

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



**Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Rostock
Direktor: Professor Dr. med. A. Wree**

**Auswirkungen von Miglustat bzw. einer Kombination aus
Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon auf das
Lernverhalten und die motorische Koordination von BALB/c-
Wildtypmäusen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Schlegel, Victoria

geboren in Ribnitz-Damgarten

Rostock, 2017

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E. C. Reisinger

Datum der Einreichung: 12.03.2017

Datum der Verteidigung: 23.08.2017

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E. C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree (Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock)

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Teipel (Klinik für Psychosomatik und Psychotherapeutische Medizin der Universitätsklinik Rostock)

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver von Bohlen und Halbach (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schlegel V, Thieme M, Holzmann C, Witt M, Grittner U, Rolfs A, Wree. Pharmacologic treatment assigned for Niemann Pick type C1 disease partly changes behavioral traits in wild-type mice. *Int J Mol Sci* 17(11). pii: E1866 IF: 3,257; 2015)

Abkürzungsverzeichnis/Wörterklärung

Abb.	Abbildung
Allopreg.	Allopregnanolon
ANCOVA	Analysis of Covariance
ANOVA	Analysis of Variance
ApoE	Apolipoprotein E
BALB/c	ist ein Albino, im Labor gezüchteter Stamm der Haus-Maus
BMP	Bis(monoacylglycerol)phosphate
BPT	By Product Replacement Therapy (Produktersatztherapie)
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6J NPC1 ^{spm}	Inzuchtstamm von Labormäusen
cm	Zentimeter
CD-Allo	Cyclodextrin und Allopregnanolon gelöst in Ringerlösung zur Medikation der Tiere
Cyclodex.	Cyclodextrin
Cyclodex.-lsg.	Cyclodextrin-Lösung
EMA	European Medicines Agency
ERT	Enzyme Replacement Therapy
EPAR	European Public Assessment Report
FDA	Food and Drug Administration
F _i	Verteilungsfunktion im Kruskal-Wallis-Test
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
GM2/3	Monosialotetrahexosylganglioside 2/3
Homoscedasticity	Homoscedasticity ist die Homogenität der Varianz: Die Annahme der Homogenität der Varianz (oder Homoskedastizität der Varianz) geht dahin, dass die Varianz innerhalb jeder der Populationen gleich ist, das heißt, die Varianz der Residuen und somit die Varianz der erklärenden Variablen selbst für alle Ausprägungen der anderen Variablen nicht signifikant unterschiedlich ist.
HPβCD	2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin
HOPS	Homotypic fusion and vacuole protein sorting
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
I01-Zeit	verbrachte Zeit im ersten Quadranten

I01-Visits	Anzahl der Besuche des ersten Quadranten
I02-Zeit	verbrachte Zeit im zweiten Quadranten
I02-Visits	Anzahl der Besuche des zweiten Quadranten
I03-Zeit	verbrachte Zeit im dritten Quadranten
I03-Visits	Anzahl der Besuche des dritten Quadranten
I04-Zeit	verbrachte Zeit im vierten Quadranten
I04-Visits	Anzahl der Besuche des vierten Quadranten
Inr.	Identifikationsnummer
Inj.	Injektion
i.p.	intraperitoneal
k	Grundgesamtheit im Kruskal-Wallis-Test
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Käfignr.	Käfignummer
LAL	Lysosomal Acid Lipase
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
Miglu	Miglustat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe
NaCl	Natriumchlorid (physiologische Kochsalzlösung)
NIH	National Institutes of Health
NPC	Niemann-Pick C
NPC1	Niemann-Pick C-Protein 1
NPC1(NTD)	NPC1-N-terminal domain
NPC2	Niemann-Pick C-Protein 2
NPC ^{-/-}	beide NPC-Gene sind defekt/mutiert
ORP5	Oxysterol-binding protein-related protein 5

ORP1L	Oxysterol-binding protein-related protein 1L
P	Lebenstag der Versuchstiere
Plattform-Latenz	Zeit, die die Versuchstiere brauchten um die Plattform des Morris Water Maze zu erreichen
Plattform-Bereich	Plattform des Morris Water Maze-Versuches
Plattform-Visits	Anzahl der Besuche des ehemaligen Plattform-Bereiches während des Morris Water Maze-Tests
PNS	Peripheres Nervensystem
Ptch-Rezeptor	PATCHED-Rezeptor (Hedgehog-Signalweg)
p/ p-Wert	Signifikanzwert
ref.	letzter Verweis (last reference)
R_i	Rangzahl im Kruskal-Wallis-Test
SCAP	SREBP-Cleavage-Activating-Protein
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittel
S_h	Rangsumme im Kruskal-Wallis-Test
Syn.	Synonym
SREBP2	Sterol regulatory element-binding protein-2
SRT	Substratreduktionstherapie
Std Dev	Standard deviation (Standardabweichung)
t	Training
$t_{r(i)}$	Anzahl der gebundenen Variablen mit dem ihnen zugewiesenen Rang i im Kruskal-Wallis-Test
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
VAP-A	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	9
1.1 Niemann-Pick-Krankheit.....	9
1.1.1 Niemann-Pick C1.....	11
1.1.1.1 Pathogenese.....	11
1.1.1.2 Klinik.....	15
1.1.1.3 Neuropathologie.....	18
1.1.1.4 Diagnostik und Differentialdiagnosen.....	18
1.1.1.5 Therapie.....	19
1.1.1.5.1 Miglustat.....	20
1.1.1.5.2 Cyclodextrin.....	23
1.1.1.5.3 Allopregnanolon.....	28
1.2 NPC1-Tiermodelle.....	30
1.3 Accelerod.....	31
1.4 Morris Water Maze.....	31
1.5 Zielsetzung der Dissertation.....	32
1.6 Fragestellungen und Hypothesen zur Arbeit.....	32
1.6.1 Fragestellungen.....	32
1.6.2 Hypothesen.....	34
2. Material und Methoden.....	34
2.1 Versuchstiere.....	34
2.2 Versuchsgruppen.....	35
2.3 Therapieschemata der Versuchsgruppen.....	36
2.3.1 Sham 1.....	36
2.3.2 Sham 2.....	37
2.3.3 Kombi-Gruppe.....	38
2.3.4 Miglustat only-Gruppe.....	38
2.4 Versuchsabfolge.....	39
2.4.1 Accelerod.....	41
2.4.2 Morris Water Maze.....	43
2.5 Datenanalyse.....	47
2.5.1 Post-hoc-Tests.....	47
2.5.2 Analysis of Variance.....	47

2.5.2.1	Einfaktorielle ANOVA	48
2.5.2.2	Zweifaktorielle ANOVA	49
2.5.3	Kruskal-Wallis-Test	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Accelerod (früh): Training	50
3.2	Accelerod (früh): Test	52
3.3	Accelerod (spät): Training	54
3.4	Accelerod (spät): Test	56
3.5	Morris Water Maze: Training	57
3.6	Morris Water Maze: Test	62
4.	Diskussion der Ergebnisse	65
4.1	Analyse des Tiermodells	65
4.2	Analyse der verwendeten Pharmakotherapie	66
4.3	Analyse der Accelerod-Ergebnisse	68
4.4	Analyse der Morris Water Maze-Ergebnisse	69
4.5	Diskussion der Fragestellungen und Hypothesen	71
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblicke	73
5.	Literaturverzeichnis	74
5.1	Internetquellen	88
6.	Thesen	89
7.	Anhang	91

1. Einleitung

1.1 Niemann-Pick-Krankheit

Die Niemann-Pick-Krankheit ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Die Mutation findet auf der chromosomalen Bande 18q11 statt (Carstea et al. 1997). Sie gehört in die Gruppe der angeborenen Lipidspeicherkrankheiten, bei denen der intrazelluläre Lipidabbau durch Defekte verschiedener lysosomaler Enzyme gestört ist. Hierdurch kommt es zur Akkumulation der verschiedenen Lipide innerhalb der Zellen. Vor allem durch den Mangel an einem funktionellem NPC1-Protein kommt es zu einem anormalen Transport von Cholesterin und hierdurch zur Anhäufung von nicht verestertem Cholesterin im späten Endosomen/Lysosomen (Neufeld et al. 1999). Die Niemann-Pick-Krankheit wird in vier verschiedene Typen eingeteilt – Typ A bis D (Greten et al. 2005). Diese Einteilung erfolgte durch den amerikanischen Pädiater Dr. Allen Carrol Crocker aufgrund der unterschiedlichen ZNS-Beteiligung der verschiedenen Subtypen (Crocker 1961). Erstbeschrieben wurde die heterogene Gruppe der Niemann-Pick-Krankheiten jedoch durch zwei Deutsche, den Pädiater Albert Niemann (1880-1921) und den Pathologen Ludwig Pick (1868-1944) (Vanier et al. 2010).

Im Falle der Niemann-Pick-Krankheit Typ A und B ist die lysosomale Sphingomyelinase, ein Enzym, das für die Spaltung von Phosphodiesterbindungen innerhalb des Sphingomyelins verantwortlich ist, gestört. Dadurch kommt es zur progredienten Ansammlung von Sphingomyelin im Monozyten-Makrophagen-System. Monozyten/Makrophagen finden sich in verschiedensten Organen wie Milz und Leber, aber auch im Nervensystem, der Lunge sowie zahlreichen weiteren. Der entsprechende Gendefekt hierfür ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert. Das morphologische Korrelat der Sphingomyelinakkumulation in den Zellen sind lipidbeladene Schaumzellen im histologischen Präparat. Diese Zellen werden „Niemann-Pick-Zellen“ genannt (Greten et al. 2005). Niemann-Pick Typ A hat eine ausgeprägte, frühe ZNS-Beteiligung, wohingegen bei Niemann-Pick Typ B die viszerale Komponente dominiert.

Beim Niemann-Pick Typ C und D konnte noch nicht geklärt werden, welches Enzym defekt ist, aber es ist bekannt, dass bei diesen Typen der Cholesterinstoffwechsel gestört ist und es dadurch zur Akkumulation von Cholesterin sowie dessen Stoffwechselprodukten in der Zelle kommt. Der entsprechende Gendefekt befindet sich für diese beiden Typen auf dem Chromosom 18. Auch bei diesen Unterformen lassen sich im histologischen Präparat die typischen „Niemann-Pick-Zellen“ finden (Greten et al. 2005).

Niemann-Pick Typ C hat, im Vergleich zu den anderen Subtypen, einen langsameren Verlauf und weist eine relativ moderate, subakute ZNS-Beteiligung auf. Diese Untergruppe wird des

Weiteren aufgrund der zu Grunde liegenden Genmutation in Niemann-Pick Typ C1 mit 95% und Niemann-Pick Typ C2 mit 5% unterteilt (Park et al. 2003).

Symptomatisch äußert sich die Niemann-Pick-Krankheit durch eine Hepatosplenomegalie, eine Neurodegeneration und eine progrediente Lungenerkrankung. Häufig treten die ersten Symptome bereits in der Kindheit auf (Greten et al. 2005).

Das weit verbreitete BALB/c-Mausmodell mit dem *NPC1-NIH*-Allel (Morris et al. 1982) ahmt zum Teil die menschliche Krankheit in neuronalen Lipidfehlspeichern und der progressiven Neurodegeneration, vor allem dem drastischen Verlust von Purkinje-Zellen nach (Sarna et al. 2003).

Die therapeutischen Möglichkeiten der Niemann-Pick C1-Krankheit sind begrenzt. Bisher wurden in Studien an NPC1-mutierten Mäusen über drei Medikamente berichtet, die eine positive Auswirkung auf die Lebensdauer und klinische Symptomatik der Tiere haben. Miglustat zeigte dabei eine Verlangsamung der Progression der Klinik bei den Versuchstieren (Zervas et al. 2001). Miglustat ist ein Inhibitor der Glycosylceramid-Synthase, welche ein Schlüsselenzym des Glycosphingolipid-Biosyntheseweges ist. Dadurch reduziert es toxische Metabolite wie Sphingomyelin, Zerebrosid, Sphingosin und weitere komplexe Glycosphingolipide. Daher kann Miglustat die Klinik von NPC1-Patienten mildern (Patterson et al. 2007, Pineda et al. 2009, Platt und Jeyakumar 2008, Cologna et al. 2012) und wurde in Langzeitanwendungen gut toleriert (Wraith et al. 2010). Daher wurde Miglustat zur Therapie von neurologischen Symptomen bei der Gaucher- und NPC-Erkrankung durch die Europäische Arzneimittel-Agentur zugelassen.

Weitere Studien an NPC1-Mäusen mit Allopregnanolon und dessen Lösungsmittel 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) ohne Miglustat zeigten, dass diese Therapie die Lebensspanne der Versuchstiere verlängert, den Beginn der Symptomatik verzögert und die Gangliosid-Akkumulation reduziert (Griffin et al. 2004). Zusätzlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung mit Cyclodextrin, Allopregnanolon und Miglustat den Krankheitseintritt verzögert, die intraneuronale Lipidakkumulation reduziert, die zerebellare Neurodegeneration vermindert (Davidson et al. 2009) und die motorischen, jedoch nicht die kognitiven Defizite bei NPC1-mutierten Versuchstieren verbessert (Hovakimyan et al. 2013, Maass et al. 2015). Da jedoch therapierte, mutierte Mäuse mit scheinbehandelten NPC1-Mutanten- und Wildtyp-Mäusen verglichen wurden, existieren noch keine Daten über die Effekte der Arzneimittel bei gesunden Wildtyp-Tieren. Zusätzlich erschien es wichtig, die Auswirkungen therapeutisch eingesetzter Medikamente in Wildtyp-

Tieren zu bewerten, um spezifische negative Nebenwirkungen zu untersuchen oder um zu zeigen, dass keine negativen Effekte durch die Arzneimittel auftreten.

Mittels Standard-Verhaltenstests präsentiere ich die erste Dissertation zu den pharmakologischen Wirkungen von Miglustat als Monotherapie im Vergleich zur bekannten Kombinationstherapie (β -Cyclodextrin, Allopregnanolon, Miglustat) auf die motorischen und kognitiven Fähigkeiten von Wildtyp-Mäusen. Darüber hinaus sollten mögliche Nebenwirkungen durch die chronische Verabreichung der Medikamente auf gesunde Mäuse ab P7 untersucht werden.

1.1.1 Niemann-Pick C1

Niemann-Pick C1 ist eine neuroviszerale, degenerative, lysosomale Lipidspeicherkrankheit. Sie folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Die Inzidenz dieser Erkrankung beträgt circa 1/120 000 Lebendgeburten (Vanier 2010). Die Angaben zur Prävalenz schwanken zwischen 0,35/100000 in den Niederlanden (Poorthuis et al. 1999) und 2,2/100000 in Portugal (Pinto et al. 2004), um zwei Beispiele zu nennen. Nach den EU-Richtlinien handelt es sich bei der Niemann-Pick C1 dementsprechend definitionsgemäß um eine seltene Erkrankung (Syn. rare disease) [Internetquelle 1]. Kennzeichnend für diesen Typ ist die Akkumulation von unverestertem Cholesterin, Glycosphingolipiden und weiteren Lipiden in zahlreichen Organen. Auf zellulärer Ebene finden die Lipidablagerungen vor allem im endolysosomalen System statt. Dadurch entstehen die typischen Niemann-Pick-Zellen, die aussehen, als seien sie mit „Schaum“ beladen. Dies führt vor allem zu Hepatosplenomegalie und progredienten neurologischen Dysfunktionen (Millat et al. 1999). Im Gehirn kommt es zu keiner Cholesterin-Akkumulation in den Zellen, stattdessen werden Ganglioside in einer unphysiologischen Menge gespeichert. Jene führen zu den Funktionsstörungen der Nervenzellen. Diese Erkrankung zeigt eine stark ausgeprägte cerebelläre Komponente (Vanier 2010, Kodam et al. 2010).

1.1.1.1 Pathogenese

Die Niemann-Pick-Krankheit Typ C entsteht durch einen Gendefekt. Der Defekt kann das Gen für das Transmembranprotein NPC1 oder ein kleineres, lösliches NPC2-Protein betreffen. Bei beiden Proteinen handelt es sich um cholesterinbindende Proteine, die als Transmembranglykoproteine am intrazellulären Cholesterin-Transport beteiligt sind. Des Weiteren wird eine enge Zusammenarbeit im Export von lysosomalem Cholesterin vermutet. Meistens tritt eine Loss-of-function-Mutation des NPC1-Gens auf, das heißt, das Gen verliert

durch die Mutation seine Funktion und die entsprechenden Proteine werden nicht mehr hergestellt oder sind funktionslos. Bei 95 Prozent der erkrankten Patienten liegt die Mutation im NPC1-Gen. Nur in 5 Prozent der Fälle ist das NPC2-Gen betroffen (Dixit et al. 2011, Vanier 2010, Kodam et al. 2010, Patterson et al. 2007).

Das NPC1-Gen ist auf Chromosom 18q11 lokalisiert. Es enthält eine Sequenz, die für 1278 Aminosäuren codiert (Carstea et al. 1997). In seinem Aufbau ähnelt es sequentiell dem SCAP, der HMG-CoA-Reduktase und dem Ptch-Rezeptor. Diese drei spielen eine wichtige Rolle im Cholesterin-Stoffwechsel (Carstea et al. 1997).

Das NPC2-Gen ist auf Chromosom 14q24.3 lokalisiert. Es codiert für ein ubiquitär vorkommendes, lysosomales Cholesterin-Bindungsprotein (Dixit et al. 2011, Naureckiene et al. 2000).

Es wird davon ausgegangen, dass beide NPC-Proteine ihre Funktion im postlysosomalen/spät endosomalen Transport des Cholesterins und anderer Verbindungen entfalten. Im Falle einer Mutation kommt es daher zur Akkumulation verschiedener heterogener Verbindungen in den Niemann-Pick-Zellen und zur Cholesterin-Transportstörung, welche wiederum eine Blockade des retrograden lysosomalen Transports nach sich zieht (Neufeldt et al. 1999).

Ein kleiner Anteil des NPC1-Proteins soll auch mit dem trans-Golgi-Netzwerk und lysosomal assoziiert sein (Higgins et al. 1999). Die genaue Funktion der beiden Proteine im Fettstoffwechsel ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht. In der Literatur existieren mehrere ähnliche Modelle, welche versuchen die Funktion der NPC-Proteine genauer zu erklären. Im Folgenden sollen zwei ähnliche, aber wichtige Modelle genauer beleuchtet werden.

Das erste Modell stammt von Rosenbaum und Maxfield aus dem Jahr 2011.

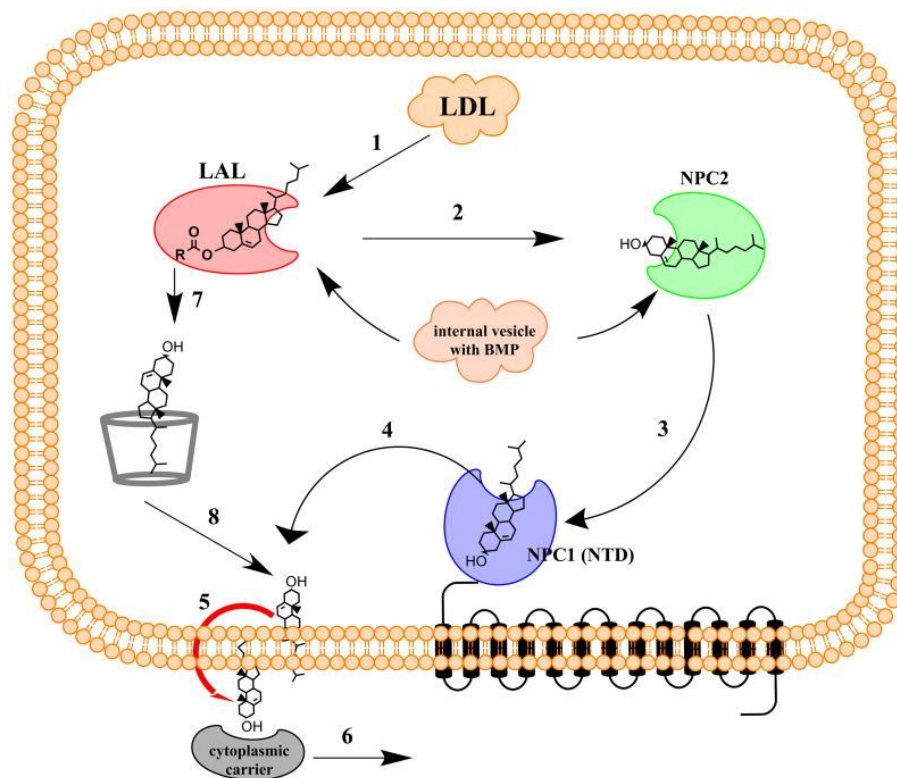


Abb. 1: Modell für NPC1, NPC2 und Cyclodextrin-Interaktionen im Cholesterin-Efflux im späten Endosom/Lysosom (Rosenbaum und Maxfield 2011). In gesunden Zellen werden Cholesterolester von LAL (Lysosomal Acid Lipase) hydrolysiert, um freies Cholesterin und Fettsäuren freizusetzen (1). Das freie Cholesterin wird dann übertragen an NPC2 (2), um anschließend weiter an NPC1(NTD) übertragen (3) zu werden. Freies Cholesterin wird dann zur luminalen Seite der Grenzmembran des späten Endosomen/Lysosomen transportiert (4), wo es spontan auf die zytosolische Seite der Membran wechselt (5) und dann an seine verschiedenen Zielorte in der Zelle durch zytoplasmatische Transportproteine getragen wird (6). In Abwesenheit von funktionellen NPC2 oder NPC1 können Cyclodextrine dessen Funktionen bei der Förderung der Cholesterinabtransportes (7, 8) unter Umgehung der Schritte 2 bis 4 ersetzen. Bis(monoacylglycerol)phosphat (BMP) stimuliert die Tätigkeit von LAL und NPC2. Im ZNS wird freies Cholesterin von den Gliazellen an die Neuronen über ein Apolipoprotein E (ApoE)-Komplex übertragen und daher muss kein Plasma-LDL die Blut-Hirn-Schranke passieren. Somit wird die gesamte ZNS-Cholesterin-Synthese endogen durchgeführt.

Dieses Modell beschreibt die Entstehung der intrazellulären Lipidakkumulation und basiert auf Untersuchungen an Fibroblasten. In gesunden Zellen hydrolysiert die LAL (Lysosomal Acid Lipase) Cholesterolester zu freiem Cholesterol und freien Fettsäuren. NPC1 und NPC2 in späten Endosomen bzw. Lysosomen transportieren das freie Cholesterol zur Membraninnenseite des Zellorganells. Hier wechselt das freie Cholesterol spontan auf die zytosolische Seite der Zellmembran und steht damit für den Abtransport durch andere Transportproteine zur Verfügung. Liegen Mutationen im NPC1- bzw. NPC2-Protein vor, ist

der Transportweg unterbrochen und es kommt zu einer intrazellulären Akkumulation von Lipiden (Rosenbaum und Maxfield 2011).

Das Modell von Rosenbaum und Maxfield erklärt die Pathogenese der Niemann-Pick-Krankheit Typ C unvollständig, denn beim NPC1 akkumuliert nicht nur Cholesterin intrazellulär, sondern auch zahlreiche andere Lipide wie beispielsweise Sphingosin, Sphingomyelin, GM2- und GM3-Ganglioside (Lloyd-Evans et al. 2008).

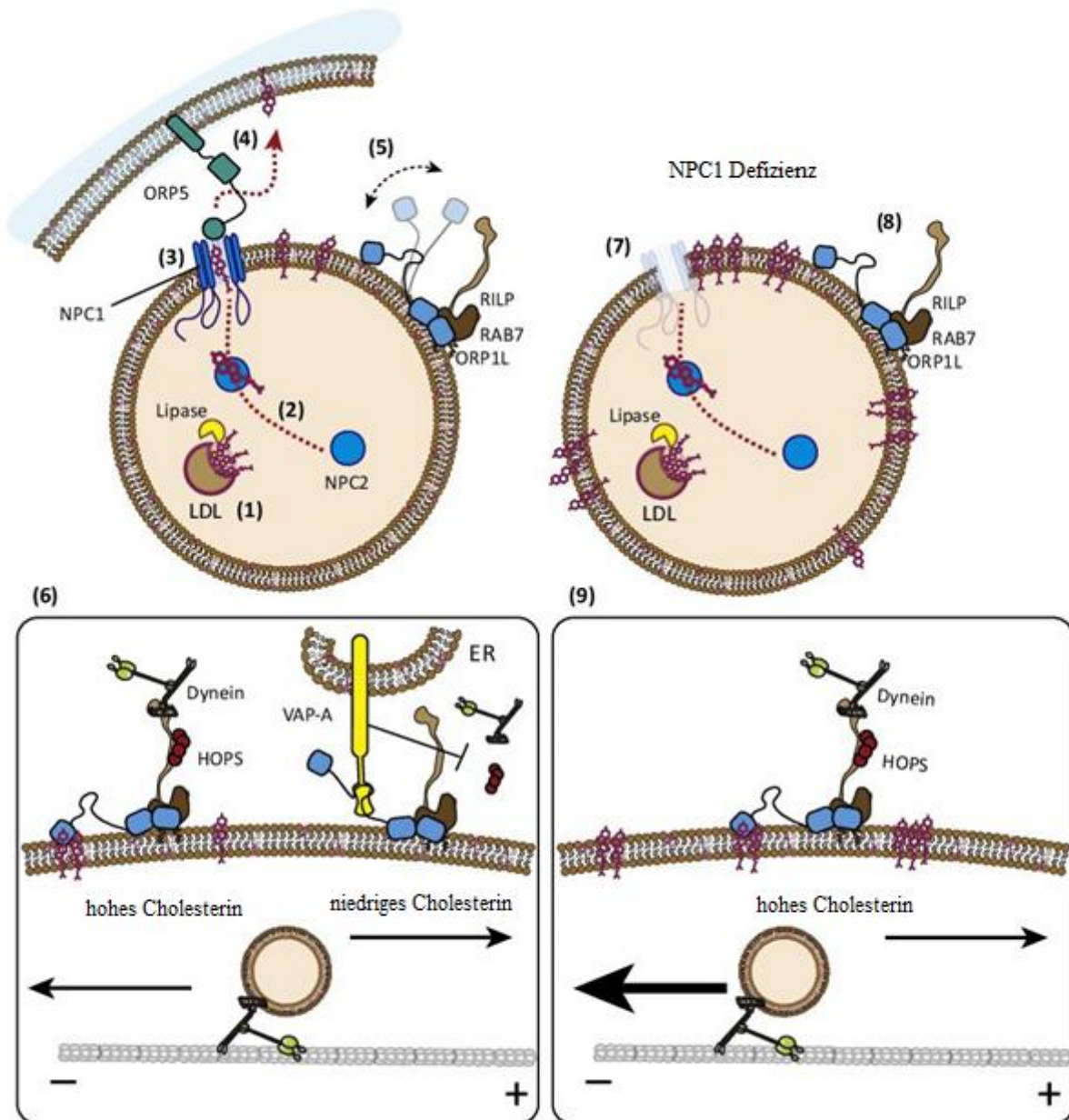


Abb. 2: Inside-out signaling; cholesterol and Niemann-Pick type C (NPC) disease aus "Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system" von Neefjes und van der Kant 2014. (1) Cholesterin wird in Form von LDL-Partikeln in die Zelle aufgenommen und durch Hydrolyse dieser Partikel wird unverestertes Cholesterin intrazellulär freigesetzt. Dieses freigesetzte Cholesterin wird vom NPC2-Protein gebunden und zum NPC1-Protein am späten Endosomen transportiert (2). Das NPC1-Protein führt

hier den transmembranären Transport des Cholesterins von der Membran des späten Endosomen auf die Membran des Endoplasmatischen Retikulums durch (4). Hierbei steht das Protein mit dem ORP5 in Verbindung (3). Das ORP1L misst die Cholesterinkonzentration am späten Endosomen (5). In Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration reguliert ORP1L die Konformation des Dynein-Dynactin und HOPS-Komplexes über das VAP-A, welches ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums ist (6). Durch die Änderung der Konformation dieser Komplexe werden die Fusionsfrequenz und die Transportrichtung des transmembranären Cholesterin-Transports beeinflusst. Durch eine NPC1- bzw. NPC2-Mutation kommt es zur intrazellulären Cholesterinakkumulation und zwar vor allem in der Nähe des späten Endosoms (7). Dieser Anstieg der Cholesterinkonzentration wird vom ORP1L registriert und leitet somit über VAP-A die Bildung eines Dynein-HOPS-Komplexes an der Membran des späten Endosoms ein (8). Hierdurch kommt es zu einem erhöhten Minus-End-Transport sowie atypischen endosomalen Transportvorgängen.

