin	88
6.2.2 Simvastatinbehandlung mit PLP-CST ASA -/- Tieren im präklinischen Stadium der Metachromatischen Leukodystrophie.....	89
6.2.3 Simvastatinbehandlung mit PLP-CST ASA -/- Tieren im klinischen Stadium der Metachromatischen Leukodystrophie.....	90
6.3 Spekulativer Pathomechanismus	92
7. Literaturverzeichnis.....	95
8. Anhang	107
9. Publikationen	112
10. Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnis

ASA	Arylsulfatase A
BDGF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CR	Complement-Rezeptor
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CST	Cerebrosid-Sulfotransferase
Cy3	Cyanin-3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ERT	<i>enzyme replacement therapy</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GalC	β -Galaktocerebrosidase
GalCer	Galaktosylceramid
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GF	<i>growth factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLD	Globoidzell-Leukodystrophy
GM-CSF	<i>granulocyte monocyte stimulating factor</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IBA-1	<i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IFN	Interferon
IgR	Immunglobulin-Rezeptor
IL	Interleukin
IRD	<i>infrared dye</i>
KC	<i>keratinocyte chemoattractant</i>
LSD	<i>lysosomal storage disease</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MBP	<i>myelin basic protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex type II</i>
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
MIP-1 β	<i>macrophage inflammatory protein 1β</i>
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MPS	Mukopolysaccharidose
MS	Multiple Sklerose
MSD	Multiple Sulfatase Defizienz
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAP	Adenosin-3', 5'-bisphosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipidprotein
PNS	peripheres Nervensystem
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor
PSR	Phosphatidylserin-Rezeptor
RANTES	<i>regulated and normal t-cell expressed and secreted</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SAP-B	Saposin-B
SD	Morbus Sandhoff
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SR	Scavenger-Rezeptor
STD	Standard
SUMF-1	<i>sulfatase modifying factor-1</i>
TLC	<i>thin-layer chromatography</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wild Typ
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Arylsulfatase A (ASA) katalysiert die Desulfatierung von 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid), einem Hauptbestandteil der Myelinscheide. Ein Verlust der Aktivität von ASA führt zu der lysosomalen Speichererkrankung Metachromatische Leukodystrophie (MLD). MLD ist durch progressive Sulfatid-Akkumulation und Demyelinisierung im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS) charakterisiert. Zur MLD existieren ein nicht demyelinisierendes und ein demyelinisierendes Mausmodell. Beide Mausmodelle akkumulieren Sulfatid im ZNS und PNS, wobei das demyelinisierende Mausmodell Sulfatid schneller akkumuliert, was in einem verstärkten pathophysiologischen Phänotyp resultiert. In beiden Mausmodellen speichern unter anderem Mikrogliazellen Sulfatid. Die Koinzidenz des Einsetzens von Sulfatid-Speicherung in der Mikroglia und Verhaltensauffälligkeiten von MLD-Mäusen lässt vermuten, dass Neuroinflammation an der Pathogenese der MLD beteiligt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden beide Mausmodelle auf Neuroinflammation hin untersucht. Hierbei wurde nachgewiesen, dass in beiden Mausmodellen inflammatorische Indikatoren, wie Mikrogliose und erhöhte zentralnervöse Zytokinkonzentrationen messbar sind. Zudem wurde gezeigt, dass der Sulfatid-Gehalt im Gehirn in beiden Mausmodellen beim Einsetzen der zentralnervösen Expression von inflammatorischen Bioindikatoren gleich war. Die höchste Expression von inflammatorischen Mediatoren wurde beim Auftreten der Demyelinisierung im verstärkten Mausmodell gemessen. Um die Beteiligung der Neuroinflammation an der Pathogenese der MLD zu untersuchen, wurde eine anti-inflammatorische Therapie mit dem demyelinisierenden Mausmodell durchgeführt. Dabei wurde gefunden, dass die orale Gabe des nicht-steroidalen Antiphlogistikums Simvastatin zu Verhaltensverbesserungen, einer Reduktion der Expression von inflammatorischen Mediatoren im ZNS sowie zu einer mildereren Demyelinisierung im Rückenmark der behandelten Mäuse führte. Aus diesen Untersuchungen kann gefolgert werden, dass Neuroinflammation an der Pathogenese der MLD beteiligt ist und eine anti-inflammatorische Therapie eine therapeutische Option zur Behandlung der humanen MLD darstellt.

2. Einleitung

2.1 Lysosomale Speichererkrankungen

Das Lysosom ist ein membranumschlossenes Organell tierischer Zellen, welches sich durch einen sauren pH (4,5-5) auszeichnet und vornehmlich der Hydrolyse von Makromolekülen für eine nachfolgende Wiederverwertung der niedermolekularen Abbauprodukte dient (de Duve *et al.*, 1955). Für den Abbau der zu zersetzenden Moleküle wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleinsäuren sind mehr als 50 verschiedene saure Hydrolasen verantwortlich (Journet *et al.*, 2002). Zahlreiche integrale Membranproteine dienen dem Import und Export von endo- und exogenen Makromolekülen sowie deren Spaltprodukte aus dem beziehungsweise in das Lysosom (Callahan *et al.*, 2009). Damit nimmt das Lysosom eine zentrale Rolle im Metabolismus und in der Homöostase der Zelle ein.

Störungen, die den Transport, die Degradation oder die Sortierung der abzubauenen Makromoleküle oder deren Abbauprodukte betreffen, resultieren in einer Gruppe von Erkrankungen, welche als lysosomale Speichererkrankungen (*lysosomal storage diseases*, LSDs) bezeichnet werden. Das Krankheitsbild von LSDs zeichnet sich makroskopisch durch die Akkumulation von Speichermaterial innerhalb der Lysosomen aus. Dieser Akkumulation liegt meist ein genetischer Defekt zu Grunde, welcher zu der Fehlfunktion, also dem kompletten oder teilweisen Verlust der Aktivität einer oder mehrerer lysosomaler Hydrolasen führt. Folglich kann das Substrat des betreffenden Enzyms nicht mehr oder nur teilweise abgebaut werden und reichert sich innerhalb des Lysosoms an. Die erste Erkrankung, welche mit dem Verlust der Funktion eines lysosomalen Enzyms in Verbindung gebracht werden konnte, ist Morbus Pompe (Hers, 1963). Bei Morbus Pompe führt der Verlust der Aktivität von α -1,4-Glukosidase zu der Akkumulation von Glykogen in den Lysosomen des Muskelgewebes, was sich schließlich klinisch als Myopathie manifestiert.

Bis heute wurden mehr als 50 verschiedene LSDs beschrieben, die mit einer Gesamtinzidenz von etwa 1 pro 7.000 Lebendgeburten auftreten (Winchester *et al.*,

2000). Die Klassifizierung von LSDs erfolgt traditionell je nach Art des Speichermaterials in Sphingolipidosen, Mukopolysaccharidosen und Oligosaccharidosen (Futerman & van Meer, 2004). Das klinische Erscheinungsbild der verschiedenen LSDs variiert stark und fast alle Gewebe können von pathologischen Veränderungen betroffen sein. Ausschlaggebend hierfür ist die Lokalisierung des akkumulierenden Substrates, welches je nach seiner Funktion in verschiedenen Geweben in unterschiedlicher Konzentration vorliegt.

So wird das klinische Bild der Glykogenose Morbus Pompe vornehmlich von Myopathien beherrscht, während es beim Hunter-Syndrom, einer Mukopolysaccharidose, vor allem zu skelettalen Fehlbildungen kommt. Gemeinsam haben etwa zwei Drittel aller LSDs, dass sie das ZNS betreffen (Schultz *et al.*, 2011). Insbesondere sind hier Sphingolipidosen zu nennen, deren klinisches Hauptmerkmal häufig Neurodegeneration und Demyelinisierung darstellt (vgl. Tab. 1).

Die Mechanismen, welche basierend auf der intralysosomalen Akkumulation von Speichermaterial zu den verschiedenen pathologischen Veränderungen führen, sind noch weitestgehend ungeklärt. Derzeit werden oxidativer Stress, Defekte der Kalziumhomöostase, Defekte der Autophagie und Entzündungsreaktionen (Inflammation) als mögliche Ursachen diskutiert (Ballabio & Gieselmann, 2009).

Tab. 1. Sphingolipidosen (Mehta & Winchester, 2012).

<u>Sphingolipidosen</u>	<u>Enzymatischer Defekt</u>	<u>Hauptspeichermaterial</u>
GM1-Gangliosidose (Typen I, II & III)	β -Galaktosidase	GM1, Glykolipide
Morbus Tay-Sachs (GM-2 Gangliosidose)	β -Hexosaminidase A (α -Polypeptid)	GM2, Glykolipide
Morbus Sandhoff (GM-2 Gangliosidose)	β -Hexosaminidase A & B (β -Polypeptid)	GM2, Glykolipide
Morbus Fabry	α -Galaktosidase A	Galaktosylierte Glykolipide
Morbus Gaucher (Typ I, II & III)	Glukocerebrosidase	Glukocerebrosid
Morbus Farber	Ceramidase	Ceramide
Globoidzell-Leukodystrophie (Morbus Krabbe)	β -Galaktocerebrosidase	Galaktosphingosin (Psychosin)
Morbus Niemann-Pick A & B	Sphingomyelinase	Sphingomyelin
Metachromatische Leukodystrophie	Arylsulfatase A	Sulfatid

2.2 Metachromatische Leukodystrophie

Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine autosomal rezessiv vererbte LSD, die mit einer Inzidenz von ca. 1 pro 100.000 Lebendgeburten auftritt und als Sphingolipidose klassifiziert wird (von Figura *et al.*, 2001). Verursacht wird MLD durch den Verlust der Aktivität des Enzyms Arylsulfatase A (ASA). Eine Erkrankung mit einem zu MLD vergleichbarem Phänotyp tritt bei dem Verlust der Funktion des Aktivatorproteins Saposin B (SAP-B) auf. ASA katalysiert die Desulfatierung des Sphingolipids 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid), wobei Galaktosylceramid entsteht (vgl. Abb. 1C). SAP-B ist ein nicht-enzymatisches Aktivatorprotein das

Sulfatid bindet und dem katalytisch aktiven Zentrum der ASA zugänglich macht (Wrobe *et al.*, 2000).

Vorwiegend finden Synthese und Degradation von Sulfatid im ZNS sowie dem peripheren Nervensystem (PNS) statt, da Sulfatid mit 4-6% Anteil des Trockengewichtes eine Hauptlipid-Komponente der Myelinscheide darstellt (Norton & Autilio, 1966). Als Myelinscheide wird die lipidhaltige Ummantelung der Axone von Neuronen bezeichnet. Sie ist unterbrochen von den nicht ummantelten Teilen, den Ranvierschen Schnürringen, welche essentiell für die saltatorische Erregungsleitung im Nervensystem von Vertebraten sind (vgl. Abb. 1B). Im ZNS wird Myelin von Oligodendrozyten und im PNS von Schwann-Zellen produziert. Auf einen Funktionsverlust von ASA oder SAP-B folgt die intralysosomale Akkumulation von Sulfatid in Myelin-produzierenden Zellen des ZNS und PNS. Daher sind bei Patienten, die an MLD leiden, das ZNS und das PNS von pathologischen Veränderungen betroffen. Ferner kann auch eine Anreicherung von Sulfatid in den Epithelien von peripheren Organen wie Niere, Gallenblase und Leber beobachtet werden, ohne dass die Funktion dieser Organe nennenswert beeinträchtigt wird.

Klinisch zeichnet sich MLD durch den progredienten Verlust der Myelinscheiden aus, ein Prozess der als Demyelinisierung bezeichnet wird. Der Verlust von Myelinscheiden führt zu einer Vielzahl von neurologischen Symptomen. Eine Unterteilung in drei klinische Subtypen der MLD lässt sich anhand des Patientenalters bei dem ersten Auftreten der Symptomatik vornehmen. Es wird unterschieden zwischen der spät infantilen, der juvenilen und der adulten Form. Ausschlaggebend für das Alter in dem sich die Krankheit manifestiert, ist die Restaktivität der ASA (Berger & Löschl, 1997).

Patienten, die von der spät infantilen Form der MLD betroffen sind, verhalten sich zunächst unauffällig. Ab dem zweiten Lebensjahr manifestieren sich dann die ersten Symptome in Form von Gangunsicherheiten und Ataxie. Im weiteren Verlauf treten Sprachstörungen, spastische Tetraplegie, epileptische Anfälle und Erblindung auf. Das Endstadium wird im Alter von etwa 5 Jahren erreicht. Diese Patienten sterben meist vor der Vollendung des neunten Lebensjahres im dezerebrierten Zustand. Verursacht wird die spät infantile Variante der MLD durch das nahezu komplette Fehlen von ASA Aktivität. Die juvenile Variante der MLD manifestiert sich im Alter von 3-16 Jahren (vgl. Abb. 1A). Im Krankheitsverlauf treten zunächst verminderte

feinmotorische Fähigkeiten sowie Verhaltens- und Konzentrationsprobleme auf. Im späteren Verlauf entwickeln sich ähnliche Symptome wie bei der spät infantilen Variante. Die adulte Form der MLD wird zunächst häufig als Schizophrenie und mentale Retardierung klassifiziert, da der Krankheitsverlauf im Vergleich zur spät infantilen oder juvenilen Form einen sehr milden Verlauf nimmt. Die Symptome der adulten Variante der MLD umfassen Verhaltens-, Sprach- und Lernstörungen sowie Halluzinationen und Demenz. Beträgt die mittlere Lebenserwartung ab der Diagnose der adulten Form der MLD noch ungefähr 12 Jahre, so führen die spät infantile und die juvenile Variante schnell zum Tod (von Figura *et al.*, 2001; Gieselmann, 2008).

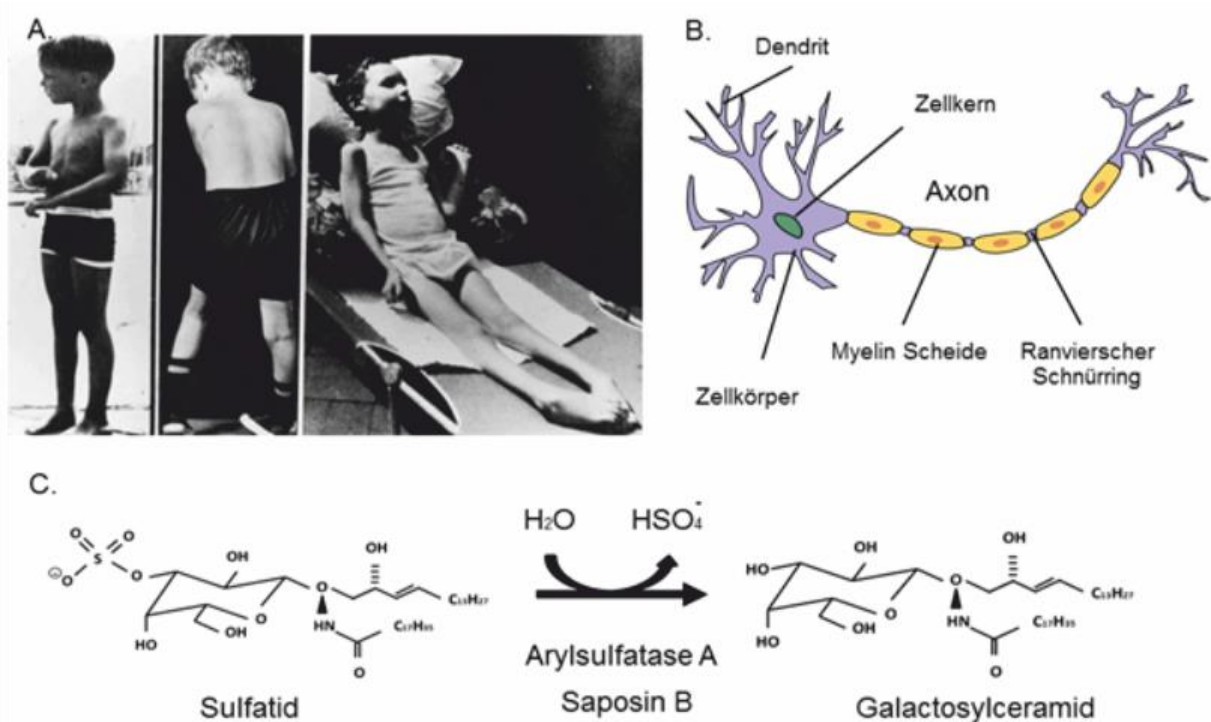


Abb. 1. Metachromatische Leukodystrophie (MLD). (A) Ein an der juvenilen Variante der MLD leidender Patient. (v.l.n.r.) Im Alter von 5 Jahren ist der Patient noch frei von Symptomen, während im Alter von 7 Jahren verstärkt Gangunsicherheiten auftreten und der Patient ist nicht mehr in der Lage selbstständig zu stehen. Im Alter von 9 Jahren ist er bettlägerig und muss künstlich ernährt werden (von Figura *et al.*, 2001). (B) Schematisierte Darstellung eines Neurons. Im ZNS und PNS werden die Axone der Neurone von Myelinscheiden ummantelt, die unterbrochen von den Ranvierschen Schnürringen für eine erhöhte saltatorische Erregungsleitung essentiell sind (modifiziert nach <http://de.wikipedia.org/wiki/Nervenzelle>). (C) Desulfatierung von Sulfatid durch ASA. ASA katalysiert innerhalb des Lysosoms mit Hilfe des nicht enzymatischen Aktivatorproteins Saposin B die Desulfatierung des Lipids Sulfatid zu Galaktosylceramid.

2.3 Therapie-Ansätze bei Lysosomalen Speichererkrankungen

Das von Fratantoni *et al.* (1968) beschriebene Prinzip der *cross-correction* (Kreuz-Korrektur) ist die Grundlage für eine Reihe von Therapieansätzen für LSDs. Fratantoni *et al.* konnten zeigen, dass die intralysosomale Speicherung von Glykosaminoglykanen in kultivierten primären Fibroblasten von Patienten mit dem Hurler-Syndrom durch die Gabe von Zellkulturüberstand von primären Fibroblasten von Patienten mit dem Hunter-Syndrom und *vice versa* korrigiert werden kann. Heute ist bekannt, dass es sich bei den von Fratantoni *et al.* postulierten *corrective-factors* (korrektiven-Faktoren) um die Enzyme Iduronat-2-Sulfatase und α -L-Iduronidase handelt. Damit konnte bewiesen werden, dass sich LSDs grundsätzlich durch die Gabe des fehlenden Enzyms therapieren lassen.

Derzeit wird versucht, LSDs durch die lokale oder auch systemische Gabe des fehlenden Enzyms in rekombinanter Form zu behandeln (Enzym Substitutionstherapie; *enzyme replacement therapy* (ERT)). Weiterhin werden Ansätze zur metabolischen Korrektur der jeweiligen Enzymdefizienz durch Stammzelltransplantation, Knochenmarktransplantation und Transplantation von genetisch modifizierten Patientenzellen verfolgt. Andere denkbare Therapieansätze für LSDs basieren darauf Enzyme, die an der Synthese des akkumulierenden Materials beteiligt sind, zu inhibieren (Substratreduktionstherapie), oder die Funktion des defekten Enzyms auf Proteinebene teilweise wiederherzustellen (Chaperontherapie) (Platt & Lachmann, 2009). Während sich die nicht-neuropathische Variante der LSD Morbus Gaucher (Typ I) vergleichsweise gut therapieren lässt, besteht eine besondere Problematik bei LSDs mit zentralnervöser Symptomatik. Hier stellt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) einen limitierenden Faktor für die Verteilung des therapeutischen Enzyms dar. Die BHS ist eine bei Landwirbeltieren vorkommende physiologische Barriere, die das ZNS vom Blutkreislauf abtrennt. Derzeit werden verschiedene Ansätze verfolgt, um einen effizienten Transport von therapeutischen Enzymen über die BHS zu erreichen. Um die Effizienz der jeweiligen Therapie untersuchen zu können, werden Tiermodelle genutzt.

2.4 Mausmodelle der Metachromatischen Leukodystrophie

Da kein natürlich vorkommendes Tiermodell der MLD bekannt ist, wurde von *Hess et al.* (1996) eine ASA-defiziente (ASA -/-) Mauslinie erzeugt. Die ASA -/- Maus zeigt analog zu MLD-Patienten eine progressive Akkumulation von Sulfatid im ZNS (vgl. Abb. 2A) und PNS sowie in Epithelien der Niere, der Gallenblase und der Leber (*Schott et al.*, 2001). Erste Verhaltensauffälligkeiten können bei ASA -/- Mäusen im Alter von etwa 6 Monaten beobachtet werden. Dazu zählen Motorkoordinationsprobleme, Gleichgewichtsstörungen und Hyperaktivität (*D'Hooge et al.*, 2001). Im Gegensatz zu MLD-Patienten besitzen ASA -/- Mäuse allerdings eine normale Lebenserwartung. Den wichtigsten Unterschied zur humanen Erkrankung stellt das Fehlen von verbreiteten demyelinisierenden Prozessen im Nervensystem der ASA -/- Mäuse dar (*Wittke et al.*, 2004). Als mögliche Ursache hierfür wird die kurze Lebenserwartung von Mäusen diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass Sulfatide im Myelin eine relativ lange Halbwertszeit von etwa 6 Monaten besitzen (*Jungalwala et al.*, 1985). Hieraus lässt sich schließen, dass die Synthese und damit auch die Akkumulation von Sulfatid, im Vergleich zu den Akkumulationsraten des Speichermaterials anderer LSDs, relativ langsam erfolgen. Bei Patienten, die an dem spät infantilen Typ der MLD leiden, treten erste Demyelinisierungen ab einem Alter von etwa zwei Jahren auf. Bei ASA -/- Mäusen sollte daher die Menge des akkumulierenden Sulfatids innerhalb der normalen Lebenserwartung von etwa 24 Monaten nicht zu gravierenden pathologischen Veränderungen führen (*Matzner et al.*, 2005).

Um ein Mausmodell zu etablieren, welches der humanen Erkrankung aus klinischer Sicht eher entspricht, wurde ein Mausmodell mit verstärktem Phänotyp erzeugt (*Ramakrishnan et al.*, 2007). Bei diesem als PLP-CST ASA -/- bezeichneten Modell wurde neben dem ASA-Nullallel zusätzlich ein Transgen unter der Kontrolle des Proteolipid-Protein Promotors (PLP) eingebracht. Bei dem Transgen handelt es sich um die Cerebrosid-Sulfotransferase (CST), welche die Synthese von Galaktosylceramid zu Sulfatid katalysiert (vgl. Abb. 2C). Da der PLP-Promotor in Oligodendrozyten und Schwann Zellen aktiv ist, wird eine erhöhte Sulfatid-Syntheserate erzeugt und die Sulfatid-Akkumulation in ZNS und PNS gegenüber dem konventionellen Mausmodell in etwa verdoppelt (vgl. Abb. 2B).

In Folge ist bei der PLP-CST ASA $-/-$ Maus ab einem Alter von etwa 17 Monaten ein deutlicher Verlust von Myelinproteinen im ZNS messbar. Außerdem entwickeln PLP-CST ASA $-/-$ Mäuse spätestens ab einem Alter von 18 Monaten Hinterlaufsparesen (Ramakrishnan *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte bei dem demyelinisierenden Mausmodell ab einem Alter von etwa 8 Monaten eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit nachgewiesen werden (Matthes *et al.*, 2012). Dieses Mausmodell zeigt im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) eine geringfügig verkürzte Lebenserwartung von ca. 20 Monaten.

Nachweislich erfolgt die Sulfatid-Speicherung sowohl bei konventionellen ASA $-/-$ als auch bei PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen. Ferner kann eine Speicherung aber auch in Subpopulationen von Neuronen, Astrozyten und den Phagozyten des ZNS, sogenannten mikroglialen Zellen, beobachtet werden (vgl. Abb. 2D) (Wittke *et al.*, 2004).

2. Einleitung

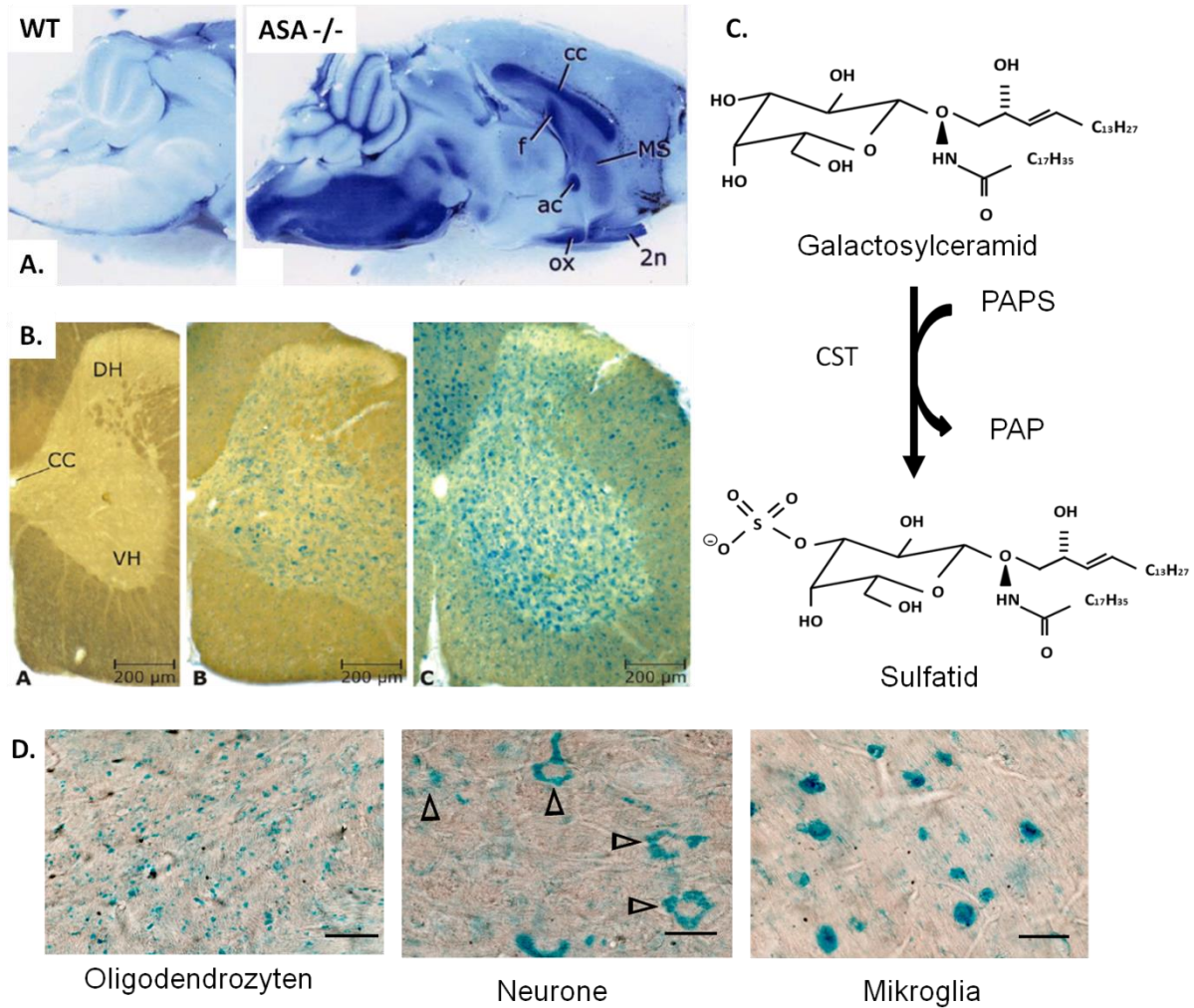


Abb. 2. Mausmodelle der Metachromatischen Leukodystrophie. **(A)** Alzianblau-Färbung von je einem Gehirn einer Arylsulfatase A defizienten Maus (ASA^{-/-}) und eines Wildtyp-Tieres. Alzianblau reagiert unter den entsprechenden Bedingungen selektiv mit Sulfatid. Die dunkelblaue Färbung im Gehirn des ASA^{-/-} Tieres ist indikativ für Sulfatid-Akkumulation, welche bei dem Wildtyp-Tier nicht vorhanden ist. (2n: Optischer Nerv; ac: Commissura anterior; cc: Corpus Callosum; f: Fornix; MS: Mediales Septum; Opt: Optischer Trakt; ox: Optisches Chiasma) (Wittke *et al.*, 2004) **(B)** Vergleich der Sulfatid-Akkumulation im Rückenmark von WT-Kontrollen, ASA^{-/-} und PLP-CST ASA^{-/-} Tieren (v.l.n.r.). Während im Rückenmark des WT-Tieres keine Sulfatid-Speicherung zu erkennen ist, finden sich prominente Sulfatidgranula bei ASA^{-/-} Mäusen. Eine gesteigerte Sulfatid-Speicherung zeigt sich im Rückenmark des PLP-CST ASA^{-/-} Tieres im Vergleich zum ASA^{-/-} Tier (CC, Corpus Callosum; DH, Dorsales Horn; VH, Ventrales Horn; Maßstabsbalken entsprechen 200 µm) (modifiziert von Ramakrishnan *et al.*, 2007) **(C)** Die Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) katalysiert die Sulfatierung von Galaktosylcerebrosid zu Sulfatid unter der Umsetzung von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) zu Adenosin-3', 5'-bisphosphat (PAP). Im PLP-CST ASA^{-/-} Mausmodell wird die CST unter der Kontrolle des PLP-Promotors von Myelin produzierenden Zellen exprimiert. **(D)** Identifizierung von verschiedenen Sulfatid speichernden Zellpopulationen im zentralen Nervensystem (ZNS) von PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen durch Alzianblau Färbung. Oligodendrozyten (kleine, diffus verteilte Sulfatid-Granula), Neurone (ringförmige Sulfatid-Speicherung, markiert mit offenen Pfeilen) und mikrogliale Zellen (große, unförmige Speicher-Granula), (Maßstabsbalken entsprechen 50 µm) (modifiziert von Stroobants *et al.*, 2011).

2.5 Mikroglia

Als Gliazellen werden alle nicht-neuronalen und nicht-epithelialen Zellen des ZNS bezeichnet. Die Glia wird generell in Makroglia, also Astrozyten und Oligodendrozyten, sowie Mikroglia unterteilt. Die Mikroglia besteht aus geweberesidenten Phagozyten, die etwa 10% der Gesamtzellpopulation des ZNS ausmachen (del Rio-Hortega, 1932). Anders als die Makrophagenpopulationen der Meninges, des Choroid Plexus und des perivaskulären Raums, stammen mikrogliale Zellen nicht von Monozyten aus dem Knochenmark ab (Alliot *et al.*, 1999), sondern aus während der Embryogenese in das ZNS eingewanderten Vorläuferzellen (Ajami *et al.*, 2007).

Als Phagozyten gehören mikrogliale Zellen zu den Zellen der angeborenen Immunität und sind damit die primären immunologisch aktiven Zellen des ZNS. Als solche regulieren sie entzündliche Prozesse im Nervengewebe. Die Mikroglia überwacht ständig das sie umgebende Gewebe und reagiert auf Verletzungen, sowie die Präsenz von Pathogenen und Toxinen. Dabei werden bei der Mikroglia zwei morphologisch und physiologisch distinkte Stadien unterschieden. Im ruhenden Zustand besitzen mikrogliale Zellen kleine Zellkörper und bilden spindelförmige Fortsätze aus, mit denen sie aktiv nach aktivierenden Signalen, wie apoptotischen Zellen oder Pathogenen suchen. Neben der Überwachung des Gewebes produzieren mikrogliale Zellen in diesem Stadium neurotrophe Faktoren, wie *nerve growth factor* (NGF) und *brain derived neurotrophic factor* (BDGF), sowie Neurotrophin-4 und -5 (Walter & Neumann, 2009). Werden mikrogliale Zellen durch einen Stimulus aktiviert, verändert sich ihre Morphologie in eine amöboide Form und die Spindelfortsätze bilden sich zurück (vgl. Abb. 3A & B).

In diesem Zustand besitzen sie die Fähigkeit, über Chemotaxis zu etwaigen Entzündungsherden zu wandern, vermehrt zu phagozytieren, zu proliferieren und Antigene zu prozessieren, um sie über Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II (*major histocompatibility complex type II*, MHC-II) Moleküle an Lymphozyten zu präsentieren. Um Phagozytose ausüben zu können, besitzen mikrogliale Zellen, wie Makrophagen auch, eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, welche das zu phagozytierende Material binden (Noda & Suzumura, 2012).

Darunter befinden sich die traditionell mit Phagozytose assoziierten Rezeptoren wie Scavenger- (SR), Pattern-Recognition- (PRR), Phosphatidylserin- (PSR), Immunglobulin- (IgR) und Komplement-Rezeptoren (CR) (Fuller & van Eldik, 2008; Liu *et al.*, 2006; Stolzing & Grune, 2004; Landreth & Reed-Geaghan, 2009). SRs dienen der Interaktion mit Zelltrümmern oder auch apoptotischen Zellen. PSRs binden spezifisch an Phosphatidylserine und vermitteln damit die Phagozytose von apoptotischen Zellen, wohingegen PRRs, wie *Toll-Like-Receptors* (TLRs), pathogen-assoziierte molekulare Strukturen erkennen und somit die Phagozytose von Pathogenen anregen. CR und IgR erkennen durch Komplement-Faktoren, bzw. Antikörper opsonierte Antigene. Außerdem exprimieren mikrogliale Zellen eine Reihe von mit Phagozytose assoziierten Rezeptoren, welche nicht in die traditionellen Klassen einzuordnen sind wie CD14, CD47, CD200R und TREM-2 (Hanisch, 2002; Hanisch & Kettenmann, 2007; Lucin & Wyss-Coray, 2009).

Bindet ein Ligand an einen der genannten Rezeptoren, wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, welche zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts der Mikroglia führt und damit die Phagozytose einleitet. Hierauf wird das zu phagozytierende Material von der äußeren Plasmamembran umschlossen. Das dabei entstehende Organell wird als frühes Phagosom bezeichnet. Das frühe Phagosom reift durch eine kontinuierliche Ansäuerung zum Phagolysosom. Der schlussendliche pH-Wert von 5 wird durch die Fusion mit Lysosomen erzielt (Desjardins *et al.*, 1994). In diesem saurem Milieu wird der aufgenommene Partikel unter Zuhilfenahme von sauren Hydrolasen und reaktiven Sauerstoff Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) zersetzt (Lambeth, 2004). Abhängig von der molekularen Struktur des zersetzten Partikels werden verschiedene Rezeptor vermittelte Signaltransduktionskaskaden eingeleitet, die zur Aktivierung der Mikroglia führen.

Neben der erhöhten Phagozytoserate und der Funktion Antigene zu präsentieren, produzieren aktivierte Mikroglia vermehrt humorale inflammatorische Mediatoren, wie Akute-Phase-Proteine und Zytokine (Dheen *et al.*, 2007).

Als sekundäre Zytokin-Produzenten wurden im ZNS noch Neurone, Oligodendrozyten und Endothelzellen identifiziert. Als primäre Zytokinproduzenten wurden im ZNS neben mikroglialen Zellen noch Astrozyten identifiziert (Benveniste, 1992).

2.6 Astroglia

Astrozyten gehören, neben Oligodendrozyten, zur Makroglia und stellen mit 35% Anteil der Gesamtzellpopulation den häufigsten Zelltyp des ZNS dar (Nedergaard *et al.*, 2003). Namensgebend für die Astroglia ist die sternförmige Morphologie der Astrozyten (vgl. Abb. 3C).