Das zweite Modell von Neefjes und van der Kant aus dem Jahr 2014 beschreibt das Zusammenspiel der NPC-Proteine noch etwas detaillierter als das Modell von Rosenbaum und Maxfield. Neefjes und van der Kant fanden heraus, dass das NPC1-Protein für den transmembranären Cholesterin-Transport und das NPC2-Protein für den luminalen Cholesterin-Transport verantwortlich sind. Des Weiteren definierten sie weitere Hilfsproteine des Cholesterin- sowie Lipidstoffwechsels der Zellen. Neefjes und van der Kant ist es gelungen zu klären, warum es beim Niemann Pick Typ C nicht nur zur Cholesterinakkumulation, sondern auch zur Ablagerung weiterer Lipide kommt (Neefjes und van der Kant 2014).

1.1.1.2 Klinik

Das klinische Spektrum dieser Erkrankung ist sehr heterogen, es reicht von Manifestationen bei Neugeborenen oder sogar in der Perinatalperiode, in der die Erkrankung meist rasch tödlich verläuft, bis hin zu einer im höheren Alter (zum Beispiel siebtes Lebensjahrzehnt) chronisch verlaufenden, neurodegenerativen Erkrankung. Die Lebensdauer der Erkrankten zeigt eine weite Varianz zwischen wenigen Tagen bis hin zu über 60 Jahren. Im Mittel liegt die Lebensdauer zwischen 10 und 25 Jahren (Vanier 2010).

Der Schweregrad der Erkrankung wird anhand der neurologischen Beteiligung bestimmt. Bei vielen Patienten gehen den neurologischen Symptomen systemische, wie Ikterus, Hepatosplenomegalie oder nur Splenomegalie voraus. Eine schwerwiegende Lungenbeteiligung kommt nur in seltenen Fällen vor. Nur bei circa 15 Prozent der Patienten fehlt die systemische Komponente vor der neurologischen Manifestation (Vanier 2010). Ungefähr die Hälfte der Patienten entwickelt im Alter einen Diabetes. Welche neurologischen Symptome zuerst auftreten, variiert dem Manifestationsalter der Erkrankung entsprechend. Es

kann zu einer verzögerten motorischen Entwicklung im frühkindlichen Alter kommen, die mit Gangstörungen, Stürzen, Ataxien und zahlreichen anderen Störungen der Motorik einhergeht. Abgesehen von einem minimalen Patientenanteil, der bereits bei der Geburt oder in den ersten sechs Lebensmonaten an Lungen- oder Leberinsuffizienz mit Neugeborenen-Hepatitis und fatalem Ikterus stirbt, entwickeln alle Patienten im Laufe der Erkrankung eine progressiv und tödlich verlaufende neurologische Erkrankung (Vanier 2010, Lachmann et al. 2004). Aufgrund der unterschiedlichen Verlaufsformen werden beim Niemann-Pick C1 eine perinatale, frühe und späte infantile, juvenile sowie adulte Form unterschieden.

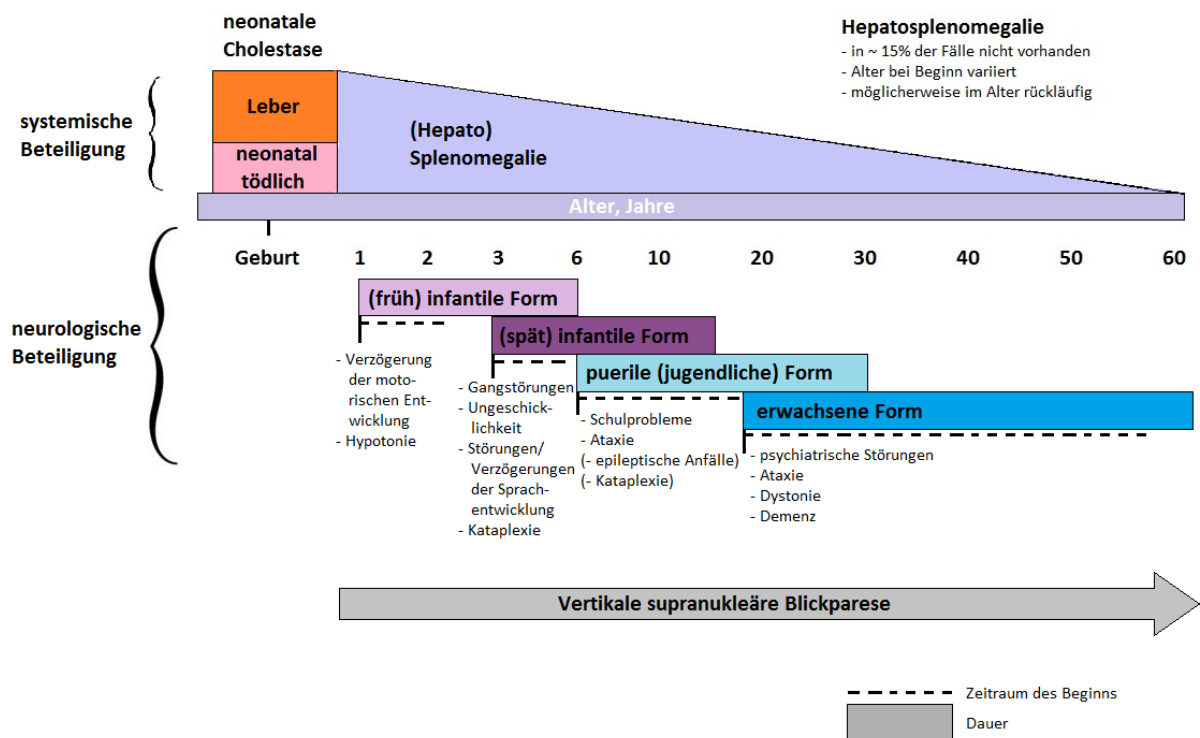


Abb. 3: Schema zu den viszeralen und neurologischen Symptomen sowie dem Verlauf der Niemann-Pick-Krankheit C1 [Internetquelle 2].

Die perinatale Verlaufsform manifestiert sich bereits vor dem dritten Lebensmonat. Sie ist vor allem durch eine Hepatosplenomegalie mit einer ausgeprägten Leberfunktionsstörung oder den Fruchttod gekennzeichnet. Des Weiteren können ein Hydrops fetalis, ein Leber- oder Lungenversagen, eine fetale Aszites sowie eine verlängerte fetale Cholestase auftreten. Die neurologischen Symptome dieser Verlaufsform werden in der Regel nicht bemerkt, da sie sich noch nicht manifestiert haben (Vanier 2010, Spiegel et al. 2009) [Internetquelle 2].

Bei der frühinfantilen Form dominiert eine ausgeprägte motorische Entwicklungsstörung. Bei der stärksten Ausprägung dieser Form lernen die betroffenen Kinder nie das Laufen. Zudem treten eine Hepatosplenomegalie, Hörstörungen und vertikale supranukleäre Blickparesen auf.

Diese Verlaufsform manifestiert sich zwischen dem dritten Lebensmonat und dem zweiten Lebensjahr (Vanier 2010) [Internetquelle 2].

Die späte infantile Verlaufsform manifestiert sich zwischen dem zweiten und sechsten Lebensjahr. Sie ist durch eine Hepatosplenomegalie und die Vergrößerung verschiedenster innerer Organe gekennzeichnet. Die neurologischen Symptome sind bereits um ein vielfaches heterogener und ausgeprägter als bei der frühen infantilen Form. Es besteht eine ausgeprägte Fallneigung mit häufigen Stürzen, eine Ungeschicklichkeit und eine progressive Ataxie lässt sich feststellen. Des Weiteren können eine Dystonie, Schluck- und Sprachstörungen sowie Hörstörungen bis hin zum Hörverlust auftreten. Es kommen partielle und/oder generalisierte epileptische Anfälle, eine Kataplexie und vertikale supranukleäre Blickpareesen vor (Vanier 2010) [Internetquelle 2].

Die juvenile Verlaufsform der Niemann-Pick-Krankheit C1 tritt am häufigsten auf, weshalb sie auch als klassische Form bezeichnet wird. Sie manifestiert sich zwischen dem sechsten und fünfzehnten Lebensjahr. Die viszerale Symptomatik wird, wie bei den anderen Formen, durch die Hepatosplenomegalie dominiert. Neurologisch zeigt sich vor allem eine dominierende cerebelläre Komponente. Diese ist durch eine progressive cerebelläre Ataxie mit Störungen der Feinmotorik (Ungeschicklichkeit) und einer ausgeprägten Fallneigung gekennzeichnet. Die Kinder werden anfänglich vor allem durch schulische Probleme, Lernschwierigkeiten und Verhaltensstörungen auffällig. Des Weiteren treten wiederum Dystonie, Dysphagie, Dysarthrie, Hörstörungen bis hin zum Hörverlust, partielle und/oder generalisierte epileptische Anfälle, Kataplexie sowie vertikale supranukleäre Blickpareesen auf. Im weiteren Progress der Erkrankung verschlechtern sich die motorischen Fähigkeiten des Patienten und es kommt zu erheblichen Einschränkungen im Alltag bis hin zu einer Spastik im Spätstadium. Die Lebensspanne der betroffenen Kinder variiert sehr stark, jedoch werden wenige nur älter als 30 Jahre (Vanier 2010) [Internetquelle 2].

Die adulte Form manifestiert sich nach dem 15. Lebensjahr und hat den langsamsten Verlauf von allen Formen. In seltenen Fällen sind einige der inneren Organe vergrößert. Wenn es zu einer Organomegalie kommt, ist dann meistens die Milz betroffen. Die neurologischen Symptome sind dieselben wie bei der juvenilen Form, jedoch sind die Symptome in einer abgeschwächten Ausprägung vorhanden. Hier dominieren vor allem die cerebelläre Ataxie und eine demenzielle Entwicklung im fortgeschrittenen Alter. Zusätzliche neurologische Symptome betreffen meist die Augen und äußern sich in sakkadierten Augenbewegungen sowie einer vertikalen supranukleären Blickparese. Des Weiteren kann es im Alter zu

psychiatrischen Manifestationen kommen (Vanier 2010, Kodam et al. 2010, Abel et al. 2009, Lachmann et al. 2004) [Internetquelle 2].

1.1.1.3 Neuropathologie

Das signifikanteste, diagnostisch wegweisende Symptom der NPC1 ist die vertikale supranukleäre Blicklähmung. Ein weiteres Hauptmerkmal ist die cerebelläre Ataxie. Den verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Symptomen liegen krankheitsbedingte, typische morphologische Veränderungen zu Grunde. Es kommt zur Bildung von Meganeuriten, ektopen Dendriten, neurofibrillären Verwickelungen und axonalen Sphärozyten. Diese Veränderungen werden besonders für die Genese der Demenz und Epilepsie im Rahmen der NPC-Krankheit verantwortlich gemacht. Im Kleinhirn kommt es zu einem starken Verlust der Purkinje-Zellen, welcher vor allem für die Gangataxie, die Dysarthrie und die Dysphagie verantwortlich ist. Der Hippocampus erleidet erstaunlicherweise keinen Zellverlust. Abgesehen vom Zellverlust im Kleinhirn kommt es im gesamten ZNS zum Verlust an Myelin und zur Aktivierung von Mikroglia sowie Astrozyten. Ein progressiver Verlust an Neuronen außerhalb des Kleinhirns ist vor allem im präfrontalen Kortex, im Thalamus und Hirnstamm zu beobachten. Für die vertikale Blickparese ist ein schwerer Zellverlust im rostralen interstitiellen Nucleus des Fasciculus longitudinalis medialis verantwortlich. Den horizontalen Sakkaden liegt eine Degeneration in der paramedianen pontinen Formatio reticularis zu Grunde. Die horizontalen Sakkaden manifestieren sich meistens vor den vertikalen Blickparesen. Die NPC-Pathogenese hat eine gewisse Ähnlichkeit mit der Alzheimer-Genese, denn in NPC-Gehirnen lassen sich ebenfalls erhöhte Spiegel von Amyloid β -verwandten Proteinen in gefährdeten Hirnregionen nachweisen. Dies ist eine weitere mögliche Erklärung für die progressiv fortschreitende Demenz, die sich während der NPC-Krankheit zunehmend manifestiert (Kodam et al. 2010, Patterson et al. 2007, Lachmann et al. 2004).

1.1.1.4 Diagnostik und Differentialdiagnosen

Eine eindeutige Diagnose der Niemann-Pick-Krankheit Typ C zu stellen, ist nicht einfach und die Heterogenität der Symptome führt häufig zu Fehldiagnosen. Aus klinischer Sicht ist die frühe Diagnose sehr wichtig für die Verfügbarkeit einer krankheitsspezifischen Therapie, welche möglicherweise die Erkrankung in ihrem Fortschreiten verlangsamt oder stabilisiert [Internetquelle 3].

Die Hauptdiagnose der Niemann-Pick-Krankheit Typ C wird primär nach einem Verdacht im Labor gestellt. Hierfür nimmt man lebende Hautfibroblasten und stellt nach einer Filipin-Färbung die intralysosomale Cholesterin-Akkumulation dar. Nach der Diagnose erfolgt die Genotypisierung, welche für eine zukünftige pränatale Diagnostik wichtig sein kann (Vanier 2010). Als mögliche Differentialdiagnosen darf man andere Lipidosen, andere Ursachen einer cholestatischen Gelbsucht und die idiopathische neonatale Hepatitis, vor allem bei Kindern, nicht außer Acht lassen (Vanier 2010).

1.1.1.5 Therapie

Die Therapie des Niemann-Pick Typ C erfolgt vor allem symptomatisch. Es existiert aktuell noch keine Kausaltherapie für diese Erkrankung. Als erstes Medikament, welches sich gegen die Pathologie der Krankheit richtet, wurde Miglustat zugelassen (Vanier 2010) [Internetquelle 4]. Es zeigte in Studien eine gute symptomatische Wirkung gegen die verschiedenen Manifestationsformen der NPC (Pineda et al. 2009, Patterson et al. 2007).

Für Cyclodextrine wurden im Tiermodell positive, symptomatische Effekte nachgewiesen (Davidson et al. 2009, Liu et al. 2009). Des Weiteren laufen zu Allopregnanolonen und zu Kombinationstherapien der drei Medikamente Versuche am Tiermodell (Davidson et al. 2009, Liu et al. 2009). Jedoch sind die Ergebnisse der Testreihen noch nicht ausreichend.

Die Prognose der Erkrankung ist sehr stark vom Alter abhängig, in dem die ersten neurologischen Symptome auftreten. Je früher die Symptome auftreten, desto infauster ist die Prognose (Vanier 2010).

Generell können zwei Prinzipien der Therapie unterschieden werden. Es gibt die SRT und die BPT. Bei der SRT handelt es sich um die Substratreduktionstherapie, das heißt, es werden Arzneimittel eingesetzt, um eine Akkumulation eines bestimmten Stoffes oder Stoffwechselproduktes zu vermindern. In diese Kategorie zählt zum Beispiel die Miglustat-Therapie, denn sie reduziert die Cholesterinkonzentration im ZNS als auch in der Peripherie und hat dadurch einen positiven Effekt auf die Symptomatik der NPC1-Patienten. Die BPT (By Product Replacement Therapy) ist eine Substrat-Ersatztherapie, das heißt, es werden Stoffe oder Stoffwechselprodukte, die bei bestimmten Erkrankungen zu wenig im menschlichen Körper vorliegen, durch orale oder anderweitige Applikationen von außen ersetzt. In diese Kategorie zählt zum Beispiel der Therapieversuch mit Allopregnanolon im Tiermodell, welches die bei der NPC vermindert vorliegenden Neurosteroiden im ZNS ersetzen soll.

1.1.1.5.1 Miglustat

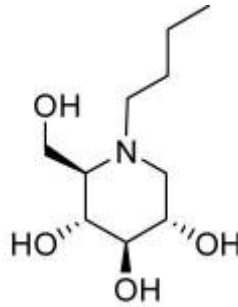


Abb. 4: Strukturformel des Miglustat (Huang et al. 2007)

Miglustat ist ein Arzneistoff, der als Glucose-Analagon wirkt. Im Handel wird es unter dem Namen Zavesca geführt und die genaue chemische Bezeichnung lautet N-butyl-deoxynojirimycin. Miglustat wird seit dem 20. November 2002 zur Therapie zweier seltener lysosomaler Speicherkrankheiten, dem Morbus Niemann-Pick Typ C und dem Morbus Gaucher Typ 1, eingesetzt. Im Falle des Morbus Gaucher Typ 1 wird es vor allem bei leichtem bis mittelschwerem Verlauf der Krankheit verwendet. Bisher ist es bei dieser Erkrankung nur für die Therapie Erwachsener induziert, bei denen eine Enzymsubstitutionstherapie (ERT) kontraindiziert ist. Die Zulassung für die Therapie der Typ 1-Gaucher-Krankheit erfolgte 2002 durch die EPAR und FDA. Beim Morbus Niemann-Pick Typ C wird es vor allem eingesetzt, wenn die neurologische Manifestation dieser Erkrankung immer weiter voranschreitet, das heißt, sehr progressiv ist. Im Gegensatz zur Therapie des Morbus Gaucher Typ 1 wird Miglustat bei der Niemann-Pick-Krankheit sowohl zur Therapie von adulten als auch pädiatrischen Patienten eingesetzt. Offiziell wurde Miglustat erst 2009 durch die EMA für die Therapie der Niemann-Pick-Krankheit Typ C1 zugelassen [Internetquelle 4] (Fachinformationen Zavesca®). Bereits der Off-Label-Use von Miglustat bei Niemann-Pick Typ C1 in den Jahren vor der offiziellen Zulassung zeigte therapeutische Erfolge dieses Medikaments (Ficicioglu 2008, Patterson et al. 2007, Lachmann et al. 2004, Platt et al. 1994).

2007 wurden die Ergebnisse einer prospektiven randomisierten Kontrollstudie aus den USA veröffentlicht. An der Studie nahmen 29 Patienten mit einem Mindestalter von 12 Jahren und 12 pädiatrische Patienten zwischen 4 und 11 Jahren teil. Diese Studie wollte den therapeutischen Nutzen von Miglustat überprüfen. Als primären Messwert für den Erfolg der Therapie wurden die schnellen, horizontal sakkadierten Augenbewegungen ausgewählt, da deren Geschwindigkeit mit der Progression von NPC1 korreliert. Die therapierte Patientengruppe zeigte eine signifikante Verbesserung der Sakkadengeschwindigkeit und

sekundärer Wirkungsvariablen wie Hör- und Schluckfähigkeit gegenüber der untherapierten Kontrollgruppe (Patterson et al. 2007).

2009 wurden durch eine Gruppe um Pineda die Ergebnisse einer großen multizentrischen, retrospektiven Kohortenstudie veröffentlicht. Von der Studie wurden 66 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 12,8 Jahren beim Therapiestart betreut. Mit Hilfe dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass Miglustat zahlreiche andere Symptome der Niemann-Pick-Krankheit Typ C1 positiv beeinflusst. Die therapierten Patienten dieser Studie zeigten deutlich mildere Ausprägungen der Symptome Dysphagie, Dystonie, Dysmetrie, Dysarthrie und Ataxie als die untherapierte Kontrollgruppe. Die Symptome erschienen ebenfalls erst zu einem späteren Zeitpunkt als bei den untherapierten Patienten (Pineda et al. 2009).

Des Weiteren wurde Miglustat in Kombination mit den Stoffen Cyclodextrin und Allopregnanolon untersucht. 2009 veröffentlichte eine Gruppe um Davidson eine Studie am Tiermodell zu diesen drei Stoffen. Die SRT/BPT-Kombinationstherapie zeigte synergistische, positive Effekte der drei Stoffe. Es zeigte sich abermals ein verzögertes Auftreten von neurologischen Symptomen wie Tremor und Ataxie bei den Versuchsmäusen. Dieses konnte durch histologische Untersuchungen erklärt werden, denn Davidson und seine Mitarbeiter stellten fest, dass mit der Kombinationstherapie deutlich weniger Purkinje-Zellen im Kleinhirn der Tiere zu Grunde gehen. Dies steigerte die Lebenserwartung und verminderte die Entwicklungsverzögerung der Versuchstiere (Davidson et al. 2009).

Chemisch gesehen ist Miglustat ein Derivat des in der Natur vorkommenden Moranolin, und zwar ein n-Butyl-Derivat. Es wird in der Industrie sowohl aus Pflanzen als auch aus Mikroorganismen gewonnen. Des Weiteren kann Miglustat als ein kleiner N-alkylierter Iminozucker angesehen werden (Ficicioglu 2008, Patterson et al. 2007, Lachmann et al. 2004).

Da Miglustat ein Glucose-Analogon ist, wirkt es als reversibler, also kompetitiver Inhibitor der Glycosylceramidsynthase. Dieses Enzym ist für die Katalyse des ersten Schrittes der Glycosylceramidbiosynthese zuständig. Hierbei wird Glucose von UDP-Glucose auf Ceramid übertragen, wodurch Glycosylceramid entsteht. Miglustat hemmt die Glycosylceramidsynthase, das heißt es reduziert ihre Aktivität so, dass weniger Glycosylceramid in den Zellen entsteht. Damit hemmt Miglustat den ersten Schritt des zellulären Syntheseweges von Glycosphingolipiden. Durch diese Substratreduktionstherapie wird erreicht, dass die intrazelluläre Akkumulation von Stoffwechselprodukten – Glycosylceramid und andere Glycosphingolipide – wie es für die beiden Krankheiten typisch ist, reduziert wird. Des Weiteren hemmt Miglustat die α -Glucosidase I und II, welche für den

Abbau langkettiger Polysaccharide zu Glucose verantwortlich sind (Ficicioglu 2008, Patterson et al. 2007, Pastores. 2006, Lachmann et al. 2004, Platt et al. 1994).

Miglustat besitzt eine relativ hohe orale Bioverfügbarkeit von 40 bis 60 Prozent, wodurch es sehr gut in Tablettenform verabreicht werden kann, was wir bei unseren Versuchstieren ab dem 23. Lebenstag durch die Verabreichung in Pelletform ausgenutzt haben. Des Weiteren verfügt Miglustat über ein sehr hohes Verteilungsvolumen, das heißt, es diffundiert in viele Organe, bevor es den Körper wieder verlässt. Für die Therapie des Morbus Gaucher Typ 1 und der Niemann-Pick-Krankheit Typ C1 sind hierbei vor allem die ZNS-Gängigkeit und die Passage in Skelett sowie Lunge von Bedeutung. Miglustat kann die Blut-Hirn-Schranke passieren. Dies wurde bereits 2001 in einem Tierversuch getestet und mit positivem Ergebnis nachgewiesen. Miglustat wurde hierbei im Rahmen einer Substrat-Reduktions-Therapie eingesetzt (Zervas et al. 2001). Durch die regelmäßige Verabreichung von Miglustat konnte bei den Versuchsmäusen eine Reduktion der Speicherung und somit auch der Akkumulation von GM2- sowie GM3-Gangliosiden im cerebralen Cortex der Tiere erreicht werden. Dieser positive therapeutische Effekt äußerte sich in einer Verzögerung des Krankheitsverlaufes, das heißt, es kam zu einem späteren Zeitpunkt zum Einsetzen der cerebellären-neurologischen Funktionsstörungen, wie Tremor und Ataxie, als es bei untherapierten Tieren beobachtet wurde. Zusätzlich wurde die Lebenserwartung der therapierten Versuchstiere verlängert (Zervas et al. 2001).