Ihre Hauptfunktion besteht darin, den Sauerstoff-, Nährstoff- und den Ionenhaushalt der Neurone zu regulieren. Dies wird über eine direkte Interaktion der Astroglia mit Endothelien der Blutgefäße und Neurone erzielt. Weitere Funktionen der Astroglia umfassen den Abtransport von Stoffwechselprodukten, überschüssiger, neuronal freigesetzter Ionen an Ranvierschen Schnürringen, den Abbau von Neurotransmittern und die Modulation der Integrität der BHS (Bélanger *et al.*, 2011; Abbott *et al.*, 2006).

Unter inflammatorischen Bedingungen verändern Astrozyten ihre Morphologie und vergrößern sich im Vergleich zum ruhenden Zustand (vgl. Abb. 3D). Dieser Vorgang wird als reaktive Astroglie bezeichnet. Die genauen Mechanismen, die zu einer Aktivierung der astroglialen Zellpopulationen führen, sowie die Rolle die Astrozyten bei entzündlichen Prozessen im ZNS einnehmen, sind nicht eindeutig geklärt (Sofroniew, 2009).

Es wird vermutet, dass Astrozyten durch die Ausbildung von glialem Narbengewebe entzündetes Gewebe von gesundem ZNS Gewebe abtrennen, um es vor Pathogenen und Toxinen zu schützen (Bush *et al.*, 1999). Im Weiteren sind Astrozyten, wie auch die Mikroglia, zur Produktion von Zytokinen und somit zur Regulation von inflammatorischen Prozessen im ZNS befähigt (Benveniste, 1992).

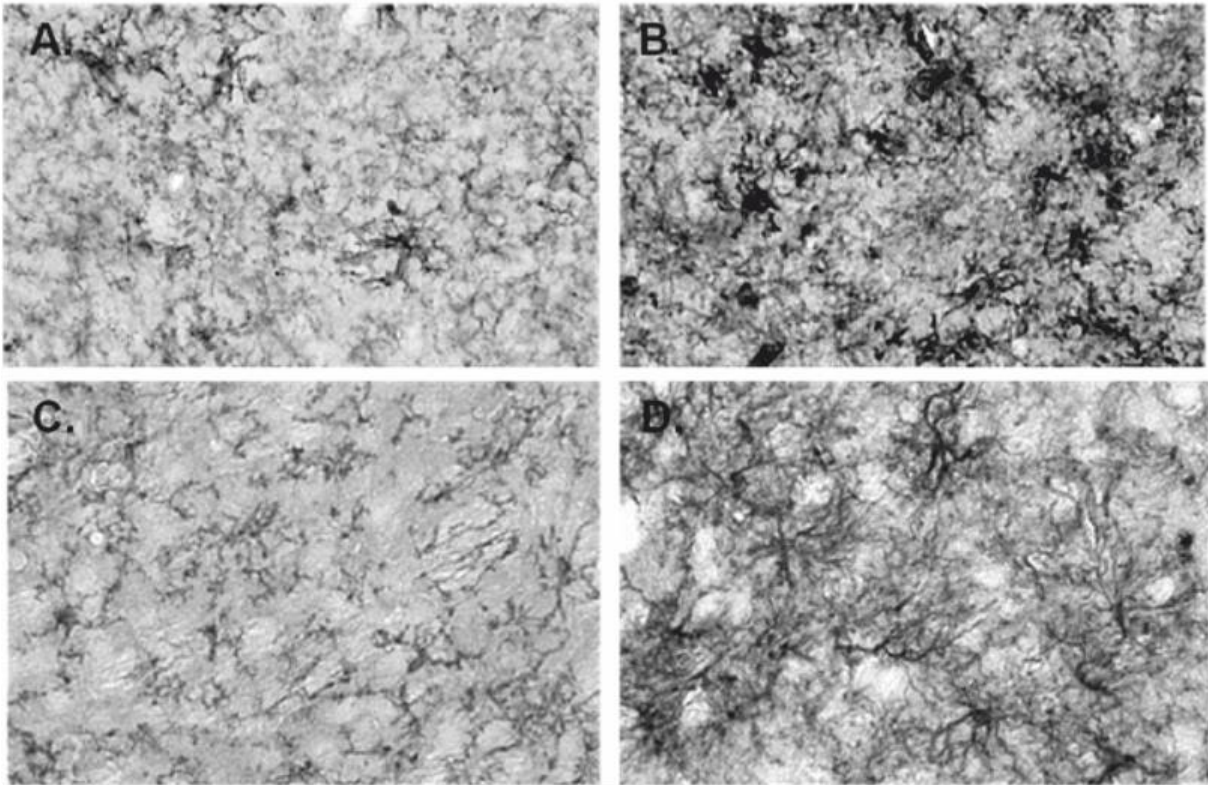


Abb. 3. Mikroglia und Astrozyten. Dargestellt sind aktivierte Phagozyten- und Astrozyten-Populationen im Gehirn von einem Mausmodell von Morbus Niemann-Pick Typ C. **(A)** Ruhende Mikroglia im Gehirn von WT-Mäusen. **(B)** Aktivierte Phagozyten im Gehirn von Niemann-Pick Typ C Mäusen. **(C)** Nicht-aktivierte Astrozyten im Gehirn von WT-Mäusen. **(D)** Aktivierte Astrozyten im Gehirn von Niemann Pick Typ C Mäusen (modifiziert von Baudry *et al.*, 2003).

2.7 Zytokine

Zytokine sind eine Klasse von kleinen, sekretorischen Proteinen, die den Verlauf von Entzündungen und die Hämatopoese steuern, indem sie Wachstum, Überleben und Differenzierung von Zielzellen beeinflussen. Diese Funktionen üben sie aus, indem sie autokrin, also auf die sekretierende Zelle, oder parakrin auf benachbarte Zellen wirken. Dabei kann die biologische Aktivität von Zytokinen pleiotrop, redundant, synergistisch sowie antagonistisch zu anderen Zytokinen sein (Abbas & Lichtman, 2005).

Ein spezielles Zytokin kann also pleiotrop auf diverse Zelltypen wirken und dadurch verschiedene physiologische Funktionen einleiten, während andere Zytokine redundant denselben funktionellen Effekt ausüben. Diverse Zytokine wirken synergistisch, um Effekte auf die Zielzellen zu verstärken, andere üben auf denselben Effekt eine hemmende Wirkung aus, verhalten sich demnach antagonistisch.

Funktionell lassen sich Zytokine in pro- und anti-inflammatorische Gruppen aufteilen. Eine genauere Unterteilung ergibt sich aus Strukturhomologien und den Rezeptorfamilien an die sie binden. Wichtige Zytokinklassen sind Tumornekrosefaktoren (TNF), Interleukine (IL), Interferone (IFN), Kolonie-stimulierende-Faktoren (*colony-stimulating-factors*, CSF) und Wachstumsfaktoren (*growth-factors*, GF).

Akut pro-inflammatorische Zytokine sind unter anderem der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und das Interleukin-1 (IL-1). TNF- α wird zumeist von Makrophagen und T-Zellen an Entzündungsstellen produziert und hat die Funktion, neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu rekrutieren und zu aktivieren. Dies wird erzielt, indem TNF- α die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie Integrinen, an vaskulären Endothelien stimuliert. Die Funktionen der beiden IL-1 Zytokine IL-1 α und IL-1 β sind untereinander und zu TNF- α redundant. IL-1 und TNF- α unterscheiden sich lediglich dadurch, dass TNF- α , nicht aber IL-1, Apoptose und einen septischen Schock auslösen kann (Abbas & Lichtman, 2005). Als prominenter Vertreter der anti-inflammatorischen Zytokine ist Interleukin-10 (IL-10) zu nennen. IL-10 wirkt antagonistisch zu Interferon- γ (IFN- γ), indem es die IFN- γ induzierte Aktivierung von Makrophagen und die damit einhergehende Produktion von Interleukin-12 (IL-12) hemmt. IL-12 dient seinerseits als Aktivator von T-Zellen und stimuliert die Produktion von IFN- γ (Abbas & Lichtman, 2005).

Chemokine sind Zytokine, die Zellmigration vermitteln. Basierend auf ihrer biologischen Aktivität lassen sich Chemokine in zwei Klassen unterteilen. Zum einen der Großgruppe von Chemokinen, die der Aufrechterhaltung der Hämatopoese dienen, zum anderen der Gruppe, welche Inflammation durch Chemotaxis von Leuko- und Lymphozyten auslöst (Moser & Loetscher, 2001).

Die chemotaktische Aktivität von Chemokinen basiert auf einem Konzentrationsgradienten, der von Zielzellen gemessen werden kann. Leuko- und Lymphozyten aus dem Blut werden zu lokalen Entzündungen rekrutiert, indem das entsprechende Chemokin aus dem entzündeten Gewebe an Proteoglykane der apikalen Membran von Endothelzellen bindet. Dort vermittelt es eine höhere Affinität des Leuko- und Lymphozyten-Integrins mit seinem Liganden auf der Endothel-Oberfläche. Am Ort der höchsten Chemokinkonzentration erfolgt schließlich der Übertritt der rekrutierten Zelle durch das Endothel in das entzündete Gewebe.

2.8 Neurodegeneration, Demyelinisierung und Neuroinflammation

Der Begriff Neurodegeneration umschreibt den primären Verlust von neuronalen Zellen durch Zelltod im Nervensystem. Mit Neurodegeneration assoziierte Krankheiten sind unter anderem Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Morbus Huntington (Skovronsky *et al.*, 2006). Unter dem Begriff Demyelinisierung wird, wie in 2.2 erläutert, der primäre Verlust von Myelinscheiden verstanden. Dieser kann sekundär zu einer axonalen Schädigung führen. Eine Demyelinisierung wurde unter anderem für die zentralnervösen Erkrankungen Morbus Pelizaeus-Merzbacher (Edgar *et al.*, 2010) und die Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS) (Mahad *et al.*, 2015) beschrieben. Die exakten Mechanismen, welche zur Neurodegeneration oder Demyelinisierung führen, sind nicht eindeutig geklärt und werden kontrovers diskutiert (Golde & Miller, 2009).

Gemeinsam haben die genannten Erkrankungen, wie auch praktisch alle Erkrankungen mit zentralnervöser Symptomatik, zentralnervöse entzündliche Prozesse, welche als Neuroinflammation bezeichnet werden.

Neuroinflammation ist ein komplexer, multifaktorieller Prozess, welcher in erster Linie dazu dient, Nervengewebe vor invasiven Pathogenen und Toxinen zu schützen. Hierbei wird das entzündete Gewebe von dem restlichen gesunden Gewebe abgetrennt und der inflammatorische Stimulus beseitigt, um anschließend eine Regeneration des Gewebes zu ermöglichen (Correale & Villa, 2004). Vermittelt wird Neuroinflammation anfänglich stets von mikroglialen Zellen. Die Phagozytose von Toxinen, Pathogenen oder Überresten von apoptotischen Zellen resultiert in einer lokalen Aktivierung der mikroglialen Zellpopulation (vgl. 2.5). Die aktivierten Zellen produzieren daraufhin immunologisch aktive Signalmoleküle, wie Zytokine, welche den weiteren Verlauf der zentralnervösen Entzündung regulieren. Eine weitere Folge der mikroglialen Aktivierung (Mikrogliose) stellt vermutlich die Aktivierung von Astrozyten (Astrogliose) dar. Im Verlauf einer Neuroinflammation dienen Astrozyten häufig einer Erweiterung der Zytokin-Expression durch die Mikroglia sowie der Ausbildung von glialem Narbengewebe, um das entzündete vom gesundem Gewebe abzutrennen (Claycomb *et al.*, 2013). Somit stellen Astro- sowie Mikrogliose, einhergehend mit einer erhöhten zentralnervösen Expression von Zytokinen, die Hauptmerkmale von neuroinflammatorischen Prozessen dar.

Eine erhöhte zentralnervöse Zytokin-Expression durch Astrozyten und mikrogliale Zellen resultiert beispielsweise in der Rekrutierung und Aktivierung von immunologischen Effektorzellen, wie Monozyten, Granulozyten und T-Zellen. Infiltrierte Immunzellen tragen durch ihre zelltypischen Effektorfunktionen, wie etwa Phagozytose zu der Beseitigung des inflammatorischen Stimulus bei. Nach der Beseitigung des inflammatorischen Stimulus wird das Ende der Neuroinflammation durch einen noch nicht verstandenen Mechanismus eingeleitet und die Homöostase wiederhergestellt. Dieser Prozess wird Resolution genannt. Auf die Resolution der Inflammation folgt schließlich die Regeneration des geschädigten Gewebes (Serhan & Savill, 2005).

Persistiert allerdings der inflammatorische Stimulus und eine Resolution kann nicht erfolgen, resultiert die dauerhafte Aktivierung der mikroglialen Zellpopulation in einer chronischen Neuroinflammation, welche ihrerseits gewebeschädigend sein kann (Farooqui *et al.*, 2007).

So konnte bereits gezeigt werden, dass beispielsweise Morbus Parkinson und MS-Patienten von einer anti-inflammatorischen Therapie profitieren (Gao *et al.*, 2003). Zur Behandlung von neuroinflammatorischen Prozessen werden Antiphlogistika verwendet. Hierzu zählen beispielsweise Kortikosteroide, wie Methylprednisolon (Milligan *et al.*, 1987). Im Weiteren werden zur Prävention einer Immunzell-Infiltration Immunglobuline mit immunmodulatorischen Eigenschaften, wie Natalizumab angewendet (Polman *et al.*, 2006). Nach neueren Erkenntnissen können auch Statine zur Behandlung von neuroinflammatorischen Prozessen angewendet werden.

Statine gehören zur pharmakologischen Gruppe der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-(HMG-CoA) Reduktase-Inhibitoren, denen bereits immunmodulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Youssef *et al.*, 2002). Nach Vorbefunden eignet sich insbesondere Simvastatin zur Behandlung von Neuroinflammation, da es, vermutlich aufgrund seiner hohen Hydrophobizität, effizient die BHS überschreiten kann (Tsuji *et al.*, 1993).

Daher wird Simvastatin derzeit in klinischen Phase-III-Studien als therapeutische Option zur Behandlung von MS evaluiert (Chataway *et al.*, 2014).

2.9 Zielsetzung

Wie Wittke *et al.* (2004) zeigen konnten, findet die zentralnervöse Akkumulation von Sulfatid im ASA ^{-/-} Mausmodell in Oligodendrozyten, Neuronen, Astrozyten und mikroglialen Zellen statt. Die intralysosomale Akkumulation von Speichermaterial in mikroglialen Zellen führte zu der These, dass eine Aktivierung der mikroglialen Zellpopulationen im Gehirn von ASA ^{-/-} Mäusen stattfindet. Tatsächlich konnte eine progressive Aktivierung der Mikroglia in ASA ^{-/-} Mäusen bereits von Hess *et al.* (1996) anhand morphologischer Kriterien nachgewiesen werden. Die zeitliche Koinzidenz der Aktivierung von mikroglialen Zellen und dem Eintreten von schwerwiegender Verhaltenssymptomatik (D'Hooge *et al.*, 2001) lässt die Vermutung zu, dass eine chronische Neuroinflammation an der Pathogenese der MLD beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die beiden Mausmodelle der MLD auf Neuroinflammation hin untersucht werden. Anschließend sollte über eine anti-inflammatorische Therapie mit Simvastatin evaluiert werden, ob neuroinflammatorische Prozesse an der Pathogenese der MLD beteiligt sind.

3. Material

Allgemeines

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Thermo Scientific (Schwerte) bezogen. Für Genotypisierungen wurden Enzyme und Puffer von Fermentas/Thermo Scientific (St. Leon-Rot) verwendet.

Verbrauchsmaterialien wurden von Sarsted (Nümbrecht), Becton Dickinson (Heidelberg), VWR (Darmstadt), Braun (Melsungen), Engelbrecht (Edermünde) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer NANOpure-Anlage (Barnstead) angesetzt. Nicht gesondert erwähnte Lösungen wurden nach (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt.

3.1 Geräte

DC-Auftraggerät	Automatic TLC sampler 4 (Software winCATS V1.2.1)	Camag
Dispergiergerät	Ultra-Turax T25	Janke & Kunkel
Elektrotransfer-Kammer	Trans-Blot SD (<i>semi-dry</i>)	Bio-Rad
Feinwaage	CP124S-0CE	Sartorius
Flachbettscanner	PowerLook III (Software MagicScan V4.3)	UMAX
Fluoreszenzmiroskop	Axiovert 100 M	Zeiss
Heizblock	Block Heater	Stuart Scientific

3.Material

Infrarot-Fluoreszenz-Scanner	Odyssey (Software Odysee V1.2)	Li-Cor
Kryostat	CM 1510 S	Leica
Mehrkanalpipette	Transferpipette S12	Brand
Mikroplattenleser	GENios (Software Magellan V3.00.12)	Tecan
Mikroplattenwascher	HydroFlex	Tecan
Mikroskop	Telaval 31	Zeiss
pH-Meter	646 digital	Knick
Photometer	DU 640	Beckmann
Reinstwasseranlage	NANOpure	Barnstead
Sterilbank	Clean Air	Bio-Flow
Thermozykler	T3	Biometra
Ultraschallbad	1210	Branson
Ultrazentrifuge	Optima TLX	Beckman
Waage	1083	GFL
Zentrifugen	5415 D, 5417 R; 5810 R Allegra 6KR; Optima TLX Labofuge 400e Sorvall RC 5C Plus Mit Rotoren GS-3, SS34, TLA-110	Eppendorf Beckman Heraus Du Pont

3.2 Fertige Reaktionssysteme (Kits)

- Multiplex	<i>Multiplex Bio-Plex Pro Mouse</i>	Bio-Rad
	<i>Cytokine 23-plex Assay</i>	
- ELISA	<i>Murine MIP-1α; MCP-1-, KC Mini</i>	Peprotech
	<i>ELISA Development Kit</i>	
- Proteinbestimmung	<i>Dc Protein Assay</i>	Bio-Rad

3.3 Chemikalien

Simvastatin (Zocor)	Selleckchem
---------------------	-------------

3.4 Antikörper

Primäre Antikörper:

Tab. 2. Verwendete primäre Antikörper.

<u>Antigen</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>		<u>Hersteller</u>
		<u>IFL</u>	<u>WB</u>	
α -Tubulin	Maus	-	1:1000	Sigma
β -Aktin	Maus	-	1:1000	Sigma
CD3 ϵ	Kaninchen	1:100	-	New England BioLabs
F4/80	Ratte	1:50	-	Eigene Herstellung
GFAP	Maus	1:200	-	Wacko Chemicals/Abcam
IBA-1	Kaninchen	1:100	-	Wako Chemicals
Ly6G	Kaninchen	1:100	-	eBioscience
MBP	Kaninchen		1:1000	Millipore

(IFL: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot)

Sekundär Antikörper:

Tab.3 Verwendete sekundäre Antikörper.

<u>Antigen</u>	<u>Spezies</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Applikation</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Kaninchen IgG	Ziege	IRD-800	WB	1:10000	Pierce
Kaninchen IgG	Ziege	IRD-680	WB	1:10000	Pierce
Kaninchen IgG	Ziege	Cy3	IFL	1:100	Dianova
Maus IgG (H + L)	Ziege	FITC	IFL	1:200	Dianova
Maus IgG (H + L)	Ziege	Cy3	IFL	1:100	Invitrogen
Maus IgG (H + L)	Ziege	IRD-800	WB	1:10000	Pierce
Maus IgG (H + L)	Ziege	IRD-680	WB	1:10000	Pierce
Ratte IgG	Ziege	Cy3	IFL	1:100	Dianova

(IFL: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot)

3.5 Mauslinien

Tab. 4. Verwendete Mauslinien.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Generiert von</u>
ASA -/-	mASA -/-	Hess <i>et al.</i> (1996)
PLP-CST ASA -/-	PLP-CST + mASA -/-	Ramakrishnan <i>et al.</i> (2007)

3.6 Verwendete Oligonukleotide für Genotypisierungen

Tab. 5. Verwendete Oligonukleotide.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Nukleotidsequenz [5'-3']</u>
ASA antisense	TGACCCAGGCCTTGTTCCCAT
ASA neo	GGAGAGGCTATTCGGCTATGAC
ASA sense	TAGGGTGGAAAGTTACCCTAGA
CST1 sense	ATGACTCTGCTGCCAAAGAAGC
CST2 antisense	CCACCTTAGAAAGTCCCTAAGG

4. Methoden

Allgemeines

Alle nicht aufgeführten Standardprotokolle wurden nach Sambrook *et al.* (1989), bzw. nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt.

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Genotypisierung

Als Genotypisierung wird eine Methode bezeichnet, welche Aufschluss über den Genotyp des zu analysierenden Labortieres gibt. Hierzu werden im Allgemeinen Gewebebiopsien genommen, die genomische DNS extrahiert und durch Polymerase-Kettenreaktion analysiert. 0,5 cm Schwanzspitzenbiopsien wurden von zu untersuchenden Mäusen entnommen und die DNS durch über Nacht (üN) Inkubation in 750 µl Lysepuffer bei 56°C unter Schütteln extrahiert. Zur Fällung von Proteinen wurden 250 µl 6 M NaCl zu den Lysaten gegeben und unter Schütteln 5 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur (RT) und 15.000 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Zu den Überständen wurden je 500 µl Isopropanol gegeben, um die genomische DNS zu fällen. Die extrahierte DNS wurde anschließend durch Zentrifugation bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol, wurde die DNS luftgetrocknet und anschließend in HPLC Wasser aufgenommen. Die so extrahierte DNS konnte mittels Polymerase-Kettenreaktion analysiert werden.

Lysepuffer: Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)
 NaCl 100 mM
 EDTA 25 mM
 1% (v/v) SDS
 Proteinase K 100 µg/ml

4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase-chain reaction*, PCR) bedient sich einer thermostabilen Form des Enzyms Polymerase um definierte Sequenzen aus einer Vorlage-DNS zu vervielfältigen. Hierzu werden typischerweise ein Reaktionspuffer für die verwendete Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), spezifische Oligonukleotide für die zu amplifizierende DNS Sequenz, MgCl₂ und Wasser benötigt. Diese Komponenten wurden nach einem generellen Reaktionsansatz gemischt (vgl. Tab. 6) und für die PCR verwendet. Anschließend verlief die PCR nach zuvor definierten Temperaturprofilen und Reaktionszeiten (vgl. Tab. 7) in einem Thermocycler (Biometra). Die so amplifizierten DNS Fragmente wurden durch Agarosegel-Elektrophorese untersucht.

Tab. 6. Exemplarischer PCR-Ansatz.

<u>Komponente</u>	<u>Volumina [µl]</u>
10x Reaktionspuffer (+KCl; - MgCl ₂)	2,5
dNTPs [2mM]	2,5
Oligonukleotide [100 pmol/µl]	1
MgCl ₂ [2mM]	1,5
Taq Polymerase	1
DNS	1-5*
H ₂ O dd	ad. 25

* entsprechen 100- 500 ng

Tab. 7. Exemplarisches PCR-Programm.

<u>Schritt</u>	<u>Dauer [min]</u>	<u>Temperatur [C°]</u>
Initiale Denaturierung	5	95
Denaturierung	0,5	95
Anlagerung	2	50- 60
Extension	2	72
Finale Extension	10	72

4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, die zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach deren Molekulargewicht und Konfirmation dient. DNS und RNS besitzen aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung und wandern daher abhängig von ihrer Größe und Konfirmation unterschiedlich schnell in einem elektrischen Feld. Zur Detektion von DNS wurden, je nach dem zu erwartenden Molekulargewicht der zu untersuchenden DNS Fragmente, Agarosegele von verschiedener Konzentration hergestellt. Hierzu wurde TAE-Puffer aufgekocht und je nach Bedarf Agarose zugegeben (1-2% w/v). Zur Visualisierung der zu untersuchenden DNS wurde das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid (interkaliert in der Sekundärstruktur der DNS) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml in der Agarosegellösung verwendet. Die noch flüssige Lösung wurde zum Aushärten bei RT in die dafür vorgesehenen Gelträger gegossen. Zu untersuchende Proben wurden anschließend mit DNS-Ladepuffer versehen und zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard auf das Agarosegel geladen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von 120-140 V.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Indirekter Sandwich-ELISA (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*)

Der *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) bezeichnet eine immunodetektions Methode zur Quantifizierung von Antigenen. Die in dieser Arbeit verwendeten indirekten Sandwich ELISA-Kits zur Quantifizierung von Zytokinen und Chemokinen in Gewebe Homogenaten wurden ausschließlich von Peprotech (Hamburg, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Beschichtung der 96-Loch Platte (NUNC Maxisorp) mit dem Fangantikörper (verdünnt je nach Herstellerangabe) erfolgte in PBS (pH 7,2) zu je 100 µl pro Vertiefung bei RT üN. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 300 µl Waschpuffer je Vertiefung gewaschen und mit 300 µl Blockierlösung für 90 min unter Schütteln blockiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden Gewebe Homogenate (1:2 verdünnt in Verdünnungslösung, 100 µl in Duplikaten je Vertiefung) und Standards (nach Herstellerangaben verdünnt in Verdünnungslösung, 100 µl je Vertiefung) auf die Platte aufgetragen und für 2 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Der Biotin-gekoppelte Detektionsantikörper (verdünnt nach Herstellerangaben in Verdünnungslösung, 100 µl) wurde ebenfalls nach viermaligem Waschen für 2 h unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation mit einem Streptavidin-Meerrettich Peroxidase (*horse raddish peroxidase*; HRP) Konjugat (Verdünnung 1:2000 in Verdünnungslösung) erfolgte für 30 min unter Schütteln nach dreimaligem Waschen. Nach drei weiteren Waschschritten wurde ABTS-Entwicklungslösung, zu je 100 µl pro Vertiefung auf die Platte gegeben und inkubiert bis die geringste Verdünnung des Standards eine Optische Dichte (OD) von 1 erreichte. Die Messung erfolgte in einem Mikroplatten Auslesegerät (Tecan; Mannedorf, Schweiz) bei $\lambda = 405$ nm Wellenlänge und $\lambda = 505$ nm Referenzwellenlänge. Die Kalkulation der Konzentration der Zytokine und Chemokine in den Proben erfolgte anschließend anhand der gemessenen Werte der Standards.

Blockierlösung:	1% (w/v) BSA in PBS (pH 7,2)
Waschpuffer:	0,5% (w/v) Tween-20 in PBS (pH 7,2)
Verdünnungslösung:	0,1% (w/v) BSA 0,5% (w/v) Tween-20 in PBS (pH 7,2)
ABTS-Entwicklungslösung:	1 mg/ml ABTS-Substrat in ABTS-Substratpuffer

4.2.2 Multiplex Sandwich-Immunoassay

Der Multiplex Sandwich-Immunoassay ermöglicht die Quantifizierung von mehreren löslichen Analyten in einer Messung und basiert auf einem von Bjerre *et al.* (2009) beschriebenen Prinzip. Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay (#M60-009RDPD) Kits wurden von Bio-Rad (Hercules, USA) bezogen und nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Analyten wurden untersucht: Il-1 α , Il-1 β , Il-2, Il-3, Il-4, Il-5, Il-6, Il-9, Il-10, Il-12 (p40), Il-12 (p70), Il-13, Il-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und TNF- α . Hierzu wurden Gehirn Homogenate 1:3 in Bio-Rad Lysepuffer (Hercules, USA) verdünnt, und anschließend 1:2 mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung verdünnt, in Folge mit den fluoreszierenden magnetischen Kugeln des Kits inkubiert und dreimalig gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörpergemisch. Nach erneutem dreimaligem Waschen und einer folgenden Inkubation mit einem Streptavidin-Phycoerythrin (PE) Konjugat wurden die Fluoreszenzwerte der Analyten mit einem Bioplex 2200 System ermittelt. Die Kalkulation der Analyt-Konzentration erfolgte anhand einer Standardkurve für jeden einzelnen Analyt, erstellt aus den dem Kit beigelegten Standards.

4.2.3 Kryogewebeschnitte

Nach transkardialer Perfusion der Maus mit 4% Paraformaldehyd (PFA), wurde das präparierte Gewebe üN bei 4°C in 4% (w/v) PFA immersions-fixiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS wurde das Gewebe im Folgenden für 2 Tage bei 4°C in 20% (w/v) Saccharose gelagert. Darauf folgten das Einfrieren der Gewebe im flüssigen Stickstoff und die anschließende Lagerung bei -80°C. Zwecks Anfertigung der Kryoschnitte wurde das gefrorene Präparat in Gefriermedium (Tissue-Tek O.C.T.TM Compound; Sakura) eingebettet und im Kryostaten eingespannt. Anschließend wurden je 10 µm Gewebeschnitte bei -21°C Kammertemperatur im Kryostaten (Leica) angefertigt und die auf Objektträgern aufgenommenen Schnitte bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebe-Schnitten

Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebe-Schnitten dienen der Detektion von Antigenen in Geweben. Hierzu wird zunächst das zu untersuchende Antigen mit einem ersten Antikörper detektiert, welcher wiederum mit einem zweiten, Fluorochrom gekoppelten Antikörper nachgewiesen wird. Gefroren gelagerte Kryogewebeschnitte wurden für 15 min an der Luft bei RT aufgetaut. Nach einem Rehydrations-Schritt für 5 min in PBS (pH 7,4) wurden die Schnitte für 30 min mit 0,1% Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Nach drei folgenden Waschschritten wurden die Schnitte für 10 min mit 0,5% Natriumborhydrid (NaBH₄) inkubiert. Nach weiteren drei Waschungen folgte die Inkubation mit Blockierlösung für 30 min. Der Antigennachweis wurde durch Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blockierlösung bei 4°C üN durchgeführt. Folgend auf drei Waschschritten wurde der Fluorochrom gekoppelte, zweite Antikörper für 2 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschritten erfolgte, sofern nicht anders angegeben, der Nachweis der Zellkerne mit 4',6-Damidin-2-phenylindol (DAPI; verdünnt 1:2000 in PBS; 5 min RT). Die Schnitte konnten nach weiteren drei Waschritten mit Pro-Long Gold (PLG; Invitrogen) eingedeckelt und nach einer Nacht des Aushärtens bei RT unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Blockierlösung:	3% (v/v) Ziegen Serum in PBS (pH 7,4)
Waschlösung:	PBS (pH 7,4)
Lösung zur Permeabilisierung:	0,1% (w/v) Triton-X 100 in PBS (pH 7,4)

4.2.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die *sodium-dodecyl-sulfate* (SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) dient dazu denaturierte Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufzutrennen. In Abhängigkeit der zu erwartenden Größe der zu trennenden Proteine, wurden Gelkonzentrationen von 7,5 bis 15 % verwendet. Hierzu wurden zu untersuchende Homogenate oder Lysate der Membranfraktion mit einem entsprechenden Volumen reduzierendem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Thermo Scientific) in die Taschen des jeweiligen Gels gefüllt. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 80–200 V.

Laufpuffer:	Tris-HCl	250 mM
	Glycin	1,9 M
	1% (v/v) SDS	(pH 8,6)
4x Probenpuffer:	8% (v/v) SDS	
	40% (v/v) Glycerol	
	4% (v/v) Bromphenolblau	

Tab. 8. Exemplarische Zusammensetzung der SDS-Gele.

<u>Komponente</u>	<u>Sammelgel [ml]</u>	<u>12,5% Trenngel [ml]</u>
H ₂ O	2,085	1,51
40% PAA	1,565	0,3125
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,625
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,25	-
10% SDS	0,05	0,025
10% APS	0,05	0,025
TEMED	0,005	0,0025
Gesamtvolumen	2,5	5

4.2.6 Western Blot

Der Begriff Western Blot bezeichnet den Nachweis von Proteinen nach einem Transfer von einer Trägermatrix auf eine Membran. Hierzu wurden zunächst zu untersuchenden Peptide in Gewebe Homogenaten oder Lysaten der Membranfraktion in einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht getrennt und anschließend elektrophoretisch typischerweise für 50 min bei 60 mA auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Blockieren der Membran mit Blockierlösung für 60 min bei RT erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers, sofern nicht anders angegeben, in Blockierlösung (üN, 4°C) unter ständigem Schwenken. Nach dreimaligem Waschen wurde der sekundäre, Infrarotfarbstoff gekoppelte Antikörper in TBS-T für 45 min bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach drei Waschrissen erfolgte die Visualisierung des zweiten Antikörpers durch Einscannen der Membran in einem Odyssey Instrument der Firma Li-Cor (Lincoln, USA)

Blockierlösung: 5% (w/v) Magermilchpulver
0,5% (w/v) Tween-20 in TBS (pH 7,4)

Waschlösung: 0,5% (w/v) Tween-20 in TBS (pH 7,4)

4.2.7 Extraktion von Lipiden aus Mausgeweben

Zwecks Lipidextraktion aus Mausgeweben wurden Rohhomogenate per Ultrazentrifugation (100.000 x g, 1 h, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Chloroform/Methanol (2:1) aufgenommen. Nach erneutem Homogenisieren im Ultra-Turrax wurde die Suspension 4 h bei 60°C gerührt. Anschließend wurden verbliebene Gewebefragmente durch Zentrifugation sedimentiert (5 min bei 1000 rpm, 4°C), der Überstand über eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette filtriert und bei -20°C gelagert. Polare Lipide wurden aus den verbliebenen Geweberesten unter Rühren bei 60°C für 4 h in Chloroform/Methanol 1:1 reextrahiert. Durch Filtration über die mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette wurden der polare und der apolare Lipidextrakt vereinigt und anschließend bei -20°C üN gelagert. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel unter beständigem N₂-Strom bei 50°C eingedampft und die Lipidfraktion in 5 ml Methanol aufgenommen. Durch Zugabe von 125 µl 4 M NaOH und 2 h Rühren bei 37°C wurden Triglyceride und Phosphoglyceride alkalisch hydrolysiert, die Reaktion anschließend mit 20 µl Eisessig gestoppt und das Lösungsmittel eingedampft. Die Lipide wurden dann in 1 ml Methanol aufgenommen und mit 300 mM Ammoniumacetat versetzt. Zwecks Entsalzung wurde die Suspension auf selbstgestopfte LiChroprep-RP-18 Säulen gegeben. Vor der Entsalzung wurden zunächst Pasteurpipetten mit Glaswolle abgedichtet, 1 ml LiproPrep-RP-18 zugegeben und die Säule anschließend zweimal mit Chloroform/Methanol/0,1 M KCl (6:96:94) äquilibriert. Nach dem Durchsickern der Suspension wurden die Säule zunächst sechsmal mit je 1 ml H₂O gewaschen. Die an die Säule gebundenen Lipide konnten dann mit 1 ml Methanol, gefolgt von sechsmal je 1 ml Chloroform/Methanol (1:1) eluiert werden. Das Lösungsmittel wurde eingedampft und die Lipide in 600 µl Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen.

4.2.8 Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung der extrahierten Lipide wurde die Dünnschichtchromatographie (*Thin-Layer-Chromatography*; TLC) verwendet. Die Lipidextrakte sowie entsprechende Standards wurden mit einem TLC-Sampler (Camag; Wilmington, USA) auf eine 20 x 20 cm Kieselgel-Dünnschicht Platte (Merck; Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Die Auftrennung der zu analysierenden Lipide erfolgte in einer mit dem verwendeten Fließmittel (Chloroform/Methanol/H₂O, 70:30:4) gesättigten Kammer. Die Detektion der aufgetrennten Lipide erfolgte durch Veraschung. Hierzu wurde die Platte in einem Abstand von etwa 30 cm mit einem Färbereagenz eingesprüht, mit einem Föhn getrocknet und anschließend für 5 min bei 180°C verascht. Die Kieselgel-Dünnschichtplatte wurde anschließend mit einem Flachbettscanner eingescannt.

Färbereagenz: 625 mM CuSO₄ in 8% (v/v) H₃PO₄

4.2.9 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in zu untersuchenden Proben erfolgte mit dem Bio-Rad DC Assay System (Hercules, USA) nach Lowry *et al.* (1951). Hierzu wurden je 5 µl der zu untersuchenden Probe und BSA-Standard in Triplikaten in die Vertiefungen einer 96-Loch Platte vorgelegt. Zu den Proben und Standards wurden dann je 25 µl Lösung A' gegeben. Nach 10 min anschließender Inkubation bei RT mit je 200 µl Lösung B wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750$ nm in einem Mikroplatten Lesegerät (Tecan, Mannedorf, Schweiz) gemessen. Anhand einer Eichkurve, erstellt durch die Messung des BSA-Standards, wurde anschließend die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proben bestimmt.

BSA-Standard: 0 mg/ml; 0,625 mg/ml; 1,25 mg/ml; 2,5 mg/ml; 5 mg/ml in TBS

Lösung A': 20 µl Lösung S in 1 ml Lösung A

4.3 Mäuse

4.3.1. *Transkardiale Perfusion von Mäusen*

Die transkardiale Perfusion von Mäusen ist eine Methode, um eventuell störendes Blut für spätere Analysen aus dem zu untersuchenden Gewebe zu entfernen. Hierzu wurden zunächst die zu analysierenden Mäuse durch eine interperitoneale Injektion mit 25 mg/ml Tribromoethanol betäubt und nach ca. 5 min auf Schmerzfreiheit durch das Kneifen mit einer Pinzette in Pfoten und Ohren überprüft. Nach der Fixierung der Maus an den Extremitäten wurde der Bauchraum geöffnet, das Sternum entfernt und der rechte Vorhof des Herzens punktiert. Das anschließende Auswaschen des Blutes erfolgte dann mit einer Peristaltikpumpe durch einen Stich mit einer Venofix Flügelkanüle in den linken Ventrikel und der Zufuhr von 50 ml PBS (37°C), bzw. 25 ml PBS gefolgt von 50 ml Fixativ (je 37°C). Für eine Homogenisierung vorgesehene Gewebe wurden präpariert, auf Trockeneis gefroren und bei -80°C gelagert. Fixiertes Gewebe wurde wie unter dem Punkt 4.2.3 beschrieben weiterverarbeitet.

Perfusionslösung:	PBS (pH 7,4)
Fixativ (Kryoschnitte):	4% (w/v) PFA in PBS (pH 7,4)

4.3.2. *Homogenisierung von Mausgeweben*

Perfundiertes, bei -80°C gelagertes Mausgewebe wurde in 1,5 ml eiskaltes TBS, komplettiert mit Proteaseinhibitoren, überführt und in drei bis vier 5 s langen Impulsen mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das so erzeugte rohe Homogenat wurde anschließend auf Trockeneis gefroren und bei -80°C gelagert. Je nach Verwendung wurde das rohe Homogenat auf Eis aufgetaut und bei Bedarf wie folgt weiterverarbeitet:

- Homogenate: Das aufgetaute Rohhomogenat wurde 5 min im Ultraschallbad sonifiziert, die unlöslichen Gewebefragmente wurden durch Zentrifugation (15 min, 15.000 x g, 4°C) pelletiert und der Überstand im Westernblot (4.2.7), ELISA (4.2.1) oder Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay (4.2.2) eingesetzt.
- Lysate der Membranfraktion: Das aufgetaute rohe Homogenat wurde durch Ultrazentrifugation (1 h, 100.000 x g, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet für 2 h in Lysepuffer auf Eis unter gelegentlichem Vortexen lysiert. Anschließend wurde das Lysat erneut per Ultrazentrifugation (20 min, 17.000 x g, 4°C) pelletiert und der Überstand im Western Blot (4.2.7) eingesetzt.

Homogenisierungspuffer: TBS (pH 7,4)

Lysepuffer: 1% (v/v) SDS in PBS

Proteaseinhibitoren: 2 µg/ml Aprotinin

(Endkonzentration) 1 mM EDTA

5 mM Iodacetamid

0,5 µg/ml Leupeptin

0,4 mM Pefabloc SC

0,7 mg/ml Pepstatin A

4.3.3. Anti-inflammatorische Therapie (Simvastatinbehandlung)

Die Therapie von PLP-CST ASA-/- Mäusen mit dem HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A)-Reduktase Inhibitor Simvastatin erfolgte über orale Aufnahme durch die Beimischung des Arzneistoffes mit normalem Futter für einen Zeitraum von 30 Tagen. Hierzu wurden je 20 mg Simvastatin pro kg Körpergewicht der zu behandelnden Mäuse zu normalem in einer Kaffeemühle zermahlenem Futter gegeben. Anschließend wurden Futter und Simvastatin in einem Mörser vermischt. Mock-behandelte Tiere erhielten gemörsertes Futter ohne Simvastatin. Um sicherzustellen, dass alle Tiere die komplette Dosis an veranschlagtem Simvastatin, bzw. der mock-Behandlung zu sich nahmen, wurden die zu behandelnden Gruppen über Nacht gehungert. Hierzu wurde abends sämtliches Futter aus den Käfigen der zu behandelnden Mäuse entfernt. Am nächsten Morgen wurden die individuell markierten Tiere einzeln in Käfige gesetzt mit *ad libitum* Zugriff auf Wasser sowie 0,5 g an Simvastatin, bzw. mock-Futter. Nach 2-3 h wurde die Futteraufnahme kontrolliert und als Schätzungen in Prozent protokolliert. Die behandelten Tiere wurden anschließend zurück in ihre Käfige gesetzt mit *ad libitum* Zugriff auf Futter und Wasser. Um sicherzustellen, dass die gewählte Therapieform keinen Einfluss auf das Gewicht der behandelten Tiere hatte, wurde zudem wöchentlich das Gewicht der Mäuse gemessen und protokolliert. Wurden Verhaltenstests durchgeführt, so erfolgten selbige jeweils in der dritten Therapiewoche. Nach Beendigung der Therapie wurden die behandelten Tiere, wie in 4.3.1 beschrieben, zu Analyse Zwecken getötet.

4.3.4. Verhaltenstests

Verhaltenstests wurden von dem Labor für Biologische Psychologie am Institut für Psychologie der Universität Leuven in Leuven (Belgien) von Stijn Stroobants nach Stroobants *et al.* (2008) durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Neuroinflammation in Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie

5.1.1 Untersuchungen zur Neuroinflammation in ASA -/- Mäusen

5.1.1.1 Histologische Untersuchungen zur Aktivierung von Astroglia und Mikroglia

Hess *et al.* (1996) konnten im Hirnstamm von 12 Monate alten ASA -/- Mäusen eine moderate Mikrogliose und Astrogliose nachweisen. Eine generalisierte Aktivierung der Mikroglia im Gehirn von ASA -/- Mäusen wurde von Hess und Kollegen ab einem Alter von 24 Monaten gezeigt. Mikrogliale und astrogliale Zellen sind die primären Zytokinproduzenten im ZNS. Da eine erhöhte zentralnervöse Zytokinproduktion sowie Astro- und Mikrogliose die Hauptmerkmale von neuroinflammatorischen Prozessen darstellen, wurden zunächst die Ergebnisse von Hess *et al.* durch Immunfluoreszenzanalysen an Kryo-Gewebeschnitten reevaluiert.

Mikrogliose im Gehirn von ASA -/- Mäusen wurde mit einem Antikörper gegen den Pan-Makrophagen Marker F4/80 untersucht (Austyn & Gordon, 1981). Die histologische Untersuchung auf Astrogliose erfolgte mit einem Antikörper gegen das *glial-fibrillary-acidic-protein* (saures Glia-Faserprotein, GFAP) (Eng *et al.*, 1971).

Für die Untersuchung auf Mikrogliose wurden F4/80-Färbungen von Gehirn-Kryoschnitten 12 Monate sowie 24 Monate alter ASA -/- Mäuse mit 12 Monate alten WT-Tieren verglichen. Auf die gleichzeitige Untersuchung altersgleicher WT-Tiere wurde verzichtet, da in Voruntersuchungen keine Veränderungen der mikroglialen Zellmorphologie über verschiedene Altersstufen von WT-Tieren hinweg detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Der gebundene α -F4/80 Antikörper wurde durch einen Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Ratte IgG Antikörper visualisiert (rot). Die Färbungen wurden mikroskopisch untersucht und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Dabei gab die Morphologie der detektierten mikroglialen Zellen Aufschluss über das Aktivierungsstadium (vgl. 2.5). Um eine Vergleichbarkeit der

Aufnahmen der verschiedenen Altersstufen zu gewährleisten, wurden die Aufnahmen der einzelnen Farbkanäle mit der gleichen Belichtungszeit angefertigt. Repräsentative Aufnahmen zur Untersuchung auf Mikrogliose sind in Abb.4 dargestellt.

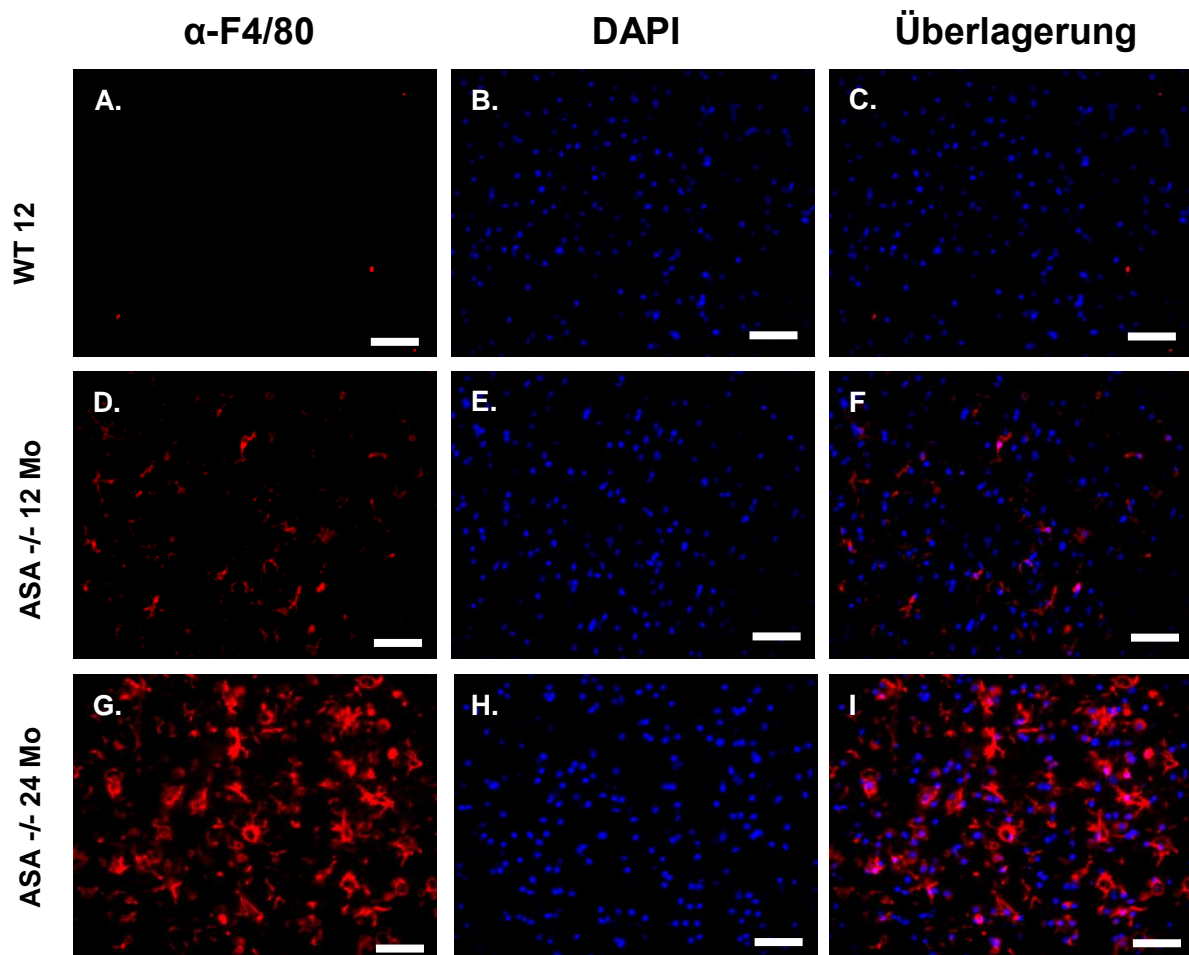


Abb. 4. Mikrogliose im Gehirn von 12 und 24 Monate alten ASA^{-/-} Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von 10 µm dicken, mit 4% (w/v) PFA fixierten, sagittalen Gehirnkryoschnitten des Pan-Makrophagen-Markers F4/80. Der gebundene α-F4/80 Antikörper wurde mit einem Cy3-gekoppelten α-Ratte IgG Antikörper angefärbt (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt sind Ausschnitte des Hirnstamms. (A, D & G) α-F4/80 Färbung von WT- sowie 12 und 24 Monaten alten ASA^{-/-} Mäusen; (B, E & H) DAPI Färbung; (C, F & I) Überlagerung der α-F4/80 und der DAPI Färbung (Maßstabsbalken entsprechen 50 µm).

Während im Hirnstamm von WT-Kontrolltieren (Abb. 4A) keine F4/80 positiven Zellen mit einer aktivierten Zellmorphologie gefunden wurden, konnten einige wenige aktivierte mikrogliale Zellen im Hirnstamm von 12 Monate alten ASA^{-/-} Mäusen detektiert werden (Abb. 4D). Bei 24 Monate alten ASA^{-/-} Mäusen wurden vermehrt F4/80 positive Zellen mit einer amöboiden Morphologie nachgewiesen (Abb. 4G).

Astrogliose wurde analog zu der Untersuchung auf Mikrogliose an 12 und 24 Monate alten Mäusen analysiert und mit 12 Monate alten WT-Kontrollen verglichen. Auf altersgleiche WT-Kontrollen wurde bei dieser Untersuchung verzichtet, da in Voruntersuchungen keine morphologischen Veränderungen der Astroglia bei zunehmenden Alter der WT-Tiere gefunden wurden (Daten nicht gezeigt). Der α -GFAP Antikörper wurde mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus IgG Antikörper nachgewiesen. Bei den mikroskopischen Analysen zur Astrogliose gaben die Morphologie sowie die Expressions-Intensität des Astrozyten-Markerproteins GFAP Aufschluss über das Aktivierungsstadium der detektierten Zellen (vgl. 2.6). Um eine Vergleichbarkeit der Aufnahmen der verschiedenen Altersstufen zu gewährleisten, wurden die Aufnahmen der einzelnen Farbkanäle mit der gleichen Belichtungszeit angefertigt. Repräsentative Aufnahmen der Untersuchungen sind in Abb. 5 dargestellt.

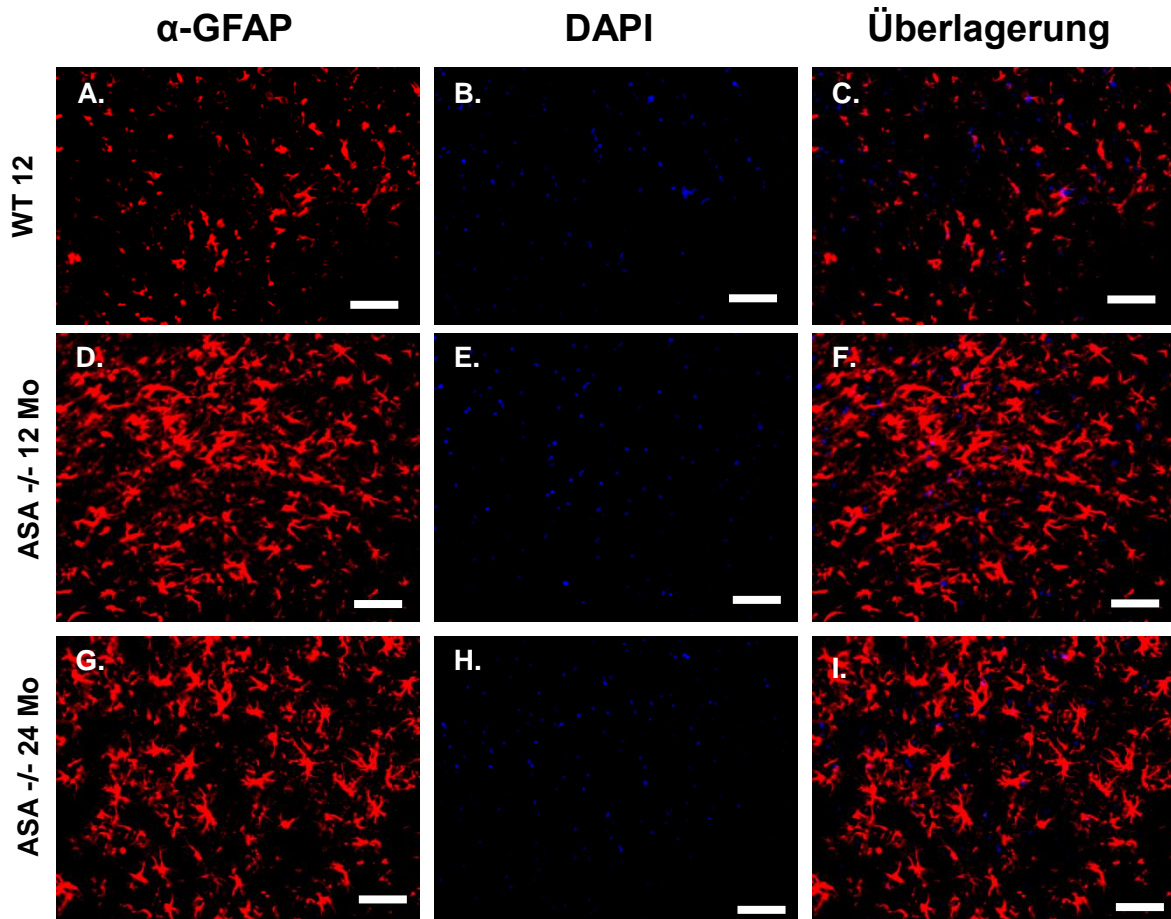


Abb. 5. Astrogliose im Gehirn von 12 und 24 Monate alten ASA $-/-$ Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von 10 μ m dicken, mit 4% (w/v) PFA fixierten, sagittalen Gehirnkryoschnitten des Astrozyten-Markers GFAP. Der gebundene α -GFAP Antikörper wurde mit einem Cy3-gekoppelten α -Maus IgG Antikörper angefärbt (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt sind Ausschnitte des Hirnstamms. **(A, D & G)** α -GFAP Färbung von WT- sowie 12 und 24 Monaten alten ASA $-/-$ Mäusen; **(B, E & H)** DAPI Färbung; **(C, F & I)** Überlagerung der GFAP und der DAPI Färbung. (Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m).

Im Hirnstamm von 12 Monate alten ASA $-/-$ Tieren (Abb. 5D) konnten GFAP-positive Zellen identifiziert werden, die gegenüber GFAP-positiven Zellen bei WT-Tieren (Abb. 5A) verstärkt GFAP exprimierten. Bei 24 Monate alten ASA $-/-$ Mäusen konnten ebenfalls GFAP-positive Zellen mit einer hypertrophen Zellmorphologie und einer gegenüber WT-Tieren gesteigerten GFAP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 5G).

5.1.1.2 Untersuchungen zur Expression von Zytokinen im Gehirn von ASA -/- Mäusen

Neben der Zellmorphologie gibt die Expression von Zytokinen Aufschluss über das Aktivierungsstadium der mikro- und astroglialen Zellpopulationen im ZNS. In Mausmodellen der LSDs Morbus Gaucher, Morbus Krabbe und Morbus Sandhoff wurden zuvor erhöhte zentralnervöse Konzentration einzelner Zytokine nachgewiesen (Vitner *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2013; Wu & Proia, 2004). Hierzu zählen das Interleukin IL-1 β (Morbus Gaucher; Vitner *et al.*, 2012), das Chemokin *keratinocyte-chemoattractant* (KC) (Morbus Krabbe; Reddy *et al.*, 2013) und das Chemokin *macrophage inflammatory protein 1 α* (MIP-1 α) (Morbus Sandhoff; Wu & Proia, 2004).

Ausgehend von diesen Beobachtungen in Mausmodellen anderer Sphingolipidosen wurden Gehirne von 12 und 24 Monate alten ASA -/- Mäusen auf die Konzentration von IL-1 β , KC und MIP-1 α hin analysiert. Um die Konzentrationen der zu untersuchenden Zytokine im Gehirn zu bestimmen, wurden Homogenate je einer kompletten Hirnhemisphäre von jeweils drei ASA -/- und drei WT-Tieren untersucht. Dazu wurden kommerziell erhältliche ELISA Systeme verwendet. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen wurden für jede analysierte Maus auf die Gesamtproteinkonzentration des Homogenates bezogen. Anschließend wurden die gemessenen Einzelwerte auf die mittlere Zytokinkonzentration der WT-Hirne normiert und als Vielfaches des mittleren WT-Wertes dargestellt (Abb. 6).

Die absoluten Messwerte der Analysen zur Zytokinkonzentration können dem Anhang (Tab. 12) entnommen werden.

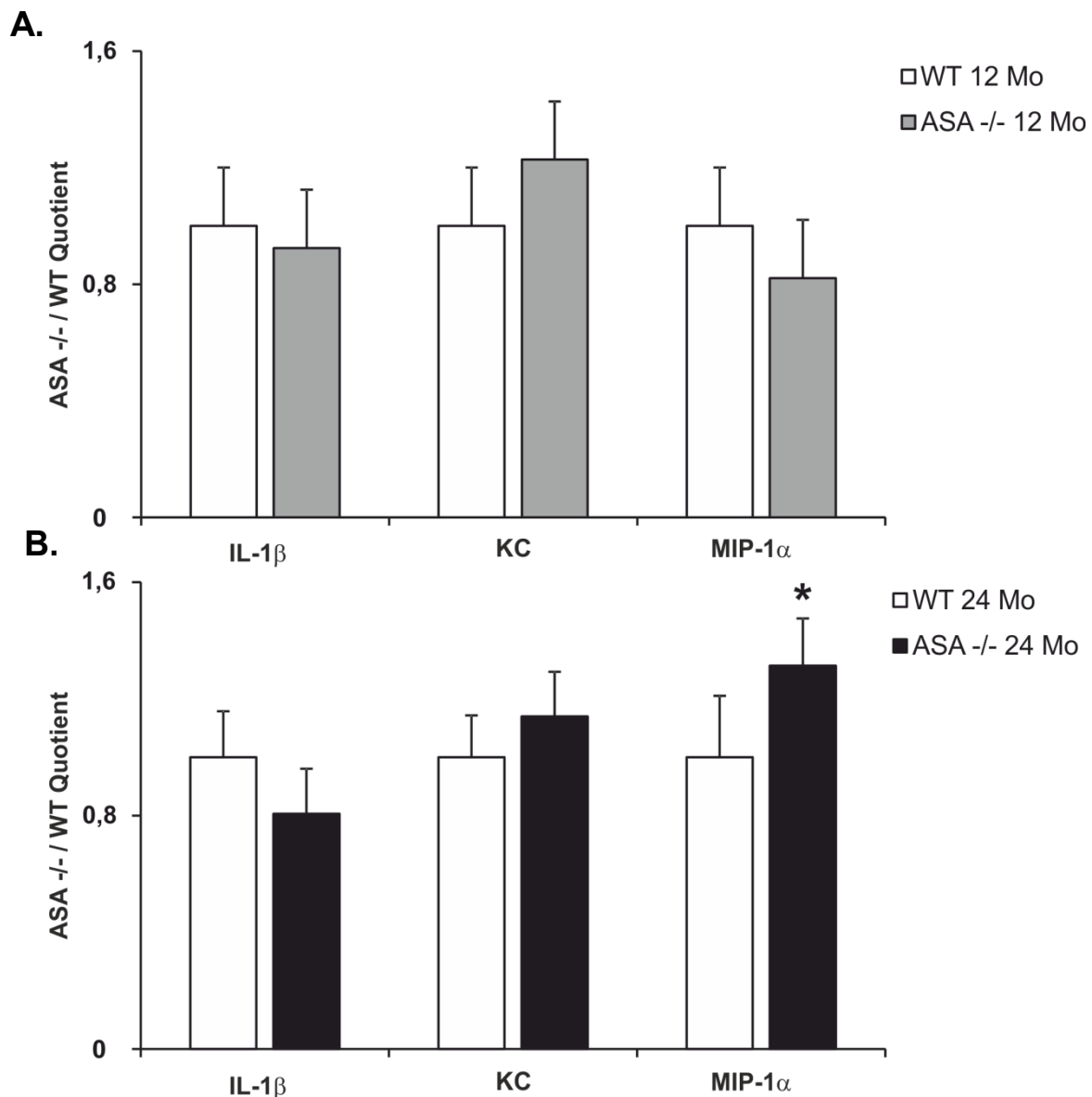


Abb. 6. Zytokin-Expression in Gehirn-Homogenaten von 12 und 24 Monate alten ASA -/- Mäusen. Die Gesamtkonzentration der Zytokine IL-1 β , KC und MIP-1 α in Homogenaten je einer Hirnhemisphäre wurde per ELISA gemessen, auf die Gesamtproteinkonzentration des Homogenates bezogen. **(A)** 12 Monate alte Tiere; **(B)** 24 Monate alte Tiere. Dargestellt sind die auf die mittlere WT-Konzentration normierten Mittelwerte der Einzelmessungen \pm Standardabweichungen ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t -Test $p < 0,05$).

In Hirn-Homogenaten von 12 Monate alten ASA -/- Mäusen wurden keine Unterschiede der Konzentrationen von IL-1 β , KC und MIP-1 α gegenüber WT-Tieren gemessen (Abb. 6A). Im Gehirn von 24 Monate alten ASA -/- Mäusen konnte eine geringfügig erhöhte Konzentration des Chemokins MIP-1 α nachgewiesen werden ($p = 0,02$). Für die Zytokine IL-1 β und KC wurden in dieser Altersstufe keine Unterschiede festgestellt (Abb. 6B).

5.1.2 Untersuchungen zur Neuroinflammation in PLP-CST ASA -/- Mäusen

5.1.2.1 Histologische Untersuchungen zur Aktivierung von Astroglia und Mikroglia

Da in 5.1.1.1 die von Hess *et al.* beschriebene progressive Aktivierung von Astrozyten und mikroglialen Zellen im Gehirn von ASA -/- Mäusen bestätigt werden konnte, erfolgten analoge histologische Untersuchungen zur Astro- und Mikrogliose im Gehirn von PLP-CST ASA -/- Mäusen. Ramakrishnan *et al.* (2007) konnten zeigen, dass im ZNS von PLP-CST ASA -/- Mäusen eine Demyelinisierung ab einem Alter von 17 Monaten messbar ist. Um eine mögliche zeitliche Korrelation zwischen Astro- bzw. Mikrogliose und demyelinisierenden Prozessen im ZNS von PLP-CST ASA -/- Mäusen zu untersuchen, erfolgten die Analysen an 12 und 17 Monate alten Tieren.

Hierfür wurden Gehirn-Kryoschnitte, wie für konventionelle ASA -/- Mäuse beschrieben (5.1.1.1), durch Immunfluoreszenzfärbungen gegen die beiden Marker-Proteine F4/80 (Phagozyten) und GFAP (Astrozyten) untersucht und die Färbungen mit Gehirn-Kryoschnitten von 12 Monate alten WT-Tieren verglichen. Die Visualisierung der gebundenen α -F4/80, bzw. α -GFAP Antikörper erfolgte über die Detektion mit Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Ratte, bzw. Ziege-anti-Maus IgG Antikörpern. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden fotografisch dokumentiert. Repräsentative Befunde der Immunfluoreszenzanalysen zur Mikro- und Astrogliose sind in Abb. 7, bzw. Abb. 8 dargestellt. Hierbei entstammen die dargestellten Aufnahmen den gleichen Färbeserien, wie die in 5.1.1.1 gezeigten Aufnahmen und wurden mit der gleichen Belichtungszeit angefertigt. Daher sind die Abb. 4 & 7 (F4/80-Färbungen) sowie 5 & 8 (GFAP-Färbungen) direkt miteinander vergleichbar.

Ferner sind aus diesem Grund die Darstellungen der F4/80- und GFAP-Färbungen der WT-Kontrollen in Abb. 4 und 7 sowie 5 und 8 identisch.

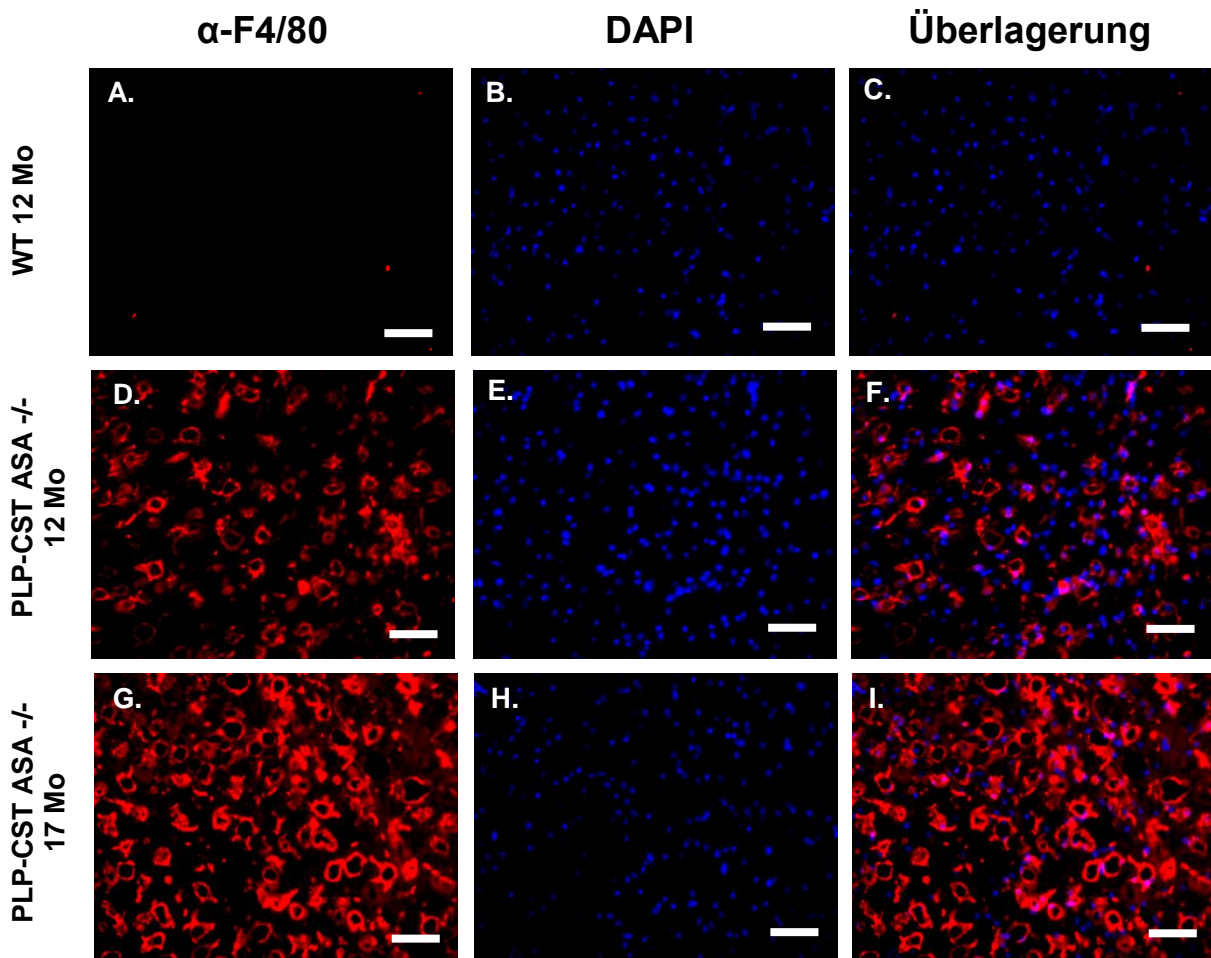


Abb. 7. Mikroglie in 12 und 17 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von 10 μm dicken, mit 4% (w/v) PFA fixierten, sagittalen Gehirnkryoschnitten des Pan-Makrophagen-Markers F4/80. Der gebundene α -F4/80 Antikörper wurde mit einem Cy3-gekoppelten α -Ratte IgG Antikörper angefärbt (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt sind Ausschnitte des Hirnstamms. (A, D & G) α -F4/80 Färbung von WT- sowie 12 und 17 Monaten alten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen; (B, E & H) DAPI Färbung; (C, F & I) Überlagerung der α -F4/80 und der DAPI Färbung (Maßstabsbalken entsprechen 50 μm).

Im Hirnstamm von 12 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren konnten F4/80 positive Zellen mit einer für eine Mikroglie sprechenden Morphologie nachgewiesen werden (Abb. 7D). Bei 17 Monate alten Tieren wurden ebenso F4/80 positive Zellen mit amöboidem Zellsoma detektiert, die gegenüber 12 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren zudem das Makrophagen-Marker Protein F4/80 verstärkt exprimierten (Abb. 7G). Im Hirnstamm von 12 Monate alten WT-Tieren konnte keine F4/80 positiven Zellen mit einer amöboiden Zellmorphologie nachgewiesen werden (Abb. 7A).

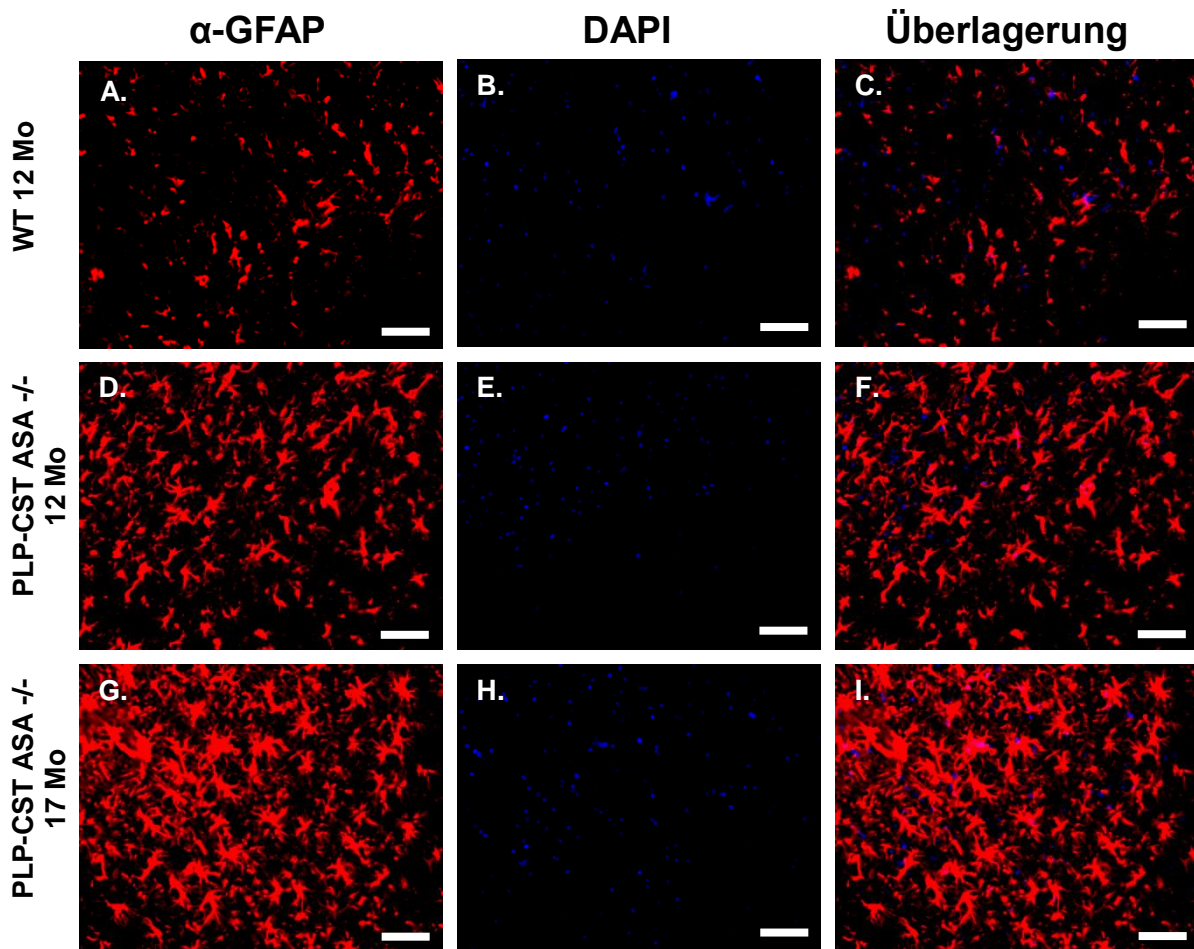


Abb. 8. Astrogliose in 12 und 17 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von 10 μ m dicken, mit 4% (w/v) PFA fixierten, sagittalen Gehirnkryoschnitten des Astrozyten Markers GFAP. Der gebundene α -GFAP Antikörper wurde mit einem Cy3-gekoppelten α -Maus IgG Antikörper angefärbt (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt sind Ausschnitte des Hirnstamms. (A, D & G) α -GFAP Färbung von 12 und 17 Monaten alten WT- und PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen; (B, E, H & K) DAPI Färbung; (C, F & I) Überlagerung der α -GFAP und der DAPI Färbung (Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m).