Miglustat wird zum Großteil über die Niere, in einer Kombination aus aktiver Sekretion in die Nierentubuli und freier glomerulärer Filtration, ausgeschieden. Die Leber trägt keinen nennenswerten Beitrag zur Elimination des Miglustat bei. Bis heute sind noch keine Zwischenfälle in der Therapie bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion bekannt.

Da Miglustat hauptsächlich über die Niere ausgeschieden wird, muss die Dosierung des Arzneistoffes dementsprechend bei einer Nierenfunktionsstörung angepasst werden. Ab einer Kreatinin-Entgiftungsleistung (Clearance) von 50 bis 70 ml/min muss die Dosis reduziert werden. Wenn die Kreatinin-Entgiftungsleistung unter 30 ml/min sinkt, ist die Therapie mit Miglustat kontraindiziert.

Das Nebenwirkungsprofil von Miglustat ist relativ vielseitig. Die meisten Nebenwirkungen sind leicht bis mittelstark ausgeprägt, wenn sie auftreten. Es ruft vor allem zu Therapiebeginn gastrointestinale Nebenwirkungen wie Diarrhö, Bauchschmerzen und Blähungen hervor. Weitere, nicht ganz so häufige gastrointestinale Nebenwirkungen sind Verstopfung, Völlegefühl, Verdauungsstörungen, Erbrechen und Übelkeit. Der Durchfall ist vermutlich durch die Inhibition intestinaler Disaccharidasen bedingt. Durch die Hemmung dieser Enzyme

werden die mit der Nahrung aufgenommenen Disaccharide nicht mehr vollständig im Darm gespalten. Aufgrund dessen können die Disaccharide nicht absorbiert werden und es kommt schließlich zu einer osmotischen Diarrhö. Sowohl durch die erhöhte Stuhlfrequenz, als auch durch das Medikament selbst, welches zu einem verminderten Appetit führt, kann es in den ersten Monaten zu einem Gewichtsverlust von ungefähr fünf Kilogramm als nichterwünschte Nebenwirkung kommen. Die Durchfälle können durch eine angepasste Ernährung oder in schlimmeren Fällen durch die Gabe von Loperamid, einem Antidiuretikum, therapiert werden (Ficicioglu 2008, Patterson et al. 2007, Lachmann et al. 2004, Fachinformationen Zavesca®) [Internetquelle 5].

Im ZNS kann es durch Miglustat zu Nebenwirkungen wie Amnesie, Ataxie, Tremor, peripherer Neuropathie, Hypästhesien und Parästhesien sowie Kopfschmerzen kommen. Die periphere Neuropathie äußert sich meist durch ein brennendes Gefühl in den distalen Extremitäten oder führt zu einem Taubheitsgefühl der selbigen. Der Tremor tritt meist während der Anfangsphase der Therapie ein – vor allem im ersten bis dritten Monat – und kann häufig durch eine Dosisreduktion beseitigt oder gelindert werden. Selten wird der Tremor, der meist an der Hand auftritt, so stark, dass die Therapie abgebrochen werden muss. Insgesamt wird der Tremor bei ungefähr 30 Prozent der Therapierten beobachtet (Ficicioglu 2008, Patterson et al. 2007, Pastores. 2006, Fachinformationen Zavesca®) [Internetquelle 5].

Des Weiteren führt Miglustat zur Störung der Spermatogenese bei Männern. In Studien, die an Tieren durchgeführt wurden, zeigte Miglustat eine Reproduktionstoxizität und führte zu Störungen des Geburtsvorganges sowie zu einer verminderten Fruchtbarkeit. Diese Nebenwirkungen lassen sich mit der Plazentagängigkeit von Miglustat erklären (Ficicioglu 2008, Fachinformationen Zavesca®) [Internetquelle 5].

Miglustat beeinflusst auch das blutbildende System und führte in mehreren Studien zu einer Thrombopenie bei den Probanden. Bei einigen Patienten wurden auch psychiatrische Erkrankungen wie Schlaflosigkeit, Depression und verminderte Libido beobachtet.

Zusätzlich wurden bei einigen Patienten Muskelkrämpfe, Muskelschwäche, Erschöpfung, Unwohlsein und eine allgemeine körperliche Schwäche beobachtet (Fachinformationen Zavesca®) [Internetquelle 5].

1.1.1.5.2 Cyclodextrin

Die pharmakologisch und industriell relevanten Cyclodextrine sind ringförmige Oligosaccharide. Sie entstehen beim Abbau der Stärke durch die Cyclodextrin-Glycosyltransferasen. Diese Enzyme lassen sich in der Industrie aus verschiedenen Bakterien

gewinnen, zum Beispiel aus dem *Bacillus macerans*. Von diesen Enzymen wird ein Gemisch aus drei verschiedenen Cyclodextrin-Formen (Alpha- bis Gamma-Cyclodextrin), die aus sechs bis acht alpha-1,4-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen aufgebaut sind, hergestellt. Daher muss das Gemisch nach der Cyclodextrin-Gewinnung gereinigt und die Cyclodextrine in ihre kristalline Form zur Weiterverwendung überführt werden. Durch die ringförmige Struktur entsteht im Inneren der Moleküle ein zentraler Hohlraum (Gröger et al. 2001).

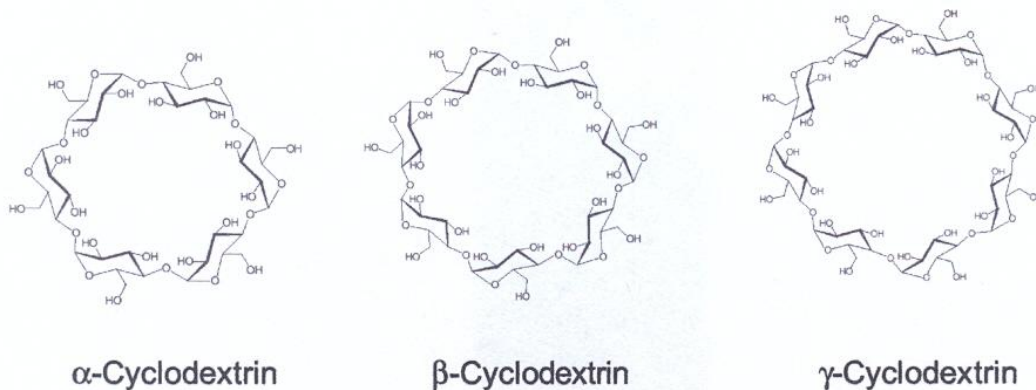


Abb. 5: Strukturformel der Cyclodextrine (Gröger et al. 2001)

Das Besondere an den Cyclodextrinen ist ihr bipolarer Aufbau. Der Hohlraum im Inneren ist hydrophob, wohingegen ihre Außenseite hydrophil ist. Durch diese besonderen chemischen Eigenschaften können die Cyclodextrine mit apolaren Stoffen eine Einschlussverbindung eingehen. Das heißt, sie können in ihren zentralen Hohlraum eine andere, nicht geladene organische Verbindung aufnehmen und somit transportieren (Gröger et al. 2001).

Die einzelnen Glucose-Bausteine des Cyclodextrin ordnen sich in der „Sessel-Form“ an. Durch die „Sessel-Form“ der Glucose-Bausteine und ihrer alpha-1,4-glykosidischen-Verknüpfung zeigen die Ring-Sauerstoffatome und je eine Hydroxymethylgruppe der Glucosen am Cyclodextrin nach außen, weshalb die Außenseite polar ist. Wohingegen die freien Elektronenpaare der Glucose-Untereinheiten in den Innenraum der Cyclodextrine orientiert sind und ihn somit apolar sowie zu einer Lewis-Base machen (Gröger et al. 2001).

Des Weiteren sind die Cyclodextrine in sauren Lösungen, das heißt, Lösungen mit einem kleineren pH-Wert als drei, hydrolysierbar, aber in alkalischen Lösungen stabil. Außerdem weisen die Cyclodextrine durch ihre hydrophile Außenseite eine gute Wasserlöslichkeit auf. Beta-Cyclodextrin hat eine geringere Wasserlöslichkeit als Alpha- und Gamma-Cyclodextrin, da Beta-Cyclodextrin durch die Wechselwirkungen seiner Hydroxylgruppen stabiler ist als die anderen beiden Cyclodextrine (Gröger et al. 2001).

Die Cyclodextrine sind hitzestabil bis 200°C und ihre Wasserlöslichkeit steigt mit zunehmender Temperatur. Gemischt mit organischen Stoffen sinkt die Wasserlöslichkeit der Cyclodextrine, gemischt mit Alkohol steigt sie (Gröger et al. 2001).

Diese besonderen chemischen Eigenschaften machen die Cyclodextrine so vielseitig einsetzbar und dadurch sehr wertvoll für die Pharmazie sowie Lebensmittelindustrie. Die Cyclodextrine können mit bestimmten apolaren, das heißt, ungeladenen Arzneistoffen eine Einschlussverbindung eingehen und diese somit vor Enzymen im menschlichen Körper schützen. Zusätzlich verändern sich die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der gebundenen Arzneistoffe und ihre Halbwertszeit erhöht sich. Diese Art von Inklusionskomplexbildung wird als Wirt-Gast-Beziehung bezeichnet (Gröger et al. 2001, Rajewski und Stella 1996). Damit es zu dieser Beziehung kommt, müssen drei Bedingungen erfüllt sein:

1. Das Gastmolekül muss von seiner räumlichen Struktur und Größe in den konusförmigen Hohlraum des Cyclodextrin passen.
2. Zwischen dem Cyclodextrin und Gastmolekül müssen Wechselwirkungen zustande kommen.
3. Eine geringe Menge an Wasser muss zur Verfügung stehen (Gröger et al. 2001).

Cyclodextrine haben ein geringes bis kein Toxizitätspotenzial, solange sie in reiner Form nicht intravenös verabreicht werden, da sie mit dem im Plasma befindlichen Cholesterin Komplexe bilden, die zu einem Niederschlag auskristallisieren, der Thrombosen hervorruft. Die Cyclodextrine werden von den Enzymen der Speicheldrüsen und des Pankreas kaum anverdaut. Daher gelangen sie unverändert in den unteren Gastrointestinaltrakt und werden schließlich unverändert oder als Metabolite über den Fäzes ausgeschieden. Selbst die Metabolite der Cyclodextrine zeigen keine toxische Wirkung auf den menschlichen Körper. Daher sind die Cyclodextrine wichtige und unbedenkliche Stabilisierer sowie Transportmoleküle für zahlreiche Arzneimittel und andere chemische Stoffe der Industrie (Gröger et al. 2001).

Die Anwendungsmöglichkeiten der Cyclodextrine sind auf Grund ihrer zahlreichen Wirkungsprinzipien vielfältig. Diese beruhen auf den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Cyclodextrine sowie der Möglichkeit einen Wirt-Gast-Komplex zu bilden. Die Cyclodextrine werden häufig in der Pharmaindustrie als Lösungsvermittler eingesetzt, da die Cyclodextrine die Wasserlöslichkeit und die Fließeigenschaften des Gastmoleküls positiv verändern. Des Weiteren werden Cyclodextrine als Stabilisatoren eingesetzt. Sie können das Gastmolekül gegen Hydrolyse, Strahleneinwirkung, thermischen Zerfall und Oxidation

abschirmen. In der Nahrungsmittelindustrie wird die Verminderung von unappetitlichem Geschmack und Geruch durch die Komplexbildung mit Cyclodextrinen ausgenutzt. Außerdem werden Cyclodextrine für eine selektive Trennung durch Adsorption des Gastmoleküls und die Fixierung von flüssigen Stoffen in Pulverform genutzt (Gröger et al. 2001).

Die Pharmaindustrie nutzt mehrere Wirkprinzipien der Cyclodextrine, um Arzneimittel zu verbessern. Zum Beispiel ist Prostavasin ein Prostaglandin, das durch α -Cyclodextrin stabilisiert wird. Dieses Medikament wird bei schweren Durchblutungsstörungen, wie einem „Raucherbein“ verschrieben. Allicin, der Wirkstoff des Knoblauchs, wirkt antifungizid und antibakteriell. Durch die Komplexbildung mit β -Cyclodextrin wird der unangenehme Geruch vermindert und führt somit zu einer höheren Patientencompliance. Des Weiteren wird das Schmerzmittel und Antiphlogistikum Ibuprofen in einer Cyclodextrin-Komplexform verabreicht, weil die komplexe Form eine bessere Wasserlöslichkeit besitzt und damit die Bioverfügbarkeit des Ibuprofen erhöht wird. Cyclodextrine werden als Zusatzstoffe in zahlreichen Augentropfen verwendet, da die Wirkstoffe alleine zu Reizungen der Augen führen würden (Gröger et al. 2001).

In der Kosmetikindustrie werden Cyclodextrine verwendet, um die Kosmetika zu stabilisieren, damit sie tiefer in die Haut eindringen können und um die Kosmetika mit angenehmen Geruchsstoffen zu verbinden. Daher lassen sich Cyclodextrine zum Beispiel in Selbstbräunern, Antiaging-Cremes und Zahnpasten finden (Gröger et al. 2001).

In der Nahrungsmittelindustrie werden Cyclodextrine verwendet, um die Nahrungsmittel länger haltbar zu machen, sie gegen Oxidation und UV-Strahlung zu schützen sowie um schädliche Stoffe aus den Nahrungsmitteln zu extrahieren und Geschmacks- sowie Geruchsstoffe an die Nahrungsmittel zu binden. Daher lassen sich Cyclodextrine zum Beispiel in Pflanzenölen, Vitaminpräparaten wie Vitamin D₃ und Retinol sowie in Zigaretten finden. Des Weiteren werden α - und β -Cyclodextrin verwendet, um zum Beispiel aus Käse und Butter Cholesterin zu entfernen (Gröger et al. 2001).

In verschiedenen Tierversuchen wurde eine hervorragende Wirksamkeit des Cyclodextrin bei der Niemann-Pick-Krankheit Typ C gefunden, wobei es jedoch zuerst lediglich als Transportvesikel für das Medikament Allopregnanolon eingesetzt wurde. Die eigenständige Wirksamkeit des Cyclodextrin stellte sich erst im Laufe verschiedener Testreihen heraus (Davidson et al. 2009, Liu et al. 2009). Es verbessert den bei dieser Krankheit vorliegenden Cholesterin-Transport-Defekt erheblich. Unverestertes Cholesterin und dessen Abbauprodukte, die lysosomal eingeschlossen sind, können nun die Zellen verlassen und

verringern dadurch die schädlichen Akkumulate in den Zellen. Des Weiteren hemmt es die Sterol-Synthese und fördert die Sterol-Ausscheidung mit dem Urin sowie Fäzes. Dadurch sinkt das Gesamtcholesterin der Tiere. Die Cholesterylester, die Ausscheidungsprodukte des Cholesterins, steigen im Plasma der Tiere. Es reguliert das SREBP2 sowie seine Zielgene herab und reduziert die Expression von Makrophagen-assoziierten inflammatorischen Genen, wodurch die hepatische und neurologische Inflammation zurückgeht. Diese Wirkungen sind vor allem im Gehirn, in der Milz, in der Leber und in der Niere zu beobachten. In der Lunge zeigt Cyclodextrin hingegen keine messbare Wirkung. Zusätzlich konnte man in der Leber messen, dass die Konzentrationen der mRNAs der Gene für das SREBP2, die HMG-CoA-Synthase und den LDLR sanken. Alle diese Wirkungen waren bereits 24 Stunden nach der Cyclodextrin-Applikation feststellbar (Taylor et al. 2012, Liu et al. 2010, Davidson et al. 2009).

Zusammengefasst zeigten die Tierversuche, dass Cyclodextrin bei der Niemann-Pick-Krankheit Typ C neuroprotektiv und antiinflammatorisch wirkt. Das heißt, es verlangsamt die Neurodegeneration, die durch die Akkumulation des Cholesterins in den Nervenzellen entsteht, indem es die intraneuronale Ablagerung von Cholesterin und unveresterten Glycosphingolipiden hemmt sowie teilweise rückgängig macht. Des Weiteren hemmt Cyclodextrin die Entzündung in Leber sowie Gehirn und verlängert das Leben der Versuchstiere (Taylor et al. 2012, Liu et al. 2010, Davidson et al. 2009).

2009 führte die Gruppe um Davidson eine NPC-Studie an NPC^{-/-}-Mäusen durch. Die Tiere wurden täglich ab P7 mit Cyclodextrin behandelt. Es zeigte sich, dass Cyclodextrin das Leben der Versuchstiere verlängerte. Es verschob den Manifestationszeitpunkt der klinischen Symptome, vor allem der neurologischen Funktionsstörungen, der NPC-Krankheit nach hinten, reduzierte die intraneuronalen Cholesterin- und Glycosphingolipid-Ablagerungen, führte zu einer Sphingosin-Akkumulation und reduzierte die Marker der Neurodegeneration, das heißt, Cyclodextrin verminderte die krankheitsbedingte Degeneration der Purkinje-Zellen. Diese Studie zeigte also, dass Cyclodextrin den klinischen Ausbruch der Krankheit verzögert, die intraneuronale Akkumulation vermindert und das Leben der Versuchstiere verlängert. Zusätzlich stellte die Gruppe um Davidson aufgrund ihrer eigenen Ergebnisse und der anderer Studien als erste die Vermutung auf, dass Cyclodextrin alleine einen enorm positiven Effekt auf den Verlauf der NPC-Krankheit hat. Davidson und seine Mitarbeiter sagen sogar, dass Cyclodextrin zur stärksten Verbesserung der NPC-Symptome bei einer Dauertherapie im Tiermodell führt (Davidson et al. 2009).

Die Gruppe um Liu führte ebenfalls 2009 eine Studie zur Therapie mit Cyclodextrin an NPC^{-/-}-Mäusen durch. Ihre Ergebnisse zeigten, dass schon einzelne Injektionen von Cyclodextrin ab P7 eine Erhöhung der Lebenserwartung der Versuchstiere und Verminderung der Degeneration der Purkinje-Zellen bewirkt (Liu et al. 2009).

2013 wurde Cyclodextrin in Japan zur Therapie zweier NPC-Patienten eingesetzt. Bei beiden Patienten zeigte sich ein Rückgang der Hepatosplenomegalie und eine vorübergehende Besserung der zerebralen Dysfunktion in der Elektroenzephalographie (Matsuo et al. 2013).

1.1.1.5.3 Allopregnanolon

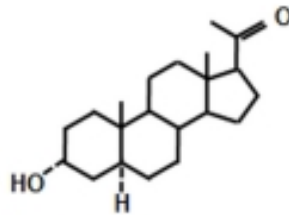


Abb. 6: Strukturformel der Allopregnanolone (Schumacher et al. 2012)

Allopregnanolon gehört in die Substanzklasse der Allopregnanolone. Allopregnanolone sind Neurosteroid, die im Blut und Gehirn vorkommen. Sie entstehen als Stoffwechselprodukte des Progesterons. Im menschlichen Körper werden Allopregnanolone physiologischerweise in der Nebennierenrinde produziert und de novo von den Gliazellen des Gehirns aus Cholesterol synthetisiert. An der Bildung sind die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und die 5 α -Reduktase beteiligt (Baulieu und Schumacher 2000, Compagnone und Mellon 2000, Robel und Baulieu 1994). In Stresssituationen kommt es zu einer akuten Erhöhung der Produktion, während einer Schwangerschaft und der Menstruation der Frau besteht eine chronische Erhöhung der Produktion (Hovakimyan et al. 2013, Turkmen et al. 2010).

Allopregnanolon ist ein sehr potenter, endogener Ligand des γ -Aminobuttersäure-A-Rezeptors (GABA_A-Rezeptor). Durch eine Bindung des Allopregnanolon an den Rezeptor kommt es zu einer allosterischen Modulation am Rezeptorkomplex, welche bewirkt, dass die GABA_A-Wirkung am GABA_A-Rezeptor stark potenziert wird. Hohe Konzentrationen von Allopregnanolon am Rezeptor können sogar direkt zu einer Öffnung des Chlorid-Kanals des GABA_A-Rezeptors führen. Dies bewirkt einen Einstrom von einfach negativen Chlorid-Ionen in die Zelle. Die Zellmembran der Zelle wird dadurch hypopolarisiert, was im ZNS zu einer verminderten Erregbarkeit führt. Die GABA_A-Rezeptoren sind die wichtigste inhibitorische Komponente des ZNS (Hovakimyan et al. 2013, Turkmen et al. 2010, Liu et al. 2002). Durch

diesen typischen inhibitorischen Effekt des Allopregnanolon entstehen die Wirkungen Sedation, Antikonvulsion, Analgesie und Anxiolyse (Herd et al. 2007).

Allopregnanolon hat eine relativ kurze Halbwertszeit, aber eine langfristige Clearance, da es ein großes Verteilungsvolumen hat, an dem das Fettgewebe einen großen Anteil aufweist. Des Weiteren verteilt sich Allopregnanolon nach seiner Applikation zügig im ZNS, weil es die Blut-Hirn-Schranke schnell und einfach passieren kann. Im ZNS ist es an der neuronalen Plastizität und einer erhöhten selektiven Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_4 und δ beteiligt (Turkmen et al. 2010). Zusätzlich ist Allopregnanolon an der Regulation der Myelinisierung von Nerven im PNS und ZNS durch Gliazellen beteiligt (Baulieu und Schumacher 2000).

Bei Niemann-Pick-Patienten konnte ein Mangel an Allopregnanolon festgestellt werden. Auch in NPC1-Tiermodellen wurde ein reduziertes Vorliegen von Neurosteroiden und eine altersabhängige Senkung der Expression der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sowie der 5 α -Reduktase besonders im Kleinhirn nachgewiesen (Griffin et al. 2004). Durch eine Substratersatztherapie - BPT - mit Allopregnanolon im Maus-Modell konnte die Purkinje-Zellzahl erkrankter Tiere teilweise wieder angehoben werden oder zumindest der Verlust verlangsamt werden. Des Weiteren konnte ein Rückgang der Gangliosid-Akkumulation in den Neuronen beobachtet werden und somit die Lebenszeit der Versuchstiere verlängert werden (Griffin et al. 2004, Maass et al. 2015, Hovakimyan et al. 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Allopregnanolon die neurologischen Symptome lindert, das Neuronen-Überleben steigert, die Reaktivität der Astrozyten verbessert wird und die Aktivität der Mikroglia deutlich inhibiert wird (Hovakimyan et al. 2013, Maass et al. 2015).

Unter einer Dauertherapie mit Allopregnanolon kommt es im Laufe der Therapie zu einer reduzierten Rezeptor-Antwort sowie zu einer Abregulation der peripher und zentral exprimierten Rezeptoren. Dies ist eine klassische Toleranzentwicklung, an die bei einer Allopregnanolon-Therapie immer gedacht werden muss, um die richtige Dosis und Therapiedauer zu wählen (Turkmen et al. 2010).

Des Weiteren wirkt Allopregnanolon im Gehirn auf die Hypophysen-Hypothalamus-Gonaden-Achse. Es bewirkt eine Senkung der Serum-FSH- und -LH-Spiegel. Aufgrund dieser Wirkung konnte in einem Ratten-Versuch gezeigt werden, dass Allopregnanolon den Eisprung hemmt und zu einer verminderten Oozyten-Zahl führt, das heißt, es hemmt bei Weibchen die Reproduktion (Timby et al. 2011).

Allopregnanolon ist schwer in Wasser zu lösen und muss daher für die therapeutische Verabreichung in einem Transportmedium gelöst werden. Für die Therapie im Mausmodell bei BPT wurde Allopregnanolon zusammen mit Cyclodextrin als Transportvehikel verabreicht. Allopregnanolon zeigte dabei lediglich in Kombination mit Cyclodextrin einen positiven Wirkeffekt, daher ergibt sich die Frage, ob Allopregnanolon wirklich eine eigene Wirkkomponente in der Therapie hat (Davidson et al. 2009, Liu et al. 2009).

2009 wurde eine NPC1-Studie an Fibroblastenkulturen durch eine Gruppe um Zampieri S. durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine positive protektive Wirkung des Allopregnanolon gegenüber oxydativem Stress (Zampieri et al. 2009). Oxydativer Stress wird aktuell als weiterer wichtiger Faktor in der Pathogenese des NPC1 diskutiert (Vázquez et al. 2012)

1.2 NPC1-Tiermodelle

Die NPC1-Tiermodelle dienen der Erforschung neuer Therapieansätze für die seltene Niemann-Pick-Krankheit Typ C1, für welche bis heute lediglich Miglustat als Therapie zugelassen ist. Diese Medikamentenstudien an Mäusen sind unerlässlich für die spätere Anwendung am Menschen.

Am häufigsten wird heutzutage das BALB/c-Mausmodell von der Gruppe um Peter Pentchev angewendet. Die Mäuse dieses Modells besitzen das *NPC1-NIH*-Allel, welches lediglich bei Homozygotie zur Ausprägung kommt. Somit basiert das Modell auf einer spontan vorkommenden Mutation mit Sequenzinsertion und Sequenzdeletion im *NPC1*-Gen. Diese Sequenzveränderungen führen zum Funktionsverlust des NPC1-Proteins, für welches das NPC1-Gen codiert (Loftus et al. 1997). Erstmals wurde das Modell 1980 von der Gruppe um Pentchev beschrieben. In den Geweben der Tiere konnte eine stark verminderte Aktivität der Glucocerebrosidase und Sphingomyelinase nachgewiesen werden. Dies korreliert mit der vermehrten Akkumulation von Glucocerebrosiden und Sphingomyelin in zahlreichen Geweben. Dies entspricht fast genau dem Phänotyp eines Niemann-Pick Typ C1-Patienten (Pentchev et al. 1980). Des Weiteren konnte in den Geweben der Mäuse eine erhöhte Cholesterollagerung registriert werden (Morris et al. 1982). Diese Ablagerungen führen zu einer ausgeprägten Neurodegeneration, die sich in einem Verlust von 96 Prozent der Purkinje-Zellen im Verlauf der Erkrankung äußert und sich in einer klinisch sichtbaren ataktischen Koordinationsstörung der Versuchstiere manifestiert (Yamada et al. 2001, Higashi et al. 1993, Tanaka et al. 1988). Die Versuchsmäuse dieses Modells sterben zwischen dem 80. und 120. postnatalen Tag (Morris et al. 1982).

Ein weiteres, jedoch relativ selten verwendetes Modell ist das C57BL/6J NPC1^{spm}-Modell. Es basiert ebenfalls auf einer spontan auftretenden Mutation, die im Phänotyp stark dem der NPC1-Patienten ähnelt (Miyawaki et al. 1986).

Eine Arbeitsgruppe um Maue und Erikson hat ein neues Tiermodell entwickelt. Bei den Mäusen dieses Modells findet sich eine „Missense“-Punktmutation, das heißt, es erfolgt der Einbau einer falschen Aminosäure in das Protein, für welches das betroffene Gen codiert (Maue et al. 2012). Bei dieser Mutation wurde lediglich an Position 1005 eine Base ausgetauscht. Dadurch ähnelt der Phänotyp der Tiere stärker der humanen NPC1-Erkrankung. Daher sollte bei zukünftigen Versuchen dieses Tiermodell mehr Beachtung finden. Des Weiteren handelt es sich bei dieser Mutation um die am häufigsten vorkommende Mutationsvariante bei NPC1-Erkrankten (Maue et al. 2012, Park et al. 2003).

1.3 Accelerod

Accelerod ist ein Experiment zur Überprüfung der Motivation und des motorischen Lernverhaltens der Mäuse (Jones und Roberts 1968, Barlow et al. 1996). Bei diesem Test wurden vor allem das Gleichgewicht, die motorische Koordination und auf eine mögliche Ataxie der Versuchstiere getestet (Jones und Roberts 1968). Das Accelerod (Beschleunigungstest) ist sensitiver in der Erfassung von motorischen Defiziten und liefert konstantere Ergebnisse als der Rota Rod-Test (Bogo et al. 1981). Dieser Test wurde an P35 und P60 – dem 35. und 60. Lebenstag – mit den Tieren durchgeführt.

Accelerod ist ein weit verbreiteter und international anerkannter Test zur Prüfung der motorischen Fähigkeiten von Nagetieren. Erstmals wurde er 1968 von Jones und Roberts entwickelt und in den folgenden Jahren mehrfach im Rahmen von Studien und Dissertationen verwendet. Wir entschieden uns für Accelerod, da es sich hierbei um einen sehr validen Test zur Prüfung der Motorik unserer Versuchsmäuse handelt und dieser Test sicherstellt, dass unsere Ergebnisse sowohl international als auch mit den vorausgegangenen Experimenten von Maass und Petersen vergleichbar sind (Jones und Roberts 1968, Barlow et al. 1996, Hovakimyan et al. 2013, Dissertation Maass 2013, Dissertation Petersen 2014).

1.4 Morris Water Maze

Das Morris Water Maze ist ein Experiment zur Überprüfung des räumlichen Lernverhaltens sowie des Gedächtnisses der Mäuse. Dieser Test wurde von Richard G. Morris entwickelt (Morris 1984, Morris et al. 1982, Hodges 1996, Karl et al. 2003). Dieser Versuch wurde an P49 mit den Tieren durchgeführt.

Morris Water Maze ist ein anerkannter Test zur Prüfung des räumlichen Lernverhaltens von Nagetieren. Damit auch hier unsere Ergebnisse sowohl international als auch mit den vorausgegangenen Experimenten von Maass und Petersen vergleichbar sind, entschieden wir uns für diese Testvariante (Morris 1984, Hodges 1996, Karl et al. 2003, Dissertation Maass 2013, Dissertation Petersen 2014).

1.5 Zielsetzung der Dissertation

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Forschungsergebnisse der NPC-Arbeitsgruppe, die in mehreren Publikationen vorliegen, zu erweitern (Hovakimyan et al. 2013, Maass et al. 2015, Hovakimyan et al. 2011). Die Autoren hatten Studien zur Kombinationstherapie aus Miglustat, Allopregnanolon und Cyclodextrin an NPC1-Mutanten-Mäusen am Institut der Anatomie der Universität Rostock durchgeführt. In diesen Studien wurde die Wirksamkeit der Kombinationstherapie bei NPC1-mutierten Mäusen durch einen Vergleich zwischen therapierten und scheinbehandelten Mäusen nachgewiesen. Für die Verhaltenstests Accelerod und Morris Water Maze konnten unterschiedliche Ergebnisse der Pharmakotherapie erzielt werden. Während sich bei dem Accelerod eine signifikante Verbesserung der therapierten NPC1-Tiere im Vergleich zu den untherapierten NPC1-Tieren zeigte (Dissertation Petersen 2014), erzielten die therapierten NPC1-Tiere im Morris Water Maze ein signifikant schlechteres Ergebnis als die scheinbehandelten NPC1-Mäuse (Dissertation Maass 2013). Diese Ergebnisse galt es nun mit größeren und weiteren Tiergruppen gesunder Wildtyp-Mäuse zu erweitern, um den Effekt der für die NPC-mutierten Mäuse angewandten Therapie in Wildtyp-Mäusen zu studieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bisher verwendeten Versuchs- und Therapietechniken angewendet. Es sollte an größeren Versuchsgruppen geprüft werden, ob eine Kombinationstherapie oder eine ausschließliche Miglustat-Therapie bei gesunden Wildtyp-Mäusen zu Verhaltensänderungen führt.

1.6 Fragestellungen und Hypothesen zur Arbeit

1.6.1 Fragestellungen

Bevor die Fragestellungen dieser Arbeit betrachtet werden, müssen die Versuchsgruppen definiert werden.

Die Sham 1-Gruppe ist eine Kontrollgruppe. Dieser Gruppe wurden weder Medikamente noch Lösungsmittel injiziert. Sie bekamen lediglich intraperitoneale „Leer-Injektionen“

entsprechend dem Therapieplan der anderen Versuchsgruppen, damit die Tiere nicht unterschiedlich oft von der versuchsausführenden Person in die Hand genommen wurden.

Als zweite Kontrollgruppe wurde Sham 2 in die Studie mit aufgenommen. Diese Gruppe wurde entsprechend ihres Körpergewichts mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung und Ringerlösung äquivalent zu den Therapieplänen der anderen Versuchsgruppen intraperitoneal injiziert. Diese Gruppe wurde in die Tests mit aufgenommen, um auszuschließen, dass bereits die Lösungsmittel der jeweiligen Medikamente einen positiven oder negativen Effekt auf das Verhalten der Tiere haben. Auch diese Tiere wurden somit genauso häufig in die Hand genommen und injiziert wie die pharmakotherapierten Mäuse.

Die Kombi-Gruppe ist eine Experimentalgruppe. Diese Gruppe wurde entsprechend der Literaturangaben mit der vollständigen 3er-Kombination der Medikamente Miglustat (gelöst in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung), Cyclodextrin und Allopregnanolon (gelöst in Ringerlösung) intraperitoneal injiziert. Die Kombination wurde an festgelegten Tagen verabreicht (Hovakimyan et al. 2011, Davidson et al. 2009). Diese Gruppe wurde in die Versuchsreihen mit aufgenommen, weil die Kombinationstherapie mit Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon der bisherigen Standardtherapie entspricht.

Die vierte Gruppe der Studie ist die Miglustat only-Gruppe. Diese Gruppe wurde mit Miglustat gelöst in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert und bekam zu den Zeitpunkten, an denen Cyclodextrin und Allopregnanolon in der Kombinationstherapie an der Reihe gewesen wären, äquivalente Volumina an Ringerlösung intraperitoneal injiziert.

Für diese Dissertation ergaben sich vier Fragestellungen:

1. Gibt es einen Unterschied zwischen der Sham 1- und der Sham 2-Gruppe? Das heißt, es soll geprüft werden, ob schon die Lösungsmittel alleine einen positiven oder negativen Effekt auf das Verhalten der Versuchstiere haben.
2. Gibt es einen Unterschied zwischen der Kombi-Gruppe und der Sham 2-Gruppe? Das heißt, wir wollen herausfinden, ob die therapierten Tiere, die eine 3er-Kombi aus Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon bekommen haben, in unseren Tests anders abschneiden, als die Mäuse, denen ausschließlich physiologische Kochsalzlösung und Ringerlösung gespritzt wurde.
3. Besteht ein Unterschied zwischen der Miglustat only-Gruppe und der Sham 2-Gruppe? Es gilt also zu ermitteln, ob Miglustat als Monotherapie einen positiven Effekt auf unsere Versuchstiere hat.

4. Treten Unterschiede im Verhalten zwischen der Kombi-Gruppe und der Miglustat only-Gruppe der gesunden Wildtyp-Mäuse auf? Das heißt, haben die bei Morbus Niemann Pick verwendeten Medikamente (3er-Kombination) einen anderen Effekt als Miglustat alleine auf gesunde Wildtyp-Tiere?

1.6.2 Hypothesen

Für unsere Versuchsabläufe wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Miglustat only und/oder die 3er-Kombi-Therapie mit Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon haben einen förderlichen Effekt auf die motorische Entwicklung und Leistung von gesunden Tieren.
2. Miglustat only und/oder die 3er-Kombi-Therapie fördern das räumliche Lernen der Tiere.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die in unseren Experimenten verwendeten Versuchstiere (Wildtyp-BALB/c-Zuchtmäuse) stammten aus den Charles River Laboratories (Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, Germany). Von dort wurden schwangere Muttertiere bezogen. Für die Experimente verwendeten wir lediglich Wildtyp-Mäuse, da wir überprüfen wollten, ob die von uns verwendeten Pharmakotherapeutika bei gesunden Tieren zu einem Effekt führen.

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Institutes für Anatomie in Rostock bei einer künstlichen Beleuchtung im stetigen 12 Stunden-Wechsel zwischen Tag und Nacht sowie einer Temperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten.

Ab dem postnatalen Tag P23 wurden die Jungtiere von ihren Müttern getrennt und in Gruppenhaltung gebracht. Die verwendeten Käfige waren vom Typ Ehret II und 207 mm x 140 mm x 265 mm groß. Ab diesem Tag wurden die Mäuse entsprechend ihres Gewichts mit Pellets (Sniff, Soest, Deutschland) ernährt. Wasser konnten die Tiere jederzeit über eine am Käfig hängende Flasche trinken.

Zur genauen Dosierung der Pharmakotherapeutika wurden die Tiere regelmäßig mit einer Digitalwaage gemessen.

Am postnatalen Tag P70 wurden die Versuchsmäuse schmerzfrei durch eine Überdosis Pentobarbital-Natrium (Serva, Deutschland) getötet.

Insgesamt waren 81 männliche Wildtyp-Mäuse im Rahmen dieser Dissertation an den Tests beteiligt. Die Tiere wurden zunächst in vier Gruppen eingeteilt (siehe Kapitel 2.2).

Alle Experimente wurden unter Einhaltung der gültigen gesetzlichen Bestimmungen und mit Erlaubnis der örtlichen Kontrollbehörde Mecklenburg-Vorpommerns (Zulassungs-ID: 7221.3-1.1-088/10) durchgeführt. Alle institutionellen Richtlinien für den Tierschutz und das experimentelle Verhalten wurden befolgt. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, um ein Leiden der Tiere zu minimieren.

2.2 Versuchsgruppen

Für die Untersuchung der Wirkung von Miglustat haben wir mit vier verschiedenen Tiergruppen gearbeitet. Die Gruppen wurden *Sham 1*, *Sham 2*, *Kombi* und *Miglustat only* genannt. Für die Versuche wurden nur männliche Tiere – Mäuse vom Wildtyp – verwendet.

Sham 1 war eine Gruppe, bestehend aus 14 Mäusen. Diese Gruppe wurde in die Tests aufgenommen, um sie mit der *Kombi*- und *Miglustat only*-Gruppe zu vergleichen. Die Tiere bekamen entsprechend des Therapieplans eine intraperitoneale Leer-Injektion, das heißt, ihnen wurden 0 Milliliter gespritzt. Die Leer-Injektion erfolgte jeweils zu den Zeiten, an denen die medikamentierten Tiere ihre Arzneimittel verabreicht bekamen. Durch die regelmäßigen Leer-Injektionen sollte verhindert werden, dass die Tiere weniger als die anderen Mäuse in die Hand genommen wurden und dadurch ein anderes Verhalten in den Versuchsreihen zeigen.

Sham 2 umfasste 15 Tiere. Diese Tiere wurden entsprechend ihres Körpergewichts mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung und Ringerlösung intraperitoneal injiziert. Sie wurden in der gleichen Häufigkeit und mit den gleichen Flüssigkeitsmengen wie die *Kombi*-Gruppe entsprechend desselben Therapieplans gespritzt. Diese Gruppe wurde in die Tests aufgenommen, um sie mit der *Kombi*- und *Miglustat only*-Gruppe zu vergleichen und auszuschließen, dass bereits die Lösungsmittel der jeweiligen Medikamente einen Effekt auf das Verhalten der Tiere haben.

In der *Kombi*-Gruppe befanden sich 27 Versuchstiere, von denen eine Maus während der Experimente starb, sodass diese komplett aus der Auswertung herausgenommen und mit 26 Tieren weitergearbeitet wurde. Diese Gruppe wurde entsprechend der Literaturangaben mit der vollständigen 3er-Kombination der Medikamente Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon therapiert. Miglustat wurde in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung und Cyclodextrin sowie Allopregnanolon wurden in Ringerlösung gelöst. Diese Lösungen wurden beide entsprechend des Körpergewichts der Mäuse intraperitoneal appliziert. Die Kombination wurde an den festgelegten Tagen verabreicht (Hovakimyan et al. 2011,

Davidson et al. 2009). Diese Gruppe wurde in die Versuchsreihen mit aufgenommen, um den Effekt der NPC-Standardtherapie auf gesunde Wildtyp-Mäuse zu untersuchen.

Die Miglustat only-Gruppe war eine Gruppe aus 31 Mäusen. Zwei Versuchstiere verstarben und drei Männchen stellten sich im fortgeschrittenen Alter als Weibchen heraus, woraufhin diese fünf Tiere aus den Versuchsreihen herausgenommen wurden und ihre Ergebnisse nicht in die Auswertung mit einfließen. Diese Gruppe bekam zur selben Zeit wie die Kombi-Gruppe Miglustat gelöst in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht und zu den Zeitpunkten, an denen Cyclodextrin und Allopregnanolon an der Reihe gewesen wären, bekamen die Tiere äquivalente Volumina an Ringerlösung intraperitoneal injiziert. Auch diese Gruppe wurde entsprechend ihres Körpergewichts therapiert.

2.3 Therapieschemata der Versuchsgruppen

	P0	P1 - P6	P7	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P28	P35	P42	P49	P56	P63	P70	
Geburt		Heranwachsen	Start CD-Allo alle 7d i.p.																						
			Start Miglu täglich i.p. bis P22														Start Miglu in Futter-Pellets gepresst								
Kombi-Gr.		CD-Allo	x					x								x		x	x	x	x	x	x	x	
		Miglu		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Start Miglu in Futter-Pellets gepresst							
Sham 1-Gr.		Leer-Inj. für CD-Allo → Stich	x					x								x		x	x	x	x	x	x	x	
		Leer-Inj. für Miglu → Stich		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Futter-Pellets ohne Medikamente								
Sham 2-Gr.		Ringerlsg. i.p. für CD-Allo	x					x								x		x	x	x	x	x	x	x	
		0,9%ige NaCl-Lsg. i.p. für Miglu		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Futter-Pellets ohne Medikamente								
Miglu only-Gr.		Ringerlsg. i.p. für CD-Allo	x					x								x		x	x	x	x	x	x	x	
		Miglu		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		Start Miglu in Futter-Pellets gepresst								

Abb. 7: Tabellarische Darstellung des Therapieplanes und der Injektions-Zeitpunkte

2.3.1 Sham 1



Abb. 8: Schematische Darstellung der Sham 1-Therapie

Die Tiere der Sham 1-Gruppe wurden ab ihrem 7. Lebenstag einmal wöchentlich leer injiziert, um das Handling der Kombinationsbehandlung aus Allopregnanolon und Cyclodextrin nachzuahmen. Das heißt, sie wurden an P7, P14, P21, P28, P35, P42, P49, P56, P63 und P70 entsprechend der CD-Allo-Termine leer injiziert. Vom 10. bis zum 22. Lebenstag P10 - P22 kamen tägliche Leer-Injektionen hinzu, um die Miglustat-Therapie der Kombi- und Miglustat

only-Gruppe nachzuahmen. Ab dem 23. Lebenstag wurde in den anderen Gruppen die Miglustat-Therapie in Pelletform durchgeführt, dadurch entfielen die täglichen Leer-Injektionen in der Sham 1-Gruppe und die Mäuse erhielten nun nur noch weiter ihre Futter-Pellets ohne Miglustat-Beisatz und die wöchentlichen Leer-Injektionen entsprechend der CD-Allo-Termine.

2.3.2 Sham 2

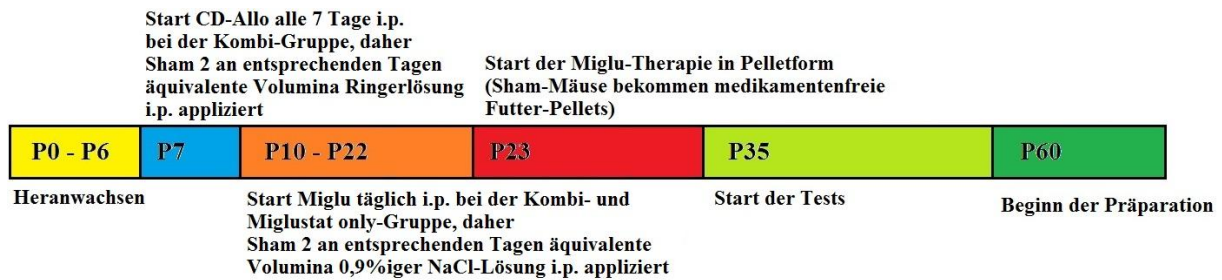


Abb. 9: Schematische Darstellung der Sham 2-Therapie

Das Therapieschema der Sham 2-Gruppe entspricht dem der Sham 1-Gruppe, jedoch wurden keine Leer-Injektionen zu den entsprechenden Zeitpunkten durchgeführt, sondern äquivalente Volumina Ringerlösung an den CD-Allo-Terminen und äquivalente Volumina 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung an den Terminen der Miglustat-Therapie verabreicht. Die Tiere dieser Gruppe bekamen von P10 bis P22 täglich 0,9-prozentige Natriumchloridlösung intraperitoneal injiziert, um das Handling der Miglustat-Therapie nachzuahmen. Um die Kombitherapie aus Allopregnanolon und Cyclodextrin nachzuempfinden sowie einen Effekt durch die Ringerlösung ebenfalls auszuschließen, wurde einmal wöchentlich ab P7 ein äquivalentes Volumen Ringerlösung zur CD-Allo-Therapie intraperitoneal injiziert. Daher ergaben sich in dieser Gruppe ebenfalls die Injektionstermine P7, P14, P21, P28, P35, P42, P49, P56, P63 und P70 für die Ringerlösung.

2.3.3 Kombi-Gruppe

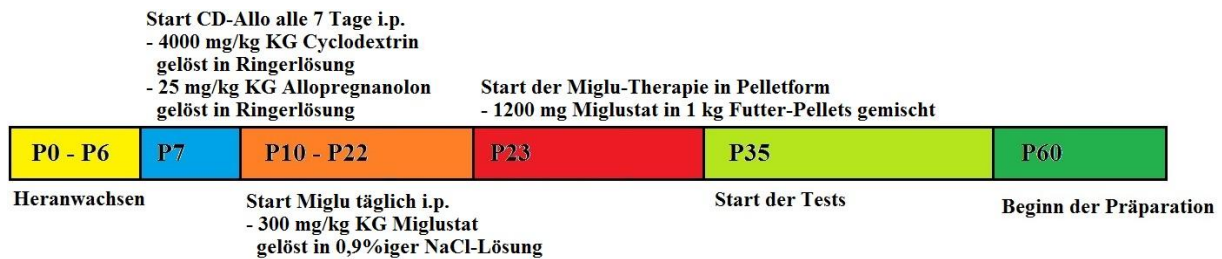


Abb. 10: Schematische Darstellung der Kombi-Therapie

Die Versuchstiere wurden ab ihrem 7. Lebenstag wöchentlich mit einer Kombinationsbehandlung aus Allopregnanolon und Cyclodextrin gelöst in Ringerlösung entsprechend ihres Körpergewichts durch eine intraperitoneale Injektion therapiert. Die Cyclodextrin-Behandlung wurde über den gesamten Zeitraum mit 4.000 mg pro kg Körpergewicht 1 x pro Woche durchgeführt. Allopregnanolon wurde während der gesamten Therapie 1 x pro Woche in einer Dosierung von 25 mg pro kg Körpergewicht verabreicht. Ab dem 10. Lebenstag wurden die Tiere zusätzlich täglich entsprechend ihres Körpergewichts mit Miglustat behandelt. Die Miglustat-Therapie erfolgte vom 10. bis zum 22. Lebenstag durch eine intraperitoneale Injektion. Während dieser Zeitspanne bekamen die Versuchsmäuse 1 x täglich 300 mg pro kg Körpergewicht Miglustat gelöst in 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung verabreicht. Ab dem 23. Lebenstag wurde Miglustat in Pelletform (Futterbeimischung) verabreicht. Die Futterpellets enthielten 1.200 mg Miglustat je kg Futter.

2.3.4 Miglustat only-Gruppe

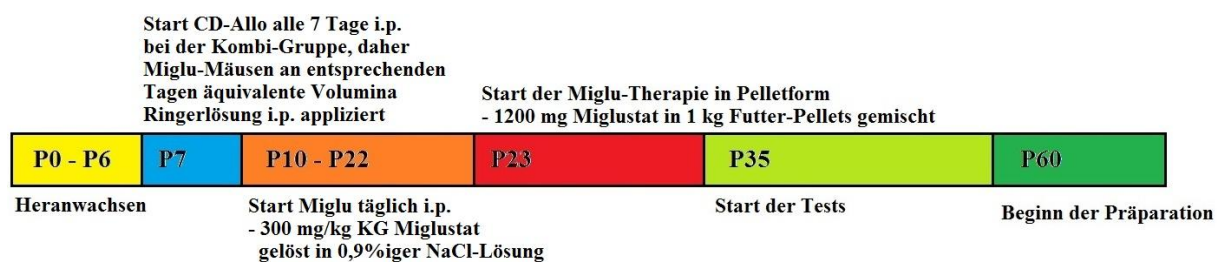


Abb. 11: Schematische Darstellung der Miglustat-Therapie

Die Mäuse der Miglustat only-Gruppe bekamen ab dem 7. Lebenstag entsprechend des CD-Allo-Therapiekonzepts äquivalente Volumina Ringerlösung intraperitoneal injiziert, um das Handling der Kombinationsbehandlung mit Cyclodextrin und Allopregnanolon nachzuahmen. Daher ergaben sich die Injektionstermine P7, P14, P21, P28, P35, P42, P49, P56, P63 und P70 für die Ringerlösung. Ab dem 10. Lebenstag kam die Miglustat-Therapie entsprechend des in 2.3.3 beschriebenen Schemas hinzu. Es erfolgten von P10 bis P22 tägliche Injektionen

von 300 mg Miglustat pro kg Körpergewicht gelöst in 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung. Vom 23. Lebenstag an erfolgte auch in dieser Gruppe die Verabreichung von Miglustat in Pelletform. Es wurden 1.200 mg Miglustat je kg Futter in die Pellets gepresst.

2.4 Versuchsabfolge

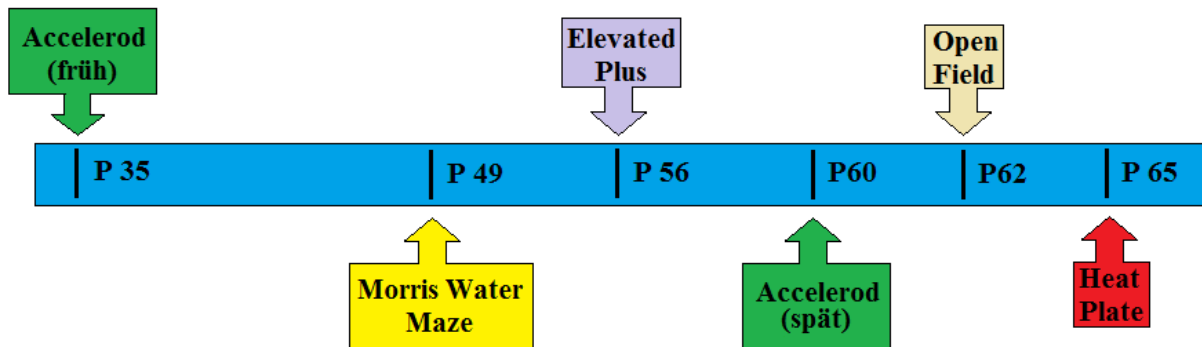


Abb. 12: Versuchsabfolge der Maustests (Elevated Plus, Open Field und Heat Plate wurden von einem weiteren Doktoranden der NPC-Arbeitsgruppe des Instituts für Anatomie Rostock im Rahmen eines Gesamtprojektes durchgeführt.)

Im Zuge der Experimente wurden mit den Mäusen sechs Tests durchgeführt. Am 35. Lebenstag der Tiere wurde mit Accelerod (früh) begonnen. Dieser Versuch erstreckte sich über drei Tage, wobei die Übungsdurchgänge am 33. und 34. Lebenstag sowie ein weiteres Training vor dem Test am 35. Lebenstag der Tiere durchgeführt wurden. Am 49. Lebenstag wurde der Morris-Water-Maze-Test durchgeführt, der sich ebenfalls über drei Tage erstreckte. Die zwei Tage vor dem eigentlichen Test wurden für das Training der Mäuse genutzt. Beim Morris Water Maze-Test handelt es sich sowohl um einen Motorik- als auch Verhaltens- und Gedächtnistest. Elevated Plus wurde am 56. Lebenstag der Tiere durchgeführt und dauerte jeweils einen Tag pro Gruppe. Elevated Plus ist ein Verhaltenstest, bei dem es vor allem um das Angstverhalten der Tiere geht. Am 60. Lebenstag wurde Accelerod (spät) durchgeführt, wobei wiederum zwei Tage vorher die Übungsdurchgänge stattfanden. Zwei Tage später – am 62. Lebenstag der Tiere – folgte der Open Field-Test, der einen Tag pro Gruppe in Anspruch nahm. Mit Open Field sollte die Spontanaktivität und das Angstverhalten der Mäuse getestet werden. Zu guter Letzt wurde am 65. Lebenstag der Test auf der Hitzeplatte durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Schmerztest, mit dem eine mögliche periphere Neuropathie als Nebenwirkung der eingesetzten Arzneistoffe ausgeschlossen oder nachgewiesen werden sollte.