Im Hirnstamm von 12 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ (Abb. 8D) Tieren konnten hypertrophe GFAP-positive Zellen mit einer gesteigerten Expression von GFAP gegenüber WT-Tieren (Abb. 8A) nachgewiesen werden. Bei 17 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren waren die Zellkörper einiger der detektierten GFAP-positiven Zellen zudem gegenüber 12 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren vergrößert (Abb. 8G).

5.1.2.2 Expression von Zytokinen im Gehirn von PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen

Da in Immunfluoreszenzanalysen bei 17 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren eine gegenüber 12 Monate alten Mäusen verstärkte Mikrogliose nachgewiesen werden konnte, ergab sich die Vermutung, dass eine Zytokin-Expression am deutlichsten in möglichst alten Tieren messbar sein sollte. Daher wurden PLP-CST ASA $-/-$ und WT-Mäuse im Alter von 20 Monaten untersucht. Um Informationen über frühe Veränderungen zu erhalten, wurden zusätzlich 10 Monate alte Tiere analysiert. Für die gleichzeitige Untersuchung von 23 Zytokinen wurde ein Multiplex-System (Bio-Rad Bioplex 200, Hercules, USA) verwendet. Zur Auswertung wurde die gemessene Zytokinkonzentration auf die Gesamtproteinkonzentration des zugehörigen Homogenates normiert. Die erhaltenen Einzelwerte von 3 bis 5 Mäusen pro Gruppe wurden gemittelt, auf die mittlere Zytokinkonzentration altersgleicher WT-Hirne normiert und als Vielfaches der WT-Werte dargestellt (Abb. 9).

Im Gehirn von 10 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen konnten Unterschiede der Chemokin-Konzentrationen von MIP-1 α und *regulated upon activation and normal T-Cell expressed and secreted* (RANTES) nachgewiesen werden. Hierbei war die Konzentration von MIP-1 α um 40% erhöht und die des Chemokins RANTES um 29% vermindert. Alle anderen gemessenen Zytokine zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 9A).

Bei 20 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren wurden erhöhte Konzentrationen der Interleukine IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-12 p40, IL-13 und der Chemokine KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β sowie RANTES gefunden. Dabei waren die Konzentrationen dieser Zytokine um 78% (IL-1 α), 96% (IL-6), 30% (IL-10), 51% (IL-12 p40), 71% (IL-13), 70% (KC), 104% (MCP-1), 147% (MIP-1 α), 57% (MIP-1 β) bzw. 67% (RANTES) erhöht (Abb. 9B).

Die Konzentration einiger Zytokine lag in allen durchgeführten Messungen bei mindestens einer Maus pro Gruppe unterhalb der Nachweisgrenze. So konnten die Interleukine IL-3, IL-4 und der Kolonie-stimulierende-Faktor *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) in keiner der untersuchten Altersstufen und Genotypen detektiert werden. Die Konzentration des Interleukins IL-5 lag sowohl bei 20 Monate alten WT-Kontrollen als auch bei PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 9B).

Die absoluten Konzentrationen der gemessenen Zytokine können dem Anhang entnommen werden (Tab. 13).

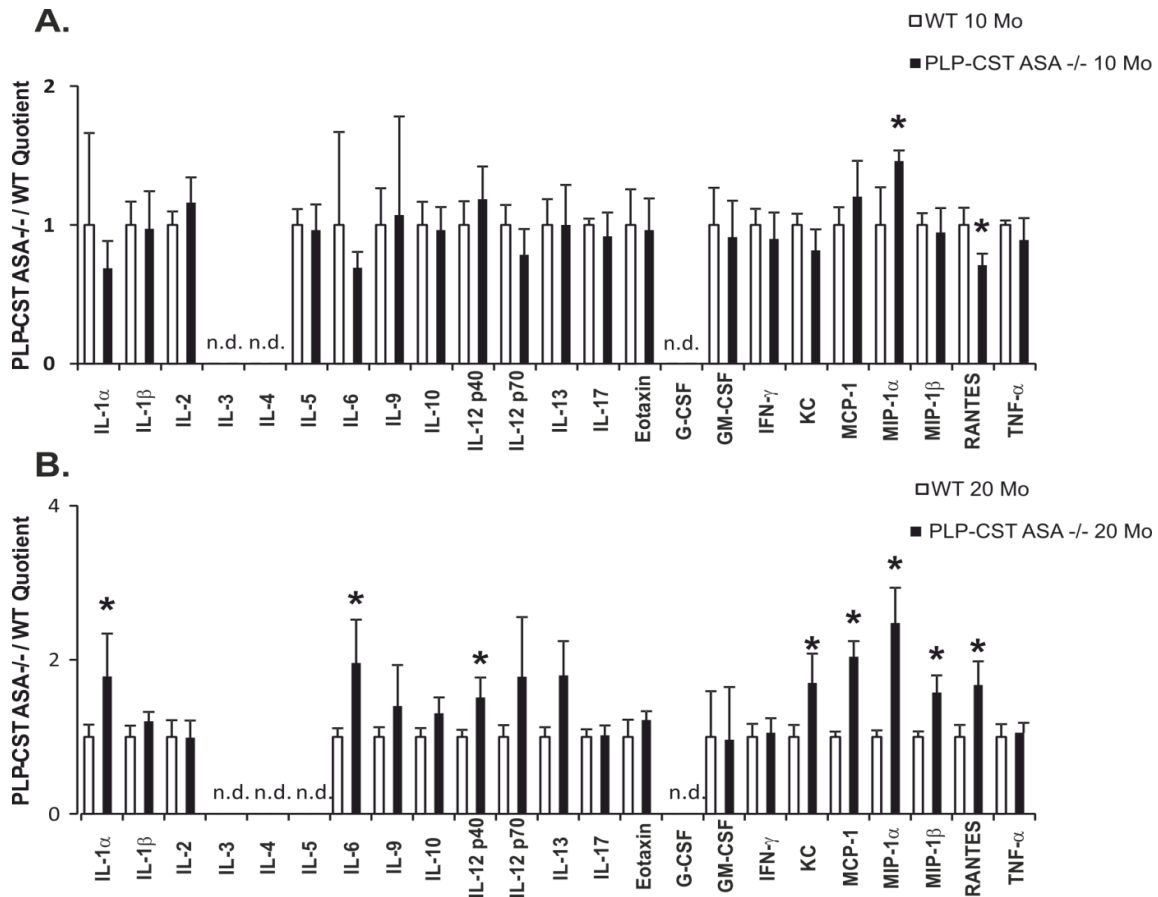


Abb. 9. Multiplex Analyse der Expression von 23 Zytokinen in Gehirn-Homogenaten von 10 und 20 Monate alten WT- und PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen. Die Gesamtkonzentrationen der angegebenen Zytokine und Chemokine wurde per Bio-Rad Bioplex 200 Analyse gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. **(A)** 10 Monate alte Mäuse. **(B)** 20 Monate alte Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der auf die mittleren WT-Konzentrationen normierten Einzelmessungen ($n = 3-5$). Statistisch signifikante Unterschiede zur WT-Kontrolle sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t -Test $p < 0,05$) (n.d.: nicht detektierbar).

5.1.2.3 Infiltration von Immunzellen in das Gehirn von PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen

Bei den Untersuchungen zur Expression von Zytokinen im Gehirn von PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen konnten erhöhte Konzentrationen des Chemokins MIP-1 α in Gehirnen von 10 und 20 Monate alten Tieren gemessen werden. Im Gehirn von 20 Monate alten PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen wurden zusätzlich noch erhöhte Konzentrationen des Chemokins MCP-1 gemessen. Sowohl MIP-1 α als auch MCP-1 können chemotaktisch auf T-Zellen wirken (Balashov *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 1994).

Beide Chemokine sind allerdings auch in der Lage die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten auszulösen (Boisvert *et al.*, 1998; Conti *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2005). Bei im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten im Gehirn von 17 Monate alten Tieren ebenfalls erhöhte Konzentrationen der Chemokine MIP-1 α und MCP-1 gemessen werden (vgl. 5.2.2.1; Abb. 18). Mangels Probenmaterials von 20 Monate alten Tieren erfolgten Untersuchungen auf eine T-Zell- bzw. neutrophile Granulozyten-Infiltration an Gehirn-Kryoschnitten von 17 Monate alten Tieren. Als Kontrolle dienten jeweils Kryoschnitte von altersgleichen WT-Tieren.

Um eine Infiltration von T-Zellen in das Gehirn von 17 Monate alten PLP-CST ASA -/- Mäusen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen an Gehirn-Kryoschnitten durchgeführt, in denen die ϵ -Untereinheit des Pan-T-Zell Markers CD3 gefärbt wurde (Abbas & Lichtman, 2005). Die Detektion des α -CD3 ϵ Antikörpers erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper (rot). Die Färbungen wurden mikroskopisch untersucht und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Um eine Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu gewährleisten, wurden die Aufnahmen der einzelnen Farbkanäle mit der gleichen Belichtungszeit angefertigt. Repräsentative Befunde der Untersuchung sind in Abb. 10 dargestellt.

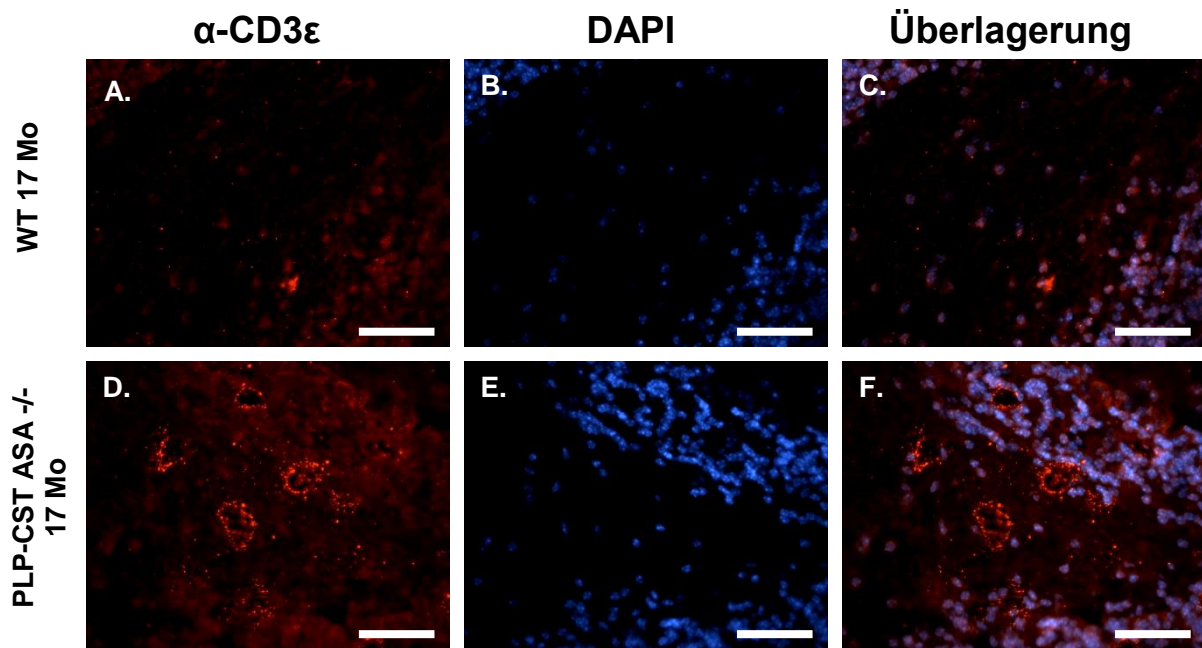


Abb. 10. Infiltration von T-Zellen in das Gehirn von 17 Monate alten PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von 10 µm dicken, mit 4% (w/v) PFA fixierten, sagittalen Gehirnkryoschnitten des Pan-T-Zell Indikators CD3ε. Die Visualisierung des gebundenen α-CD3ε Antikörpers erfolgte durch Inkubation mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-α-Kaninchen IgG Antikörper (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Cerebellums. (A & D) α-CD3ε Färbung WT- und PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen; (B & E) DAPI Färbung; (C & F) Überlagerung der α-CD3ε und der DAPI Färbung (Maßstabsbalken entsprechen 50 µm).

Perivaskulär infiltrierende CD3ε-positive Zellen konnten bei 17 Monate alten PLP-CST ASA^{-/-} Tieren angefärbt werden (Abb. 10D). CD3ε-positive Zellen waren im Gehirn von WT-Tieren nicht nachweisbar (Abb. 10A).

Zum Nachweis infiltrierender Granulozyten wurde der neutrophile Granulozyten Marker Ly-6G (Daley *et al.*, 2008) in Gehirnkryoschnitten angefärbt. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich Kryoschnitte der Milz von WT-Tieren untersucht. Der gebundene α-Ly-6G Antikörper wurde mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper angefärbt (rot). Die Färbungen wurden mikroskopisch untersucht und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Um eine Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu gewährleisten, wurden die Aufnahmen der einzelnen Farbkanäle mit der gleichen Belichtungszeit angefertigt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 11 dargestellt.

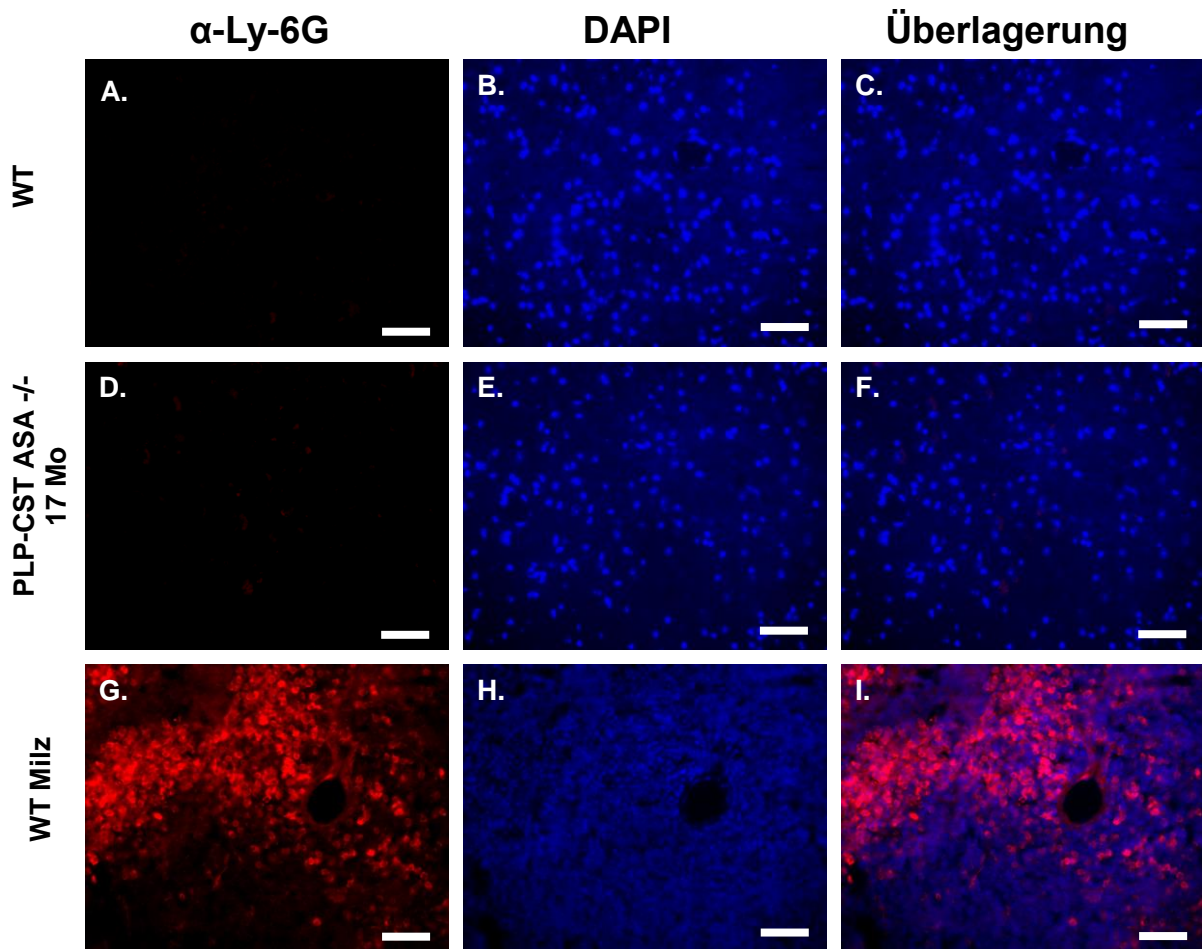


Abb. 11. Fehlen von neutrophilen Granulozyten im Gehirn von 17 Monate alten PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von 10 µm dicken, mit 4% PFA fixierten, sagittalen Gehirn- bzw. Milz-Kryoschnitten des neutrophilen Granulozyten Indikators Ly-6G. Die Visualisierung des gebundenen α-Ly6g Antikörpers erfolgte durch Inkubation mit einem Cy3-gekoppelten Ziege-α-Maus IgG Antikörper (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Hirnstamms. (A & D) α-Ly-6G Färbung WT- und PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen; (G) α-Ly-6G Kontrollfärbung der Milz (B, E & H) DAPI Färbung; (C, F & I) Überlagerung der α-Ly-6G und der DAPI Färbung (Maßstabsbalken entsprechen 50 µm).

Ly-6G positive Zellen waren weder im Gehirn von WT-Kontrolltieren (Abb. 11A) noch bei 17 Monate alten PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen (Abb. 11D), wohl aber in der Kontrollfärbung der Milz (Abb. 11G), nachweisbar.

5.1.2.4 Untersuchungen zur Demyelinisierung im PLP-CST ASA -/- Mausmodell

Da im Gehirn von 17 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren eine prominente Astro- und Mikrogliose nachgewiesen werden konnte, wurde ein möglicher zeitlicher Zusammenhang zwischen Neuroinflammation und Demyelinisierung untersucht. Hierzu wurden die Befunde von Ramakrishnan *et al.* (2007) zur Demyelinisierung an Gehirnen von 17 Monate alten Tieren reevaluiert. Da eine Astro- und Mikrogliose bereits in Gehirnen von 12 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren nachgewiesen werden konnte, erfolgten zudem die Untersuchungen auf eine Demyelinisierung an Gehirnen 12 Monate alter Tiere. Als Kontrolle wurden Gehirne von 12 Monate alten WT-Tieren verwendet. Ein Vergleich des MBP-Gehalts in Gehirnen von 17 Monate alten PLP-CST ASA -/- Mäusen mit gleichaltrigen WT-Tieren ist in 5.2.2.2 (Abb. 19) dargestellt.

Die Untersuchung auf Demyelinisierung erfolgte durch Quantifizierung des Myelinproteins *myelin-basic-protein* (Basisches Myelinprotein, MBP).

Hierfür wurden Lysate der Membranfraktion je einer kompletten Hirnhemisphäre von je drei Tieren der drei experimentellen Gruppen per SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion von MBP erfolgte mit einem Kaninchen-anti-MBP Antikörper. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin mit einem Maus-anti- α -Tubulin Antikörper detektiert. Zum Nachweis des gebundenen α -MBP Antikörpers wurde die Membran anschließend mit einem Infrarotfarbstoff (IRD-800) gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Der Nachweis des gebundenen Maus-anti- α -Tubulin Antikörpers erfolgte über einen Ziege-anti-Maus Antikörper (IRD-680). Zur Visualisierung der gebundenen mit Infrarotfarbstoff gekoppelten sekundär Antikörper wurde die Membran in einem Infrarotscanner (Licor) gescannt. Nach densitometrischer Auswertung wurde das MBP-Signal auf das α -Tubulin-Signal normiert.

Das Ergebnis der Western Blot Analyse, sowie die Quantifizierung sind in Abb. 12 gezeigt.

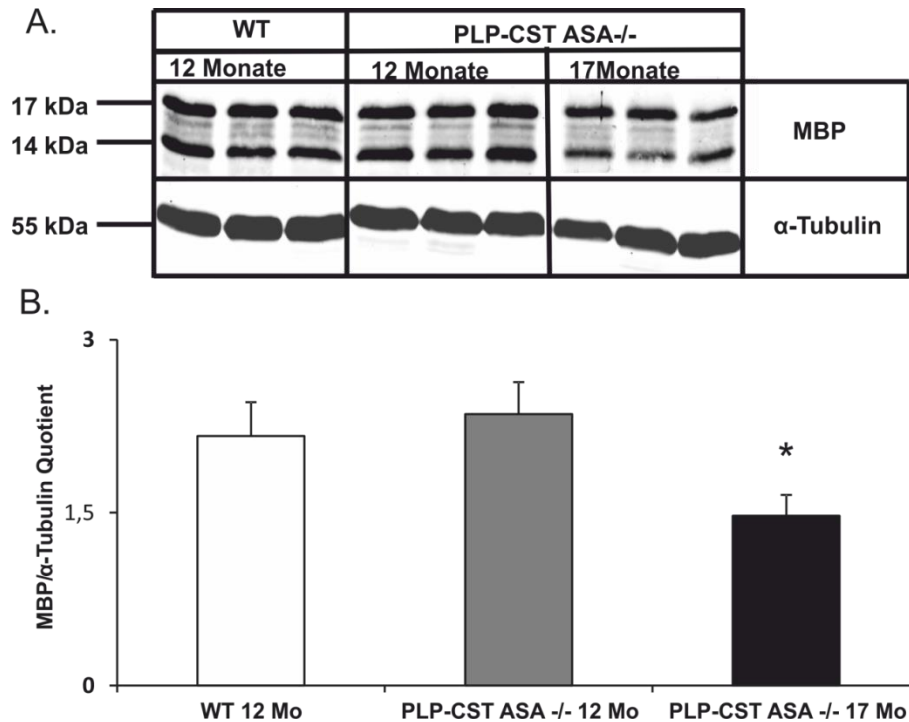


Abb. 12. MBP-Gehalt im Gehirn von 12 und 17 Monate alten PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen. 20 μ g Lysate der Membranfraktionen je einer kompletten Hirnhemisphäre wurden elektrophoretisch in einem 15% Polyacrylamidgel getrennt. Nach dem Western Blot folgte die Detektion von MBP und α -Tubulin mit einem Kaninchen- α -MBP Antikörper bzw. Maus-anti- α -Tubulin Antikörper. Die Visualisierung des primären Antikörpers erfolgte mit einem IRD680-gekoppelten Ziege-anti-Maus bzw. IRD800-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. **(A)** Immundetektion von MBP (14-17 kDa) und α -Tubulin (55 kDa). **(B)** Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Signale aus (A). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der MBP/ α -Tubulin Quotienten ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede zur WT-Kontrolle sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t -Test $p < 0,05$).

Der Immunblot mit dem α -MBP Antikörper lieferte ein für MBP charakteristisches Bandenmuster mit den erwarteten Molekulargewichten von 14-17 kDa. Die Detektion von α -Tubulin erbrachte eine Bande auf einer Höhe der erwarteten 55 kDa (Abb. 12A).

In Gehirnen 17 Monate alter PLP-CST ASA^{-/-} Tiere wurde eine Abnahme des MBP-Gehaltes gegenüber 12 Monate alten WT- und PLP-CST ASA^{-/-} Mäusen nachgewiesen (40%). Im Vergleich zwischen 12 Monate alten PLP-CST ASA^{-/-} und WT-Tieren wurde kein Unterschied des MBP-Gehaltes festgestellt (Abb. 12B). Der vollständige Scan des Western Blots kann im Anhang eingesehen werden (Abb. 24).

5.1.3 Sulfatid-Akkumulation in Gehirnen von MLD-Mäusen korreliert mit der Expression von inflammatorischen Biomarkern im Gehirn

5.1.3.1 Die absolute Sulfatid-Akkumulation korreliert mit der Expression von inflammatorischen Bioindikatoren

Histologische Untersuchungen zur Mikrogliose sowie Analysen von Zytokinkonzentrationen zeigten, dass nur wenige aktivierte mikrogliale Zellen und keine erhöhte Zytokin-Expression in Gehirnen von ASA -/- Mäusen in einem Alter von 12 Monaten detektierbar waren. Ab einem Alter von 24 Monaten konnte allerdings eine geringfügig erhöhte Expression von MIP-1 α und eine deutliche Mikrogliose nachgewiesen werden. In Gehirnen von PLP-CST ASA -/- Tieren war eine erhöhte Expression von MIP-1 α und eine Mikrogliose bereits ab einem Alter von 10 bzw. 12 Monaten detektierbar.

Da das PLP-CST ASA -/- Mausmodell gegenüber ASA -/- Mäusen eine beschleunigte Sulfatid-Akkumulation aufweist, deuten diese Befunde darauf hin, dass die Expression von inflammatorischen Markern im ZNS von MLD-Mäusen zeitlich mit der Sulfatid-Akkumulation korreliert.

Um daher eine eventuelle Korrelation zwischen progredienter Sulfatid-Speicherung im ZNS und fortschreitender Neuroinflammation zu untersuchen, wurde der Sulfatid-Spiegel in Gehirnlipidextrakten der bisher untersuchten Genotypen und Altersstufen mittels Dünnschichtchromatographie analysiert und miteinander verglichen. Mangels Verfügbarkeit von Probenmaterial wurde keine Untersuchung auf die Sulfatid-Akkumulation im Gehirn von 20 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren durchgeführt. Als Kontrolle dienten Gehirn-Lipidextrakte von 20 Monate alten WT-Tieren. Auf die Analyse von gleichalten WT-Kontrollen wurde verzichtet, da WT-Tiere kein Sulfatid im ZNS akkumulieren (Wittke *et al.*, 2004).

Um die gemessenen Sulfatid-Mengen von Lipidextrakten aus Gehirngewebe vergleichen zu können, wurde der Cholesterin-Gehalt als interner Standard verwendet. Dafür wurden die densitometrisch gemessenen Sulfatid-Werte durch Quotientenbildung auf die jeweiligen Cholesterin-Werte normiert.

Das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie ist in Abb. 13A und das der entsprechenden densitometrischen Auswertung in Abb. 13B dargestellt.

Abb. 13B zeigt, dass in Gehirnen von 12 Monate alten ASA -/- Tieren 30% mehr Sulfatid, als in WT-Tieren gemessen wurde. Weiterhin wurde in Gehirnen von 24 Monate alten ASA -/- Mäusen (65% Zunahme im Vergleich zu WT) mehr Sulfatid als bei 12 Monate alten ASA -/- Tieren nachgewiesen (27%). Kein Unterschied des Sulfatid-Gehalts wurde im Vergleich zwischen 12 Monate alten PLP-CST ASA -/- und 24 Monate alten ASA -/- Mäusen gemessen (80% Zunahme im Vergleich zu WT). Der höchste Sulfatid-Gehalt war in Gehirnen von 17 Monate alten PLP-CST ASA -/- Mäusen (141% Zunahme im Vergleich zu WT) detektierbar.

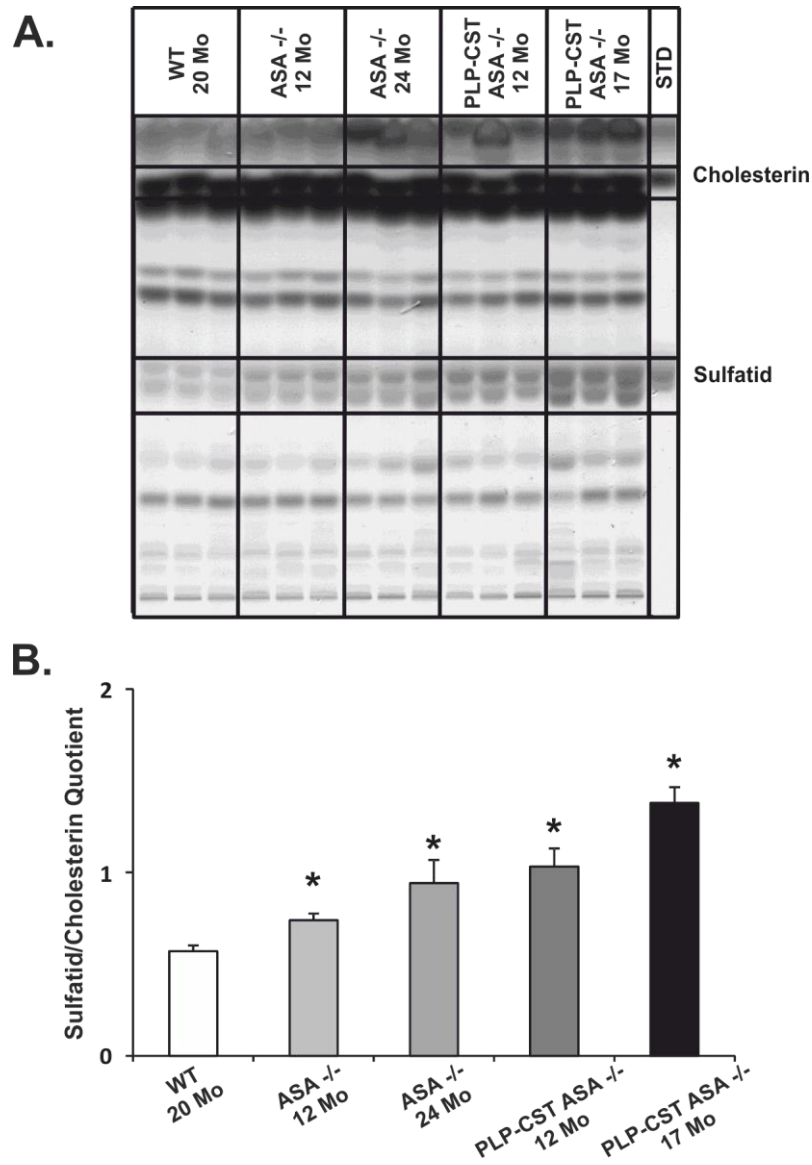


Abb. 13. Sulfatid-Gehalt im Gehirn der angegebenen Genotypen und Altersstufen. Aus Gehirnen extrahierte Lipide wurden per Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und der Sulfatid-Gehalt densitometrisch bestimmt. Cholesterin wurde als interner Standard verwendet und die Sulfatid-Werte durch Quotientenbildung auf die jeweiligen Cholesterinwerte normiert. **(A)** Chromatogramm der untersuchten Lipidextrakte. **(B)** Densitometrische Analyse des Chromatogramms aus (A). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede zur WT-Kontrolle sind mit einem Stern markiert (Student'scher t -Test $p < 0,05$) (STD: Gemisch aus Cholesterin und Sulfatid als Standard).

5.1.3.2 Sulfatid-Akkumulation korreliert regional mit der Expression von MIP-1 α

Wittke *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die Sulfatid-Akkumulation in Gehirnen von ASA $-/-$ Mäusen in retro anterograder Richtung abnimmt. Um eine mögliche regionale Korrelation zwischen lokaler Sulfatid-Akkumulation und der Expression des Chemokins MIP-1 α zu untersuchen, wurden Hirnhälften von je drei 11 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren in Vorder- und Stammhirn mit Kleinhirn unterteilt. Die MIP-1 α Konzentration wurde in den entsprechenden Homogenaten per ELISA gemessen, auf die Gesamtproteinkonzentration des jeweiligen Homogenates bezogen und mit der MIP-1 α Konzentration in Homogenaten der jeweils korrespondierenden kompletten Hirnhälfte verglichen. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 14 dargestellt.

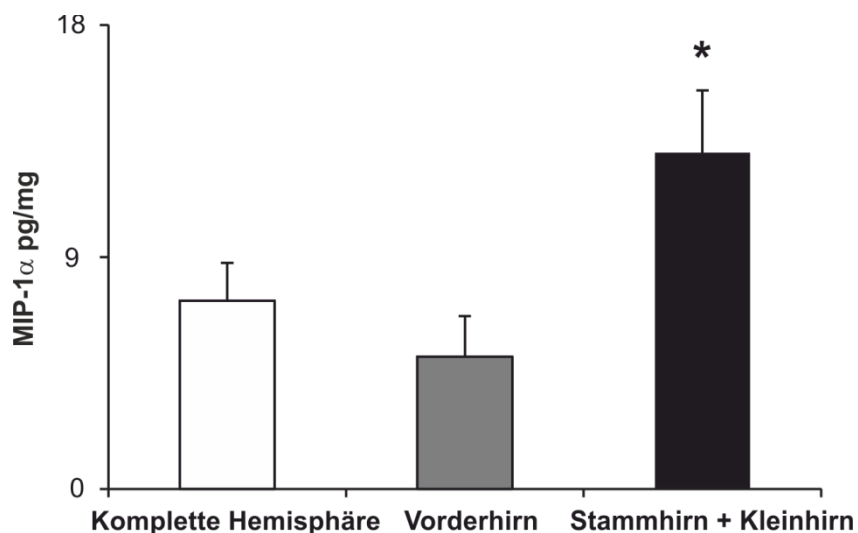


Abb. 14. Vergleich der MIP-1 α Expression in verschiedenen Hirnregionen. Die Gesamtkonzentration des Chemokins MIP-1 α in Homogenaten je einer Hirnhälfte, dem Hirnstamm und dem Vorderhirn von PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen wurde per ELISA gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration des Homogenates bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede zur MIP-1 α Konzentration der Gesamt-Hemisphäre sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t -Test $p \leq 0,05$).

Bei der Messung wurde nachgewiesen, dass die Konzentration von MIP-1 α im Hirnstamm mit Kleinhirn jeweils im Vergleich zur kompletten Hirnhemisphäre und Vorderhirn erhöht war. Im Mittel belief sich die gemessene Konzentration von MIP-1 α in den kompletten Hirnhemisphären auf 7,31 pg/mg, in Vorderhirnen auf 5,13 pg/mg und in Stamm- mit Kleinhirnen auf 13,06 pg/mg.

5.2 Anti-inflammatorische Therapie von PLP-CST ASA -/- Mäusen

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus 5.1, dass Neuroinflammation während der Pathogenese in MLD-Mausmodellen auftritt und dass möglicherweise eine Korrelation zwischen Sulfatid-Akkumulation, Neuroinflammation und Demyelinisierung besteht.

Um zu analysieren, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Neuroinflammation und Demyelinisierung besteht, wurden PLP-CST ASA -/- Mäuse mit dem Antiphlogistikum Simvastatin behandelt.