Im Folgenden führe ich einen ausführlichen Ablaufplan an:

01.03.12	17:00	Accelerod (früh) Sham 1 und 2
02.03.12	17:00	Accelerod (früh) Sham 1 und 2
03.03.12	17:00	Accelerod (früh) Sham 1 und 2
06.03.12	17:00	Accelerod (früh) Kombi
07.03.12	17:00	Accelerod (früh) Kombi
08.03.12	17:00	Accelerod (früh) Kombi
10.03.12	17:00	Accelerod (früh) Miglustat only
11.03.12	17:00	Accelerod (früh) Miglustat only
12.03.12	17:00	Accelerod (früh) Miglustat only
15.03.12	14:00	Morris Water Maze Sham 1 und 2
16.03.12	14:00	Morris Water Maze Sham 1 und 2
17.03.12	14:00	Morris Water Maze Sham 1 und 2
20.03.12	14:00	Morris Water Maze Kombi
21.03.12	14:00	Morris Water Maze Kombi
22.03.12	14:00	Morris Water Maze Kombi
24.03.12	14:00	Elevated Plus Sham 1 und 2
	14:00	Morris Water Maze Miglustat only
25.03.12	14:00	Morris Water Maze Miglustat only
26.03.12	17:00	Accelerod (spät) Sham 1 und 2
	14:00	Morris Water Maze Miglustat only
27.03.12	17:00	Accelerod (spät) Sham 1 und 2
28.03.12	17:00	Accelerod (spät) Sham 1 und 2
29.03.12	14:00	Elevated Plus Kombi
30.03.12	14:00	Open Field Sham 1 und 2
	17:00	Accelerod (spät) Kombi
31.03.12	17:00	Accelerod (spät) Kombi
01.04.12	17:00	Accelerod (spät) Kombi
02.04.12	14:00	Elevated Plus Miglustat only
	17:00	Heat Plate Sham 1 und 2
04.04.12	14:00	Open Field Kombi
	17:00	Accelerod (spät) Miglustat only
05.04.12	17:00	Accelerod (spät) Miglustat only
06.04.12	17:00	Accelerod (spät) Miglustat only

07.04.12	17:00	Heat Plate Kombi
08.04.12	14:00	Open Field Miglustat only
11.04.12	17:00	Heat Plate Miglustat only

2.4.1 Accelerod

Accelerod ist ein Experiment zur Überprüfung der Motivation und des motorischen Lernverhaltens der Mäuse (Jones und Roberts 1968, Barlow et al. 1996). Bei diesem Test wurden vor allem das Gleichgewicht und die motorische Koordination der Versuchstiere getestet. Dieser Test wurde an P35 und P60 – dem 35. und 60. Lebensstag – mit den Tieren durchgeführt.

Der Test besteht aus einer Trainingsphase (zwei Tage) und einer Testphase (zwei Tage). An P33 wurden die Tiere viermal trainiert. Die Tiere wurden hierfür in 4er-Gruppen für 120 Sekunden auf eine sich bei konstanter Geschwindigkeit – 12 UpM – drehende Walze gesetzt. Während dieser Zeit wurde dann gezählt, wie oft jedes einzelne Tier heruntergefallen ist. Innerhalb der 120 Sekunden wurden die Tiere sofort nach dem Herunterfallen wieder auf die rotierende Walze gesetzt. Es wurden immer alle Tiere einer Gruppe einmal trainiert, bevor der zweite Trainingslauf begann.

An P34 wurden die Tiere auf die gleiche Weise wieder viermal trainiert und im Anschluss daran fanden die ersten zwei Tests statt. Bei den Tests beschleunigte das Laufband für fünf Minuten kontinuierlich von 4 UpM auf 40 UpM. Die Beschleunigung erfolgte immer nach dreißig Sekunden und das Tempo des Laufbandes steigerte sich immer um 4 UpM. Nun wurde gemessen, wie lange jedes Tier läuft bis es herunterfällt, das heißt, es wurde die maximal erreichte UpM-Zahl für jedes Tier ermittelt.

An P35 wurden dann nochmals auf die gleiche Weise sechs Tests mit jeder Maus durchgeführt.

Dieses Experiment wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten mit den Tieren durchgeführt. Die Testreihe zu P60 begann wieder mit vier Trainingseinheiten an P58. An P59 folgten weitere vier Trainingsläufe sowie zwei Tests und an P65 wurden sechs abschließende Tests durchgeführt. Die Versuche wurden nach dem gleichen Prinzip wie die frühe Test- und Trainingsreihe durchgeführt.

Während des Trainings wurden die Latenzen bis zum ersten Sturz und die Anzahl der Stürze pro Trainingsdurchgang registriert. Beim Accelerod-Test wurden die Latenzen bis zum Sturz und die erreichte Umdrehungsgeschwindigkeit für jedes Versuchstier aufgezeichnet.

Sowohl der frühe (P35) als auch der späte (P60) Test wurden unter Standardbedingungen durchgeführt: Raumtemperatur um die 18 °C, Lichtstärke von ungefähr zwei bis drei Lux und Start der Versuche nicht vor 17 Uhr. Die Tests durften nicht vor 17 Uhr gestartet werden, weil die Motorik der Mäuse nur in der Aktivitätsphase der Tiere gemessen werden darf.

Die Apparatur (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) für den Accelerod-Versuch besteht aus einer Basis – eine 8,0 cm hohe und 53,5 cm lange Box – und einer Plattform, die sich 4,5 cm oberhalb der Basis befindet. Die Plattform besteht aus dünnen Metallstäben und einer Lichtschranke, die den Aufprall einer Maus registriert. In einem Abstand von 26,5 cm oberhalb der Plattform befindet sich eine rotierende Walze. Die Walze ist in vier Abschnitte unterteilt, die durch 0,3 cm dicke Zwischenwände voneinander getrennt sind, damit vier Mäuse gleichzeitig getestet werden können. Jeder einzelne Abschnitt der Walze ist 8,5 cm breit. Der Durchmesser der Walze beträgt 3,0 cm. Die Oberfläche der Walze ist gummiert, damit die Versuchstiere nicht zu schnell ins Rutschen kommen.

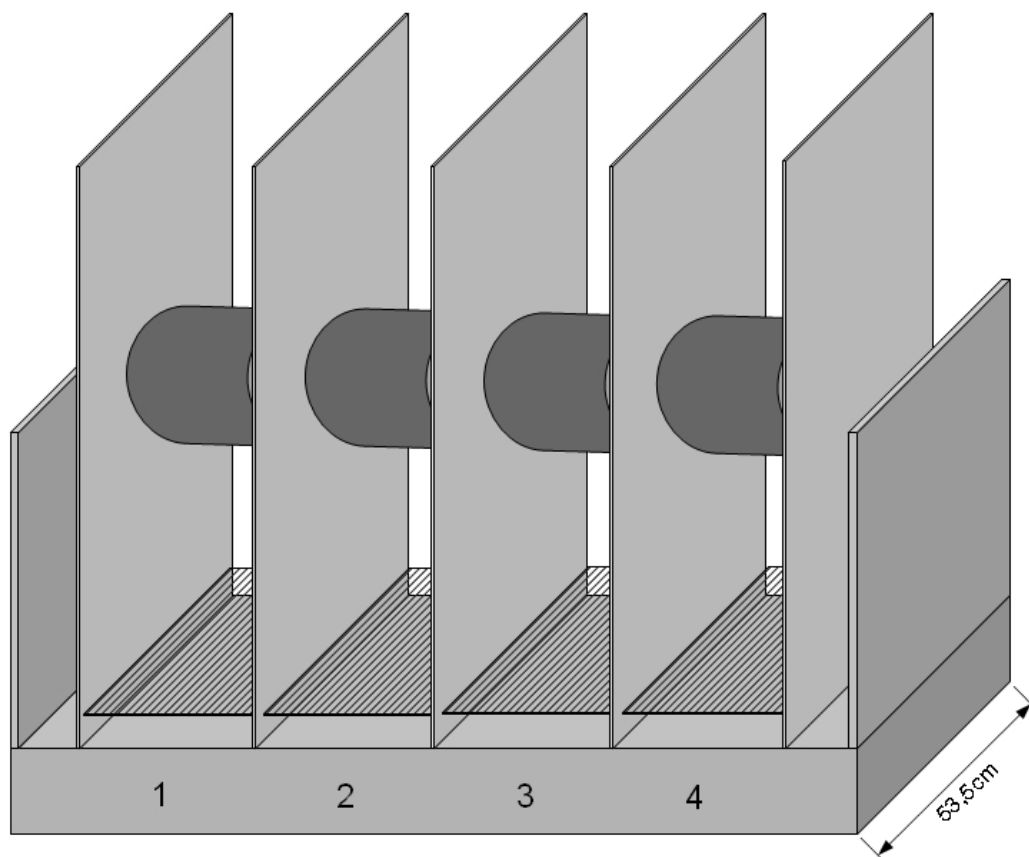


Abb. 13: Schematische Darstellung der Rota Rod-Apparatur im Profil

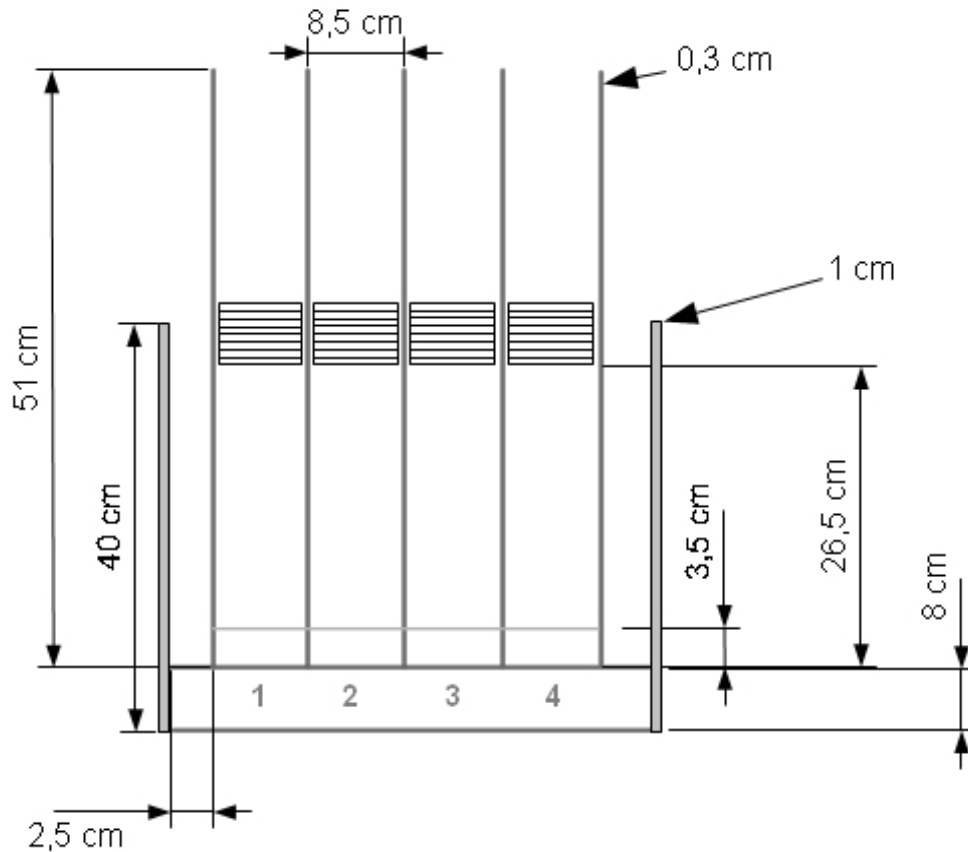


Abb. 14: Rota Rod-Gerät in schematischer Frontalansicht

2.4.2 Morris Water Maze

Morris Water Maze ist ein Experiment zur Überprüfung des räumlichen Lernverhaltens sowie des Gedächtnisses der Mäuse. Dieser Test wurde von Richard G. Morris entwickelt (Morris 1984, Hodges 1996, Karl et al. 2003). Dieser Versuch wurde an P49 mit den Tieren durchgeführt.

Der Test besteht aus einer Trainingsphase (drei Tage) und einer Testphase (ein Tag).

Bei diesem Experiment werden die Mäuse in ein rundes Wasserbecken gesetzt, das in vier Quadranten eingeteilt wurde. Die Quadranten sind durch vier verschiedene Symbole außerhalb des Beckens optisch für die Mäuse erkennbar. Im vierten Quadranten befindet sich eine Plattform, die circa 1 cm mit Wasser bedeckt ist. Diese Plattform befindet sich immer am selben Ort. Es soll nun mit diesem Experiment getestet werden, ob die Mäuse sich merken, wo sich die Plattform befindet.

An P47 wurden die Mäuse zweimal trainiert. Ein Training bestand aus vier Durchgängen à 60 Sekunden. Wenn die Maus innerhalb dieser Zeit die Plattform gefunden hatte, wurde der Durchgang abgebrochen und die Maus zur Belohnung kurz aus dem Becken genommen und leicht abgetrocknet. Wenn sie die Plattform aber nicht innerhalb der 60 Sekunden gefunden

hatte, wurde sie Richtung Plattform geschoben und dort kurz sitzen gelassen. Anschließend wurde sie aus dem Wasser genommen und leicht abgetrocknet, damit sie nicht unterkühlt. Für die vier Durchgänge wurde die Maus einmal zum Start in jeden Quadranten gesetzt. Dieser Vorgang wurde mit jeder Maus direkt viermal hintereinander wiederholt. Wenn die Gruppen dann einmal komplett durchgetestet waren, wurde wieder mit Maus 1 von vorne begonnen.

An P48 wurden die Mäuse ebenfalls zweimal auf dieselbe Weise trainiert.

An P49 wurden die Mäuse nur einmal auf diese Weise trainiert und nachdem alle noch einmal trainiert hatten, wurde der Test durchgeführt. Für den Test wurde die Plattform aus dem Wasser genommen. Die Maus wurde zum Start in jenen Quadranten gesetzt, der gegenüber dem Quadranten liegt, in welchem sich zuvor im Trainingsversuch die Plattform befand. Der Test dauerte 60 Sekunden und es wurde beobachtet, wie häufig die Maus die Stelle, an der sich die Plattform während der Trainingsdurchläufe befand, kreuzt und wie lange sowie wie oft sie sich im vierten Quadranten – in welchem sich zuvor in den Trainingseinheiten die Plattform befand – aufhält.

Die Apparatur für den Morris Water Maze-Test besteht aus einem schwarzen, kreisrunden Kunststoffbecken. Das Becken hat einen oberen Durchmesser von 103 cm, einen unteren von 100 cm und eine Tiefe von 33 cm. Die Plattform ist schwarz lackiert, hat einen Durchmesser von 12 cm und eine Höhe von 19,5 cm. Damit die Plattform circa einen Zentimeter von Wasser bedeckt ist, wurde das Becken täglich bis zu einer Höhe von 21,5 cm mit frischem, circa 19 °C warmen Wasser aufgefüllt. Das Wasser war klar und nicht durch Kalk eingetrübt, da wir weiße und keine schwarzen Mäuse testeten. Um das Hantieren mit den Mäusen zu vereinfachen, befand sich das gesamte Becken auf einem 33 cm hohen und runden Podest.

Zur Orientierung der Versuchstiere wurden während des Trainings und der Tests im Blickfeld der Tiere um das Kunststoffbecken herum in allen vier Himmelsrichtungen vier verschiedene Symbole aufgehängt. Es wurden ein Kreis, ein Dreieck, ein Viereck und ein Sechseck verwendet. Der Raum wurde während des gesamten Versuchs mit ungefähr zwei bis drei Lux ausgeleuchtet. Das Verhalten der Versuchstiere wurde mit einem computergestützten, automatischen Video-Trackingsystem aufgenommen (TSE VideoMot 2, Black and White Systems, Bad Homburg Germany)

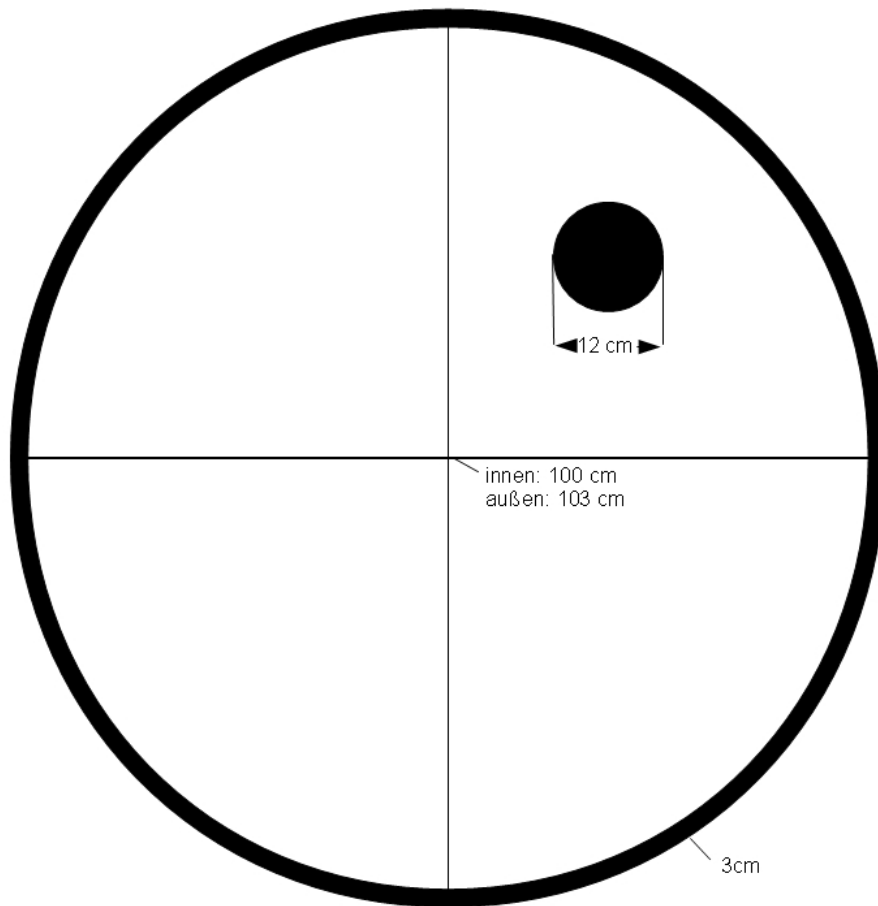


Abb. 15: Schematische Darstellung des Morris Water Maze-Beckens in der Draufsicht

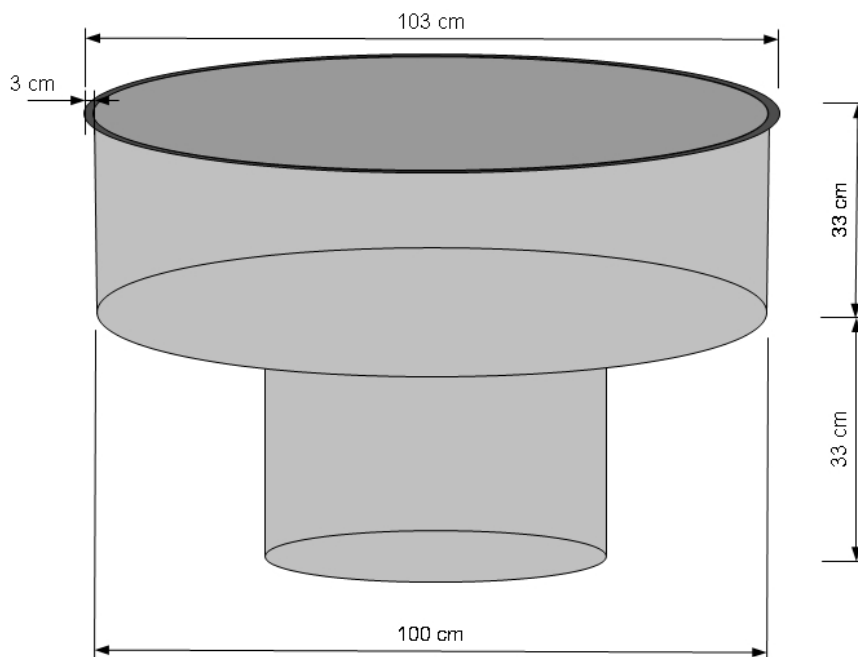


Abb. 16: Räumliche, schematische Darstellung des Morris Water Maze-Beckens mit dazugehörigem Podest

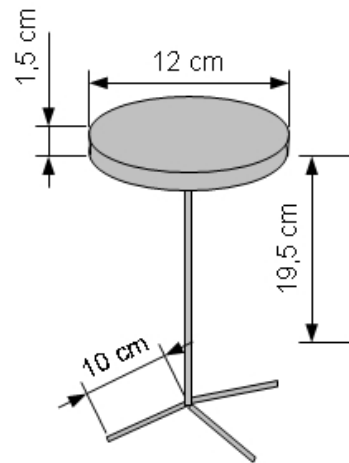


Abb. 17: Räumliche, schematische Darstellung der Plattform des Morris Water Maze-Versuches

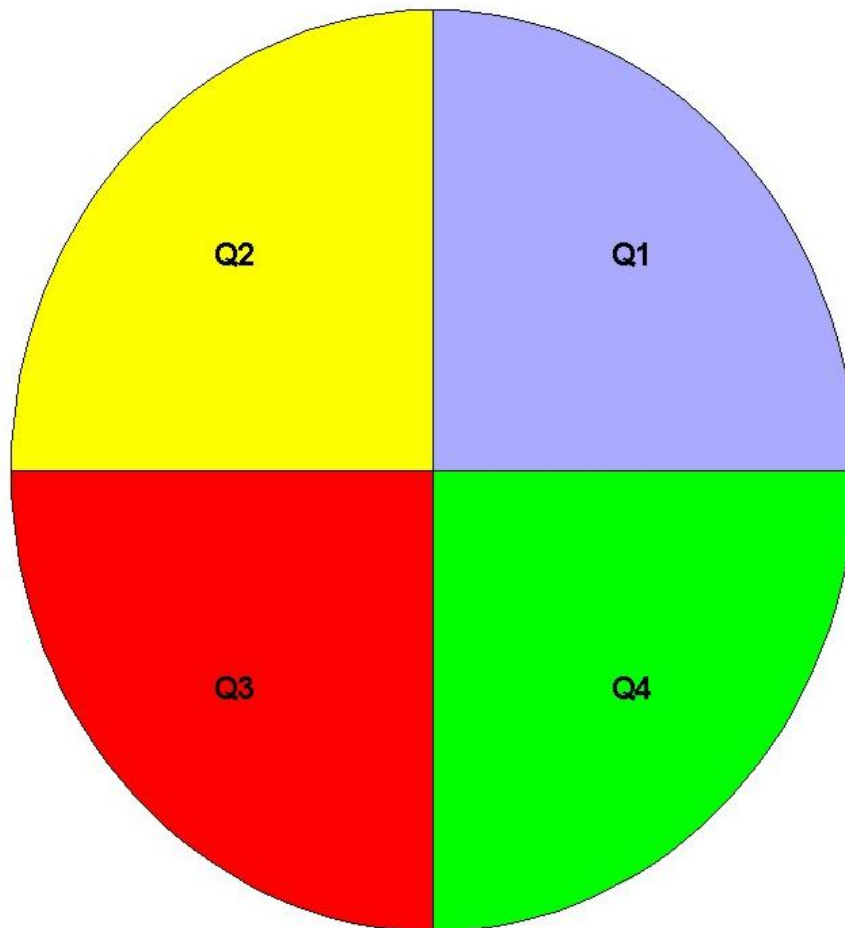


Abb. 18: Schematische Darstellung der Morris Water Maze-Quadranten (Draufsicht)

2.5 Datenanalyse

In dieser Arbeit sollen Unterschiede zwischen den Gruppen (therapiert vs. scheintherapiert) in Bezug auf ihre motorischen und kognitiven Fähigkeiten herausgearbeitet werden. Durch den Umstand, dass die Mäuse mit identischen Therapien in Gruppen zusammengefasst wurden, sind die individuellen Unterschiede innerhalb der Gruppen eher gering, das heißt, die individuellen Ergebnisse der Versuchstiere einer Gruppe korrelieren miteinander, und sind deshalb vernachlässigbar. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen sind jedoch interessant und wichtig, weshalb sie im folgenden Kapitel erläutert werden. Da alle Mäuse wiederholt gemessen und getestet wurden, handelt es sich um Messwiederholungsdaten. Um der Clusterung der Messdaten bezüglich der verschiedenen Mäuse gerecht zu werden, wurden die Daten mit einer ein- oder zweifaktoriellen ANOVA ausgewertet (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999). Der Holm-Sidak-Ansatz wurde für die Anpassung für mehrere Tests für deren Post-hoc-Vergleiche verwendet. Im Fall von nicht normalverteilten Daten wurden diese mit einer Kurskal-Wallis ein- oder zweifachen ANOVA nach Rängen ausgewertet. Auf diese Vergleiche nach Rängen wurden dann die Dunn-Methode angewandt, um den Testfehler zu minimieren. Als kritischer Wert für die Signifikanz der Ergebnisse wurde in der gesamten Auswertung $p \leq 0,05$ verwendet.

2.5.1 Post-hoc-Tests

Zu den Post-hoc-Signifikanztests zählen die einfaktorielle ANOVA, der Kruskal-Wallis-Test oder zum Beispiel der Median-Test. Diese Tests werden im Anschluss an eine Varianzanalyse durchgeführt, um die Fehler der Ergebnisse zu minimieren und die genaue Signifikanz zu lokalisieren. Hierzu erfolgen paarweise Mittelwertvergleiche im Rahmen der verschiedenen Tests. Dies kann auf verschiedenen Weisen durchgeführt werden, zum Beispiel als Holm-Sidak- oder Dunn-Methode (Tamhane 1977).

2.5.2 Analysis of Variance

Die ANOVA, oder auch Analysis of Variance, ist eine univariable Varianzanalyse und gehört in die Gruppe der statistischen Analyseverfahren. Varianzanalysen sind strukturprüfende und datenanalysierende Testverfahren. Mit ihnen werden Prüfgrößen und Varianzen einer Datenmenge berechnet, um die Gesetzmäßigkeiten hinter den Daten zu verstehen und aufzudecken. Wie die Regressionsanalyse untersucht auch die Varianzanalyse Zusammenhänge zwischen einer abhängigen und verschiedenen unabhängigen Variablen (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999).

Die Varianzanalyse prüft, ob sich die Erwartungswerte der abhängigen Variablen, also der Zielgröße, in verschiedenen Gruppen unterscheiden. Anhand von Prüfgrößen kann festgestellt werden, ob die Varianz innerhalb einer Gruppe kleiner ist als die Varianz zwischen den Gruppen (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999).

Bevor eine Analyse der Varianz durchgeführt werden kann, muss geprüft werden, ob die zu untersuchenden Datensätze die Voraussetzungen für eine ANOVA erfüllen. Diese sind die gleichen wie bei der linearen Regressionsanalyse, da beide Verfahren vergleichbar sind (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999) [Internetquelle 7].

2.5.2.1 Einfaktorielle ANOVA

Die einfaktorielle ANOVA stellt eine einfache Varianzprüfung dar. Sie wird an unabhängigen Stichproben bzw. Datensätzen durchgeführt. Es handelt sich um eine einfache Varianzanalyse, da lediglich eine unabhängige Variable der Gruppe geprüft wird. Mit ihr wird geschaut, welchen Einfluss eine erklärende, also unabhängige Variable (z.B. Gruppenzugehörigkeit) mit k verschiedenen Fallgruppen auf die Ausprägung der normalverteilten, abhängigen Variablen hat. Hierzu werden von den Variablen der einzelnen Gruppen die Mittelwerte gebildet und miteinander verglichen. Es werden auf der einen Seite die Varianzen innerhalb der Gruppen und auf der anderen Seite die Varianzen zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen. Bei der Durchführung der einfaktoriellen ANOVA müssen vom Prinzip her dieselben Voraussetzungen wie für eine allgemeine Varianzanalyse beachtet werden. Die Varianzen müssen normalverteilt vorliegen. Es muss eine Varianzhomogenität vorliegen, das heißt, die Fehlerkomponenten zwischen den einzelnen Gruppen müssen identisch sein. Des Weiteren müssen die Messwerte voneinander unabhängig sein (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999, Brosius 1998) [Internetquelle 7].

Für eine einfaktorielle ANOVA kann, wie für andere statistische Testverfahren, eine Nullhypothese (H_0) formuliert werden. H_0 : Zwischen den Erwartungswerten der einzelnen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied, das heißt die Mittelwerte, die miteinander verglichen werden, sind in ihrer Grundgesamtheit identisch. Dies sieht in einer mathematischen Formel folgendermaßen aus: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ (μ_i steht für den Erwartungswert der erklärten, also abhängigen Variable der i . Gruppe) Wird die Nullhypothese nicht bestätigt, das heißt, sie wird verworfen, gibt die einfaktorielle ANOVA lediglich eine Information darüber, dass mindestens zwei Gruppenmittelwerte der abhängigen Variablen einen signifikanten Unterschied aufweisen. Weder zeigt sie auf, welche sich

signifikant unterscheiden, noch ob es mehr als zwei sind (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999, Brosius 1998) [Internetquelle 7].

Gegenüberstehend zu der Nullhypothese kann bei der einfaktoriellen ANOVA eine Alternativhypothese formuliert werden. Diese lautet wie folgt: Es besteht zwischen mindestens zwei Erwartungswerten der einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied. In einer mathematischen Formel sieht dieses wie folgt aus: $H_1 : \exists i, j : \mu_i \neq \mu_j$. Wenn die Nullhypothese nicht verworfen werden kann, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden und die Alternativhypothese konnte nicht mit ausreichender Sicherheit nachgewiesen werden (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999, Brosius 1998) [Internetquelle 7].

2.5.2.2 Zweifaktorielle ANOVA

In der zweifaktoriellen ANOVA werden zwei verschiedene, erklärende Variablen bzw. Faktoren berücksichtigt, die auf die abhängige, also erklärte Zielvariable einen möglichen Einfluss haben. In diesem Verfahren werden die entsprechenden Varianzen der einzelnen unabhängigen Faktoren berechnet und anschließend die Varianz für die Wechselwirkung zwischen den beiden Variablen bestimmt (Rudolf und Müller 2012, Fahrmeier et al. 1999) [Internetquelle 7].

2.5.3 Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier, statistischer Test zur Überprüfung von Unterschieden in nicht normalverteilten Testgrößen bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Benannt wurde dieser Test nach seinen Erfindern William Kruskal und Wilson Allen Wallis. Dieser Test basiert auf der Erstellung von Rängen für die Messdaten und kann für mehr als zwei Gruppen durchgeführt werden (Kruskal und Wallis 1952) [Internetquelle 9]. Es gibt drei zentrale Annahmen, die für den Kruskal-Wallis-Test erfüllt werden müssen, damit er verwertbare Ergebnisse liefert. Erstens: Die abhängigen Variablen müssen ein ordinales Messniveau besitzen und der Grundgesamtheit k entstammen. Zweitens: Die Stichproben müssen voneinander unabhängig sein. Drittens: Die Stichprobenvariablen müssen eine stetige Verteilungsfunktion $F_j^{(j=0,1,\dots,k)}$ besitzen (Kruskal und Wallis 1952) [Internetquelle 9].

Der Kruskal-Wallis-Test ordnet die Variablen der Größe nach und weist ihnen damit anhand dieser Ordnung eine Rangzahl R_i zu. Aus den einzelnen Rangzahlen wird nun eine

Rangsumme S_h für die einzelnen Stichproben berechnet (Kruskal und Wallis 1952) [Internetquelle 9].

Die Nullhypothese H_0 für den Kruskal-Wallis-Test lautet: Zwischen den Stichproben gibt es keinen Unterschied. Die Prüfgröße für diese Aussage ist der H-Wert, der wie folgt berechnet wird:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_h \frac{S_h^2}{n^h} - 3(n+1)$$

Bestehen zwischen den Variablen Bindungen, das heißt mehreren Variablen wurde die gleiche Rangzahl zugeordnet, wird diesen die mittlere in Frage kommende Rangzahl zugeschrieben und der H-Wert berechnet sich dann wie folgt:

$$H = \frac{\frac{12}{n(n+1)} \sum_h \frac{S_h^2}{n^h} - 3(n+1)}{1 - \frac{1}{(n^3 - n)} \sum t_{r(i)}^3 - t_{r(i)}}$$

$t_{r(i)}$ steht in dieser Gleichung für die Anzahl der gebundenen Variablen mit dem ihnen zugewiesenen Rang i (Kruskal und Wallis 1952) [Internetquelle 9].

Der berechnete H-Wert wird mit einem theoretischen Wert aus der Chi-Quadrat-Verteilung – siehe 2.5.5 – für einen gewählten Fehler 1. Art verglichen. Ist der berechnete H-Wert größer als der theoretische H-Wert aus der Chi-Quadrat-Tabelle, wird die Nullhypothese verworfen, das heißt zwischen den Stichproben besteht ein signifikanter Unterschied und damit sind sie voneinander unabhängig (Kruskal und Wallis 1952) [Internetquelle 9].

3. Ergebnisse

3.1 Accelerod (früh): Training

Das Accelerod-Training erfolgte, um die Tiere an das Laufband zu gewöhnen und sich einen ersten Eindruck über die motorischen Fähigkeiten der einzelnen Gruppen zu verschaffen. Des Weiteren sollte mit dem Training geprüft werden, ob alle Versuchsgruppen die Aufgabe des Accelerod, also die motorischen Abläufe, erlernen. Dies ist eine Voraussetzung, damit der Accelerod-Test durchgeführt werden darf.

Alle vier Gruppen zeigten während des Accelerod-Trainings ein sehr gutes Lernverhalten und verinnerlichteten die motorischen Abläufe, womit der Test mit diesen Versuchstieren durchgeführt werden durfte.

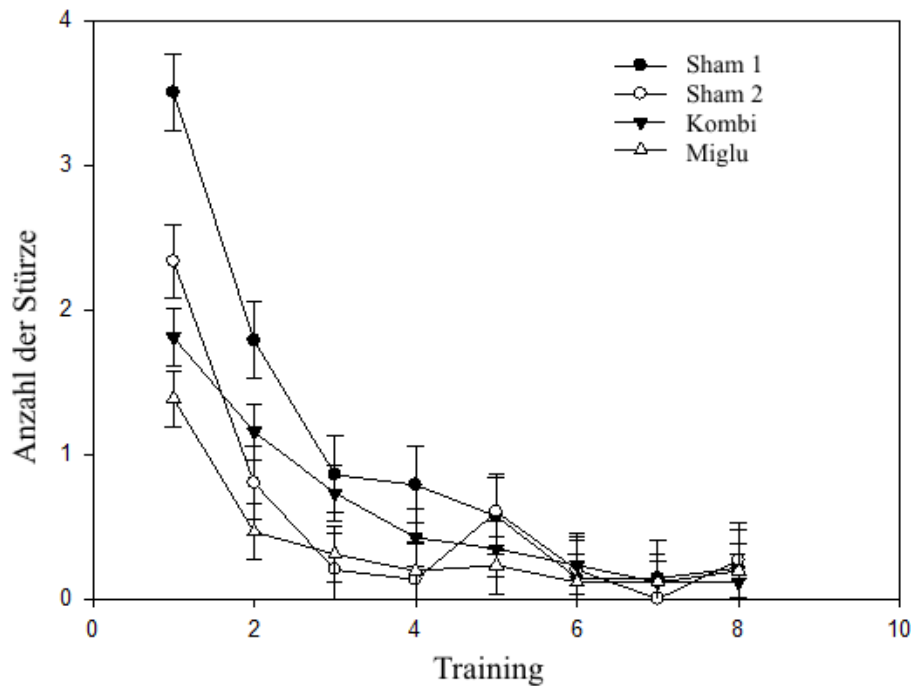


Abb. 19: Accelerod-Training P35 Zusammenfassung der Lernkurven. Abgebildet werden die Daten als Mittelwert \pm SEM. Alle vier Gruppen zeigen eine Weiterentwicklung ihrer motorischen Fähigkeiten und sind daher für den späteren Accelerod-Test geeignet.

Die Trainingsergebnisse des Accelerod wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA untersucht. Die Analysen wurden an einem Modell für vier und drei Gruppen durchgeführt. Beim Modell mit drei Gruppen wurden die beiden Sham-Gruppen zusammengefasst, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden untherapierten Kontrollgruppen gab.

Die Untersuchung am Modell für vier Gruppen ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,001$) zwischen der Miglustat only- und Sham 1-Gruppe. Die therapierte Miglustat only-Gruppe zeigte im frühen Accelerod-Training insgesamt eine signifikant bessere Leistung als die Sham 1-Gruppe. Dies ist durch die besseren Startergebnisse der Gruppe zu erklären, denn werden die einzelnen Trainingsdurchgänge betrachtet, ist die Sham 1-Gruppe jeweils nur im ersten und zweiten Training mit einem p -Wert $<0,001$ signifikant schlechter als die Miglustat only-Gruppe.

Die Analyse am Modell für drei Gruppen zeigte ebenfalls, dass die Miglustat only-Tiere insgesamt signifikant bessere Trainingsergebnisse erzielten als die Sham-Tiere ($p = 0,011$). Dies beruht erneut auf einem signifikant besseren Ergebnis der Tiere in den ersten zwei Trainingseinheiten. Im ersten Training sind sowohl die Miglustat only- als auch die Kombi-Gruppe mit einem p -Wert von $<0,001$ signifikant besser als die Sham-Gruppe. Im zweiten Training ist die Miglustat only-Gruppe mit einem p -Wert von $0,003$ signifikant besser als die Sham-Gruppe.

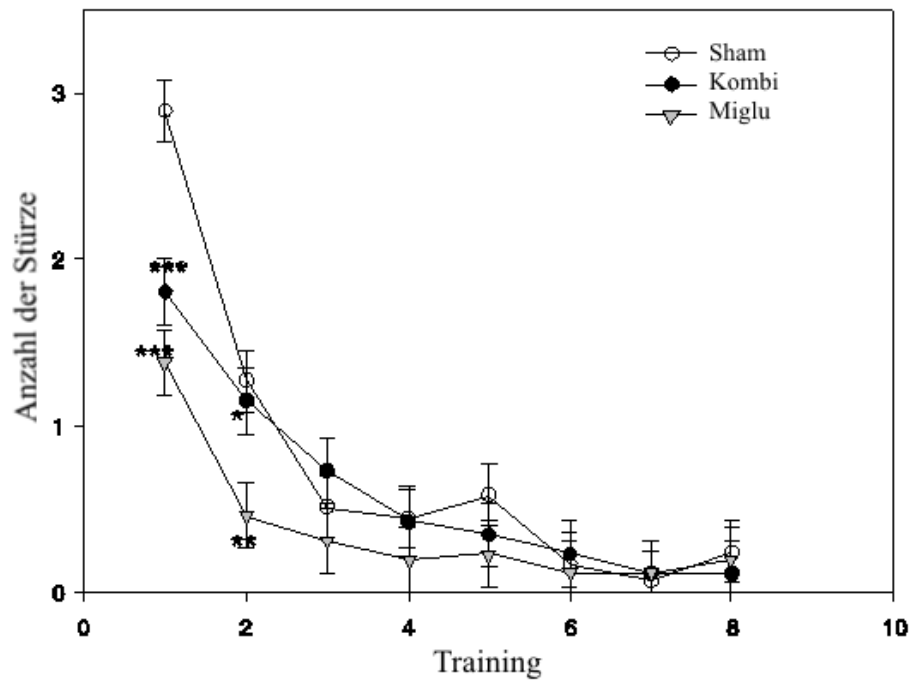


Abb. 20: Graphische Darstellung der zweifaktoriellen ANOVA für die Trainingsreihe Accelerod (früh). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM abgebildet. * bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,05$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. ** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,01$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. *** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,001$ ist und das Ergebnis somit hoch signifikant ist. Es finden sich signifikante Unterschiede für das erste ($p < 0,001$) und zweite Training ($p = 0,003$) an P33. Die therapierten Miglustat only-Tiere sind jeweils signifikant besser als die untherapierten Sham-Tiere. Im zweiten Training ist die Miglustat only-, mit einem p-Wert von 0,013, signifikant besser als die therapierte Kombi-Gruppe. Des Weiteren ist die Kombi-Gruppe im ersten Training mit einem p-Wert $< 0,001$ signifikant besser als die Sham-Gruppe (Schlegel et al. 2016).

3.2 Accelerod (früh): Test

Bei diesem Test wurde beobachtet, bis zu welcher Umdrehungszahl (UpM) sich die Versuchstiere auf dem Laufband halten können. Er dient der Beurteilung der motorischen Fähigkeiten und des Gleichgewichts der Versuchstiere. Zum Vergleich der Ergebnisse und zur Auswertung wurden wieder die Mittel der einzelnen Gruppen in den unterschiedlichen Testversuchen errechnet. Wenn also im Folgenden von einem Testergebnis gesprochen wird, ist das Mittel der gesamten Gruppe gemeint.

Tabelle 1: Übersicht über die UpM-Mittel (U/min) der Versuchsgruppen im Accelerod (früh)-Test

	Sham 1	Sham 2	Kombi	Miglu
Test	UpM-Mittel	UpM-Mittel	UpM-Mittel	UpM-Mittel
1	21,42	21,45	23,08	23,7
2	19,25	23,33	22,24	22,23
3	20,31	20,04	21,3	23,9
4	22,14	20,92	21,83	22,34
5	21,81	23,29	23,94	22,4
6	22,06	21,64	23,14	22,55
7	21,46	21,13	25,45	24,54
8	23,04	22,2	23,09	24,18

Sham 1 erreichte in der ersten Accelerod-Testreihe Ergebnisse von 19,25 UpM bis 23,04 UpM. Diese Gruppe zeigte keine Kontinuität mit steigender Testanzahl. Die Mittel der einzelnen Tiere dieser Gruppe zeigen eine relativ große Spannbreite. Die beste Maus (1743/3203) erreichte im Mittel 28,85 UpM und die schlechteste (1744/3203) nur 15,41 UpM. Hieraus ergibt sich ein Unterschied von 13,44 UpM. Bemerkenswert ist jedoch, dass die beste Maus dieser Gruppe (1743/3203) auch die beste Maus der gesamten ersten Accelerod-Testreihe ist und dass die schlechteste Maus dieser Gruppe auch die schlechteste (1744/3203) der gesamten ersten Testreihe aller vier Gruppen ist.

Sham 2 erreichte Ergebnisse von 20,04 UpM bis 23,33 UpM. Auch diese Gruppe zeigte keine Kontinuität in ihren Ergebnissen. Die Mittel der einzelnen Tiere zeigen eine deutlich geringere Spannbreite als die Ergebnisse der Sham 1-Mäuse. Das beste Tier (1717/3208) dieser Gruppe erreichte im Mittel 24,75 UpM und die schlechteste Maus (1711/3207) 17,25 UpM. Hieraus ergibt sich eine Spannbreite von 7,5 UpM zwischen dem besten und schlechtesten Tier. Diese Spannbreite ist fast halb so groß wie die der Sham 1-Gruppe und von allen vier Gruppen die geringste.

Die Kombi-Gruppe erreichte in der ersten Accelerod-Testreihe Ergebnisse von 21,3 UpM im dritten Test und bis 25,45 UpM im siebten Test. Die Kombi-Gruppe bestand aus 26 Tieren. Von diesen blieben nur drei Tiere im Mittel unter 20 UpM. Das beste Ergebnis erzielte die Maus 1814/3217 mit 27,11 UpM im Mittel. Das schlechteste Ergebnis insgesamt war 17,64 UpM im Mittel, erreicht durch die Maus 1761/3219. Diese Gruppe zeigt mit 9,47 UpM also insgesamt eine größere Spannbreite als die Sham 2-Gruppe, ist jedoch konstanter in ihren Ergebnissen als die Sham 1-Gruppe.

Die Miglustat only-Gruppe erreichte Ergebnisse von 22,23 UpM im zweiten Test, bis 24,54 UpM im siebten Test. Damit war diese Gruppe insgesamt nicht die beste, aber die

kontinuierlichste. Die Spannbreite dieser Gruppe beträgt 12,34 UpM und ergibt sich daraus, dass das beste Tier (1865/3236) dieser Gruppe im Mittel 28,29 UpM und die schlechteste Maus (1869/3237) im Mittel 15,95 UpM erreichten. Somit zeigt die Miglustat only-Gruppe die zweitgrößte Spannbreite der Ergebnisse in der ersten Accelerod-Testreihe.

Die Testergebnisse wurden wieder mit einer zweifaktoriellen ANOVA verglichen. Sowohl im Modell für vier als auch drei Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Es ließen sich nur für einzelne Tests signifikante Unterschiede finden. Im dritten Test war sowohl die Sham-Gruppe mit einem p-Wert von 0,006 als auch die Kombi-Gruppe mit einem p von 0,024 signifikant schlechter als die Miglustat only-Gruppe. Im siebten Test war die Sham-Gruppe erneut signifikant schlechter als die Miglustat only- (p = 0,016) und Kombi-Gruppe (p = 0,002).

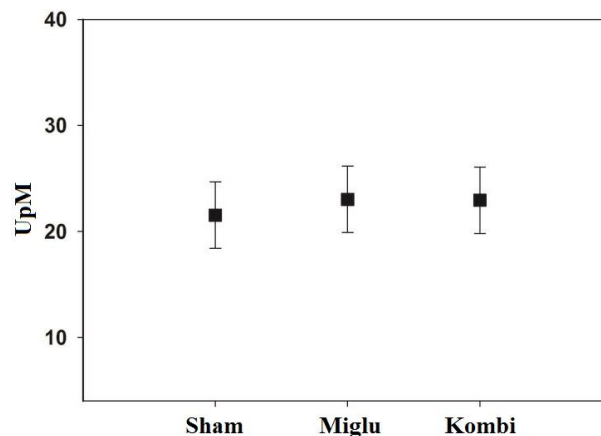


Abb. 21: Graphische Darstellung der zusammengefassten Ergebnisse für die Testreihe Accelerod (früh). Die Daten werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Testgruppen (Schlegel et al. 2016).

3.3 Accelerod (spät): Training

Bevor Accelerod ein zweites Mal getestet wurde, gab es ein weiteres Training, nach dem Ablaufschema des ersten Accelerod-Trainings, um die Tiere wieder an das Laufband zu gewöhnen. Auch dieses Training zeigte, dass alle Versuchstiere der vier Gruppen die geforderten motorischen Abläufe für den späten Accelerod-Test beherrschten.

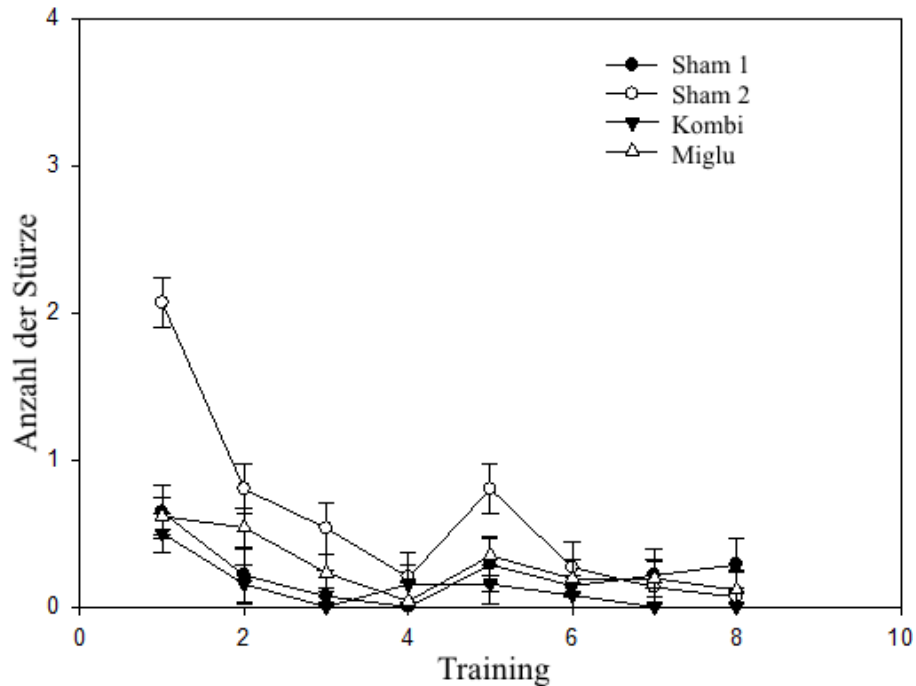


Abb. 22: Accelerod-Training P60 Zusammenfassung der Lernkurven. Abgebildet werden die Daten als Mittelwert \pm SEM. Die Grafik zeigt deutlich, dass alle vier Versuchsgruppen einen Lerneffekt aus der ersten Trainingsreihe zurückbehalten haben, denn sie starten bereits im ersten Training zur späten Accelerod-Testreihe mit einer deutlich geringeren Sturzrate im ersten Training.

Die Auswertung der Trainingsergebnisse erfolgte wieder mit der zweifaktoriellen ANOVA. Die Analyse wurde erneut an einem Modell für vier und drei Gruppen durchgeführt. Hier sahen wir, dass die Kombi-Tiere insgesamt signifikant bessere Trainingsergebnisse erzielten als die Sham 2-Tiere ($p < 0,000$). Die Sham 2-Tiere waren im ersten ($p < 0,001$), zweiten ($p = 0,003$) und fünften Training signifikant schlechter als die Kombi-Gruppe. Im ersten Training war die Sham 2-Gruppe zusätzlich noch jeweils mit einem p-Wert unter 0,001 signifikant schlechter als die Miglustat only- und Sham 1-Gruppe.

Die Datenanalyse für drei Gruppen spiegelt diese Ergebnisse wieder. Hier sahen wir, dass die Kombi-Tiere insgesamt signifikant bessere Trainingsergebnisse erzielten als die gesamten Sham-Tiere ($p = 0,010$). In der Betrachtung der einzelnen Trainingseinheiten konnten nur für das erste Training signifikante Unterschiede gefunden werden. In diesem Training war jeweils die Sham-Gruppe signifikant schlechter als die therapierte Kombi- und Miglustat only-Gruppe. Der p-Wert liegt für beide Signifikanzen unter 0,001.

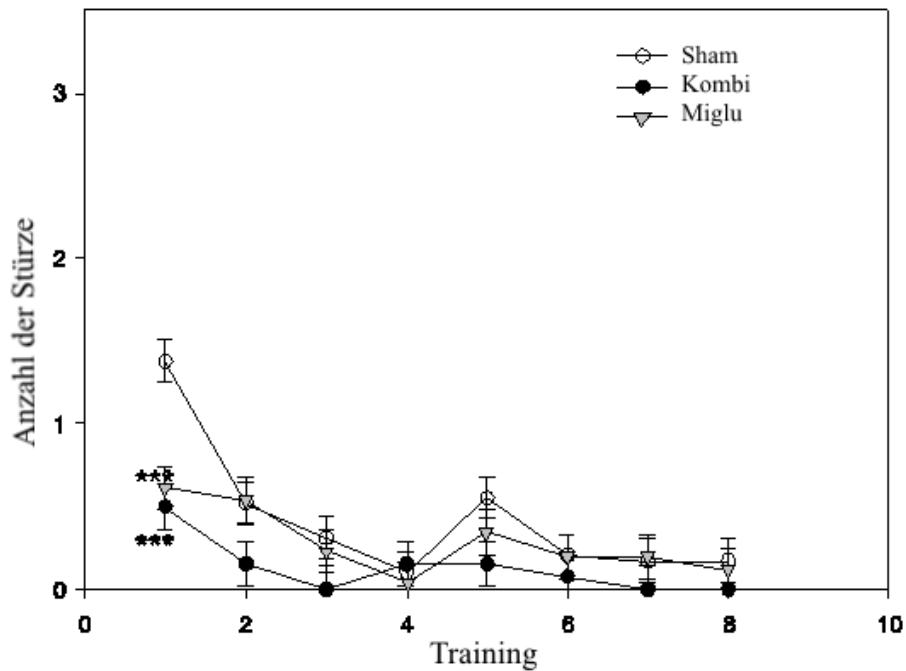


Abb. 23: Graphische Darstellung der zweifaktoriellen ANOVA für die Trainingsreihe Accelerod (spät). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM abgebildet. *** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,001$ ist und das Ergebnis somit hoch signifikant ist. Es finden sich signifikante Unterschiede für das erste Training (p jeweils $< 0,001$) an P58. Die therapierten Miglustat only- und Kombi-Tiere sind signifikant besser als die untherapierten Sham-Tiere (Schlegel et al. 2016).