Zur Untersuchung eines therapeutischen Effektes einer anti-inflammatorischen Therapie wurden PLP-CST ASA -/- Mäuse im präklinischen Stadium, also vor dem Auftreten der Demyelinisierung und im klinischen Stadium über einen Zeitraum von 30 Tagen mit Simvastatin behandelt. Die Tiere im präklinischen Stadium wiesen bei Beginn der Therapie ein Alter von 12 Monaten auf. Für Tiere im klinischen Stadium wurden zwei unabhängige Therapieansätze durchgeführt. Hierbei wurden zum einen Tiere in einem Alter von 16 und zum anderen Tiere in einem Alter von 17 Monaten behandelt. Zur Kontrolle wurden altersgleiche PLP-CST ASA -/- Mäuse mit Placebo (Mock) behandelt. Um einen Effekt der Simvastatinbehandlung auf das Verhalten von WT-Tieren zu untersuchen, wurden in zwei separaten Ansätzen 12 Monate alte WT-Tiere mit Simvastatin bzw. mock-behandelt. Die WT-Kontrollen der Therapieansätze mit 16 und 17 Monate alten Tieren wurden jeweils mit Simvastatin behandelt. Die Gabe von Simvastatin erfolgte oral mit einer Dosierung von 20 mg Simvastatin pro kg Körpergewicht pro Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen (vgl. 4.3.6).

5.2.1 Simvastatin-Therapie an 12 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren

Zunächst wurden 12 Monate alte PLP-CST ASA -/- Mäuse mit Simvastatin behandelt und Effekte auf das Körpergewicht, den Lipidmetabolismus, das Verhalten und die Zytokin-Expression gemessen.

Wöchentliches Wiegen ergab keine Hinweise auf eine signifikante Gewichtszu- oder abnahme während der Behandlung und auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und WT-Kontrollen (Tab. 9).

Tab. 9. Mittlere Gewichte der behandelten Mäuse (n = 10).

Gewichte der behandelten Mäuse [g]				
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
Simva	29,30 ± 4,12	28,35 ± 4,48	28,20 ± 4,29	28,00 ± 4,18
Mock	29,00 ± 3,83	28,83 ± 2,66	29,05 ± 2,59	28,85 ± 2,48
WT	29,95 ± 4,41	29,22 ± 2,80	29,45 ± 3,34	29,30 ± 3,19

5.2.1.1 Lipid-Analytik

Statine sind etablierte Cholesterinsenker mit immunmodulatorischen Eigenschaften. Um mögliche Effekte auf den Sphingolipidmetabolismus zu erfassen, wurde der Sulfatid-Spiegel in Gehirnlipidextrakten der behandelten Gruppen per Dünnschichtchromatographie untersucht. Das Ergebnis der densitometrischen Auswertung und die entsprechende Dünnschichtchromatographie sind in Abb. 15 dargestellt. Cholesterin wurde als interner Standard verwendet und die gemessenen Sulfatid-Mengen durch Quotientenbildung auf die zugehörigen Cholesterin-Werte normiert.

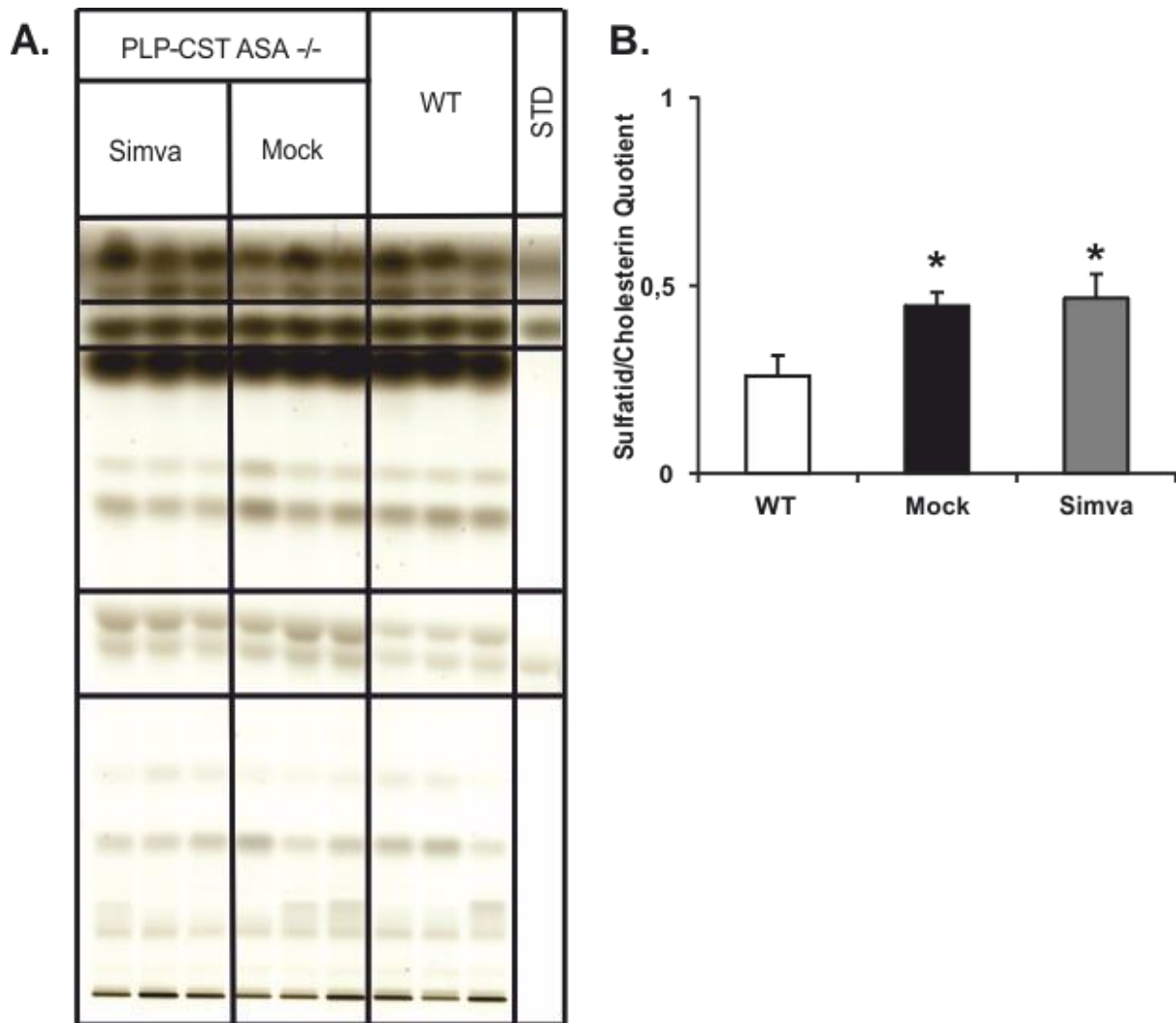


Abb. 15. Lipidanalytik vom Gehirn der Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA ^{-/-} und WT-Tieren. (A) Dünnschichtchromatographie von Gehirn-Lipidextrakten von Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA ^{-/-}, sowie Simvastatin-behandelten WT-Mäusen. Nach der Lipidextraktion aus dem Gehirn wurden die Lipide per Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und der Sulfatid-Gehalt densitometrisch bestimmt. Cholesterin wurde als interner Standard verwendet und die Sulfatid-Werte durch Quotientenbildung auf die jeweiligen Cholesterinwerte normiert. (B) Densitometrische Analyse der Dünnschichtchromatographie in (A). Dargestellt sind die gemessenen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede zur WT-Kontrolle sind mit einem Stern markiert (Student'scher t -Test $p < 0,05$) (STD: Lipid-Standard (Cholesterin und Sulfatid)).

Wie der Abb. 15B zu entnehmen ist, hatte die Simvastatinbehandlung keinen Einfluss auf den Sulfatid-Spiegel von PLP-CST ASA ^{-/-} Mäusen. Sowohl in Simvastatin-, als auch mock-behandelten Tieren war der Sulfatid-Gehalt im Gehirn im Vergleich zu WT-Tieren um 72% erhöht. Zwischen Simvastatin- und mock-behandelten Tieren wurde kein Unterschied gemessen.

5.2.1.2 Verhaltenstests

Verhaltenstests wurden während der dritten Behandlungswoche vom Labor für Biologische Psychologie am Institut für Psychologie der Universität Leuven (Belgien) von Stijn Stroobants durchgeführt. Die Ergebnisse der Verhaltenstests werden in Kapitel 6 diskutiert.

5.2.1.3 Untersuchungen zur Mikrogliose im Gehirn von Simvastatin-behandelten Mäusen

Um zu testen, ob die Simvastatinbehandlung die Mikrogliose beeinflusst, wurden Gehirn-Kryoschnitte der Simvastatin und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Mäuse mit Antikörpern gegen den Pan-Makrophagen-Marker *ionized calcium binding adaptor molecule 1* (IBA-1) (Ito *et al.*, 1998) über Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Als Kontrolle wurden zusätzlich Gehirn-Kryoschnitte von Simvastatin-behandelten WT-Tieren angefärbt. Die Detektion des gebundenen α -IBA1 Antikörpers erfolgte über einen Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper (rot). Die Färbungen wurden mikroskopisch untersucht und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Bei diesen Analysen gab die Morphologie der angefärbten Zellen Aufschluss über das Aktivierungsstadium der Mikroglia (vgl. 2.5). Um eine Vergleichbarkeit der Aufnahmen der verschiedenen Behandlungsgruppen zu gewährleisten, wurden die Aufnahmen der einzelnen Farbkanäle mit der gleichen Belichtungszeit angefertigt. Repräsentative Aufnahmen aus dem Cerebellum und dem Hirnstamm der Simvastatin, bzw. mock-behandelten Tiere sind in Abb. 16 dargestellt.

Im Cerebellum und Hirnstamm der Simvastatin-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Mäuse wurden jeweils weniger IBA-1 positive Zellen mit einer amöboiden Zellmorphologie gegenüber mock-behandelten Tieren nachgewiesen (vgl. Abb. 16D & G, sowie J & M). Im Gehirn von Simvastatin-behandelten WT-Mäusen konnten keine IBA1 positiven Zellen mit einer amöboiden Zellmorphologie detektiert werden (vgl. Abb. 16A).

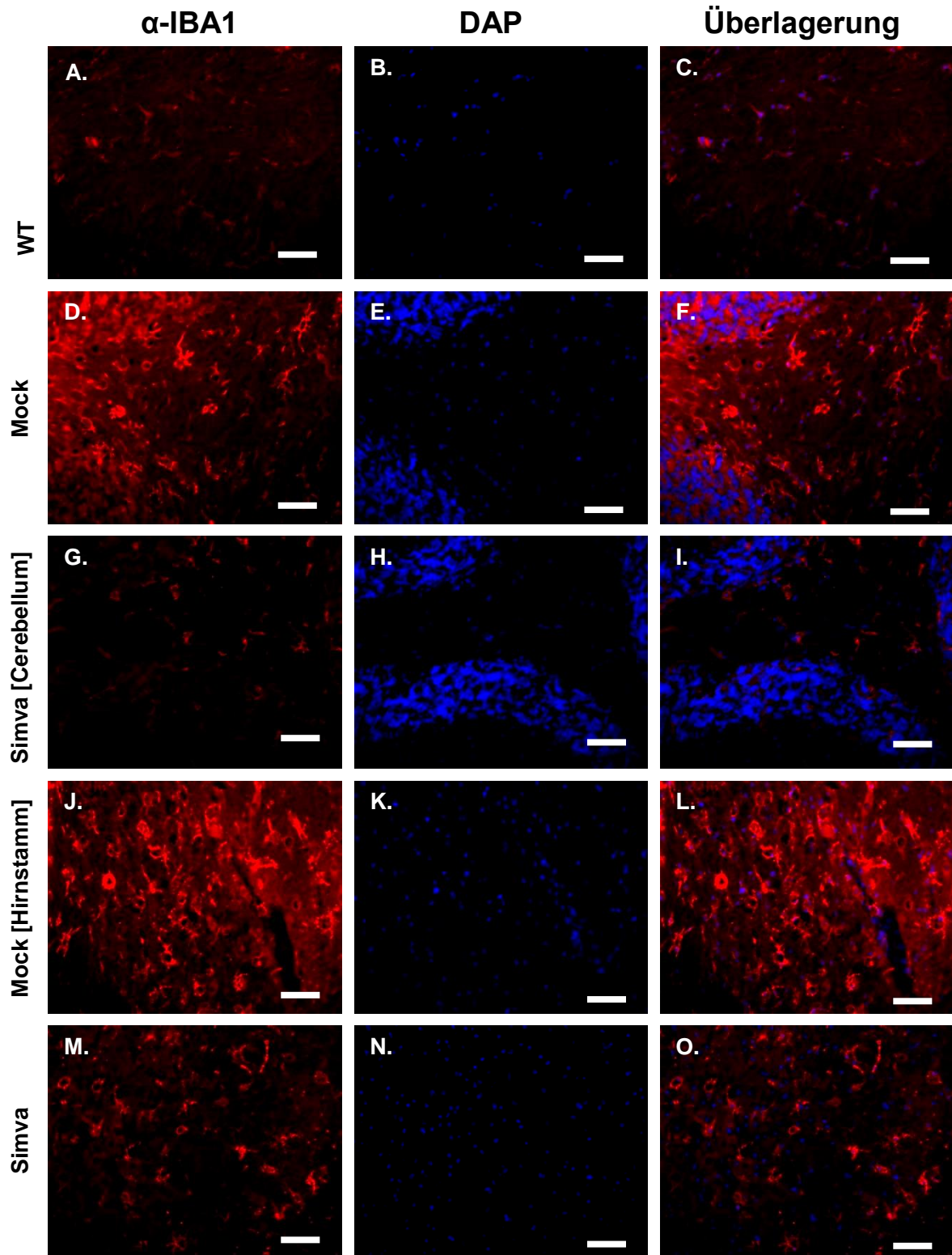


Abb. 16. Mikrogliose bei 12 Monate alten Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von mit 4% (w/v) PFA fixierten, sagittalen Gehirn-Kryoschnitten des Pan-Makrophagen-Markers IBA-1. Der gebundene α -IBA-1 Antikörper wurde mit einem α -Kaninchen IgG Cy3-gekoppelten Antikörper angefärbt (rot). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt sind Ausschnitte des Cerebellums (A, B, C, D, E, F, G, H & I) und des Hirnstamms (J, K, L, M, N & O). (A, D, G, J & M) α -IBA1 Färbung von Simvastatin-behandelten WT- sowie Simvastatin und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen; (B, E, H, K & N) DAPI Färbung; (C, F, I, L & O) Überlagerung der α -IBA1 und der DAPI Färbung (Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m).

5.2.1.4 Zytokin-Expression

Die Ergebnisse aus 5.1.2.2 (Abb. 9) zeigten, dass der MIP-1 α -Spiegel im Gehirn von 10 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen erhöht ist. Daher wurde untersucht, ob die Simvastatinbehandlung die Expression dieses Chemokins beeinflusste.

Hierzu wurde die Konzentration von MIP-1 α in Homogenaten je einer kompletten Hirnhemisphäre von jeweils vier Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ sowie WT-Mäusen per ELISA gemessen. Die gemessenen Konzentrationen wurden anschließend auf die Gesamtproteinkonzentration der Homogenate normiert und miteinander verglichen. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 17 dargestellt.

Im ELISA wurde eine höhere Konzentration von MIP-1 α in Hirn-Homogenaten von mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen gegenüber Simvastatin-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ und WT-Tieren festgestellt.

Im Mittel wurden MIP-1 α Konzentrationen von 4,10 pg/mg für WT-Tiere, 6,15 pg/mg für mock-behandelte PLP-CST ASA $-/-$ und 4,80 pg/mg für Simvastatin-behandelte Tiere gemessen.

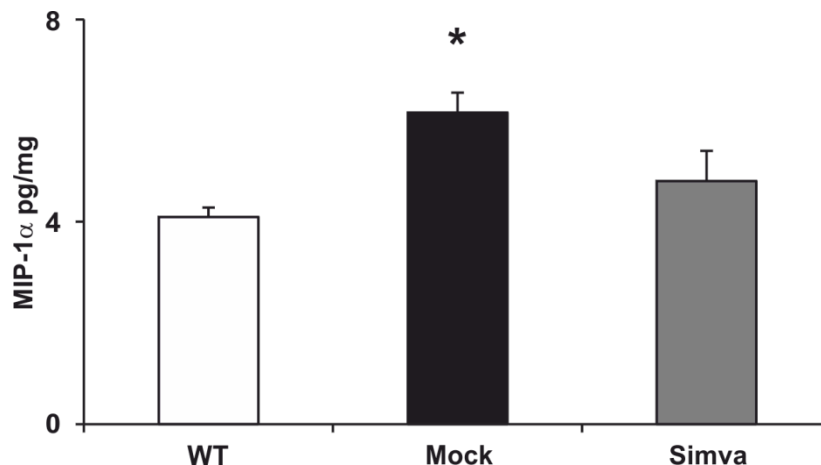


Abb. 17. MIP-1 α Expression in Gehirn-Homogenaten von 12 Monate alten Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren. Die Gesamtkonzentration des Chemokins MIP-1 α in Homogenaten je einer Hirnhälfte wurde per ELISA gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration des Homogenats bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4). Der statistisch signifikante Unterschied von mock- gegenüber Simvastatin-behandelten WT- und Simvastatin-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren ist mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher *t*-Test $p < 0,05$).

5.2.2 Simvastatin-Therapie von 16 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren

Der Therapieansatz mit 16 Monate alten Tieren diente dazu einen therapeutischen Effekt auf die Expression von Zytokinen und der in 5.1.2.4 (Abb. 12) bestimmten Demyelinisierung zu untersuchen, da die Tiere bei der Beendigung der Behandlung ein Alter von 17 Monaten erreicht hatten.

Um mögliche Effekte der Therapie und des angewendeten Fütterungsprotokolls auf das Gewicht der Mäuse zu untersuchen, wurden die Mäuse wöchentlich gewogen.

Tab. 10 zeigt, dass die Behandlung keinen signifikanten Effekt auf das Gewicht der Mäuse hatte.

Nebenbefundlich konnte festgestellt werden, dass 16-17 Monate alte PLP-CST ASA -/- Tiere im Mittel um 30% leichter sind, als gleichalte WT-Tiere.

Tab. 10. Mittlere Gewichte der behandelten Mäuse (n = 6).

Gewichte der behandelten Mäuse [g]				
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche
Simva	26,13 ± 2,06	26,30 ± 1,39	26,25 ± 2,04	26,13 ± 1,69
Mock	28,58 ± 2,44	27,88 ± 2,43	27,93 ± 1,81	28,01 ± 1,28
WT	35,46 ± 2,11	35,26 ± 2,14	35,80 ± 2,15	35,51 ± 2,34

5.2.2.1 Zytokin-Expression

Behandlungseffekte auf die Zytokin-Expression im Gehirn der behandelten Tiere wurden mit dem Multiplex-System untersucht (Bio-Rad Bioplex 200, Hercules, USA).

Analysiert wurden jeweils vier Homogenate einer kompletten Hirnhemisphäre von Simvastatin- bzw. mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren. Zur Kontrolle wurden zusätzlich vier Hirnhälften von Simvastatin-behandelten WT-Tieren untersucht. Zur Auswertung wurde die gemessene Zytokinkonzentration auf die Gesamtproteinkonzentration des zugehörigen Homogenates normiert. Dann wurden die gemessenen Einzelwerte von mock-behandelten Tieren auf die mittlere Zytokinkonzentration der WT-Tiere normiert, die erhaltenen Quotienten innerhalb der 3 experimentellen Gruppen gemittelt und sind als Vielfaches der Kontrollwerte dargestellt (Abb. 18A).

Bei mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen wurden signifikant erhöhte Konzentrationen der Interleukine IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p40, IL-13 und IL-17, der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1 sowie des Interferons IFN- γ gegenüber Simvastatin-behandelten WT-Tieren gemessen. Die Konzentration der Zytokine waren um 205% (IL-1 β), 68% (IL-6), 394% (IL-9), 22% (IL-10), 99% (IL-12 p40), 23% (IL-13), 72% (IL-17), 218% (MIP-1 α), 64% (MIP-1 β), bzw. 322% (MCP-1) erhöht.

Die Darstellung des Vergleichs der Zytokinkonzentration von Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren erfolgte analog zu der Darstellung des Vergleichs zwischen mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ und WT-Tieren. Hierbei wurden die gemessenen Einzelwerte von Simvastatin-behandelten Tieren auf die mittlere Zytokinkonzentration der mock-behandelten Tiere normiert und sind als Vielfaches der Werte für mock-behandelte Tiere dargestellt (Abb. 18B).

Nach der Simvastatinbehandlung war die Konzentration der Interleukine IL-6, IL-10 und IL-12 p70, des Kolonie-stimulierenden Faktors GM-CSF, des Interferons IFN- γ und TNF- α in Homogenaten von Simvastatin- gegenüber mock-behandelten Tieren verringert. Dabei war eine Abnahme der Konzentrationen um 32% (IL-6), 30% (IL-10), 57% (IL-12 p70), 35% (GM-CSF), 18% (IFN- γ) bzw. 33% (TNF- α) messbar.

Die Konzentration der Interleukine IL-1 α , IL-3, IL-4 und IL-5 sowie des Chemokins Eotaxin und des Kolonie-stimulierenden Faktors G-CSF lag bei allen experimentellen Gruppen unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 18).

Die absoluten Messwerte können dem Anhang entnommen werden (Tab. 13).

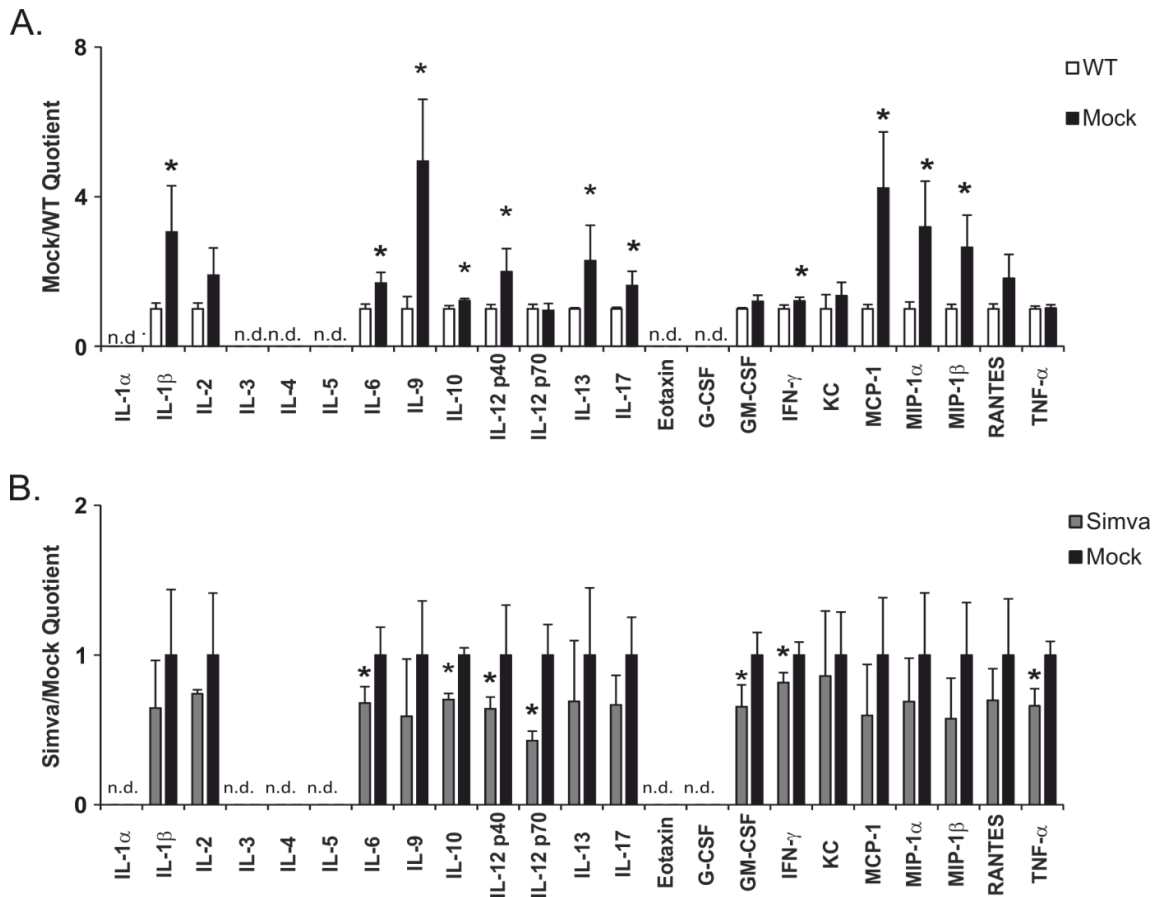


Abb. 18. Multiplex Analyse der Expression von 23 Zytokinen in Gehirn-Homogenaten von 17 Monate alten Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren. Die Gesamtkonzentrationen der angegebenen Zytokine wurde per Bio-Rad Bioplex 200 Analyse gemessen und auf die eingesetzte Gesamtproteinkonzentration bezogen. **(A)** Vergleich mock-behandelte Tiere mit Simvastatin-behandelten WT-Tieren. **(B)** Vergleich Simvastatin-behandelte PLP-CST ASA $-/-$ Tiere mit mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der auf die mittleren Zytokinkonzentrationen im Gehirn von mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ bzw. WT-Mäusen normierten Einzelmessungen ($n = 4$). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t -Test $p < 0,05$) (n.d.: nicht detektierbar).

5.2.2.2 Einfluss der Simvastatinbehandlung auf die Demyelinisierung im ZNS

Die Ergebnisse der Multiplex-Analyse zur Zytokin-Expression in Gehirn-Homogenaten zeigten, dass die Simvastatinbehandlung die Expression von neuroinflammatorischen Biomarkern im Gehirn erfolgreich senken konnte.

Um eine mögliche Auswirkung der Abnahme der Expression von Zytokinen auf die in 5.1.2.4 beschriebene Demyelinisierung zu untersuchen, wurde der MBP-Gehalt im Lysaten der Membranfraktion des Gehirns der behandelten Mäuse per Western Blot untersucht.

Hierfür wurden Lysate der Membranfraktion je einer kompletten Hirnhemisphäre von vier bis fünf Tieren der drei experimentellen Gruppen per SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion von MBP erfolgte mit einem Kaninchen-anti-MBP Antikörper. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin, bzw. β -Aktin mit einem Maus-anti- α -Tubulin bzw. Maus-anti- β -Aktin Antikörper detektiert. Zum Nachweis des gebundenen α -MBP Antikörpers wurde die Membran anschließend mit einem Infrarotfarbstoff (IRD-800) gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Der Nachweis des gebundenen Maus-anti- α -Tubulin, bzw. Maus-anti- β -Aktin Antikörpers erfolgte über einen Ziege-anti-Maus Antikörper (IRD-680). Zur Visualisierung der gebundenen mit Infrarotfarbstoff gekoppelten sekundär Antikörper wurde die Membran in einem Infrarotscanner (Licor) gescannt. Nach der densitometrischen Auswertung wurde das MBP-Signal auf das α -Tubulin-, bzw. β -Aktin-Signal normiert (Abb. 19).

Der Immunblot mit dem α -MBP Antikörper lieferte ein für MBP charakteristisches Bandenmuster mit den erwarteten Molekulargewichten von 14-17 kDa (Abb. 19A & C). Die Detektion von β -Aktin Ladekontrolle erbrachte eine Bande mit einem Molekulargewicht der erwarteten 40 kDa (Abb. 19A). Die Detektion von α -Tubulin lieferte eine Bande mit einem Molekulargewicht der erwarteten 55 kDa (Abb. 19B).

Wie den densitometrischen Auswertungen in Abb. 19B & D zu entnehmen ist, wurde eine Abnahme des MBP-Gehaltes im Vergleich zwischen mock-behandelten PLP-CST ASA +/- und Simvastatin-behandelten WT-Tieren gemessen (50%) (Abb. 19B). Im Vergleich von Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA +/- Tieren war kein Unterschied des MBP-Gehaltes im Gehirn nachweisbar (Abb. 19D). Die vollständigen Scans der Western Blots sind im Anhang dargestellt (Abb. 25 & 26).

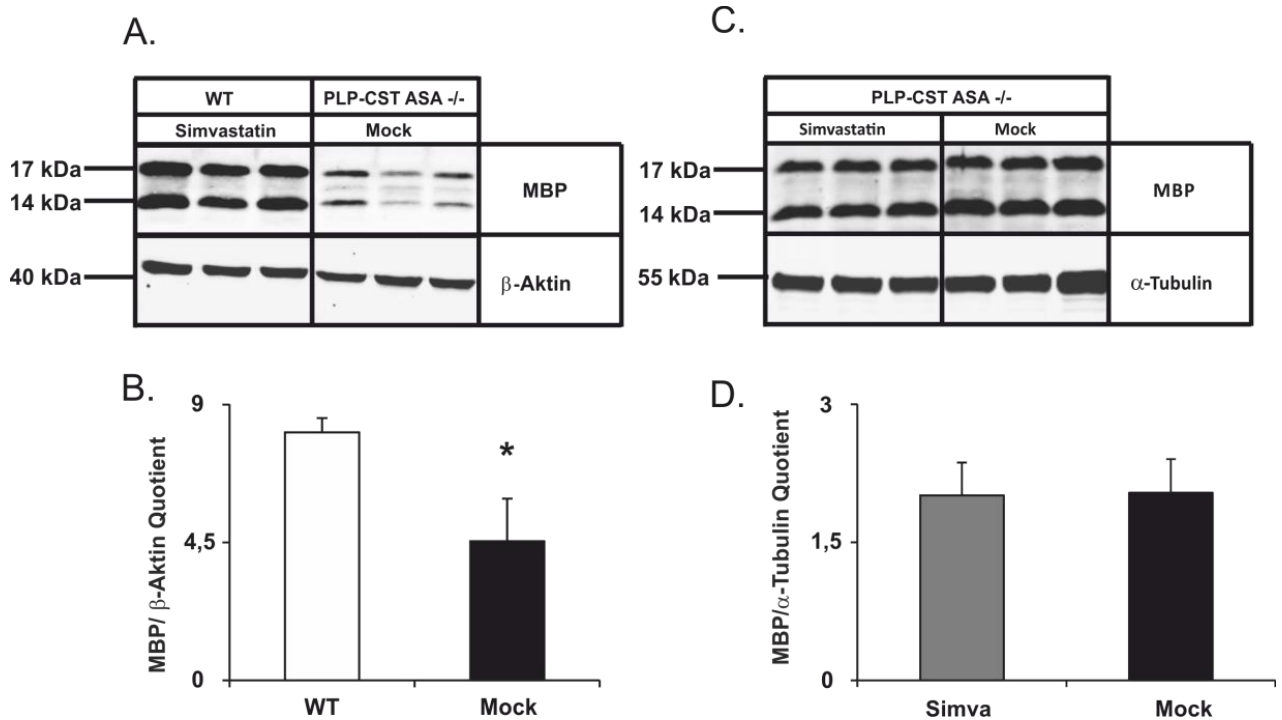


Abb. 19. Untersuchung auf Demyelinisierung im Gehirn von 17 Monate Simvastatin-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren im Vergleich zu mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ und WT-Tieren. 20 μ g Lysate der Membranfraktion je einer kompletten Hirnhemisphäre wurden elektrophoretisch in einem 15% Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Nach erfolgtem Western Blot erfolgte die Immundetektion von MBP, α -Tubulin und β -Aktin mit einem Kaninchen-anti-MBP, Maus-anti- α -Tubulin bzw. Maus-anti- β -Aktin Antikörper. Die Visualisierung der Immundetektion erfolgte durch mit einem IRD680-gekoppelten Ziege-anti-Maus bzw. IRD800-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. **(A & C)** Darstellung der Western Blots mit MBP (14-17 kDa) und β -Aktin (40 kDa) bzw. α -Tubulin (55 kDa) nach erfolgter Immundetektion. **(B & D)** Densitometrische Quantifizierung der Western Blots aus (A & C). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5 - 6$). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t -Test $p < 0,05$).

Im Weiteren wurde ein möglicher Effekt der Behandlung auf den MBP-Gehalt in Lysaten der Membranfraktion des Rückenmarks von je drei Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ sowie WT-Tieren, wie für Lysate der Membranfraktion des Gehirns beschrieben, untersucht. Hierzu wurden Western Blot Analysen mit anschließender Immundetektion von MBP und β -Aktin durchgeführt. Nach der densitometrischen Auswertung wurde das MBP-Signal β -Aktin-Signal normiert (Abb. 20).

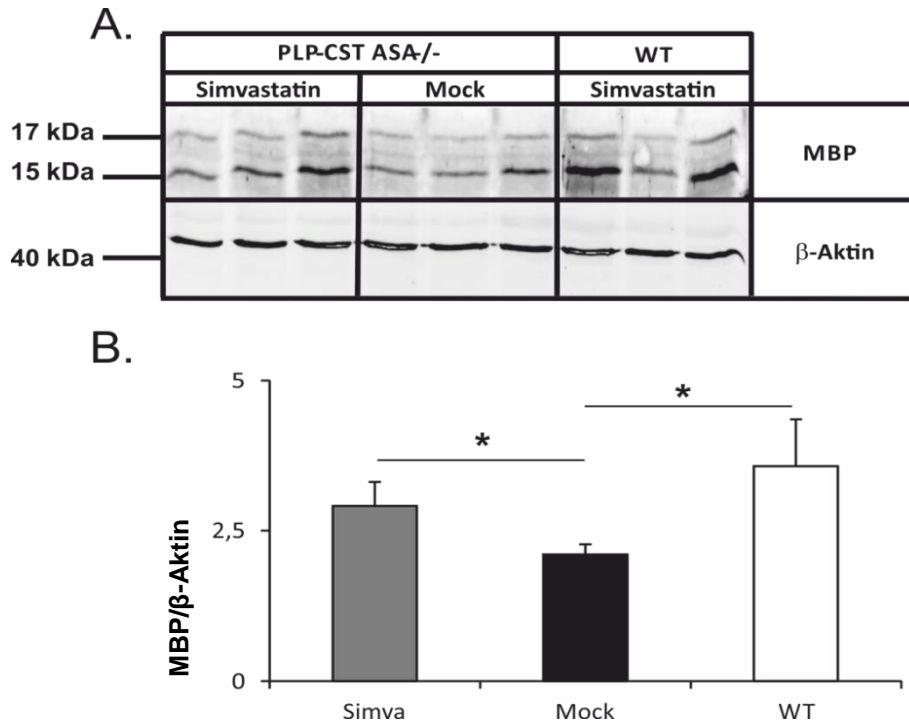


Abb. 20. Untersuchung auf Demyelinisierung im Rückenmark von 17 Monate alten Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA^{-/-} Tieren im Vergleich zu Simvastatin-behandelten WT-Tieren. 5 µg Lysate der Membranfraktion aus dem Rückenmark wurden elektrophoretisch in einem 15% Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Nach erfolgtem Western Blot folgte die Detektion von MBP und β-Aktin mit einem Kaninchen-anti-MBP Antikörper bzw. Maus-anti-β-Aktin Antikörper. Die Visualisierung der Immunodetektion erfolgte durch die Detektion mit einem IRD680-gekoppelten Ziege-anti-Maus bzw. IRD800-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. **(A)** Darstellung des Western Blots mit MBP (15-17 kDa) und der Ladekontrolle β-Aktin (40 kDa). **(B)** Densitometrische Quantifizierung des Western Blots aus (A). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher *t*-Test $p < 0,05$).

Die Detektion des α-MBP Antikörpers lieferte ein für MBP charakteristisches Bandenmuster den erwarteten Molekulargewichten von 15-17 kDa. Der Nachweis von β-Aktin erbrachte eine Bande mit einem Molekulargewicht der erwarteten 40 kDa (Abb. 20A).