3.4 Accelerod (spät): Test

Bei den Tests wurden die Umdrehungszahlen (UpM), bis zu welchen sich die Versuchstiere auf dem Laufband halten konnten, ausgewertet. Zum Vergleich der Ergebnisse und zur Auswertung wurden wieder die Mittel der einzelnen Gruppen in den unterschiedlichen Testversuchen errechnet. Wenn also im Folgenden von einem Testergebnis gesprochen wird, ist das Mittel der gesamten Gruppe gemeint.

Tabelle 2: Übersicht über die UpM-Mittel der Versuchsgruppen im Accelerod (früh)-Test

	Sham 1	Sham 2	Kombi	Miglu
Test	UpM-Mittel	UpM-Mittel	UpM-Mittel	UpM-Mittel
1	21,63	23,41	25,45	24,26
2	22,05	24,51	24,63	22,05
3	22,57	21,39	21,17	19,04
4	24,65	22,22	22,42	23,29
5	25,69	21,5	22,87	21,76
6	27,68	20,39	22,39	21,78
7	24,99	22,33	23,36	21,96
8	26,06	23,39	24,26	21,17

Sham 1 erreichte in der zweiten Accelerod-Testreihe bessere und konstantere Ergebnisse als zuvor in der ersten. Es wurde wieder mit einem Wert über 21 UpM gestartet und dann verbesserte sich die Gruppe kontinuierlich. Die schlechteste Maus der Gruppe (1755/3218) fiel im Mittel bei 18,9 UpM herunter und die beste (1743/3203) bei 29,76 UpM. Hieraus ergibt sich eine relativ hohe Spannbreite der Testergebnisse von 10,86 UpM. Diese ist jedoch etwas kleiner als in der Testreihe Accelerod (früh), woraus sich schlussfolgern lässt, dass sich die Tiere in ihrem Leistungsniveau etwas angenähert haben.

Sham 2 erbrachte in der zweiten Testreihe ebenfalls bessere Ergebnisse als in der ersten und zeigte eine gute Konstanz. Die Spannbreite zwischen dem besten und schlechtesten Ergebnis der zweiten Testreihe beträgt 9,82 UpM, das heißt, die zweite Reihe ist etwas variabler als die erste, da die Spannbreite um 2,32 UpM angestiegen ist.

Die Kombi-Gruppe war im späten Accelerod-Test insgesamt etwas besser als in der ersten Testreihe. Die Mittel der einzelnen Testergebnisse der Mäuse haben sich in der zweiten Testreihe nur unwesentlich zu den Ergebnissen der ersten Reihe verändert. Dieses Mal reichen die Mittel von 17,84 UpM bis 28,3 UpM. Daraus ergibt sich eine Spannbreite von 10,46 UpM. Diese ist ebenfalls nur unwesentlich höher als die Spannbreite – 9,47 UpM – der ersten Testreihe. Somit ist die Kombi-Gruppe auch im späten Accelerod-Test sehr konstant in ihren Leistungen.

Die Miglustat only-Gruppe zeigte wieder keine Kontinuität ihrer Testergebnisse, wie zuvor bereits in der frühen Accelerod-Testreihe. In der zweiten Testreihe reichen die Mittel der Ergebnisse der einzelnen Versuchstiere von 15,57 UpM bis 27,64 UpM. Diese extremen Unterschiede waren auch schon in der ersten Testreihe zwischen den einzelnen Tieren festzustellen. Daraus ergibt sich eine Spannbreite von 12,06 UpM.

Die Testergebnisse wurden wieder mit einer zweifaktoriellen ANOVA verglichen. Sowohl im Modell für vier als auch drei Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Im achten Test wurde ein Ausreißer gefunden. In diesem Test war die Miglustat only-Gruppe mit einem p-Wert von 0,007 signifikant schlechter als die Sham-Gruppe.

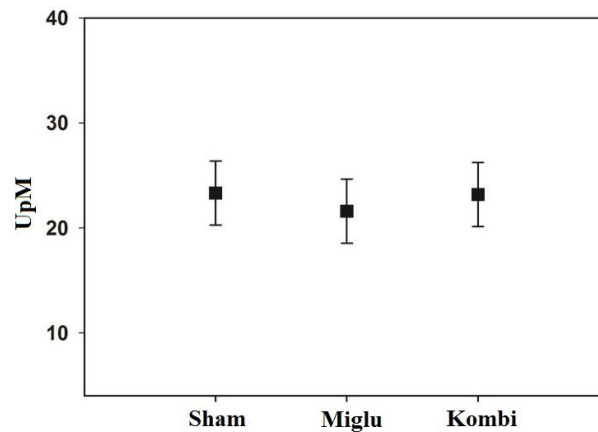


Abb. 24: Graphische Darstellung der zusammengefassten Ergebnisse für die Testreihe Accelerod (spät). Die Daten werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Testgruppen (Schlegel et al. 2016).

3.5 Morris Water Maze: Training

Der Morris Water Maze-Test ist ebenfalls ein Test zur Überprüfung der Motorik der Versuchstiere, kann aber zusätzlich noch genutzt werden, um das räumliche Lernverhalten sowie das Gedächtnis der Tiere zu überprüfen. Das Morris Water Maze-Training sollte die Tiere an das Wasser gewöhnen und ihnen die Möglichkeit geben, sich zu merken, wo sich die Plattform befindet.

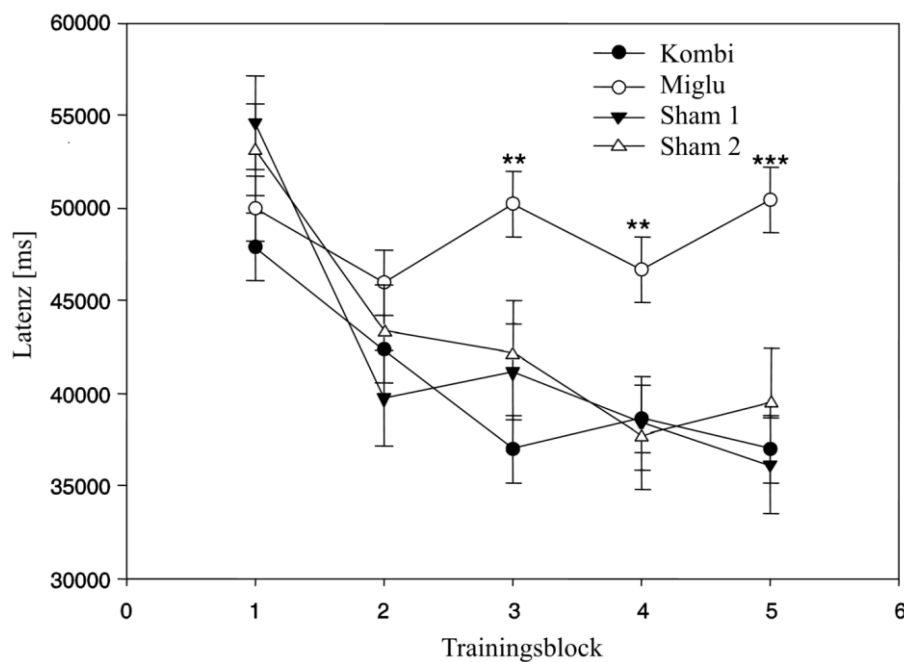


Abb. 25: Lernkurven der Versuchsgruppen im Morris Water Maze-Training: graphische Darstellung der benötigten Zeit (Latenz in ms) zum Finden der Plattform. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM abgebildet. ** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,01$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. *** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,001$ ist und das Ergebnis somit hoch signifikant ist. Alle vier Versuchsgruppen zeigen, dass sie während des Morris

Water Maze-Trainings die Aufgabe gelernt haben, jedoch zeigt die Miglustat only-Gruppe ein signifikant schlechteres Lernverhalten als alle anderen drei Versuchsgruppen.

Die Trainingsdaten wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA ausgewertet. Dabei wurden einmal alle vier Gruppen einzeln miteinander verglichen. Dies zeigte für die einzelnen Trainingsdurchgänge vereinzelte signifikante Unterschiede zum Ende der Trainingsreihe hin. Die Kombi-Gruppe war zum Beispiel im elften Training mit einem p-Wert kleiner als 0,001 signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe. Im achtzehnten Training war die Sham 1- (p = 0,001) und die Kombi-Gruppe (p = 0,002) signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe.

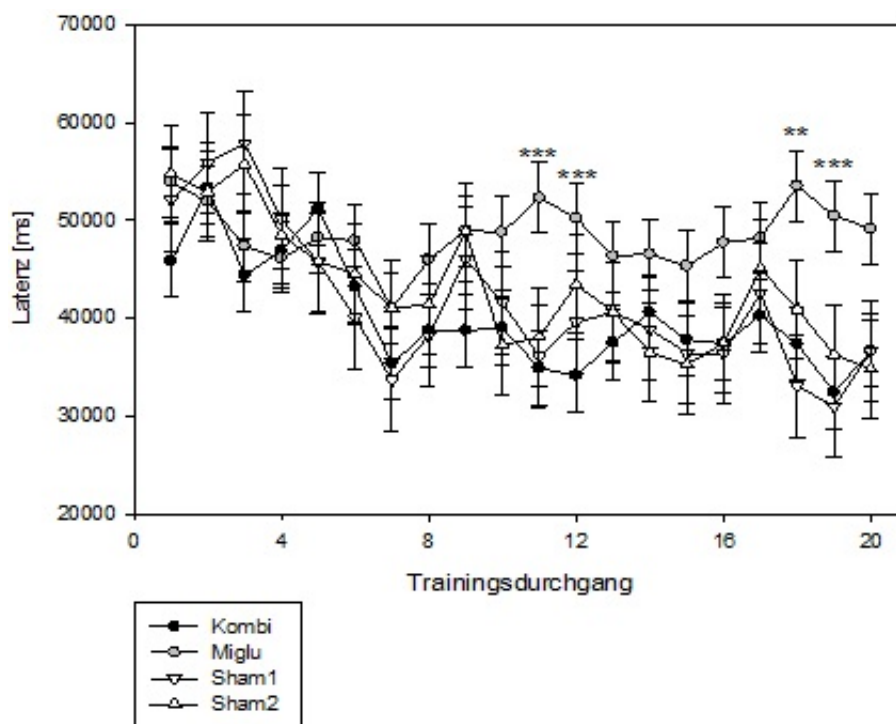


Abb. 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse für das Morris Water Maze-Training: Darstellung der benötigten Zeit (Latenz in ms) zum Finden der Plattform. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM abgebildet. ** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,01$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. *** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,001$ ist und das Ergebnis somit hoch signifikant ist. Training 11 Kombi-Gruppe mit $p < 0,001$ signifikant besser als Miglustat only-Gruppe. Training 12 Kombi-Gruppe mit $p = 0,002$ signifikant besser als Miglustat only-Gruppe. Training 18 Sham 1-Gruppe mit $p = 0,001$ und Kombi-Gruppe mit $p = 0,002$ signifikant besser als Miglustat only-Gruppe. Training 19 Kombi-Gruppe mit $p < 0,001$ und Sham 1-Gruppe mit $p = 0,002$ signifikant besser als Miglustat only-Gruppe.

Anschließend wurden die einzelnen Trainingseinheiten zu den Trainingsblöcken zusammengefasst, um einen besseren Überblick über die Ergebnisse der einzelnen Gruppen zu bekommen. Das Training wurde in 5 Blöcken mit je 4 Durchgängen durchgeführt, siehe Kapitel 2.4.2. Hier zeigte sich deutlich, dass die Miglustat only-Gruppe am wenigsten

Fortschritte während des Morris Water Maze-Trainings machte. An den letzten drei Trainingstagen waren jeweils alle drei Gruppen signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe.

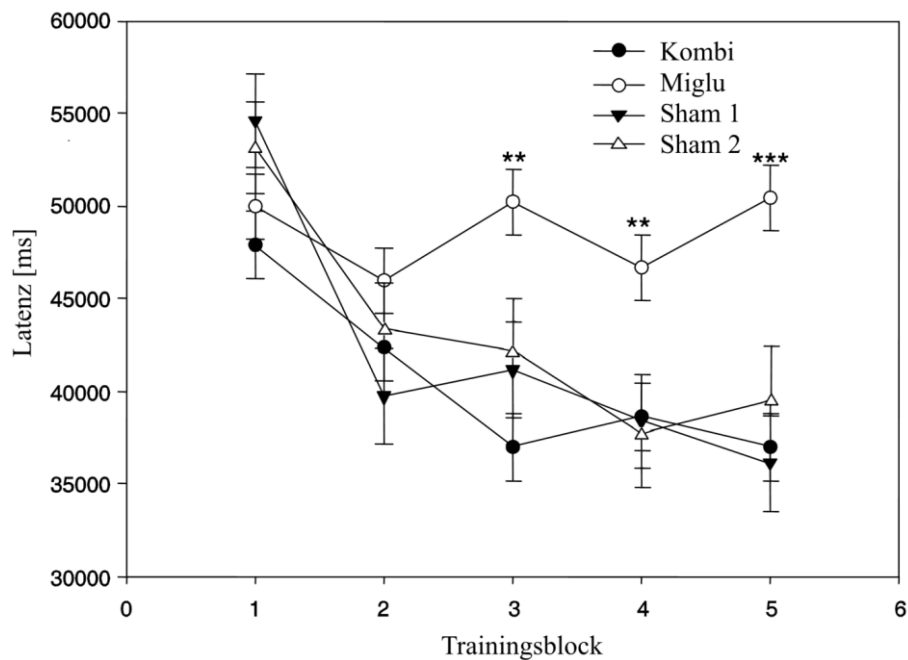


Abb. 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse für das Morris Water Maze-Training: Darstellung der benötigten Zeit (Latenz in ms) zum Finden der Plattform. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM abgebildet. ** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,01$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. *** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,001$ ist und das Ergebnis somit hoch signifikant ist. Trainingsblock 3 Kombi-Gruppe mit $p < 0,001$, Sham 1-Gruppe mit $p = 0,003$ und Sham 2-Gruppe mit $p = 0,008$ signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe. Trainingsblock 4 Kombi-Gruppe mit $p = 0,002$, Sham 1-Gruppe mit $p = 0,003$ und Sham 2-Gruppe mit $p = 0,008$ signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe. Trainingsblock 5 alle Gruppen mit $p < 0,001$ signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe.

Des Weiteren erfolgte eine zweifaktoriellen ANOVA für 3 Gruppen (Sham-Gruppe = untherapierte Sham 1- und 2-Gruppe zusammengefasst, Kombi- und Miglustat only-Gruppe). Im direkten Vergleich der einzelnen Therapievarianten schnitt sowohl die Kombi-Gruppe als auch die Sham-Gruppe mit einem p-Wert $< 0,001$ signifikant besser ab als die Miglustat only-Gruppe. Dies zeigt sich ebenfalls in der Betrachtung der einzelnen Trainingsdurchgänge, wobei die Kombi-Gruppe im 11. ($p < 0,001$), 12. ($p = 0,002$), 18. ($p = 0,002$), 19. ($p < 0,001$) und 20. Training ($p = 0,016$) signifikant schneller die Plattform fand als die Miglustat only-Gruppe. Außerdem ist in diesen Trainingseinheiten die Sham-Gruppe ebenfalls, mit ähnlichen p-Werten, signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe.

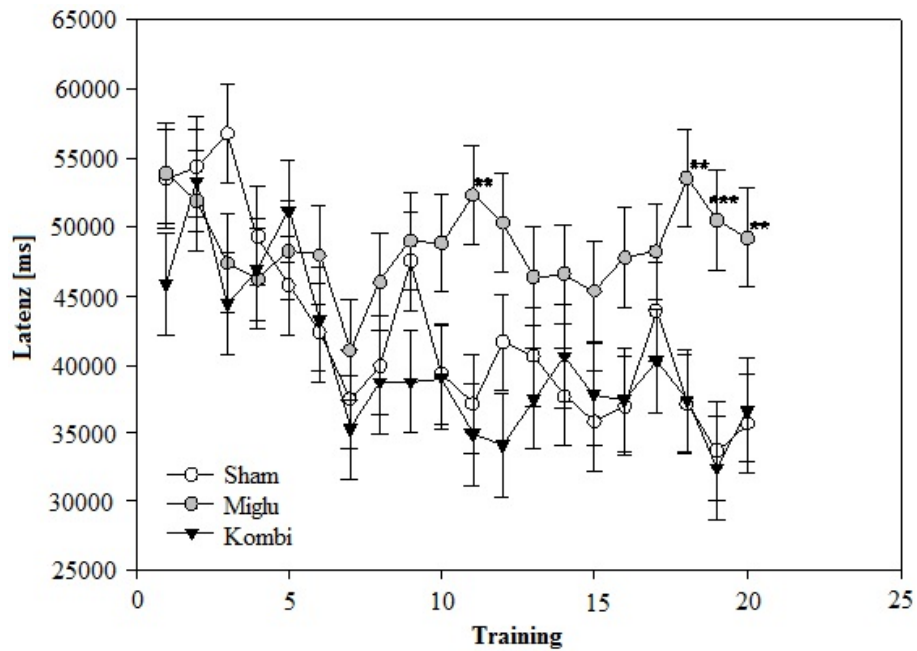


Abb. 28: Morris Water Maze-Training: graphische Darstellung der benötigten Zeit (Latenz in ms) zum Finden der Plattform für 3 Gruppen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM abgebildet. ** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,01$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. *** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,001$ ist und das Ergebnis somit hoch signifikant ist. Die Abbildung verdeutlicht das zunehmend schlechtere Abschneiden der Miglustat only-Gruppe im Vergleich zur Kombi- und Sham-Gruppe.

Auch beim Vergleich der drei Gruppen erfolgte abschließend das Zusammenfassen der Trainingseinheiten zu den Trainingsblöcken, um einen besseren Überblick über die Ergebnisse der einzelnen Gruppen zu erlangen. Dieser erneute Vergleich für drei Gruppen unterstrich die Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA für die einzelnen Trainingseinheiten. Die Kombi- und Sham-Gruppe waren in Block 3, 4 und 5 jeweils signifikant besser als die Miglustat only-Gruppe.

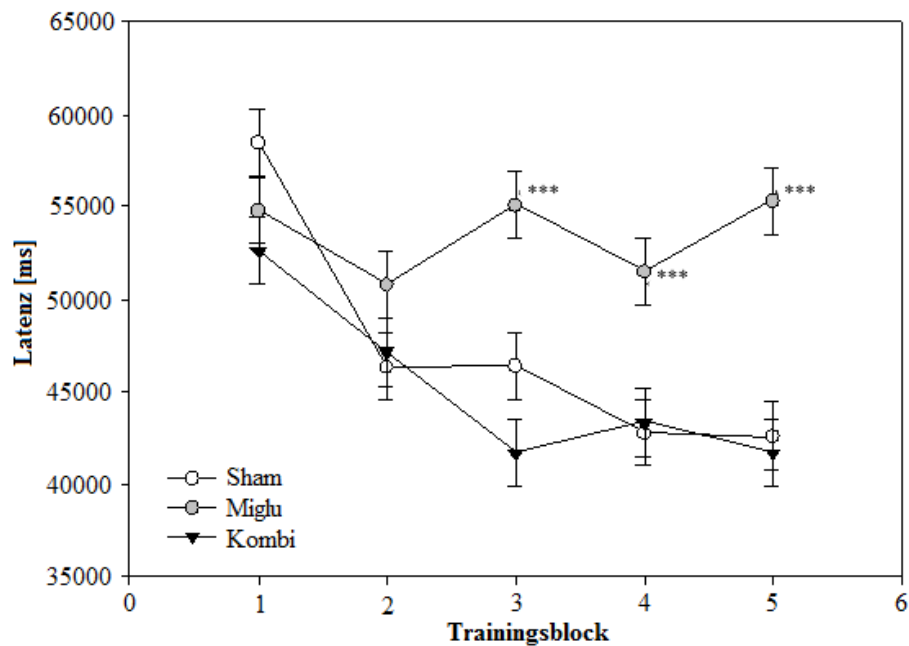


Abb. 29: Morris Water Maze-Training: graphische Darstellung der benötigten Zeit (Latenz in ms) zum Finden der Plattform in den einzelnen Trainingsblöcken für 3 Gruppen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM abgebildet. ** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,01$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. *** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,001$ ist und das Ergebnis somit hoch signifikant ist. Die Abbildung verdeutlicht das zunehmend schlechtere Abschneiden der Miglustat only-Gruppe im Vergleich zur Kombi- und Sham-Gruppe, mit signifikanten Unterschieden im dritten, vierten und fünften Block (Schlegel et al. 2016).

3.6 Morris Water Maze: Test

Der Morris Water Maze-Test fand direkt im Anschluss des fünften Trainingblockes statt. Mit diesem Test sollte überprüft werden, ob die Gruppen eine unterschiedliche motorische Entwicklung und ein unterschiedliches räumliches Lernverhalten zeigen.

Tabelle 3: Latenz bis zum Erreichen der ehemaligen Plattformregion (in ms)

Sham 1	Sham 2	Miglu	Kombi
47222	36828	49327	38615

Tabelle 4: Anzahl der Besuche der ehemaligen Plattform-Region

Sham 1	Sham 2	Miglu	Kombi
1,5	2	0,724	1,667

Da es im Morris Water Maze-Test ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Sham-Gruppen gab, erfolgte gleich die Auswertung am Modell für 3 Gruppen.

Während des Tests verbrachten die Versuchstiere signifikant unterschiedliche Zeiten im ehemaligen Plattformsektor. Die Miglustat only-Mäuse waren signifikant seltener im Plattformsektor als die Kombi-Tiere ($p \leq 0,001$; Abbildung 30). Die ANOVA nach Rängen

zeigte auch signifikante Unterschiede in den Kreuzungen des ehemaligen Plattformbereiches, jedoch konnte dies in allen paarweisen Mehrfachvergleichsverfahren (Dunn-Methode) nicht bestätigt werden (Abbildung 31). Um eine motorische Unterlegenheit der Miglustat only-Tiere auszuschließen, wurden die Schwimgeschwindigkeiten verglichen (Abbildung 32). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, daher können die signifikanten Unterschiede in der Zeit im Plattformquadranten nicht auf die Motorik zurückgeführt werden, sondern muss in den unterschiedlichen geistigen Fähigkeiten gesucht werden.

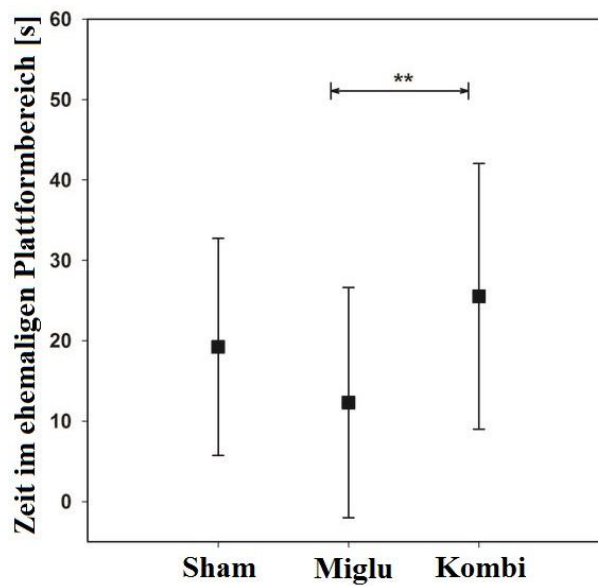


Abb. 30: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Morris Water Maze-Test: Zeit im ehemaligen Plattformbereich für 3 Gruppen. Die Darstellung der Testergebnisse erfolgt in einem Streudiagramm. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. ** bedeutet, dass der p-Wert $\leq 0,01$ ist und das Ergebnis somit signifikant ist. Die Kombi-Gruppe ist signifikant länger im ehemaligen Plattformbereich als die Miglustat only-Gruppe (Schlegel et al. 2016).

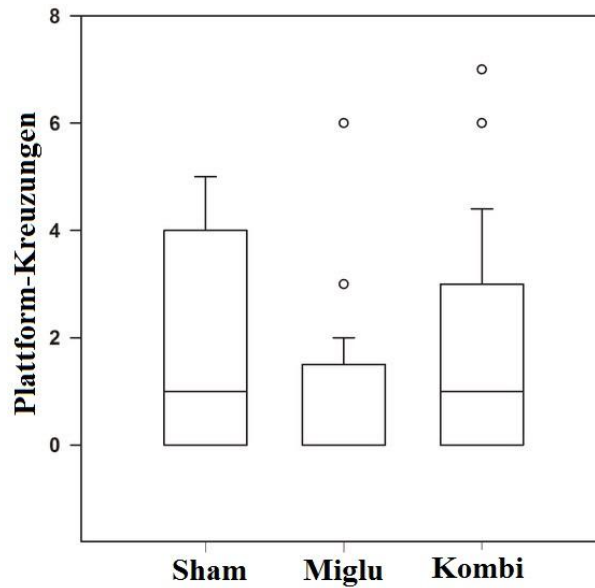


Abb. 31: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Morris Water Maze-Test: Plattformkreuzungen für 3 Gruppen. Die Darstellung der Testergebnisse erfolgt in einem Streudiagramm, die Daten werden als Mittelwert \pm SD abgebildet. Die Box bildet den Median, das obere und untere Quartil ab. Die Kreise sind Ausreißer außerhalb der 10. und 90. Perzentile. Kein signifikanter Unterschied zwischen Sham-, Miglustat only- oder Kombi-Gruppe (Schlegel et al. 2016).