Laut der densitometrischen Evaluation liegt im Rückenmark der Simvastatin-behandelten Tiere im Vergleich zu mock-behandelten Tieren ein um 38% erhöhter MBP-Gehalt vor. Im Rückenmark von mock-behandelten Tieren wurde ein geringerer MBP-Gehalt im Vergleich zu WT-Mäusen gemessen (41%) (Abb. 20B). Der Scan des vollständigen Western Blots ist im Anhang dargestellt (Abb. 27).

5.2.3 Simvastatin-Therapie von 17 Monate alten PLP-CST ASA -/- Tieren

Um den gefundenen therapeutischen Effekt der Behandlung auf den MBP-Gehalt im Rückenmark der behandelten 16 Monate alten Tiere zu bestätigen, wurde ein dritter Therapieansatz an 17 Monate alten Mäusen durchgeführt. Die behandelten Tiere erreichten demnach bei der Beendigung der Therapie ein Alter von 18 Monaten. Um mögliche Effekte der Therapie und des angewendeten Fütterungsprotokolls auf das Gewicht der Mäuse zu untersuchen, wurden die Mäuse erneut wöchentlich gewogen. Auch hier konnten keine signifikanten Effekte des Fütterungsprotokolls auf das Gewicht der behandelten Tiere festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.3.1 Einfluss der Simvastatinbehandlung auf die Zytokin-Expression im Rückenmark

Da in 5.2.2.1 ein Effekt der Behandlung auf die Zytokin-Expression im Gehirn gefunden wurde (Abb. 18B), erfolgten analoge Untersuchungen zur Zytokin-Expression in Homogenaten des Rückenmarks der behandelten Tiere mit einer Multiplex-Analyse (Bio-Rad Bioplex 200, Hercules, USA). Analysiert wurden jeweils drei Rückenmarks-Homogenate von Simvastatin- bzw. mock-behandelten PLP-CST ASA -/- Tieren. Zur Kontrolle wurde zusätzlich das Rückenmark von drei Simvastatin-behandelten WT-Tieren untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 analog zu den Ergebnissen zur Untersuchung auf die Zytokin-Expression im Gehirn aus 5.2.2.1 dargestellt (Abb. 18).

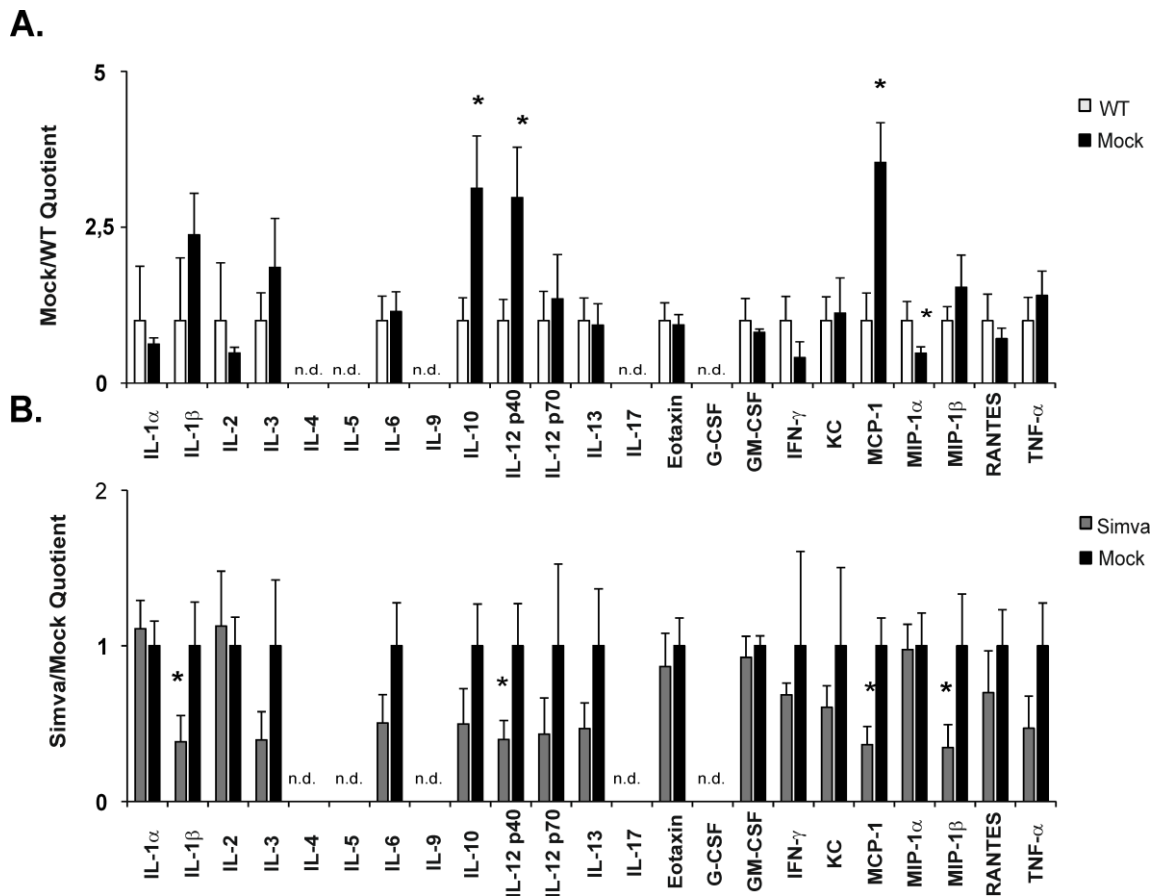


Abb. 21. Multiplex Analyse der Expression von 23 Zytokinen in Homogenaten des Rückenmarks von 18 Monate alten Simvastatin- sowie mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ Tieren. Die Gesamtkonzentrationen der angegebenen Zytokine wurde per Bio-Rad Bioplex 200 Analyse gemessen und auf die eingesetzte Gesamtproteinkonzentration bezogen. **(A)** Vergleich mock-behandelte Tiere mit WT-Tieren. **(B)** Vergleich Simvastatin-behandelte mit mock-behandelten Tieren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der auf die mittleren Zytokinkonzentrationen im Rückenmark von mock-behandelten PLP-CST ASA $-/-$ bzw. WT-Mäusen normierten Einzelmessungen ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t -Test $p < 0,05$) (n.d.: nicht detektierbar).

Im Rückenmark von mock-behandelten Tieren wurden erhöhte Konzentrationen der Zytokine IL-10, IL-12 p40 und MCP-1 gegenüber WT-Tieren gemessen. Hierbei waren die Konzentrationen um 212% (IL-10), 197% (IL-12 p40) und 250% (MCP-1) erhöht. Für MIP-1 α wurde in Rückenmarkshomogenaten von mock-behandelten Tieren eine geringere Konzentration gegenüber WT-Tieren gemessen (52%) (Abb. 21A).

Bei Simvastatin-behandelten Tieren konnte eine Abnahme der Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-12 p40, MCP-1 und MIP-1 β gegenüber mock-behandelten Tieren gemessen werden. Hier waren die Konzentrationen um 62% (IL-1 β), 50% (IL-10), 65% (MCP-1) und 65% (MIP-1 β) verringert (Abb. 21B).

Die Konzentration einiger Zytokine lag in den durchgeführten Messungen bei jeweils mindestens einer Maus der experimentellen Gruppen unterhalb der Nachweisgrenze. So konnten die Interleukine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17 und G-CSF in keiner der untersuchten Gruppen detektiert werden.

Die absoluten Messwerte können dem Anhang entnommen werden (Tab. 14).

5.2.3.2 Einfluss der Simvastatinbehandlung auf die Demyelinisierung im Rückenmark

Zwecks Verifikation des gefundenen Effekts auf den MBP-Gehalt im Rückenmark der in 5.2.2 therapierten Tiere (vgl. Abb. 20) wurde erneut der Effekt der Simvastatinbehandlung auf den MBP-Gehalt in Lysaten der Membranfraktion des Rückenmarks per Western Blot untersucht.

Hierfür wurden je drei Lysate der Membranfraktion des Rückenmarks der drei experimentellen Gruppen per SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion von MBP erfolgte mit einem Kaninchen-anti-MBP Antikörper. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin mit einem Maus-anti- α -Tubulin Antikörper detektiert. Zum Nachweis des gebundenen α -MBP Antikörpers wurde die Membran anschließend mit einem Infrarotfarbstoff (IRD-680) gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Der Nachweis des gebundenen Maus-anti- α -Tubulin Antikörpers erfolgte über einen Ziege-anti-Maus Antikörper (IRD-800). Zur Detektion der gebundenen mit Infrarotfarbstoff gekoppelten sekundär Antikörper wurde die Membran in einem Infrarotscanner (Licor) gescannt. Nach der densitometrischen Auswertung wurde das MBP-Signal auf das α -Tubulin-Signal normiert. Der Western Blot, sowie die densitometrische Auswertung sind in Abb. 22 dargestellt.

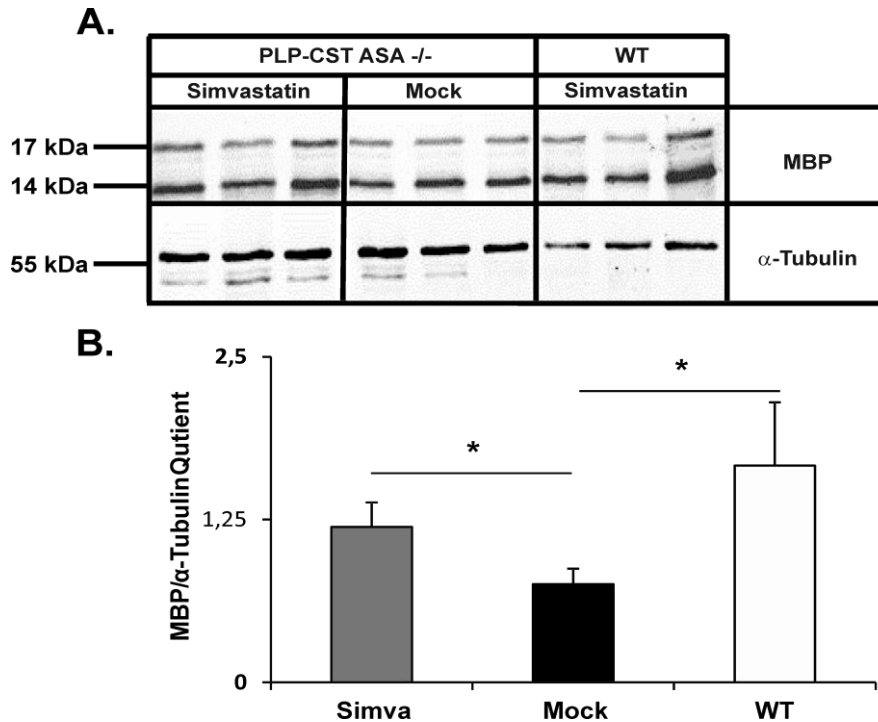


Abb. 22. Untersuchung auf Demyelinisierung im Rückenmark von 18 Monate alten Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA ^{-/-} Tieren. 5 μ g Lysate der Membranfraktion aus dem Rückenmark wurden elektrophoretisch in einem 15% Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Nach erfolgtem Western Blot folgte die Immundetektion von MBP und α -Tubulin mit einem Kaninchen-anti-MBP Antikörper bzw. Maus-anti- α -Tubulin Antikörper. Die Visualisierung der gebundenen α -MBP bzw. α -Tubulin Antikörper erfolgte durch die Detektion mit einem IRD800-gekoppelten Ziege-anti-Maus bzw. IRD680-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. **(A)** Darstellung des Western Blots nach erfolgter Immundetektion mit MBP (14-17 kDa) und α -Tubulin (55 kDa). **(B)** Densitometrische Quantifizierung des Western Blots aus (A). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 3). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet (Student'scher t-Test $p < 0,05$).

Der Nachweis mit dem α -MBP Antikörper lieferte ein für MBP charakteristisches Bandenmuster mit einem erwarteten Molekulargewicht von 14-17 kDa. Die Detektion von α -Tubulin erbrachte eine Bande mit einem Molekulargewicht der erwarteten 55 kDa (Abb. 22A).

Die densitometrische Evaluation des Western Blots zeigte, dass in Lysaten der Membranfraktion des Rückenmarks der Simvastatin-behandelten Tiere, im Vergleich zu mock-behandelten Tieren, ein um 58% erhöhter MBP-Gehalt vorliegt. Im Rückenmark von mock-behandelten Tieren wurde ein geringerer MBP-Gehalt im Vergleich zu WT-Mäusen nachgewiesen (55%) (Abb. 22B). Der vollständige Scan des Western Blots ist im Anhang dargestellt (Abb. 28).

6. Diskussion

6.1 Neuroinflammation in Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie

6.1.1 Lysosomale Speichererkrankungen und Neuroinflammation

Defekte der lysosomalen Homöostase resultieren in einer Gruppe von etwa 50 erblichen Krankheiten, die als LSDs bezeichnet werden (Futerman & van Meer, 2004). Klinisch zeichnet sich das Krankheitsbild durch die Akkumulation von nicht degradierbarem Material innerhalb der Lysosomen aus. Je nach Gewebeverteilung des akkumulierenden Speichermaterials sind verschiedene Organe von pathologischen Veränderungen betroffen. Etwa zwei Drittel aller LSDs und fast alle Sphingolipidosen resultieren in neurodegenerativen und demyelinisierenden Prozessen im ZNS (Schultz *et al.*, 2011). Ungeklärt sind allerdings noch die Mechanismen, welche ausgehend von der intralysosomalen Akkumulation von Speichermaterial, zu den verschiedenen pathologischen Veränderungen führen.

Gemeinsam haben LSDs mit neurologischer Symptomatik mit praktisch allen ZNS-Erkrankungen, wie Multiple Sklerose (MS), Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Morbus Pelizaeus-Merzbacher, neuroinflammatorische Prozesse (Ramesh *et al.*, 2013). Auch bei Analysen der Mausmodelle zu den Sphingolipidosen Morbus Farber, GM1-Gangliosidose, den GM2-Gangliosidosen (Morbus Sandhoff (SD) und Morbus Tay-Sachs) sowie der neuropathischen Variante von Morbus Gaucher konnten neuroinflammatorische Prozesse nachgewiesen werden (Alayoubi *et al.*, 2013; Jeyakumar *et al.*, 2003; Vitner *et al.*, 2012). Auch im ZNS der Mausmodelle zu den Mukopolysaccharidosen (MPS) MPS I, MPS IIIA und MPS IIIB sowie der Lipidose Morbus Niemann-Pick Typ C finden nachweislich neuroinflammatorische Prozesse statt (Wilkinson *et al.*, 2012; German *et al.*, 2002).

Umfassende Daten liegen zudem von der *twitcher* Maus, einem Tiermodell der Sphingolipidose Globoidzell-Leukodystrophie (GLD) vor (Kobayashi *et al.*, 1980). GLD beruht auf einem Enzymdefekt der β -Galaktocerebrosidase (GalC). GalC

katalysiert den Abbau von Galaktosylceramid (GalCer) zu Ceramid und Galactose. Anders als zu erwarten wäre, akkumuliert im ZNS von *twitcher* Mäusen jedoch nicht GalCer, sondern das toxische metabolische Derivat von GalCer, Galaktosphingosin (Psychosin) (Svennerholm *et al.*, 1980; Nagara *et al.*, 1986). Vermutlich entsteht das im ZNS von WT-Tieren nicht detektierbare Psychosin durch die N-Deacylierung des nicht degradierbaren GalCer (Miyatake & Suzuki, 1972). Wie auch MLD wird GLD klinisch durch einen progressiven Verlust von Myelinscheiden charakterisiert (Wenger *et al.*, 2001). Im ZNS von *twitcher* Mäusen kann ein progressiver Verlust von Oligodendrozyten und damit einhergehend eine Demyelinisierung ab dem postnatalen Tag 20 nachgewiesen werden (Taniike & Suzuki, 1994). *Twitcher* Mäuse weisen im Schnitt eine Lebenserwartung von 45 Tagen auf (Suzuki, 1983). Neuroinflammatorische Prozesse in Mausmodellen der GLD konnten bereits in Form von Astro- und Mikroglie, infiltrierenden Monozyten, T-Zellen, verstärkter I-A (muriner MHC II Isotyp) Expression und erhöhter Zytokinkonzentrationen nachgewiesen werden (Ohno *et al.*, 1993; Wu, *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2013; Snook *et al.*, 2014).

6.1.2 Neuroinflammation in Mausmodellen der Metachromatischen Leukodystrophie

Für Mausmodelle der MLD wurden bisher kaum Daten zur Neuroinflammation erhoben. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen neuroinflammatorischen Prozessen und der ZNS-Pathogenese der MLD zu evaluieren, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die beiden MLD-Mausmodelle auf Neuroinflammation hin untersucht. Hierbei reflektiert die konventionelle ASA *-/-* Maus (Hess *et al.*, 1996) mit dem milden Phänotyp über ihre gesamte Lebensspanne ein präklinisches Stadium der MLD. Das MLD-Mausmodell mit der transgenen Expression der CST (PLP-CST ASA *-/-*; Ramakrishnan *et al.*, 2007) zeigt gegenüber dem konventionellen ASA *-/-* Mausmodell einen verstärkten Phänotyp und eine gegenüber WT-Tieren verkürzte Lebenserwartung von 20 Monaten. Bei diesen Mäusen ist, vermutlich aufgrund der beschleunigten Sulfatid-Akkumulationsrate, eine Demyelinisierung im ZNS ab einem Alter von 17 Monaten nachweisbar. Somit stellen Tiere diesen Alters ein authentischeres Modell der klinischen Phase der MLD als die ASA *-/-* Maus dar.

6.1.2.1 Neuroinflammation im ASA -/- Mausmodell

Für die Untersuchung auf Neuroinflammation erfolgten zunächst Immunfluoreszenzanalysen auf Astro- und Mikrogliose in konventionellen ASA -/- Mäusen. Dabei konnte eine milde bzw. generalisierte Astro- und Mikrogliose im Gehirn von 12 bzw. 24 Monate alten ASA -/- Mäusen gezeigt werden (vgl. Abb. 4 & 5). Hiermit wurden Vorbefunde von Hess *et al.* (1996) bestätigt, nach denen eine progrediente Astro- und Mikrogliose im Gehirn von ASA -/- Mäusen ab einem Alter von 12 Monaten detektierbar ist.

Vergleichbare Analysen zu einer progressiven astro- und mikroglialen Aktivierung wurden zuvor an Mausmodellen für die Sphingolipidosen Morbus Sandhoff und Morbus Tay-Sachs, sowie Morbus Gaucher und GLD durchgeführt (Jeyakumar *et al.*, 2003; Farfel-Becker *et al.*, 2011; Ohno *et al.*, 1993). Für LSDs mit neurologischer Symptomatik konnte in Mausmodellen zu MPS I, MPS IIIA und MPS IIIB (Wilkinson *et al.*, 2012) sowie der Lipidose Morbus Niemann-Pick Typ C (Baurdy *et al.*, 2003) ebenso gezeigt werden, dass eine progrediente Mikro- und Astrogliose im Verlauf der Pathogenese entsteht. Damit stellt die progrediente Aktivierung der astro- und mikroglialen Zellpopulationen ein gemeinsames Merkmal von LSDs mit neurologischer Symptomatik dar.

Bei den Analysen zur Expression von Zytokinen konnte eine geringfügig erhöhte Konzentration des Chemokins MIP-1 α im Gehirn von 24 Monate alten ASA -/- Tieren festgestellt werden (vgl. Abb. 6B). Die Zytokine IL-1 β und KC, welche in Gehirnen der Mausmodelle zu Morbus Gaucher und GLD in erhöhter Konzentration vorliegen (Vitner *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2013), zeigten in keiner der untersuchten Altersstufen einen Konzentrationsanstieg.

MIP-1 α ist ein Chemokin, das von aktivierten Phagozyten sowie den meisten Zellen des hämatopoetischen System exprimiert werden kann und weist pleiotrope Funktionen auf (Maurer & von Stebut, 2004). Hierzu zählt die Chemotaxis von Immunzellen und die Stimulation von Zielzellen zur Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren (Menten *et al.*, 2002).

Die zeitliche Koinzidenz zwischen generalisierter Mikrogliose und geringfügig erhöhter MIP-1 α Konzentration lässt vermuten, dass die Expression des Chemokins auf die Aktivierung der Mikroglia zurückzuführen ist. Gestützt wird diese Annahme

durch den Befund, dass bei konventionellen ASA $-/-$ Tieren im Alter von 12 Monaten zwar eine milde Mikrogliose, aber keine erhöhte MIP-1 α Konzentration nachgewiesen werden kann (vgl. Abb. 4D & 6A). In einem MS-Mausmodell wurde zudem von Balashov *et al.* (1999) gezeigt, dass MIP-1 α von der aktivierten Mikroglia produziert wird, um Immunzellen aus dem Blut ins ZNS zu rekrutieren. Auffälligerweise wurde eine erhöhte Expression von MIP-1 α in Gehirnen der Tiermodelle von allen bisher untersuchten LSDs mit zentralnervöser Pathologie und neuroinflammatorischer Komponente nachgewiesen (Vitner *et al.*, 2012; Sano *et al.*, 2005; Tsuji *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2001; Snook *et al.*, 2014; Wilkinson *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2012). Daher scheint eine zentralnervöse Expression von MIP-1 α , wie auch Astro- und Mikrogliose ein gemeinsames Kennzeichen von LSDs mit neurologischer Symptomatik darzustellen.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen allerdings, dass im ZNS von ASA $-/-$ Mäusen nur milde neuroinflammatorische Prozesse detektierbar sind und reflektieren damit auch den generell milden Phänotyp von konventionellen ASA $-/-$ Mäusen.

6.1.2.2 Neuroinflammation im PLP-CST ASA $-/-$ Mausmodell

Bei den Analysen im PLP-CST ASA $-/-$ Mausmodell wurde eine deutlich verstärkte Expression von neuroinflammatorischen Bioindikatoren gegenüber ASA $-/-$ Tieren gefunden. Hier konnte eine generalisierte Aktivierung des astro- und mikroglialen Kompartimentes bereits ab einem Alter von 12 Monaten gezeigt werden (vgl. Abb. 7D & 8D). Bei 17 Monate alten Tieren waren Astro- und Mikrogliose gegenüber dem ASA $-/-$ Modell deutlich verstärkt (vgl. Abb. 7G & 8G). Zeitlich koinzident mit einer generalisierten Mikrogliose bei 10-12 Monate alten Mäusen, wie auch bei 24 Monate alten ASA $-/-$ Tieren, wurde im Gehirn von PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen ein Konzentrationsanstieg von MIP-1 α gemessen (vgl. Abb. 9A). Auch hier konnten keine erhöhten Konzentrationen der anderen untersuchten Zytokine nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde zudem im Gehirn von PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen diesen Alters eine geringere Konzentration des Chemokins RANTES gegenüber WT-Tieren gemessen. Dieser Befund könnte damit erklärt werden, dass RANTES und MIP-1 α in ihrer biologischen Funktion zueinander redundant sind und daher die

beiden Chemokine in der frühen Phase der ZNS-Pathogenese miteinander kompetieren. Somit könnte der Konzentrationsanstieg von MIP-1 α im ZNS der PLP-CST ASA $-/-$ Tiere zu einer vorübergehend verringerten Expression des Chemokins RANTES führen. Genauere Untersuchungen zu diesem Befund konnten allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Da MIP-1 α im PLP-CST ASA $-/-$ sowie dem ASA $-/-$ Mausmodell als das erste Chemokin identifiziert wurde das einen Konzentrationsanstieg zeigte, deutet dieser Befund darauf hin, dass die Expression von MIP-1 α den Beginn der neuroinflammatorischen Kaskade während der ZNS-Pathogenese in MLD-Mäusen darstellt. Auch in Mausmodellen für den Subtypen der GM2-Gangliosidose SD sowie MPS IIIB konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte zentralnervöse Expression von MIP-1 α früh in der Pathogenese beginnt und im pathogenetischen Verlauf zunimmt (Tsuji *et al.*, 2005; Ausseil *et al.*, 2008). Für die Mausmodelle der LSDs MPS I, MPS IIIA, Morbus Gaucher und GM1-Gangliosidose können vergleichbare Ergebnisse zu den in dieser Arbeit erhobenen Befunden nicht ausgeschlossen werden, da weder Wilkinson *et al.* (2012), Vitner *et al.* (2012) noch Sano *et al.* (2005) eine Expression des Chemokins im präklinischen Stadium der ZNS-Pathogenese untersuchten. Eine Ausnahme hierzu stellen die Untersuchungen von Snook *et al.* (2014) zur Zytokin-Expression im ZNS von *twitcher* Mäusen dar. Nach Snook und Kollegen können erhöhte Konzentrationen von MIP-1 α erst im terminalen Stadium der ZNS-Pathogenese von GLD-Mäusen nachgewiesen werden.

Da für neuroinflammatorische Prozesse bei anderen LSDs, wie beispielsweise der neuropathischen Variante von Morbus Gaucher (Vitner *et al.*, 2012) und GLD (Wu *et al.*, 2001; Snook *et al.*, 2014) bereits gezeigt werden konnte, dass der Konzentrationsanstieg von diversen Zytokinen mit dem Grad der Aktivierung von mikro- und astroglialen Zellen korreliert, wurde in weiteren Analysen das Zytokinprofil im Gehirn von 20 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen untersucht (vgl. Abb. 9B). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde zudem das Zytokinprofil im Gehirn von 17 Monate alten Tieren analysiert (vgl. Abb. 18A). Bei diesen Analysen reflektieren 17 Monate alte Mäuse also das klinische Stadium beim Einsetzen der Demyelinisierung und 20 Monate alte Tiere die terminale Phase der ZNS-Pathogenese. Bei diesen Untersuchungen wurden transient erhöhte Konzentrationen diverser Interleukine, wie IL-1 β und IL-9, sowie des IFN- γ im Gehirn von 17 Monate alten PLP-CST ASA $-/-$

Mäusen detektiert, die sich allerdings bei 20 Monate alten Tieren wieder nahezu auf WT-Niveau normalisierten. Eine vorübergehend erhöhte Zytokin-Expression während der ZNS-Pathogenese wurde auch bei Untersuchungen im Gehirn von *twitcher* Mäusen nachgewiesen (Wu *et al.*, 2000). Wu und Kollegen konnten zeigen, dass im Gehirn von *twitcher* Mäusen eine erhöhte Zytokinkonzentration ab dem präklinischen Stadium nachweisbar sind, bis zur Demyelinisierung an Tag 20 (Taniike & Suzuki, 1994) progressiv zunehmen und in der terminalen Phase der ZNS-Pathogenese abnehmen. Wu *et al.* erklären ihre Ergebnisse damit, dass in diesem pathogenetischen Stadium eine Veränderung der Immunantwort stattfindet, können allerdings weder erklären wie dieser Wechsel eingeleitet wird, noch inwiefern sich dieser Wechsel vollzieht. Nach den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zum Zytokinprofil in der prä-, der klinischen und der terminalen Phase der Pathogenese kann also angenommen werden, dass vergleichbare Prozesse auch im ZNS von PLP-CST ASA *-/-* Mäusen stattfinden.

Möglicherweise basieren diese Ergebnisse allerdings aber auch auf Ungenauigkeiten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Multiplex-Methode. So fällt bei der Betrachtung der absoluten Messwerte auf (vgl. Tab. 13), dass die Werte für IL-1 α , IL-5, sowie Eotaxin nahe an der Detektionsgrenze liegen und somit keine definitive Aussage über eventuelle Veränderungen der genannten Zytokine getroffen werden kann. Weiterhin wurde bei den Untersuchungen zu den Zytokinprofilen festgestellt, dass die absoluten Messwerte zwischen den WT-Kontrollen der verschiedenen Altersstufen, ausgenommen der Zytokine mit chemotaktischer Aktivität (KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β & RANTES) teils erheblich schwankten. Möglicherweise ist dieser Befund auf Veränderungen der Zytokin-Expression im Gehirn während des Alterungsprozesses zurückzuführen, da auch Reddy (2011), mit der Messmethode, bei Untersuchungen zur Expression diverser Zytokine im Gehirn von *twitcher* Mäusen verschiedener Altersstufen teils erhebliche Schwankungen der Zytokinkonzentrationen in Gehirnen der WT-Kontrollen feststellte. Diese Annahme wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Neben einer erhöhten Expression von MIP-1 α und diversen Interleukinen wurden bei 17 Monaten alten Tieren noch erhöhte Konzentrationen der Chemokine MCP-1 und MIP-1 β nachgewiesen. Verglichen mit MIP-1 α werden diese Chemokine verzögert exprimiert, bleiben aber Gegensatz zu den Interleukinen, wie beispielsweise IL-9 und IL-17, auch im terminalen Stadium der ZNS-Pathogenese im Vergleich zu gleichalten

WT-Kontrollen erhöht. MCP-1 und MIP-1 β sind strukturell und funktionell redundant zu MIP-1 α und lassen demnach auf vergleichbare Funktionen in der neuroinflammatorischen Kaskade der MLD schließen (Deshmane *et al.*, 2009).

Mit den Ergebnissen zur erhöhten Konzentration von Chemokinen gleicht das für PLP-CST ASA *-/-* Tiere erhobene Zytokinprofil, in der klinischen und terminalen Phase der ZNS-Pathogenese, den Untersuchungen zur Expression von Zytokinen im Gehirn von Mausmodellen der LSDs Morbus Gaucher, GLD und MPS (Vitner *et al.*, 2012; Snook *et al.*, 2014; Wilkinson *et al.*, 2012). Im Mausmodell zur neuropathischen Variante von Morbus Gaucher wurden die Chemokine MCP-1, MIP-1 α und RANTES im Gehirn als am stärksten exprimiert gemessen (Vitner *et al.*, 2012). Im Gehirn von *twitcher* Mäusen zeigten nach Snook *et al.* (2014) und Reddy *et al.* (2011) die Chemokine MCP-1, MIP-1 α , KC und RANTES einen Konzentrationsanstieg. Die höchste Zytokin-Expression bei MPS I und MPS IIIA Mäusen zeigten die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α . Im Mausmodell zu MPS IIIB wurde neben MCP-1 und MIP-1 α noch KC als am höchsten exprimiert nachgewiesen (Wilkinson *et al.*, 2012). Demnach wurden in Gehirnen aller genannten Mausmodelle erhöhte Konzentrationen der beiden Chemokine MIP-1 α und MCP-1 gemessen. Basierend auf diesen Befunden kann demnach angenommen werden, dass beide Chemokine eine zentrale Rolle bei neuroinflammatorischen Prozessen im ZNS von LSD-Mausmodellen einnehmen.

Um das Ausmaß der Neuroinflammation im PLP-CST ASA *-/-* Mausmodell zu evaluieren bietet sich ein quantitativer und qualitativer Vergleich der untersuchten Zytokine mit dem ZNS-Zytokinprofil anderer LSD-Mausmodelle an. Hierzu ist es sinnvoll das Zytokinprofil von PLP-CST ASA *-/-* Mäusen mit dem von GLD-Mausmodellen zu vergleichen. Zum einen sind die Enzyme, welche bei einem Funktionsverlust MLD bzw. GLD verursachen im gleichen Stoffwechselweg involviert und zum anderen sind die klinischen Symptome der MLD und GLD, anders als bei LSDs mit neurodegenerativer Symptomatik, durch Demyelinisierung geprägt (von Figura *et al.*, 2001; Wenger *et al.*, 2001).

Besonders interessant ist hierbei der Vergleich mit institutsinternen Messungen zur GalC *knock-in* (GalC-Ki) Maus, einem neuen Mausmodell der GLD. Entgegen der *twitcher* Maus, bei der eine durch Mutationen hervorgerufene funktionelle Defizienz der murinen GalC vorliegt (Sakai *et al.*, 1996), exprimiert diese Maus eine mutierte,

funktionell eingeschränkte humane Variante der GalC zeigt aber einen mit *twitcher* Mäusen vergleichbaren Phänotyp (Matthes *et al.*, 2015). Das Zytokinprofil wurde von Matthes *et al.* für 40 und 42 Tage alte GalC-Ki Mäuse bestimmt. In der gleichen Messung und dem gleichen Protokoll zur Probenvorbereitung folgend, wurde für das 20 Monate alte PLP-CST ASA *-/-* Mäuse beschriebene Zytokinprofil untersucht (vgl. Abb. 9B). *Twitcher* und GalC-Ki Mäuse weisen beide eine mittlere Lebenserwartung von etwa 45 Tagen auf (Matthes *et al.* 2015, Suzuki, 1983). PLP-CST ASA *-/-* Mäuse besitzen im Mittel eine Lebenserwartung von etwa 20 Monaten. Beide Untersuchungen reflektieren aufgrund des Alters der analysierten Tiere demnach das zentralnervöse Zytokinprofil im terminalen Stadium der jeweiligen Pathogenese. Für den Vergleich der Zytokin-Expression im Gehirn beider Mausmodelle wurde jeweils der Konzentrationsanstieg im Vergleich zu altersgleichen WT-Tieren miteinander verglichen (Tab. 11).

Tab. 11. Vergleich der Zytokinexpression in Mausmodellen der MLD und GLD.

Zytokin-Expression (Vielfaches zu WT)		
Mausmodell		
Zytokin	PLP-CST ASA -/-	GalC-Ki (Matthes <i>et al.</i>)
IL-1 α	1,8*	2,2*
IL-1 β	1,2	1,3*
IL-2	1	1,7*
IL-6	2*	1,5*
IL-9	1,4	1,4*
IL-10	1,3	1,2*
IL-12 p40	1,5	1,9*
IL-12 p70	1,8	1,0
IL-13	1,8*	1,5*
IL-17	1,0	1,1
Eotaxin	1,2	1,5*
GM-CSF	1,0	1,3*
IFN- γ	1,1	1,2
KC	1,7*	11,2*
MCP-1	2,0*	6,4*
MIP-1 α	2,5*	47*
MIP-1 β	1,6*	2,4*
RANTES	1,7*	2,4*
TNF- α	1,1	1,1

* signifikant erhöht

Der Vergleich der Zytokinprofile beider Mausmodelle zeigt, dass die untersuchten Profile bei GalC-Ki und PLP-CST ASA -/- Mäusen für verschiedene Interleukine, Kolonie-stimulierende-Faktoren und des IFN- γ qualitativ und quantitativ vergleichbar sind. Enorme Diskrepanzen sind allerdings in dem Konzentrationsanstieg der Chemokine zu finden. Das Chemokin mit dem höchsten Anstieg im ZNS von 20 Monate alten PLP-CST ASA -/- Mäusen ist MIP-1 α (2,5-fach). Das Chemokin mit dem höchsten Konzentrationsanstieg im Gehirn der GalC-Ki Maus ist nach Matthes *et al.* ebenfalls MIP-1 α , allerdings mit einem gemessenen 47-fachen Anstieg. Aus dem Vergleich der Lebenserwartung der beiden Mausmodelle von 20 Monaten zu 45 Tagen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Konzentrationsanstieg von

Chemokinen mit der Schwere der Neuroinflammation und daher eventuell mit der zentralnervösen Pathogenese korreliert.

Da in beiden Mausmodellen ein vergleichbarer Konzentrationsanstieg der verschiedenen Interleukine, Kolonie-stimulierenden-Faktoren und des IFN- γ gemessen wurde, kann zudem angenommen werden, dass keine der genannten Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf die zentralnervöse Pathogenese ausüben.

Auffallend bei diesen Untersuchungen war, dass weder für GalC-Ki noch für PLP-CST ASA $-/-$ Mäuse erhöhte Konzentrationen des potentiell neurotoxischen, akuten Entzündungsmediators TNF- α gefunden wurden (Takeuchi *et al.*, 2006). Demnach kann vermutet werden, dass TNF- α keinen Einfluss auf die Pathogenese in MLD und GLD Mausmodellen ausübt. Damit unterscheiden sich allerdings sowohl das PLP-CST ASA $-/-$, als auch das GalC-Ki Modell von anderen LSD-Mausmodellen. Eine erhöhte zentralnervöse Expression von TNF- α wurde zuvor in den LSD-Mausmodellen zu SD, Morbus Gaucher und GM1-Gangliosidose beschrieben (Jeyakumar *et al.*, 2003; Farfel-Becker *et al.*, 2012; Sano *et al.*, 2005). Daher scheint sich die neuroinflammatorische Kaskade bei GLD und MLD von der in anderen LSDs zu unterscheiden. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen von Abo-Of *et al.* (2013) an SD-Mäusen und Pedchenko *et al.* (2000) an *twitcher* Mäusen. Im SD-Mausmodell führte eine genetische Deletion von TNF- α zu einem verlängertem Überleben und einer mildereren neurologischen Symptomatik der Mäuse (Abo-ouf *et al.*, 2013). Bei *twitcher* Mäusen hingegen konnten keine Effekte einer genetischen Deletion des TNF- α Rezeptors 1 auf die ZNS-Pathogenese festgestellt werden (Pedchenko *et al.*, 2000).

6.1.2.3 Infiltration von Immunzellen in das ZNS von PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen

Bei den Analysen zu der Expression von Zytokinen in Gehirnen von PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen wurden, wie auch in Mausmodellen anderer LSDs mit neurologischer Symptomatik, Chemokine als die am höchsten exprimierten Zytokine nachgewiesen. Chemokine sind Zytokine mit chemotaktischer Funktion (Moser & Loetscher, 2001). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden in der klinischen und terminalen Phase der ZNS-Pathogenese von PLP-CST ASA $-/-$ Tieren unter anderem erhöhte Konzentrationen der Chemokine MCP-1 und

MIP-1 α gefunden. Die beiden Chemokine wurden in der Literatur als Chemoattraktanten für Monozyten und T-Zellen beschrieben (Balashov *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1993; Deshmane *et al.*, 2009). Beide Chemokine können allerdings auch chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken (Boisvert *et al.*, 1998; Conti *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2005). Untersuchungen an Mausmodellen der LSDs GLD, SD und Morbus Farber zeigten, dass erhöhte Konzentrationen der Chemokine MIP-1 α und MCP-1 im ZNS in der Rekrutierung von peripheren Monozyten resultieren (Wu *et al.*, 2001; Wu & Proia, 2004; Alayoubi *et al.*, 2013).

Da keine einzigartigen Biomarker für mikrogliale Zellen bekannt sind, waren Untersuchungen zur Infiltration von Monozyten in das ZNS von PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Um eine Infiltration von Monozyten zu untersuchen, wären durchflusszytometrische Analysen notwendig. Dabei sollten Untersuchungen zur Koexpression der beiden Oberflächenproteine CD11b und CD45 vorgenommen werden. Beide Proteine sind Oberflächenmarker für Zellen myeloiden Ursprungs. Dabei wird CD11b, wie auch F4/80, exklusiv von myeloiden Zellen (Arnaout *et al.*, 1983) und CD45 praktisch von allen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert (Thomas, 1989). Somit werden über eine Färbung beider Marker mikroglialen Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen detektiert. Eine Unterscheidung zwischen infiltrierten Monozyten und mikroglialen Zellen ergibt sich hierbei durch die Expressionsintensität des Oberflächenproteins CD45, welches im geringen Maße von mikroglialen Zellen, aber verstärkt von Monozyten exprimiert wird (Sedgwick & Schwender, 1991).

Bei *twitcher* Mäusen kann eine Monozyten-Infiltration in das ZNS etwa 10 Tage nach dem Einsetzen von demyelinisierenden Prozessen nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2000). Dieser Befund ist den Autoren zufolge darauf zurückzuführen, dass die phagozytotische Aktivität der Mikroglia ab einem bestimmten Grad der Demyelinisierung nicht ausreicht, um den entstehenden Zelldebris zu beseitigen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt also nach Wu *et al.* der Influx von Monozyten in das ZNS. Dort reifen die infiltrierten Monozyten zu Phagozyten und tragen über Phagozytose zu der Beseitigung von Zelltrümmern bei.

Bei den Analysen zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten konnte nachgewiesen werden, dass keine neutrophilen Granulozyten in das ZNS von PLP-CST ASA $-/-$ Tieren infiltrieren. Interessanterweise konnten auch im Gehirn von

twitcher Mäusen, trotz massiv erhöhter Chemokinkonzentrationen, keine neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Reddy *et al.*, 2011; Snook *et al.*, 2014). Demnach haben neutrophile Granulozyten keinerlei Einfluss auf die ZNS-Pathogenese in Mausmodellen der GLD und MLD.

Die Präsenz von CD3 ϵ -positiven T-Zellen konnte allerdings anhand von Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden (vgl. Abb. 10D). Dabei scheinen die infiltrierenden Zellen im perivaskulären Raum zu verbleiben und nicht in das ZNS-Parenchym einzudringen. Vergleichbare Analysen zeigten, dass auch im ZNS von *twitcher* Mäusen T-Zellen nachweisbar sind (Wu *et al.*, 2000). Um welche T-Zellpopulationen es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit detektierten Zellen handelt und welche Funktion sie ausüben, bleibt aber noch zu evaluieren.

6.1.3 Einfluss der Neuroinflammation auf die Pathogenese in Mausmodellen lysosomaler Speichererkrankungen

Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, inwiefern neuroinflammatorische Prozesse zu den pathologischen Veränderungen im ZNS von LSD-Mausmodellen beitragen. Dabei konnte allerdings in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass neuroinflammatorische Biomarker noch vor dem Eintreten von Neurodegeneration bzw. Demyelinisierungen messbar sind (Wada *et al.*, 2000; Snook *et al.*, 2014; Tsujii *et al.*, 2005; Ausseil *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Astro- und Mikrogliose sowie eine erhöhte Konzentration des Chemokins MIP-1 α im ZNS des konventionellen ASA $-/-$ Tiermodells erst nach einem 1,7 fach erhöhten Sulfatid-Spiegel und in PLP-CST ASA $-/-$ Mäusen noch vor dem Eintreten der Demyelinisierung messbar sind (vgl. Abb. 23).

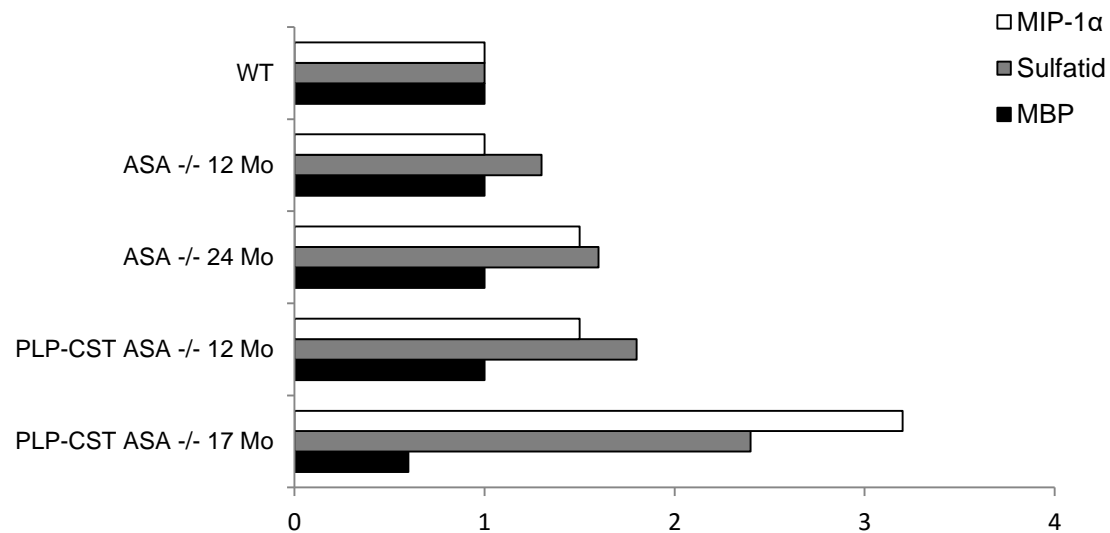


Abb. 23. Grafische Darstellung des Bezugs zwischen Sulfatid-Akkumulation, Neuroinflammation und Demyelinisierung in Mausmodellen der MLD. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen zur Sulfatid-Akkumulation, der zentralnervösen Expression des Chemokins MIP-1 α sowie der Demyelinisierung in verschiedenen Altersstufen von Mausmodellen der MLD, jeweils normiert auf die Messdaten von WT-Tieren.

Aus der Chronologie der pathogenetischen Ereignisse im ZNS von LSD-Mausmodellen lassen sich zunächst zwei gegenteilige Hypothesen aufstellen: (1) neuroinflammatorische Prozesse sind eine Begleiterscheinung der Akkumulation von Speichermaterial und üben möglicherweise eine protektive Funktion auf das Überleben bzw. die Funktion von zentralnervösem Gewebe aus oder aber (2) die beschriebene Neuroinflammation resultiert in zellulären Schäden und trägt durch zytotoxische Effekte zur ZNS-Pathogenese bei.

Bisher wurden in verschiedenen Untersuchungen genetische Ansätze verfolgt, um eine mögliche Beteiligung der aktivierten Mikroglia an der jeweiligen neurologischen Symptomatik in LSD-Mausmodellen zu untersuchen. Dabei gelangten verschiedene Studien allerdings zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen.

Kondo und Kollegen (2011) untersuchten beispielsweise die Rolle der Mikroglia im ZNS von *twitcher* Mäusen. Hierzu kreuzten die Autoren der Studie *twitcher* Mäuse mit einer für den Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor defizienten Mauslinie. Die so erzeugte Makrophagen- und Mikroglia-defiziente GLD-Maus zeigte eine verkürzte Lebensspanne sowie eine stärker ausgeprägte Demyelinisierung gegenüber konventionellen *twitcher* Mäusen. Den Autoren zufolge inhibiert der durch den progressiven Verlust von Oligodendrozyten und das Fehlen der phagozytotischen

Aktivität der Mikroglia vermehrt entstehende Myelindebris eine Remyelinisierung. Diese These von Kondo *et al.* bestätigt damit Befunde von Neumann *et al.* (2009) zu remyelinisierenden Prozessen, die nach Neumann *et al.* ohne die phagozytotische Aktivität der Mikroglia nahezu vollständig inhibiert werden. Dagegen stehen die Untersuchungen von Matsushima *et al.* (1994). Matsushima und Kollegen untersuchten die ZNS-Pathogenese in Ia (muriner Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II) defizienten *twitcher* Mäusen und gelangten zu dem Ergebnis, dass die Demyelinisierung im ZNS der Mäuse milder ausgeprägt war und die Tiere eine abgeschwächte neurologische Verhaltenssymptomatik zeigten. Dabei konnten Matsushima und Kollegen nachweisen, dass Phagozyten im ZNS der Mäuse noch detektierbar, aber in ihrer Zahl im Vergleich zu konventionellen *twitcher* Mäuse reduziert waren. Matsushima *et al.* schließen daraus, dass durch die Ia-Deletion sowohl die Aktivierung als auch die Proliferation der Mikroglia inhibiert wird.

Der scheinbare Widerspruch zwischen den Ergebnissen von Kondo *et al.* sowie Matsushima *et al.* lässt sich damit erklären, dass in dem Ansatz von Matsushima und Kollegen noch mikrogliale Zellen verbleiben, die eine phagozytotische Aktivität ausüben können. Die von Matsushima und Kollegen gefundenen Effekte der Ia-Deletion auf die Demyelinisierung und die neurologische Symptomatik, lassen sich mit einer durch die Reduktion der Phagozytenpopulation im ZNS einhergehende abgeschwächte Neuroinflammation erklären.

Für diese These sprechen beispielsweise Untersuchungen zur Funktion von Zytokinen im ZNS bei neuroinflammatorischen Prozessen. Wu und Proia (2004) erzeugten MIP-1 α defiziente SD-Mäuse und zeigten, dass die genetische Deletion des Chemokins in einer verlängerten Lebenserwartung (30%) und einer milderer neurologischen Symptomatik resultierte. Auch in einem Kuprizon-induziertem Mausmodell zur Demyelinisierung führte nach McMahon *et al.* (2001) das Fehlen von MIP-1 α zu einer Verzögerung der durch das Toxin induzierten Demyelinisierung um 36%. Eine weitere Beteiligung von Zytokinen an der ZNS-Pathogenese in SD-Mäusen wurde von Kyrkanides *et al.* (2008) nachgewiesen. Hier zeigten Kyrkanides und Kollegen, dass auch die Deletion des für den MCP-1-Rezeptor kodierenden Gens zu einer Verlangsamung der Pathogenese in SD-Mausmodellen führte.

Also die Mikroglia, abhängig von dem Stadium der ZNS-Pathogenese, durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen entweder zur Neurodegeneration bzw.

Demyelinisierung beizutragen, oder aber über die phagozytotische Aktivität eine protektive Funktion auf das ZNS-Gewebe auszuüben.

Zur Funktion der Astrogliose bei neuroinflammatorischen Prozessen im ZNS von LSD-Mausmodellen wurden bislang erst wenige Studien durchgeführt. Bei Analysen im *twitcher* Mausmodell wurde gezeigt, dass die Aktivierung der mikroglialen Zellpopulationen einer Astrogliose vorausgeht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass mikrogliale Zellen im Gehirn von *twitcher* Mäusen die Astroglia über eine Sekretion von Prostaglandinen aktiviert Mohri *et al.* (2006). Eine genetische Deletion des Prostaglandin D₂ führte nach Mohri *et al.* durch die Inhibition der Astrogliose zu einer milderer neurologischen Symptomatik sowie zu einer milderer Demyelinisierung. Auch Di Malta *et al.* (2012) zeigten an einem Mausmodell zur Multiplen-Sulfatase Defizienz (*multiple sulfatase deficiency*, MSD) eine Beteiligung der aktivierten Astroglia an der ZNS-Pathogenese. MSD wird durch den Verlust der Aktivität des Enzyms *sulfatase modifying factor-1* (SUMF-1) verursacht. Durch eine Astrozyten-spezifische Deletion von SUMF-1 konnten Malta *et al.* den kompletten Phänotyp der MSD induzieren und folgern daher, dass im MSD-Mausmodell nicht die mikrogliale Zellpopulation, sondern die aktivierte Astroglia eine zentrale Beteiligung an der ZNS-Pathogenese einnimmt.

Um den Einfluss der im ersten Teil dieser Arbeit charakterisierten Neuroinflammation auf die ZNS-Pathogenese in MLD-Mausmodellen zu untersuchen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit kein genetischer, sondern ein pharmakologischer Ansatz verfolgt.

6.2 Anti-inflammatorische Therapie mit PLP-CST ASA -/- Mäusen

6.2.1 Simvastatin

Um eine mögliche Korrelation zwischen Neuroinflammation und Demyelinisierung im Gehirn von MLD-Mäusen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit PLP-CST ASA -/- Mäuse im präklinischen und im klinischen Stadium der ZNS-Erkrankung mit einer anti-inflammatorischen Therapie behandelt. Als Antiphlogistikum wurde Simvastatin verwendet. Zur pharmakologischen Gruppe der Statine zählend, ist Simvastatin ein HMG-CoA Reduktase Inhibitor und wird in der Klinik als Cholesterinsenker eingesetzt. Vermutlich aufgrund der höheren Hydrophobizität gegenüber anderen Statinen, wie Lovastatin oder Pravastatin, ist Simvastatin nach oraler Aufnahme dazu in der Lage, die BHS zu passieren (Thelen *et al.*, 2006; Tsuji *et al.*, 1993).

Generell wurden für Statine und Simvastatin im Speziellen, auch antiphlogistische Effekte nachgewiesen (Aktas *et al.*, 2003; Youssefet *et al.*, 2002; Stanislaus *et al.*, 2002). Dabei sind die anti-inflammatorischen Wirkmechanismen von Statinen nicht eindeutig geklärt. Es wird allerdings vermutet, dass Statine die Phosphorylierung von Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) inhibieren (Greenwood *et al.*, 2006).

MAPKs sind unter anderem an der durch Zytokin-Rezeptor-Interaktion ausgelösten Signaltransduktionskaskade beteiligt (Page *et al.*, 2010). Daher könnte durch eine Simvastatinbehandlung die Signalweiterleitung von Zytokinen inhibiert werden, wodurch ein antiphlogistischer Effekt erzielt wird.

Vor allem aus der Eigenschaft die BHS passieren zu können ergab sich die These, dass Simvastatin ein geeignetes Antiphlogistikum für die Untersuchungen auf die Beteiligung der Neuroinflammation an der zentralnervösen Pathogenese im PLP-CST ASA -/- Mausmodell darstellt.

6.2.2 Simvastatinbehandlung mit PLP-CST ASA -/- Tieren im präklinischen Stadium der Metachromatischen Leukodystrophie

Bei den Untersuchungen zum Effekt der Simvastatinbehandlung mit Tieren im präklinischen Stadium der ZNS-Pathogenese wurden reduzierte Konzentrationen von MIP-1 α in Gehirnen der behandelten Tiere festgestellt (vgl. Abb. 17). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung zu einer Reduktion der Mikrogliose im Gehirn führte (vgl. Abb. 16). Stijn Stroobants konnte zudem therapeutische Effekte auf das Verhalten der behandelten Tiere nachweisen. Er zeigte, dass die Behandlung zu einer Normalisierung des Koeffizienten der Ungleichheit des Schrittmusters sowie einer Verbesserung der Ausdauer in Schwimmtests führte. Interessanterweise wurden in einer von Stroobants *et al.* (2011) durchgeführten Studie zum Verhalten von mit ERT behandelten PLP-CST ASA -/- Mäusen vergleichbare Verhaltensparameter im Schrittmuster als verbessert gefunden. Stroobants und Kollegen fanden Verbesserungen des Koeffizienten der Ungleichheit des Schrittmusters nach kontinuierlicher Injektion von rekombinanter ASA direkt in die Cerebrospinalflüssigkeit von behandelten PLP-CST ASA -/- Mäusen. Der Koeffizient der Ungleichheit des Schrittmusters normalisierte sich in dieser Studie, wie auch der für die Simvastatinbehandlung bestimmte therapeutische Effekt nahezu auf ein WT-Schrittmuster. Nach Stroobants *et al.* ist dieser Effekt auf eine Reduktion der Sulfatid-Akkumulation im ZNS der ERT-behandelten Mäuse zurückzuführen. Bei vergleichbaren Analysen, bei denen die ERT-Behandlung über eine Injektion von ASA in die Schwanzvene erfolgte und daher nur wenig rekombinantes Enzym die BHS passierte, wurden andere Verhaltensparameter, wie etwa eine erhöhte Geschwindigkeit in Schwimmtests, als verbessert gefunden (Matzner *et al.*, 2009). Da im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluss der Simvastatinbehandlung auf den Sulfatid-Gehalt im Gehirn der behandelten Mäuse festgestellt werden konnte (vgl. Abb. 15), ist der von Stijn Stroobants gefundene therapeutische Effekt demnach vermutlich auf die Reduktion der Expression von neuroinflammatorischen Biomarkern zurückzuführen. Dabei kann allerdings nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass die von Stijn Stroobants bestimmten Verhaltensverbesserungen auf anderen Wirkmechanismen der Simvastatinbehandlung, wie etwa eine Senkung des Cholesterinspiegels, zurückzuführen ist.

Da sich die behandelten Tiere im präklinischen Stadium der ZNS-Pathogenese befanden, kann zudem angenommen werden, dass die messbare frühe neurologische Symptomatik im PLP-CST ASA ^{-/-} Mausmodell auf pathologische Veränderungen abseits einer Demyelinisierung zurückzuführen ist. Nach den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten kann angenommen werden, dass messbare neuroinflammatorische Prozesse, wie die erhöhte zentralnervöse Konzentration von MIP-1 α , an dieser frühen neurologischen Symptomatik beteiligt sind.

6.2.3 Simvastatinbehandlung mit PLP-CST ASA ^{-/-} Tieren im klinischen Stadium der Metachromatischen Leukodystrophie

Im Rahmen der Untersuchungen zum Effekt der Simvastatinbehandlung konnte bei Tieren im klinischen Stadium der ZNS-Pathogenese in zwei unabhängigen Therapieansätzen eine bemerkenswerte Reduktion der Zytokinkonzentration im Gehirn und Rückenmark festgestellt werden. Im Gehirn der behandelten Tiere wurden verminderte Konzentrationen der Interleukine IL-6, IL-10 und IL-12 p40 sowie des Kolonie-stimulierenden-Faktors GM-CSF und IFN- γ gemessen (vgl. Abb. 18B). Bemerkenswerterweise wurden zudem reduzierte Konzentrationen des TNF- α gemessen, obwohl der Entzündungsmediator bei mock-behandelten Tieren gegenüber WT-Tieren diesen Alters als nicht erhöht gemessen wurde. Möglicherweise ist dieser Befund auf eine generelle Reduktion der Expression von Zytokinen im ZNS der behandelten Tiere zurückzuführen. Genauere Untersuchungen hierzu wurden allerdings nicht durchgeführt. Interessanterweise konnte zudem bei diesen Analysen, im Gegensatz zu dem therapeutischen Ansatz mit Tieren im präklinischen Stadium, keine verminderten Konzentrationen von MIP-1 α gemessen werden. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die neuroinflammatorische Kaskade im ZNS der PLP-CST ASA ^{-/-} Tiere ab einem gewissen Stadium, wie beispielsweise dem Einsetzen der Demyelinisierung, irreversibel ist.

In Homogenaten des Rückenmarks konnte nach der Behandlung eine Abnahme der Interleukine IL-1 β und IL-12 p40 sowie der Chemokine MCP-1 und MIP-1 β festgestellt werden (Abb. 21A). Auffälligerweise wurde bei diesen Analysen eine verringerte Konzentration des Chemokins MIP-1 α bei mock- und Simvastatin-behandelten Tieren gegenüber WT-Tieren gemessen. Damit steht dieses Ergebnis

im Gegensatz zu den Untersuchungen zur Zytokinkonzentration im Gehirn. Dieser Befund lässt sich eventuell durch eine unterschiedliche Zusammensetzung des inflammatorischen Milieus in verschiedenen Regionen des ZNS erklären. Auch Reddy (2011) gelangte bei Untersuchungen zur Zytokin-Expression im Vergleich zwischen Gehirn und Rückenmark von *twitcher* Mäusen zu widersprüchlichen Ergebnissen. So fand Reddy beispielsweise eine Erhöhung des Interleukins IL-6 im Rückenmark von *twitcher* Mäusen, nicht aber im Gehirn.

Im weiteren Analysen wurde gezeigt, dass die Behandlung zwar keinen Effekt auf die progressive Demyelinisierung im Gehirn der Tiere hatte, wohl aber in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Therapieansätzen bei 17 und 18 Monate alten Tieren zu einer mildereren Demyelinisierung im Rückenmark führte. Hier wurde im Rückenmark der behandelten Tiere jeweils 37% bzw. 58% mehr MBP gegenüber mock-behandelten Tieren gemessen (vgl. Abb. 20B & 22B). Da im Rückenmark der behandelten Tiere, im Gegensatz zu den Untersuchungen im Gehirn, auch reduzierte Konzentrationen des Chemokins MCP-1 gemessen wurden (vgl. Abb. 18B & 20B), unterstreicht dieser Befund die in 6.2.2 formulierte These, dass vor allem Chemokine an der ZNS-Pathogenese im MLD-Mausmodell beteiligt sind. Weiterhin kann aus den Untersuchungen zur Zytokinkonzentration sowie des MBP-Gehaltes im Gehirn und Rückenmark der behandelten Tiere die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Simvastatin effizienter ins Rückenmark gelangte, als in das Gehirn. Eine längere Therapie mit Simvastatin könnte demnach auch zu einer mildereren Demyelinisierung im Gehirn führen. Diese Hypothese bleibt allerdings experimentell zu überprüfen.

Vergleichbare Effekte einer Therapie mit nicht-steroidalen Antiphlogistika wurden zuvor bereits für Mausmodelle der Sphingolipidosen SD und GLD beschrieben (Jeyakumar *et al.*, 2004; Kagitani-Shimono *et al.*, 2005). Jeyakumar und Kollegen behandelten SD-Mäuse jeweils mit den nicht-steroidalen Antiphlogistika Ibuprofen, Aspirin und Indomethacin. Bei der Evaluation des Therapieerfolgs wurde gefunden, dass alle eingesetzten Arzneistoffe zu einem signifikant längerem Überleben der behandelten Mäuse führten (~12-15%). Am *twitcher* Mausmodell konnten Kagitani-Shimono und Kollegen zeigen, dass im ZNS von mit Ibudilast behandelten *twitcher* Mäusen die Therapie zu einer Reduktion der Expression von Zytokin-Rezeptoren führte. Gleichzeitig wiesen die Autoren über histologische Analysen nach, dass weniger apoptotische Oligodendrozyten im ZNS der behandelten Mäuse detektierbar

waren und, wie hier für PLP-CST ASA -/- Mäuse beschrieben, die Demyelinisierung milder ausgeprägt war.

Die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen damit, dass neuroinflammatorische Prozesse an der Demyelinisierung im ZNS der Tiere zumindest beteiligt sind. Weiterhin deuten die in dieser Arbeit angefertigten Untersuchungen darauf hin, dass anti-inflammatorische Therapien neue Möglichkeiten zur Behandlung der MLD eröffnen.

6.3 Spekulativer Pathomechanismus

Alle im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass die beschriebene Neuroinflammation an der Demyelinisierung sowie der neurologischen Symptomatik im PLP-CST ASA -/- Mausmodell zumindest beteiligt ist. Weiterhin deuten die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen darauf hin, dass neuroinflammatorische Prozesse in dem verstärkten MLD-Mausmodell weder im prä- noch im klinischen Stadium der ZNS-Pathogenese eine protektive Funktion einnehmen.

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, welche Mechanismen letztendlich zur Aktivierung der mikroglialen Zellpopulationen führen und damit die Neuroinflammation einleiten.

Für GLD wird basierend auf *in vitro* und *in vivo* Studien vermutet, dass die progressive Akkumulation des Lysosphingolipids Psychosin zum Zelltod von Oligodendrozyten führt (Cho *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1976). Der progressive Verlust von Oligodendrozyten durch die Akkumulation von Psychosin stellt die primäre Ursache für demyelinisierende Prozesse im ZNS von *twitcher* Mäusen dar. Ein Verlust von myelinisierenden Zellen könnte nach Wu *et al.* (2001) sowie Snook *et al.* (2014) über die Phagozytose von Zellresten durch die Mikroglia zur Mikro- und in Folge zu einer Astrogliose führen, welche ihrerseits sekundär an der Demyelinisierung beteiligt sind.

Von Blomqvist *et al.* (2011) wurde nachgewiesen, dass neben Sulfatid auch Lysosphingolipide in Form von Lysosulfatid im Gehirn von ASA -/- Mäusen progressiv akkumulieren. Da sich PLP-CST ASA -/- Tiere genetisch, abgesehen von der transgenen Expression der CST in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, nicht von konventionellen ASA -/- Mäusen unterscheiden, kann angenommen werden, dass eine sekundäre Akkumulation von Lysosulfatid auch im ZNS von PLP-CST ASA -/- Mäusen stattfindet. Somit stellt sich die Frage, ob auch in Mausmodellen der MLD eine sekundäre Akkumulation von Lysosphingolipiden zu einem Verlust von Oligodendrozyten führt.

Ein progressiver Verlust von Oligodendrozyten könnte also primär zu dem Verlust von Myelinscheiden und sekundär zu der Phagozytose von Zellresten, inklusive Sulfatid-Granula durch die Mikroglia führen. Da die Mikroglia aufgrund der funktionellen ASA-Defizienz das phagozytierte Sulfatid und Lysosulfatid nicht degradieren kann, wäre die Folge der Phagozytose eine progressive intralysosomale Akkumulation von Sulfatid bzw. Lysosulfatid. Diese progressive Akkumulation könnte schließlich zu einer dauerhaften Aktivierung der Mikroglia führen. Da die Phagozytose von Sulfatid potentiell zu der Aktivierung der Mikroglia führen kann, wurde zuvor in *in vitro* Studien von Jeon *et al.* (2008) gezeigt.

Denkbar wäre ein Modell der Beteiligung der Neuroinflammation an der zentralnervösen Demyelinisierung im ZNS von demyelinisierenden MLD-Mäusen, dass sich an dem von Jeyakumar *et al.* (2003) für die ZNS-Pathogenese der GM2-Gangliosidosen anlehnt:

- 1) Die mit der Akkumulation von Sulfatid einhergehende Akkumulation von Lysosulfatid führt zu einem progressiven Verlust von Oligodendrozyten;
- 2) die Überreste der Oligodendrozyten und somit auch Sulfatid werden von Zellen des mikroglialen Kompartimentes phagozytiert;
- 3) die progressive Akkumulation von Sulfatid und Lysosulfatid in der Mikroglia resultiert in einer chronischen Aktivierung der mikroglialen Zellen;
- 4) die chronisch aktivierte Mikroglia produziert pro-inflammatorische Faktoren, welche in einer Aktivierung der astroglialen Zellpopulation resultiert;

- 5) auf die verstärkte Sekretion von Chemokinen durch die aktivierte Astro- und Mikroglia folgt die Chemotaxis von mikroglialen Zellen, Astrozyten und eventuell Monozyten zu den Arealen des ZNS mit der höchsten Sulfatid-Akkumulation;
- 6) hier folgt eine erweiterte Aktivierung der mikroglialen Zellen über die Stimulation durch Zytokine, was eine erhöhte Phagozytoserate zur Folge hat;
- 7) die Phagozytose von Myelindebris und die erhöhte Sekretion von Zytokinen verstärkt die auf den Verlust von Oligodendrozyten folgende Demyelinisierung;
- 8) da Myelin Sulfatid enthält, folgt auf die Phagozytose von Myelin eine erweiterte Aktivierung der Mikroglia;
- 9) hieraus resultiert ein sich selbstverstärkender Kreislauf.

Konventionelle ASA -/- Tiere durchlaufen nach diesem Modell lediglich die Stadien 1) bis 6). Im ZNS von PLP-CST ASA -/- Tieren könnten hingegen, vermutlich aufgrund der beschleunigten Sulfatid-Akkumulation und eines damit verbundenen erhöhten metabolischen Stresses, die Stadien 1) bis 9) durchlaufen werden.

Um dieses Modell zu verifizieren, wären allerdings weitere Untersuchungen nötig. Eines der Kernelemente wäre beispielsweise der Nachweis über den progressiven Verlust von Oligodendrozyten im ZNS von MLD-Mausmodellen. Nach dem hier postulierten Modell basiert dieser Verlust auf der Akkumulation von Lysosulfatid. Da nach Blomqvist *et al.* (2011) zentralnervös akkumulierendes Lysosulfatid bei ASA -/- Mäusen ab einem Alter von 10 Monaten detektierbar ist, sollte ein Verlust von Oligodendrozyten bereits bei Tieren diesen Alters nachweisbar sein.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1): 41–53.
- Abbas, A. & Lichtman, A. (2005). Cellular and molecular immunology. 5th Edition, Philadelphia, PA: Saunders.
- Abo-Ouf, H. & Hooper, A.W.M., White, E.J., van Rensburg, H.J.J., Trigatti, B.L., Igdoura, S.A. (2013). Deletion of tumor necrosis factor- α ameliorates neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Human molecular genetics*, 22(19): 3960–3975.
- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F.M.V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience*, 10(12): 1538–1543.
- Aktas, O., Waiczies, S., Smorodchenko, A., Dorr, J., Seeger, B., Prozorovski, T., Sallach, S., Endres, M., Brocke, S. & Zipp, F. (2003). Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *The Journal of experimental medicine*, 197(6): 725–33.
- Alayoubi, A.M., Wang, J.C., Au, B.C., Carpentier, S., Garcia, V., Dworski, S., El-Ghamrasni, S., Kirouac, K.N., Exertier, M.J., Xiong, Z.J., Privé, G.G., Simonaro, C.M., Casas, J., Fabrias, G., Schuchman, E.H., Turner, P.V., Hakem, R., Levade, T. & Medin, J.A. (2013). Systemic ceramide accumulation leads to severe and varied pathological consequences. *EMBO molecular medicine*, 5(6): 827–842.
- Alliot, F., Godin, I. & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain research. Developmental brain research*, 117(2): 145–152.
- Arnaut, M., Todd, R.F. 3rd, Dana, N., Melamed, J., Schlossman, S.F. & Colten, H.R. (1983). Inhibition of phagocytosis of complement C3-or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte. *Journal of clinical investigation*, 72(1): 171–179.
- Ausseil, J., Desmaris, N., Bigou, S., Attali, R., Corbineau, S., Vitry, S., Parent, M., Cheillan, D., Fuller, M., Maire, I., Vanier, M. & Heard, J. M. (2008). Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Public Library of Science (PLOS ONE)*, 3(5), e2296.
- Austyn, J.M. & Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European journal of immunology*, 11(10): 805–815.

- Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner H.L. & Hancock, W.W. (1999). CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12): 6873-6878.
- Ballabio, A. & Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(4): 684–696.
- Baudry, M., Yao, Y., Simmons, D., Liu, J., Bi, X. (2003). Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: Immunohistochemical observations of microglia and astroglia. *Experimental Neurology*, 184(2): 887–903.
- Bélanger, M., Allaman, I. & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism*, 14(6): 724–738.
- Benveniste, E.N. (1992). Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *The American journal of physiology*, 263 (1 PT 1): C1-C16.
- Berger, J., Löschl, B., Bernheimer, H., Lugowska, A., Tyłki-Szymanska, A., Gieselmann, V. & Molzer, B. (1997). Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *American journal of medical genetics*, 340(69): 335–340.
- Bjerre, M., Hansen, T. K., Flyvbjerg, A. & Tønnesen, E. (2009). Simultaneous detection of porcine cytokines by multiplex analysis: development of magnetic bioplex assay. *Veterinary immunology and immunopathology*, 130(1-2): 53–58.
- Blomqvist, M., Gieselmann, V. & Månsson, J.E. (2011). Accumulation of lysosulfatide in the brain of arylsulfatase A-deficient mice. *Lipids in health and disease*, 10: 28.
- Boisvert, W.A, Santiago, R., Curtiss, L.K. & Terkeltaub, R.A. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, 101(2): 353–363.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. & Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23(2): 297–308.
- Callahan, J.W., Bagshaw, R.D. & Mahuran, D.J. (2009). The integral membrane of lysosomes: its proteins and their roles in disease. *Journal of proteomics*, 72(1): 23–33.

- Carr, M., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S. & Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9): 3652–3656.
- Cartier, L., Hartley, O., Dubois-Dauphin, M. & Krause, K.H. (2005). Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain research. Brain research reviews*, 48(1): 16–42.
- Chataway, J., Schuerer, N., Alsanousi, A., Chan, D., MacManus, D., Hunter, K., Anderson, V., Bangham, C.R., Clegg, S., Nielsen, C., Fox, N.C., Wilkie, D., Calder, V.L., Greenwood, J., Frost, C. & Nicholas, R. (2014). Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, 383(9936): 2213–2221.
- Cho, K., Kim, M. & Kim., S. (1997). Tissue culture model of Krabbe's disease: psychosine cytotoxicity in rat oligodendrocyte culture. *Developmental neuroscience*, 19(4): 321–327.
- Claycomb, K.I., Johnson, K.M., Winokur, P.N., Sacino, A.V, Crocker, S.J. (2013). Astrocyte regulation of CNS inflammation and remyelination. *Brain sciences*, 3(3): 1109–1127.
- Colrrelae, J. & Villa, A. (2004). The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *Journal of neurology*, 251(11): 1304-1316.
- Conti, P., Feliciani, C., Barbacane, R.C., Frydas, S., Placido, F.C., Cataldo, I. & Reale, M. (1999). Monocyte chemotactic protein-1 gene expression and translation in formed granulomatous calcified tissue in vivo. *Calcified tissue international*, 64(1): 57–62.
- D'Hooge, R., Van Dam, D., Franck, F., Gieselmann, V. & De Deyn, P.P. (2001). Hyperactivity, neuromotor defects, and impaired learning and memory in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Brain research*, 907(1-2): 35–43.
- Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S. & Albina, J.E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of leukocyte biology*, 83(1): 64–70.
- de Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies: Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal*, 64:604-617.
- del Rio-Hortega, P. (1932). Microglia. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, 2: 482-534.

- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6): 313–26.
- Desjardins, M., Huber, L., Parton R.G. & Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of cell biology*, 124(5): 677–688.
- Dheen, S.T., Kaur, C. & Ling, E.A. (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current medical chemistry*, 14(11): 1189-1197.
- Di Malta, C., Fryer, J. D., Settembre, C. & Ballabio, A. (2012). Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35): E2334–E2342.
- Edgar, J.M., McCulloch, M.C., Montague, P., Brown, A.M., Thilemann, S., Pratola, L., Gruenenfelder, F., Griffiths, S. & Nave, K.A. (2010). Demyelination and axonal preservation in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *EMBO molecular medicine*, 2(2): 42–50.
- Eng, L., Vanderhaeghen, J., Bignami, A. & Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain research*, 28: 351–354.
- Farfel-Becker, T., Vitner, E.B., Pressey, S.N.R., Eilam, R., Cooper, J.D. & Futerman, A. H. (2011). Spatial and temporal correlation between neuron loss and neuroinflammation in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease. *Human molecular genetics*, 20(7): 1375–1386.
- Farooqui, A. a., Horrocks, L.A. & Farooqui, T. (2007). Modulation of inflammation in brain: A matter of fat. *Journal of neurochemistry*, 101(3): 577–599.
- Fratantoni, J., Hall, C. & Neufeld, E. (1968). The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 60(4): 699–706.
- Fuller, A.D. & van Eldik, L.J. (2008). MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 3(4): 246-256.
- Futerman, A. H. & van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(7): 554–65.
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W. & Hong, J. S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences*, 24(8): 395–401.
- German, D., Liang, C.L., Song, T., Yazdani, U., Xie, C. & Dietschy, J. (2002). Neurodegeneration in the Niemann–Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience*, 109(3): 437–450.
- Gieselmann, V. (2008). Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatrica Supplement*, 97(457): 15-21.

- Golde, T.E. & Miller, V.M. (2009). Proteinopathy-induced neuronal senescence: a hypothesis for brain failure in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Alzheimer's research & therapy*, 1(2): 5.
- Greenwood, J., Steinman, L. & Zamvil, S.S. (2006). Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nature reviews. Immunology*, 6(5): 358–370.
- Hanisch, U.K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40(2): 140–55.
- Hanisch, U.K. & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, 10(11): 1387–1394.
- Hers, H.G. (1963). alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *The Biochemical journal*, 86: 11-16.
- Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lüllmann-Rauch, R., Goebel, H. H., Evers, M., von Figura, K., D'Hooge, R., Nagels, G., de Deyn, P., Peters, C. & Gieselmann, V. (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25): 14821–14826.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y. & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57(1): 1–9.
- Jeon, S.B., Yoon, H.J., Park, S. H., Kim, I.H. & Park, E.J. (2008). Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells. *Journal of immunology*, 181(11): 8077–8087.
- Jeyakumar, M., Smith, D.A., Williams, I. M., Borja, M.C., Neville, D. C.A, Butters, T. D., Dwek, R. & Platt, F.M. (2004). NSAIDs increase survival in the Sandhoff disease mouse: Synergy with N-butyldeoxynojirimycin. *Annals of Neurology*, 56(5): 642–649.
- Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D. a., Van der Spoel, A., d'Azzo, A., Perry, V., Butters, T., Dwek, R. & Platt, F. M. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain: a journal of neurology*, 126(4): 974–987.
- Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Roux, F. & Garin, J. (2002). Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics*, 2(8): 1026–1040.
- Jungalwala, F.B., Koul, O., Stoolmiller, A. & Sapirstein, V.S. (1985). Regulation of Cerebroside and Sulfatide Metabolism in Glia Cells. *Journal of neurochemistry*, 45(1): 191–198.

- Kagitani-Shimono, K., Mohri, I., Fujitani, Y., Suzuki, K., Ozono, K., Urade, Y. & Taniike, M. (2005). Anti-inflammatory therapy by ibudilast, a phosphodiesterase inhibitor, in demyelination of twitcher, a genetic demyelination model. *Journal of neuroinflammation*, 2(1): 10.
- Kobayashi, T., Yamanaka, T. & Jacobs, J. (1980). The Twitcher mouse: an enzymatically authentic model of human globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). *Brain research*, 202(2): 479–483.
- Kondo, Y., Adams, J.M., Vanier, M.T. & Duncan, I.D. (2011). Macrophages counteract demyelination in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *The Journal of Neuroscience*, 31(10): 3610–3624.
- Kyrkanides, S., Miller, A.W., Miller, J.N. H., Tallents, R.H., Brouxhon, S. M., Olschowka, M. E., O'DAnion, M. & Olschowka, J.A. (2008). Peripheral blood mononuclear cell infiltration and neuroinflammation in the HexB^{-/-} mouse model of neurodegeneration. *Journal of neuroimmunology*, 203(1): 50–57.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology*, 4(3): 181–189.
- Lendreth, G.E. & Reed-Geaghan, E.G. (2009). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Current topics in microbiology and immunology*, 336: 137-153.
- Liu, Y.Q., You, S., Tashiro, S., Onodera, S. & Ikejima, T. (2006). Roles of Ras and extracellular signal-regulated kinase dependent IkappaBalpha degradation in oridonin-enhanced phagocytosis of apoptotic cells by human macrophage-like U937 cells. *International immunopharmacology*, 6(2): 260-268.
- Lopez, M. E., Klein, A. D., Hong, J., Dimbil, U. J. & Scott, M. P. (2012). Neuronal and epithelial cell rescue resolves chronic systemic inflammation in the lipid storage disorder Niemann-Pick C. *Human molecular genetics*, 21(13): 2946–2960.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1): 265–275.
- Lucin, K.M. & Wyss-Coray, T. (2009). Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little?. *Neuron*, 64(1): 110–22.
- Mahad, D.H., Trapp, B.D. & Lassmann, H. (2015). Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology*, 14(2): 183-193.
- Matsushima, G. K., Taniike, M., Glimcher, L. H., Grusby, M. J., Frelinger, J. a., Suzuki, K. & Ting, J. P. Y. (1994). Absence of MHC class II molecules reduces CNS demyelination, microglial/macrophage infiltration, and twitching in murine globoid cell leukodystrophy. *Cell*, 78(4): 645–656.

- Matthes, F., Stroobants, S., Gerlach, D., Wohlenberg, C., Wessig, C., Fogh, J., Gieselmann V., Eckhardt, M., D'Hooge, R. & Matzner, U. (2012). Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. *Human molecular genetics*, 21(11): 2599–2609.
- Matthes, F., Andersson, C., Stein, A., Eistrup, C., Fogh, J., Gieselmann, V., Wenger, D.A. & Matzner, U. (2015). Enzymen replacement therapy of a novel humanized mouse model of globoid cell leukodystrophy. *Experimental neurology*, 271: 36–45.
- Matzner, U., Habetha M. & Gieselmann, V. (2000). Retrovirally expressed human arylsulfatase A corrects the metabolic defect of arylsulfatase A-deficient mouse cells. *Gene therapy*, 7(9): 805–812.
- Matzner, U., Herbst, E., Hedayati, K. K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Schröder, S., Eistrup C., Möller, C., Fogh, J. & Gieselmann, V. (2005). Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Human molecular genetics*, 14(9): 1139–1152.
- Matzner, U., Lüllmann-Rauch, R., Stroobants, S., Andersson, C., Weigelt, C., Eistrup, Fogh, J., D'Hooge, R. & Gieselmann, V. (2009). Enzyme replacement improves ataxic gait and central nervous system histopathology in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Molecular therapy*, 17(4): 600–606.
- Maurer, M. & von Stebut, E. (2004). Macrophage inflammatory protein-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(10): 1882–1886.
- McMahon, E. J., Cook, D. N., Suzuki, K. & Matsushima, G. K. (2001). Absence of macrophage-inflammatory protein-1 α delays central nervous system demyelination in the presence of an intact blood-brain barrier. *Journal of immunology*, 167(5): 2964–2971.
- Menten, P., Wuyts, A. & Van Damme, J. (2002). Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(6): 455–481.
- Metha, A. & Winchester, B. (2012). *Lysosomal Storage Disorders A Practical Guide*. UK, West Sussex, Wiley-Blackwell.
- Milligan, N. Newcombe, R. & Compston, D.A. (1987). A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 50(5): 511–516.
- Miyatake, T. & Suzuki, K. (1972). Galactosylsphingosine Galactosyl Hydrolase. Partial Purification and Properties of the Enzyme in Rat Brain. *The journal of biological chemistry*, 48(3): 538–543.

- Mohri, I., Taniike, M., Taniguchi, H., Kanekiyo, T., Aritake, K., Inui, T., Fukumoto, N., Eguchi, N., Kushi, A., Sasai, H., Kanaoka, Y., Ozono, K., Narumiya, S., Suzuki, K. & Urade, Y. (2006). Prostaglandin D2-mediated microglia/astrocyte interaction enhances astrogliosis and demyelination in twitcher. *The journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience*, 26(16): 4383–4393.
- Moser, B. & Loetscher, P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology*, 2(2): 123–128.
- Nagara, H., Ogawa, H., Sato, Y., Kobayashi, T. & Suzuki, K. (1986). The twitcher mouse: degeneration of oligodendrocytes in vitro. *Brain research*, 391(1): 79–84.
- Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*, 26(10): 523–30.
- Neumann, H., Kotter, M.R. & Franklin, R.J.M. (2009). Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. *Brain: a journal of neurology*, 132(2): 288–295.
- Noda, M. & Suzumura, A. (2012). Sweepers in the CNS: Microglial Migration and Phagocytosis in the Alzheimer Disease Pathogenesis. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012, 891087. doi:10.1155/2012/891087
- Norton, W. & Autilio, L. (1966). The Lipid Composition of purified Bovine Brain Myelin. *Journal of neurochemistry*, 13: 213–222.
- Ohno, M., Komiyama, A., Martin, P.M. & Suzuki, K. (1993). Proliferation of microglia/macrophages in the demyelinating CNS and PNS of twitcher mouse. *Brain research*, 602(2): 268–274.
- Page, T.H., Brown, A., Timms, E.M., Foxwell, B.M.J. & Ray, K.P. (2010). Inhibitors of p38 suppress cytokine production in rheumatoid arthritis synovial membranes: does variable inhibition of interleukin-6 production limit effectiveness in vivo? *Arthritis and rheumatism*, 62(11): 3221–3231.
- Pedchenko, T.V., Bronshteyn, I.G. & LeVine, S.M. (2000). TNF-receptor 1 deficiency fails to alter the clinical and pathological course in mice with globoid cell leukodystrophy (twitcher mice) but affords protection following LPS challenge. *Journal of neuroimmunology*, 110(1-2): 186–194.
- Platt, F.M. & Lachmann, R.H. (2009). Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(4): 737–745.
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn F., Panzara, M.A. & Sandrock, A.W. (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, 354(9): 899–910.

- Ramakrishnan, H., Hedayati, K.K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Fewou, S.N., Maier, H., Goebel, H., Gieselmann, V. & Eckhardt, M. (2007). Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. *The Journal of neuroscience*, 27(35): 9482-9490.
- Ramesh, G., Maclean, A.G. & Philipp, M.T. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of inflammation*, 2013. doi: 10.1155/2013/480739. Epub 2013.
- Ramos, C.D.L., Canetti, C., Souto, J.T., Silva, J.S. & Hogaboam, C.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. (2005). MIP-1 α [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF- α and LTB $_4$. *Journal of leukocyte biology*, 78(1): 167–177.
- Reddy, A. (2011). The role of inflammation in pathogenesis and treatment of globoid-cell leukodystrophy. *St. Louis, Washington University. Dissertation*.
- Reddy, A. S., Patel, J. R., Vogler, C., Klein, R. S. & Sands, M. S. (2013). Central Nervous System Pathology Progresses Independently of KC and CXCR2 in Globoid-Cell Leukodystrophy. *Public Library of Science (PLOS ONE)*, 8(6): e64647.
- Sakai, N., Inui, K., Tatsumi, N., Fukushima, H., Nishigaki, T., Taniike, M., Nishimoto, J., Tsukamoto, H., Yanagihara, I., Ozono, K. & Okada, S. (1996). Molecular cloning and expression of cDNA for murine galactocerebrosidase and mutation analysis of the twitcher mouse, a model of Krabbe's disease. *Journal of neurochemistry*, 66(3): 1118–1124.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sano, R., Tessitore, A., Ingrassia, A. & D'Azzo, A. (2005). Chemokine-induced recruitment of genetically modified bone marrow cells into the CNS of GM1-gangliosidosis mice corrects neuronal pathology. *Blood*, 106(7): 2259–2268.
- Serhan, C.N. & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, 6(12): 1191-1197.
- Schott, I., Hartmann, D., Gieselmann, V. & Lüllmann-Rauch, R. (2001). Sulfatide storage in visceral organs of arylsulfatase A-deficient mice. *Virchows Archiv: an international Journal of Pathology*, 439(1): 90–96.
- Schultz, M.L., Tecedor, L., Chang, M. & Davidson, B.L. (2011). Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in neurosciences*, 34(8): 401–410.
- Sedgwick, J. & Schwender, S. (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16): 7438–7442.

- Skovronsky, D.M., Lee, V.M.Y. & Trojanowski, J.Q. (2006). Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annual review of pathology*, 1: 151–170.
- Snook, E.R., Fisher-Perkins, J.M., Sansing, H.A., Lee, K.M., Alvarez, X., MacLean, A.G., Peterson, K., Lackner, A. & Bunnell, B.A. (2014). Innate immune activation in the pathogenesis of a murine model of globoid cell leukodystrophy. *American journal of pathology*, 184(2): 382–396.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*, 32(12): 638–647.
- Stanislaus, R., Gilg, A.G., Singh, A.K. & Singh, I. (2002). Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by Lovastatin. *Neuroscience letters*, 333(3): 167–170.
- Stroobants, S., Gerlach, D., Matthes, F., Hartmann, D., Fogh, J., Gieselmann, V., D'Hooge, R. & Matzner, U. (2011). Intracerebroventricular enzyme infusion corrects central nervous system pathology and dysfunction in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Human molecular genetics*, 20(14): 2760–2769.
- Stroobants, S., Leroy, T., Eckhardt, M., Aerts, J. M., Berckmans, D. & D'Hooge, R. (2008). Early signs of neuropilidosis-related behavioural alterations in a murine model of metachromatic leukodystrophy. *Behavioural brain research*, 189(2): 306–316.
- Stolzing, A. & Grune, T. (2004). Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(6): 743-745.
- Suzuki, K. (1983). The twitcher mouse. A model of human globoid cell leukodystrophy (krabbe's disease). *The American journal of pathology*, 111(3): 394–397.
- Suzuki, K., Tanaka, H. & Suzuki, K. (1976). Studies on the pathogenesis of Krabbe's leukodystrophy: cellular reaction of the brain to exogenous galactosphingosine, monogalactosyl diglyceride, and lactosylceramide. *Advances in experimental medicine and biology*, 68: 99-114.
- Svennerholm, L., Vanier, M. & Månsson, J. (1980). Krabbe disease: a galactosylsphingosine (psychosine) lipidosis. *Journal of Lipid Research*, 21(1): 53–64.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T. & Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The journal of biological chemistry*, 281(30): 21362–21368.
- Taniike, M. & Suzuki, K. (1994). Spacio-temporal progression of demyelination in twitcher mouse: with clinico-pathological correlation. *Acta neuropathologica*, 88(3): 228-236.

- Thelen, K. M., Rentsch, K. M., Gutteck, U., Heverin, M., Olin, M., Andersson, U., von Eckardstein, A., Björkhem, I. & Lütjohann, D. (2006). Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(3): 1146–1152.
- Thomas, M. (1989). The leukocyte common antigen family. *Annual review of immunology*, 33: 339–369.
- Tsuji, A., Saheki, A., Tamai, I. & Terasaki, T. (1993). Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 267(3): 1085–1090.
- Tsuji, D., Kuroki, A., Ishibashi, Y., Itakura, T., Kuwahara, J., Yamanaka, S. & Itoh, K. (2005). Specific induction of macrophage inflammatory protein 1- α in glial cells of Sandhoff disease model mice associated with accumulation of N-acetylhexosaminyl glycoconjugates. *Journal of Neurochemistry*, 92(6): 1497–1507.
- Vitner, E.B., Farfel-Becker, T., Eilam, R., Biton, I. & Futerman, A.H. (2012). Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. *Brain: a journal of neurology*, 135(6): 1724–1735.
- von Figura, K., Gieselmann, V. & Jaeken, J. (2001) Metachromatic Leukodystrophy. in: Scriver *et al.* (eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. McGraw-Hill, New York.
- Wada, R., Tiffit, C. & Proia, R. (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20): 10954–10959.
- Walter, L. & Neumann, H. (2009) Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. *Seminars in immunopathology*, 31(4): 513-525.
- Wang, J. M., Sherry, B., Fivash, M. J., Kelvin, D. J. & Oppenheim, J. J. (1993). Human recombinant macrophage inflammatory protein-1a and -b and monocyte chemotactic and activating factor utilize common and unique receptors on human monocytes. *The Journal of immunology*, 150(7): 3022–3029.
- Wenger, D.A., Suzuki, K., Suzuki Y. & Suzuki, K. (2001). Galactosylceramide lipidosis. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). in: Scriver *et al.* (eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. McGraw-Hill, New York.
- Wilkinson, F.L., Holley, R.J., Langford-Smith, K.J., Badrinath, S., Liao, A., Langford-Smith, A., Cooper, J., Jones, S., Wraith, J., Wynn, R., Merry, C. & Bigger, B.W. (2012). Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *Public Library of Science (PLOS ONE)*, 7(4): e35787.

- Winchester, B. Vellodi, A. & Young, E. (2000). The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochemical Society Transactions*, 28(2): 50–54.
- Wittke, D., Hartmann, D., Gieselmann, V. & Lüllmann-Rauch, R. (2004). Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: Cellular alterations and topographic distribution. *Acta neuropathologica*, 108(4): 261–271.
- Wrobe D., Henseler M., Heuttler S., Pascual Pascual S.I., Chabas, A., & Sandhoff, K. (2000). A non-glycosylated and functionally deficient mutant (N215H) of the sphingolipid activator protein B (SAP-B) in a novel case of metachromatic leukodystrophy (MLD). *Journal of interited metabolic disease*, 23(1): 63–76.
- Wu, Y.P., Matsuda, J., Kubota, A., Suzuki, K. (2000). Infiltration of hematogenous lineage cells into the demyelinating central nervous system of twitcher mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 59(7): 628–639.
- Wu, Y.P., McMahon, E.J., Matsuda, J., Suzuki, K. & Matsushima, G.K. (2001). Expression of immune-related molecules is downregulated in twitcher mice following bone marrow transplantation. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 60(11): 1062–1074.
- Wu, Y. & Proia, R. (2004). Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 α retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22): 8425–8430.
- Youssef, S., Stüve, O., Patarroyo, J., Ruiz, P.J., Radosevich J.L., Hur, E.M., Bravo, M., Mitchell, D.J., Sobel, R.A., Steinman, L. & Zamvil, S.S. (2002). The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*, 420(6911): 78–84.

8. Anhang**Tab. 12.** Absolute Messwerte der ELISA-Messungen auf die Zytokinexpression im Gehirn von ASA -/- Mäusen

	Zytokin-Expression [pg/mg]			
	12 Monate		24 Monate	
	WT	ASA -/-	WT	ASA -/-
IL-1β	448 \pm 115	414 \pm 52	469 \pm 73	378 \pm 58
KC	4,95 \pm 0,29	6 \pm 1	5,28 \pm 0,75	6,01 \pm 0,81
MIP-1α	3,53 \pm 0,45	2,60 \pm 0,64	3,85 \pm 0,8	5,06 \pm 0,81

Tab. 13. Absolute Messwerte der Multiplex-Messungen auf die Zytokin-Expression im Gehirn von PLP-CST ASA -/- Mäusen.

	Zytokin-Expression [pg/mg]						
	10 Monate		16 Monate			20 Monate	
	WT	PLP-CST ASA -/-	WT Simvastatin	PLP-CST ASA -/- Mock	PLP-CST ASA -/- Simvastatin	WT	PLP-CST ASA -/-
IL-1α	1,43 \pm 0,94	0,98 \pm 0,28	n.d.	n.d.	n.d.	0,52 \pm 0,15	0,92 \pm 0,29
IL-1β	124 \pm 21	120 \pm 34	124 \pm 19	378 \pm 153	245 \pm 120	73 \pm 13	87 \pm 9
IL-2	61 \pm 6	71 \pm 11	18 \pm 3	34 \pm 13	25,11 \pm 0,88	13 \pm 3	13 \pm 3
IL-3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-5	2,64 \pm 0,3	2,54 \pm 0,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1 \pm 1
IL-6	5 \pm 3	3,33 \pm 0,55	1,14 \pm 0,14	1,92 \pm 0,33	1,3 \pm 0,21	2,19 \pm 0,47	4 \pm 1
IL-9	372 \pm 98	399 \pm 264	87 \pm 29	429 \pm 143	253 \pm 164	103 \pm 18	145 \pm 55
IL-10	20 \pm 3	19 \pm 3	5,21 \pm 0,47	6,37 \pm 0,28	4,48 \pm 0,26	11 \pm 2	15 \pm 2
IL-12 p40	4,49 \pm 0,76	5 \pm 1	2,59 \pm 0,3	5 \pm 2	3,32 \pm 0,41	2,89 \pm 0,39	4,37 \pm 0,75
IL-12 p70	21 \pm 3	17 \pm 4	5,85 \pm 0,7	6 \pm 1	2,14 \pm 0,35	12 \pm 3	21 \pm 9
IL-13	73 \pm 14	73 \pm 21	20,25 \pm 0,63	46 \pm 19	32 \pm 19	22 \pm 5	39 \pm 10
IL-17	10,91 \pm 0,49	10 \pm 2	5,04 \pm 0,21	8 \pm 2	5 \pm 2	6,61 \pm 0,67	6,75 \pm 0,85
Eotaxin	158 \pm 40	152 \pm 36	n.d.	n.d.	n.d.	90 \pm 24	110 \pm 10
G-CSF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GM-CSF	27 \pm 7	24 \pm 7	21,34 \pm 0,61	26 \pm 4	17 \pm 4	14 \pm 8	13 \pm 9
IFN-γ	12 \pm 1	11 \pm 2	6,03 \pm 0,63	7,33 \pm 0,58	5,98 \pm 0,49	9 \pm 2	9 \pm 2
KC	4,99 \pm 0,40	4,07 \pm 0,76	1,94 \pm 0,74	2,62 \pm 0,69	2 \pm 1	4,16 \pm 1,10	7 \pm 2
MCP-1	16 \pm 2	20 \pm 4	17 \pm 2	70 \pm 25	42 \pm 24	11 \pm 1	22 \pm 2
MIP-1α	3,44 \pm 0,93	5,02 \pm 0,26	5 \pm 1	17 \pm 7	12 \pm 5	3,86 \pm 0,81	10 \pm 2
MIP-1β	15 \pm 1	14 \pm 3	6,7 \pm 0,81	18 \pm 6	10 \pm 5	7,05 \pm 0,78	11 \pm 2
RANTES	3,79 \pm 0,46	2,69 \pm 0,31	2,52 \pm 0,34	5 \pm 2	3,2 \pm 0,97	2,9 \pm 0,76	4,85 \pm 0,89
TNF-α	123 \pm 4	110 \pm 19	60 \pm 5	61 \pm 5	40 \pm 7	82 \pm 14	86 \pm 10

(n.d.: Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze)

Tab. 14. Absolute Messwerte der Multiplex-Messungen auf die Zytokin-Expression im Rückenmark von Simvastatin- und mock-behandelten PLP-CST ASA ^{-/-} Mäusen.

	Zytokin-Expression [pg/mg]		
	PLP-CST ASA ^{-/-}		WT
	Simvastatin	Mock	Simvastatin
IL-1α	17 \pm 2	15 \pm 2	25 \pm 21
IL-1β	189 \pm 83	494 \pm 139	208 \pm 209
IL-2	46 \pm 14	41 \pm 7	84 \pm 78
IL-3	12 \pm 5	30 \pm 13	16 \pm 7
IL-4	n.d.	n.d.	n.d.
IL-5	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6	13 \pm 4	26 \pm 7	23 \pm 9
IL-9	236 \pm 34	172 \pm 125	212 \pm 123
IL-10	81 \pm 37	164 \pm 44	52 \pm 19
IL-12 p40	24 \pm 7	60 \pm 16	20 \pm 7
IL-12 p70	133 \pm 71	309 \pm 162	228 \pm 107
IL-13	246 \pm 87	526 \pm 193	566 \pm 206
IL-17	16 \pm 2	32 \pm 8	47 \pm 18
Eotaxin	1048 \pm 259	1210 \pm 217	1299 \pm 373
G-CSF	n.d.	n.d.	n.d.
GM-CSF	230 \pm 33	249 \pm 16	306 \pm 109
IFN-γ	17 \pm 1	25 \pm 15	61 \pm 24
KC	9 \pm 2	15 \pm 8	14 \pm 5
MCP-1	107 \pm 34	293 \pm 52	82 \pm 36
MIP-1α	20 \pm 3	21 \pm 4	44 \pm 13
MIP-1β	16 \pm 7	48 \pm 16	31 \pm 7
RANTES	7 \pm 2	11 \pm 2	15 \pm 6
TNF-α	225 \pm 98	478 \pm 131	340 \pm 126

(n.d.: Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze)

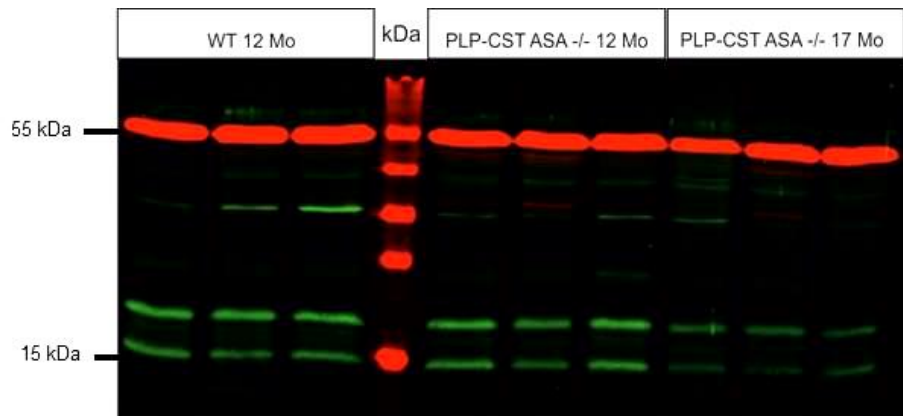


Abb. 24. Komplette Darstellung des Western Blots aus Abb.12A.

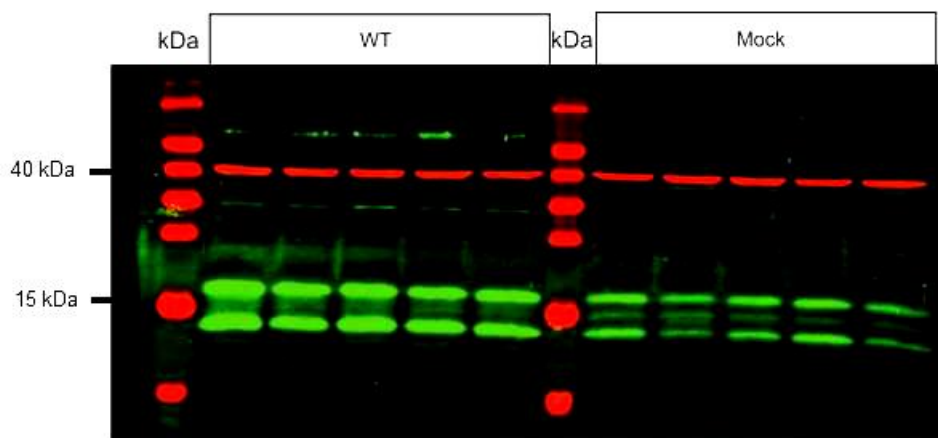


Abb. 25. Komplette Darstellung des Western Blots aus Abb. 19A.

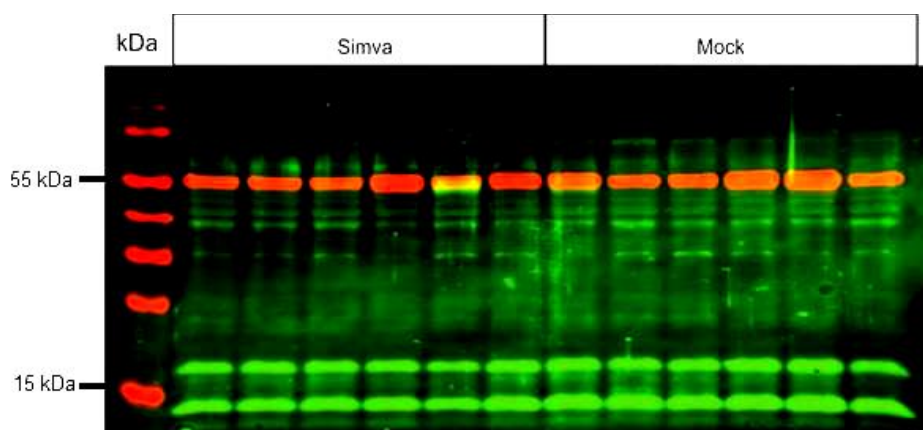


Abb. 26. Komplette Darstellung des Western Blots aus Abb. 19C.

8. Anhang

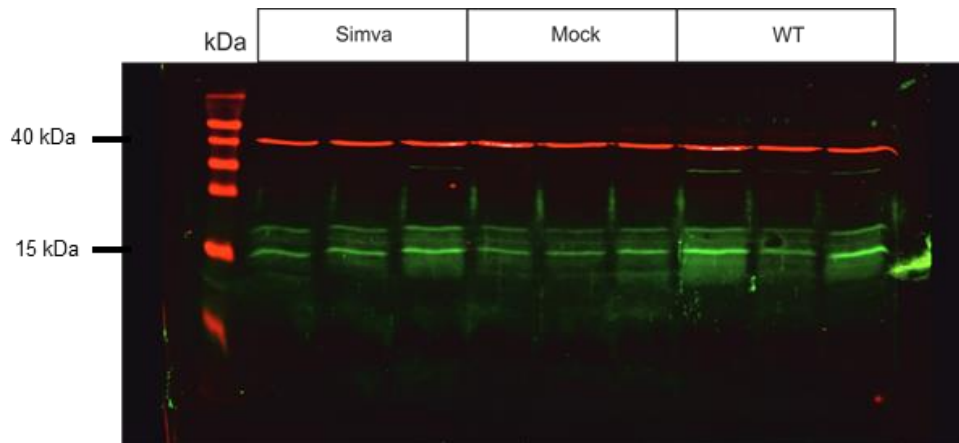


Abb. 27. Komplette Darstellung des Western Blots aus Abb. 20A.

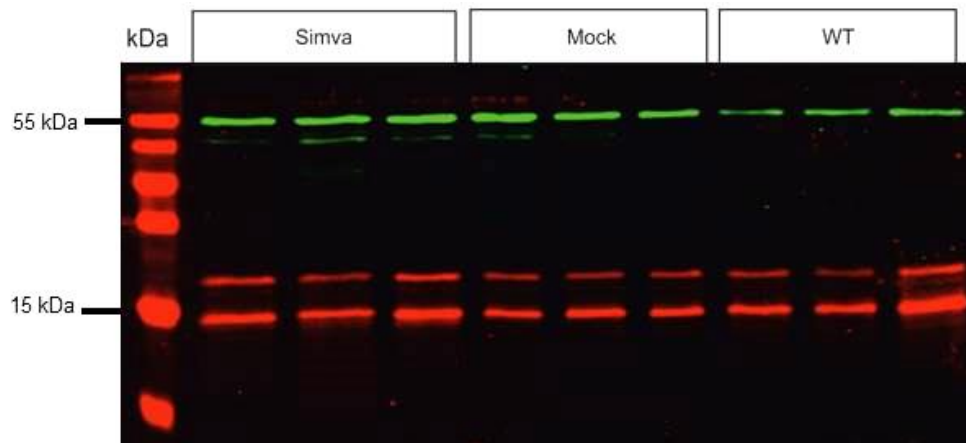


Abb. 28. Komplette Darstellung des Western Blots aus Abb. 22A.

9. Publikationen

Stein, A., Stroobants, S., Gieselmann, V., D'Hooge, R. & Matzner, U. (2015). Anti-inflammatory therapy with simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Molecular Therapy*, doi: 10.1038/mt.2015.69. [Epub ahead of print]

Matthes, F., Andersson, C., Stein, A., Eistrup, C., Fogh, J., Gieselmann, V., Wenger, D.A. & Matzner, U. (2015). Enzyme replacement therapy of a novel humanized mouse model of globoid cell leukodystrophy. *Experimental neurology*, 271: 36-45.

Posterpräsentationen:

Axel Stein, Matthias Eckhardt, Volkmar Gieselmann, Ulrich Matzner (2011): Neuroinflammation is a Hallmark of the Pathogenesis in an aggravated Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. *18th ESGLD-Workshop*: Langvik, Finnland.

Axel Stein, Volkmar Gieselmann, Ulrich Matzner (2013): Neuroinflammation is a new therapeutic target in mouse models of metachromatic leukodystrophy. *19th ESGLD-Workshop*: Gratz, Österreich.

Axel Stein, Stijn Stroobants, Volkmar Gieselmann, Ulrich Matzner (2014): Impact of Neuroinflammation on disease progression in mouse models of metachromatic leukodystrophy. *44th Annual Meeting of the German Society for Immunology*: Bonn, Deutschland.

10. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann für die Überlassung des Themas für diese Dissertation, die hilfreichen Anregungen zu meinem Projekt und sein unschätzbares Wissen.

Herrn Prof. Dr. N. Koch danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. W. Wittke für die spontane und freundliche Übernahme des fachnahen Gutachtens.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. U. Matzner für die Betreuung dieser Arbeit bedanken sowie dafür, dass er es mir ermöglichte meine Ideen selbständig und eigenverantwortlich in die Tat umzusetzen.

Ein besonderer Dank geht zudem an die Mitarbeiter der AG Matzner: vorne Weg natürlich dem fleißigen Korrekturleser Tillman Schuster und den beiden hervorragenden technischen Angestellten Claudia Yaghootfam & Heidi (Monika) Simonis. Selbstverständlich bedanke ich mich auch bei unsren „Ehemaligen“: Annika Böckenhoff, Debora (Debby) Kaminski und Frank Matthes.

Auch möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Doktoranden-Brutstätte für einen angenehmen Alltag bedanken: Klaudia (de) Brysch(é), Isabell (Izzie) Zech, Asisa (Asisia) Saile, (He-)Lena Maier, Tatjana Floßdorf, Carmen Schoor & Robert Hardt.

Außerdem gebührt mein Dank den restlichen Mitarbeitern der AG Gieselmann: der „Familie Eckhardt“, Karola Ragout, Elvira Thiessen, Bernd Gehrig, Norbert Rösel, sowie den beiden Helden des Tierstalls: Ali & Nevzat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mich trotz aller herben Schicksalsschläge stets unterstützt und immer ein offenes Ohr für mich hat.

Danke!

calor, rubor, tumor, dolor - functio laesa

(Celsus & Virchow)