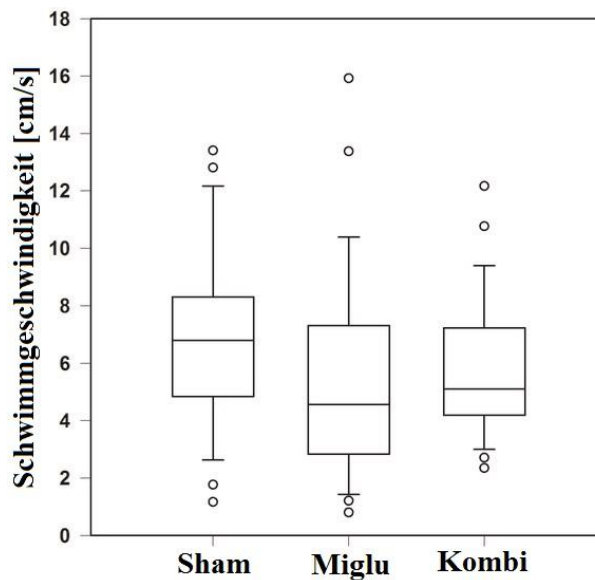


Abb. 32: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Morris Water Maze-Test: Schwimmgeschwindigkeit für 3 Gruppen. Die Darstellung der Testergebnisse erfolgt in einem Streudiagramm, die Daten werden als Mittelwert \pm SD abgebildet. Die Box bildet den Median, das obere und untere Quartil ab. Die Kreise sind Ausreißer außerhalb der 10. und 90. Perzentile. Kein signifikanter Unterschied zwischen der Sham-, Miglustat only- oder Kombi-Gruppe (Schlegel et al. 2016).

4. Diskussion der Ergebnisse

Das Hauptergebnis dieser Studie ist, dass weder eine alleinige Therapie mit Miglustat noch die Kombinationstherapie aus Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon einen Einfluss auf das motorische Verhalten von erwachsenen BALB/c-Wildtyp-Mäusen oder deren postnatale Entwicklung haben. Die Motorik der gesunden Versuchstiere wird weder positiv noch negativ durch eine Monotherapie mit Miglustat oder Kombinationstherapie beeinflusst. Hingegen die Lernfähigkeit der gesunden Mäuse wird durch eine Monotherapie mit Miglustat verschlechtert (Schlegel et al. 2016). Die Monotherapie mit Miglustat oder die Kombinationstherapie mit Cyclodextrin und Allopregnanolon zusammen, haben jedoch bei NPC^{-/-}-Mausmutanten (Davidson et al. 2009, Hovakimyan et al. 2013) und dem Menschen (Lachmann et al. 2004, Patterson et al. 2007, Pineda et al. 2009, Brand et al. 2015, Santos-Lozano et al. 2015) einen positiven Effekt. Dies wird durch die Interaktion der Medikamente mit dem lysosomalen Cholesteroll-Transport erklärt, der durch das defekte NPC1-Protein beeinträchtigt ist (Zervas et al. 2001, Aqul et al. 2011).

4.1 Analyse des Tiermodells

Die im Rahmen der Experimente verwendeten Mäuse stammten aus den Charles River Laboratories (Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, Germany) und gehörten dem Wildtyp NPC^{+/+} des Mausstammes BALB/c Nctr-Npc1^{m1N}/J an. Bei diesen Experimenten wurde sich gegen die klassischerweise erkrankten Tiere aus dem BALB/c-Mausmodell entschieden, um zu überprüfen, ob die Pharmakotherapie auch bei gesunden Tieren einen Effekt zeigt. Die Tiere des BALB/c-Mausmodell besitzen das Niemann-Pick Typ C1 NIH Allel, das nur bei Homozygotie zu einem Phänotyp führt (Pentchev et al. 1980). Diese Tiere werden bis heute am häufigsten in der NPC1-Forschung verwendet. Die hier vorkommende Mutation trat ursprünglich spontan auf und beruht auf einer Sequenzinsertion sowie Sequenzdeletion im NPC1-Gen. Diese Sequenzveränderungen führen zum Funktionsverlust aufgrund einer Leserasterverschiebung des NPC1-Proteins, für welches das NPC1-Gen codiert (Loftus et al. 1997). Die beim BALB/c-Mausmodell auftretende Form der NPC1-Erkrankung ähnelt eher der früh auftretenden und schnell verlaufenden Form der humanen NPC1-Erkrankung (Maue et al. 2012). Diese Form tritt bei Menschen eher selten auf und ist daher ein oft geäußerter Kritikpunkt am BALB/c-Mausmodell.

Ein weiteres, seltener verwendetes Tiermodell ist das C57BL/6J NPC1^{spm} Modell (Maue et al. 2012, Miyawaki et al. 1986). Die Mutation bei diesem Tiermodell wurde bis heute noch nicht identifiziert, jedoch ähnelt der Phänotyp der Mäuse stark dem der NPC1-Patienten (Miyawaki

et al. 1986). Diese Tiere sind besser für kognitive Verhaltenstests geeignet als Tiere des BALB/c-Mausmodells, da sie diesen Teil der NPC1-Erkrankung besser widerspiegeln (Owen et al. 1997, Rogers et al. 1999).

Eine Arbeitsgruppe um Maue und Erickson hat ein neues Tiermodell entwickelt. Bei den Mäusen dieses Modells findet sich eine „missense“-Punktmutation (Maue et al. 2012). Dadurch ähnelt der Phänotyp der Tiere stärker der humanen NPC1-Erkrankung als beim BALB/c-Mausmodells, denn die Klinik tritt später und langsamer auf. Des Weiteren handelt es sich bei dieser Mutation um die am häufigsten vorkommende Mutationsvariante bei NPC1-Erkrankten (Maue et al. 2012, Park et al. 2003). Durch diese Weiterentwicklung des BALB/c-Mausmodells können Maue und Erickson den am häufigsten geäußerten Kritikpunkt des BALB/c-Mausmodells umgehen.

Einen Kritikpunkt haben alle drei Tiermodelle gemeinsam. Bei keinem der Modelle kommt es bei den Versuchstieren zur Ausbildung von Neurofilamenten (neurofibrillary tangles). Diese Pathologie wurde jedoch bei NPC1-Erkrankten sowie bei Patienten mit Morbus Alzheimer festgestellt (Walkley et Suzuki.2004). Welche Auswirkung das Fehlen dieser Pathologie für die Übertragbarkeit der Tiermodelle auf den Menschen hat, wurde bis heute noch nicht ausreichend geklärt. Trotz dieses Defizites ist die Forschung an Versuchstieren immens wichtig, da die NPC1-Erkrankung sehr selten vorkommt und neue pharmakologische Therapieschemata vor der humanen Anwendung getestet werden müssen.

4.2. Analyse der verwendeten Pharmakotherapie

Im Rahmen dieser Studie wurden verschiedene Therapieschemata, die für NPC1-Mausmutanten entwickelt wurden, bei gesunden Wildtyp-Mäusen angewandt. Zu einem gab es zwei Gruppen (Sham 1 und 2), die gar nicht oder scheintherapiert wurden. Diese Gruppen sollten als Kontrollgruppen für die zwei therapierten Gruppen dienen, um positive oder negative Nebenwirkungen der Lösungsmittel, in welchen die verwendeten Arzneimittel gelöst wurden, auszuschließen und das Handling aller Tiere zu standardisieren. Die Kombi-Gruppe erhielt eine SRT/BPT-Kombinationstherapie aus Allopregnanolon, Cyclodextrin und Miglustat, entsprechend dem bisherigen Therapieschema der Arbeitsgruppe Wree sowie anderer Arbeitsgruppen aus der Literatur (Maass et al. 2015, Hovakimyan et al. 2013, Hovakimyan et al. 2011). Aus der Literatur ist bereits ein positiver Effekt dieser Therapie auf die Symptomatik des NPC1 bekannt. Es lindert und verlangsamt die neurologische Klinik (Tremor, ataktischer Gang) durch den Erhalt von Purkinje-Zellen im Kleinhirn und vergrößert die Gesamtlebensspanne der Versuchstiere (Davidson et al. 2009). Durch unsere

Arbeitsgruppe konnte zusätzlich ein positiver Effekt auf die kornealen Lipidablagerungen im Tierversuch festgestellt werden (Hovakimyan et al. 2011). Cyclodextrin wurde in einer japanischen Studie bereits bei humanen NPC1-Patienten eingesetzt (Matsuo et al. 2013). In Tierversuchen konnte für dieses Oligosaccharid ein positiver Einfluss auf die NPC-Proteine 1 und 2 nachgewiesen werden (Rosenbaum et al. 2010). Der genaue Wirkmechanismus des Cyclodextrin konnte bis heute nicht geklärt werden. Jedoch wurde eine eingeschränkte Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke festgestellt, dies stellt ein Problem bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen dar, zu denen der Morbus Niemann-Pick C1 zählt (Vance und Peake. 2011). Bei intraperitonealer Applikation im Tiermodell konnte trotzdem eine Verlangsamung und Besserung der cerebellären Neurodegeneration und damit der neurologischen Klinik sowie Verlängerung der Lebensspanne der Tiere erzielt werden (Liu et al. 2009).

Allopregnanolon wurde bisher nur an Tiermodellen getestet (Davidson et al. 2009, Hovakimyan et al. 2011, Maass Dissertation 2013, Petersen Dissertation 2013). Seine Wirkung wird bis heute in der Literatur stark bezweifelt. Durch mehrere Arbeitsgruppen konnte der ursprünglich angenommene positive Effekt des Allopregnanolon dem im Tierexperiment verwendeten Transportvehikel Cyclodextrin zugesprochen werden (Davidson et al. 2009, Li et al. 2005, Griffin et al. 2004). Lediglich eine Reduzierung des oxidativen Stress durch Allopregnanolon konnte nachgewiesen werden (Zamperi et al. 2009). Die Beteiligung des oxidativen Stress am Pathomechanismus des Morbus Niemann-Pick C1 durch Steigerung der Neurodegeneration wird noch kontrovers diskutiert (Vázquez et al. 2012). Des Weiteren konnte durch eine Arbeitsgruppe um Ishrat dem Allopregnanolon eine neuroprotektive Eigenschaft nachgewiesen werden, da es die Gliazellaktivierung nach Hirnverletzungen reduzieren soll (Ishrat et al. 2010). Dies könnte für die Therapie von NPC1 von Bedeutung sein, da durch Pressey eine frühe Neuroinflammation im Rahmen der Entstehung der Erkrankung diskutiert wird (Pressey et al. 2012).

Die Miglustat only-Gruppe erhielt lediglich Miglustat gelöst in 0,9%iger Natriumchloridlösung. Diese Gruppe wurde in unsere Versuche aufgenommen, da Miglustat seit 2009 als einziges Medikament für die Therapie des NPC1 durch die EMA zugelassen ist (Internetquelle 5) und wir prüfen wollten, ob es alleine den positiven Effekt der Kombinationstherapie bewirkt. Ein besonderes Merkmal des Morbus Niemann-Pick C1 ist die Akkumulation und Ablagerung von Glycosphingolipiden in Neuronen (Zervas et al. 2001). Dies kann Miglustat aufgrund seiner chemischen Beschaffenheit als alkylierter Iminozucker positiv beeinflussen, da es die Glukosylceramidsynthase reversibel hemmt und dadurch die

Akkumulation der Glycosphingolipide verlangsamt, indem es in die Glycosphingolipidsynthese eingreift (Platt et al. 1994). Jedoch konnte Miglustat bisher nur eine Besserung der Klinik und nicht eine Verzögerung des Krankheitsprogresses nachgewiesen werden (Patterson et al. 2007).

Aufgrund dieses Forschungsstandes ergaben sich die vier Versuchsgruppen, welche meiner Ansicht nach sinnvoll sind und aussagekräftige Ergebnisse liefern.

4.3 Analyse der Accelerod-Ergebnisse

Das Accelerod-Experiment diente der Überprüfung der Motivation, des motorischen Lernverhaltens, des Gleichgewichts und der motorischen Koordination der Versuchstiere. Durchgeführt wird der Versuch auf einer gleichmäßig rotierenden, gummierten Walze, wobei die Rotationsgeschwindigkeit während der Trainingseinheiten konstant ist und während der Testläufe kontinuierlich gesteigert wird (Barlow et al. 1996). Um den Test durchführen zu können, benötigen die Tiere eine intakte cerebelläre Funktion und Verschaltung (Carter et al. 1999). Accelerod ist ein anerkanntes Experiment zur Überprüfung der motorischen Leistungsfähigkeit von Nagetieren (Jones und Roberts 1968).

Die Klinik des NPC1 wird vor allem von motorischen Symptomen geprägt. Die motorische Dysfunktion äußert sich zum Beispiel in Gangstörungen durch die cerebelläre Ataxie mit häufigen Stürzen und Schluckbeschwerden (Vanier 2010, Patterson et al. 2013).

Für das BALB/c-Mausmodell beschrieb Vöikar eine bereits ab dem 36. postnatalen Tag auftretende motorische Dysfunktion und Davidson wies eine sichtbare cerebelläre Ataxie ab der sechsten postnatalen Woche nach (Vöikar et al. 2002, Davidson et al. 2009).

Der Versuch wird bei erkrankten Versuchstieren am 35. und 60. postnatalen Tag durchgeführt, um mit dem P35-Wert einen Ausgangswert vor Beginn der Erkrankung zu erhalten oder eine frühe motorische Dysfunktion auszuschließen, sowie um an Tag 60 einen möglichen Therapieerfolg zu detektieren. Obwohl die Experimente nicht mit erkrankten Tieren durchgeführt wurden, wurden für die Experimente dieser Studie dieselben Versuchsabfolgen verwendet, damit die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Arbeiten unserer Gruppe und Ergebnissen aus der Literatur vergleichbar sind.

Im frühen Accelerod-Training (P33-35) zeigten alle vier Versuchsgruppen einen Lerneffekt, wenn sich auch nicht für alle vier Gruppen eine perfekte Lernkurve ergeben hat. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Accelerod-Training einen Lerneffekt hatte und dass sie während des Trainings motiviert waren. Eine Einschränkung der cerebellären Funktion konnte somit

bei den Mäusen ausgeschlossen werden und bewies, dass die Tiere für die geplanten Experimente und Untersuchungen geeignet waren.

Es wurden sowohl im Training als auch im Test zu P35 nur vereinzelte signifikante Unterschiede gefunden (siehe Kapitel 3.1 und 3.2). Dies beweist, dass die Therapie der gesunden Tiere keine Auswirkung auf ihre Motorik hat. Jedoch konnte dadurch auch sowohl ein „Doping“ als auch eine „toxische Wirkung“ auf das Nervensystem der therapierten, gesunden Tiere ausgeschlossen werden.

Das späte Accelerod-Experiment sollte ebenfalls der Überprüfung der Motivation, des motorischen Lernverhaltens, des Gleichgewichts und der motorischen Koordination der Versuchstiere dienen, sowie zusätzlich Informationen darüber liefern, wie sich die Tiere im Laufe ihres Lebens entwickeln und sich die zwei verschiedenen Therapieschemata auf das Verhalten sowie die Motorik der Mäuse auswirken.

Im späten Accelerod-Training zeigten alle vier Versuchsgruppen, dass der Lerneffekt aus dem frühen Accelerod-Training angehalten hatte. Alle Gruppen starteten bereits im ersten Training zur späten Accelerod-Reihe mit einem niedrigeren Ausgangswert, woraus geschlussfolgert werden kann, dass der Lerneffekt aus der ersten Trainingsreihe um P35 weiterhin bestand. In den folgenden Trainingsdurchgängen verbesserten alle Gruppen ihr Niveau an Herunterfallern weiter. Damit wurde erneut bewiesen, dass das Accelerod-Training einen Lerneffekt widerspiegelt. Es wurden sowohl im Training als auch im Test zu P60 nur vereinzelte signifikante Unterschiede gefunden (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). Dies beweist erneut, dass die Medikation bei gesunden Tieren keinen Effekt auf ihr motorisches Verhalten hat. Jedoch konnte dadurch auch ein „Doping“ sowie eine „toxische Wirkung“ auf das Nervensystem der therapierten, gesunden Tiere erneut ausgeschlossen werden.

Dies stimmt mit den Ergebnissen einer früheren Studie überein. Bereits Hovakimyan et al. zeigte 2013, dass weder eine Kombinationstherapie noch eine Monotherapie mit Miglustat motorische Unterschiede zwischen den mutierten, erkrankten Versuchstieren bewirkt.

4.4 Analyse der Morris Water Maze-Ergebnisse

Das Morris Water Maze-Experiment diente der Überprüfung des räumlichen Lernverhaltens, der Orientierungsfähigkeit, des Gedächtnisses und der Motorik der Versuchstiere, somit dient dieser Versuch vor allem als Marker für die Kognition. Dieser Test wurde durchgeführt, um einen möglichen Effekt der Miglustat only- oder SRT/BPT-Kombinationstherapie zu detektieren (Karl et al. 2003, Hodges 1996, Morris 1984).

Patienten mit NPC1 haben häufig mit kognitiven Störungen zu kämpfen. Vor allem die Ausbildung einer Demenz im Rahmen der adulten Verlaufsform beeinträchtigt die Patienten schwer. Zusätzlich können die Patienten im höheren Alter psychiatrische Symptome zeigen (Vanier 2010, Kodam et al. 2010, Abel et al. 2009, Lachmann et al. 2004) [Internetquelle 2].

Im BALB/c-Mausmodell konnte diese negative kognitive Entwicklung der Versuchstiere durch ein schlechteres Ergebnis der Kognition von untherapierten Tieren mit Kontrolltieren im Morris Water Maze an P50-51 nachgewiesen werden (Vöikar et al. 2002). Ein möglicher Einfluss der SRT/BPT-Kombinationstherapie wurde durch die Rostocker Arbeitsgruppe untersucht. Deren Ergebnisse zeigten keinen positiven Effekt der Kombinationstherapie auf das räumliche Lernen und Gedächtnis der NPC1-Mutanten (Hovakimyan et al. 2013).

Mit diesem Experiment sollte nun geprüft werden, ob die Ergebnisse der Rostocker Arbeitsgruppe zur Kombinationstherapie reproduzierbar sind und ob eine Miglustat only-Therapie möglicherweise einen positiven Effekt auf die Kognition der gesunden Versuchstiere hat. Des Weiteren sollten „toxische Effekte“ auf gesunde Versuchstiere ausgeschlossen werden. Das Experiment wurde, wie schon bei Petersen und Maass, am 47. postnatalen Tag mit 2 Trainingsblöcken begonnen, an P48 folgten zwei weitere Trainingsdurchgänge und an P49 wurde mit einem weiteren Trainingsblock sowie dem einmaligen Testdurchgang dieser Versuch beendet (Hovakimyan et al. 2013). Dieser Zeitraum ähnelt zudem den Angaben aus der Literatur (Vöikar et al. 2002).

Die Ergebnisse der Wildtyp-Mäuse zeigen, dass die Miglustat only-Tiere eine signifikant eingeschränkte räumliche Lernfähigkeit gegenüber den kombitherapierten sowie scheinbehandelten Mäusen aufweisen (siehe Abbildung 30). Die Kombi-Gruppe ist aber nicht signifikant schlechter als die Sham-Gruppen. Für sie konnte nach dem Entfernen der verborgenen Plattform die gleiche Anzahl an Plattformkreuzungen und die gleiche verbrachte Zeit im ehemaligen Plattformsektor bestimmt werden.

Es ist bekannt, dass die Leistung der Versuchstiere während des Morris Water Maze-Tests vom Alter, dem Geschlecht, dem Ernährungszustand, Stress und der Hintergrundbelastung abhängig ist (D'Hooge und De Deyn 2001). Für einige Mausstämme konnte gezeigt werden, dass sie trotz einer Verbesserung der Voraussetzungen und äußeren Bedingungen für den Test kein Lernverhalten zeigen und den Zielquadranten nicht vermehrt finden (Royle et al. 1999, Van Dam et al. 2006). Eine Gruppe um Van Dam zeigte 2006 sogar, dass die BALB/c-Mäuse nie eine deutliche Präferenz für den Plattformquadranten entwickeln. Sie schlussfolgerten damals, dass die BALB/c-Mäuse nicht in der Lage sind, die Aufgabe des Morris Water Maze-Tests zu lernen und sich die Position der Plattform zu merken (Van Dam et al. 2006). Diese

Aussage kann heute mit den von uns verwendeten Wildtyp- Mäusen mit BALB/c-Stamm-Hintergrund nicht bestätigt werden, da alle vier Versuchsgruppen die Aufgabe des Morris Water Maze lernten, auch wenn sie während des Tests eine große interindividuelle Spannbreite bezüglich der Plattformkreuzungen aufwiesen (siehe Kapitel 3.5 und 3.6).

Die Kombi- und Sham-Gruppen schnitten im Test signifikant besser ab als die Miglustat only-Gruppe. Dies könnte durch eine bereits bekannte Nebenwirkung des Miglustat – die Amnesie – erklärt werden (Internetquelle 5). Nun kann spekuliert werden, dass die Substanzen der Kombinationstherapie (Cyclodextrin und Allopregnanolon) die Nebenwirkung des Miglustat aufheben, der molekulare Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt. 2012 wurde nachgewiesen, dass Cyclodextrin die Verteilung von Substanzen im Gehirn, z. B. des Adenylat-Cyclase-aktivierenden Polypeptids, verändert und dass es sogar spezifische Verteilungsmuster erzeugt (Nonaka et al. 2012). Jetzt kann nur vermutet werden, dass Cyclodextrin ebenfalls die Verteilung von Miglustat im Hippocampus der Nagetiere verändert, welche bei diesen Tieren für das räumliche Lernverhalten und die Gedächtnisleistung verantwortlich ist (Morris et al. 1982).

Zusätzlich konnte mit dem Morris Water Maze-Experiment gezeigt werden, dass beide Therapieschemata keinen Einfluss auf die Motorik der Tiere hat, denn alle vier Versuchsgruppen hatten etwa die gleiche Schwimmgeschwindigkeit während des Tests trotz unterschiedlicher Präferenzen für den Zielquadranten. Somit konnte erneut sowohl ein „Doping“ als auch eine „toxische Wirkung“ auf die Motorik gesunder Versuchstiere ausgeschlossen werden.

4.5 Diskussion der Fragestellungen und Hypothesen

Auf Grundlage der erlangten Trainings- und Testergebnisse müssen die aufgestellten Fragestellungen und Hypothesen aus 1.6.1 sowie 1.6.2 betrachtet werden. Zunächst möchte ich mich den Fragestellungen widmen.

Die erste Fragestellung aus 1.6.1 lautete wie folgt: Gibt es einen Unterschied zwischen der Sham 1- und der Sham 2-Gruppe? Das heißt, es soll geprüft werden, ob schon die Lösungsmittel alleine einen positiven oder negativen Effekt auf das Verhalten der Versuchstiere haben. Diese Fragestellung muss verneint werden. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Sham 1 -und 2-Gruppe und somit ist nachgewiesen, dass Kochsalzlösung und Ringerlösung alleine keinen Effekt auf das Verhalten der Versuchstiere hat.

Die zweite Fragestellung lautete: Gibt es einen Unterschied zwischen der Kombi-Gruppe und der Sham 2-Gruppe? Das heißt, wir wollen herausfinden, ob die therapierten Tiere, die eine 3er-Kombi aus Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon bekommen haben, in unseren Tests besser abschneiden als die Mäuse, denen ausschließlich physiologische Kochsalzlösung und Ringerlösung gespritzt wurde. Diese Fragestellung muss deutlich verneint werden, es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kombi- und Sham 2-Gruppe. Somit hat sie keinen Nutzen bei gesunden Wildtyp-Tieren, aber auch keinen „Doping-Effekt“ oder eine „toxische Wirkung“.

Die dritte Fragestellung lautete: Besteht ein Unterschied zwischen der Miglustat only-Gruppe und der Sham 2-Gruppe? Es gilt also zu ermitteln, ob Miglustat als Monotherapie einen positiven Effekt auf unsere Versuchstiere hat. Diese Fragestellung muss ebenso wie die zweite verneint werden und sagt somit ebenfalls aus, dass die Miglustat only-Therapie keinen Nutzen bei gesunden Wildtyp-Tieren hat, aber auch keinen „Doping-Effekt“ oder eine „toxische Wirkung“.

Die vierte Fragestellung lautete: Treten Unterschiede im Verhalten zwischen der Kombi-Gruppe und der Miglustat only-Gruppe der gesunden Wildtyp-Mäuse auf? Das heißt, haben die bei Morbus Niemann Pick verwendeten Medikamente (3er-Kombination) einen anderen Effekt als Miglustat alleine auf gesunde Wildtyp-Tiere? Es wurde deutlich gezeigt, dass weder Miglustat alleine noch die 3er-Kombinationstherapie signifikant die Motorik der gesunden Versuchstiere verbessert. Im Morris Water Maze waren die kombinationsbehandelten Mäuse jedoch signifikant häufiger im Plattformquadranten als die nur mit Miglustat alleine therapierten Mäuse (siehe Abbildung 30). Dies lässt schlussfolgern, dass die Miglustat only-Tiere ein eingeschränktes räumliches Lernverhalten gegenüber den kombitherapierten Mäusen aufweisen. Daher sollte überlegt werden, ob nicht die Kombinationstherapie bevorzugt wird, da Cyclodextrin zum Beispiel die Amnesie als Nebenwirkung des Miglustat durch die Umverteilung von Substanzen im Gehirn (Nonaka et al. 2012, Morris et al. 1982) und möglicherweise auch andere Nebenwirkungen unterdrückt.

Im Folgenden sollen die Hypothesen genauer beleuchtet werden.

Die erste Hypothese aus 1.6.2 lautete wie folgt: Miglustat only und/oder die 3er-Kombi-Therapie mit Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon haben einen förderlichen Effekt auf die motorische Entwicklung und Leistung von gesunden Tieren. Diese Hypothese wurde deutlich widerlegt, wie in Kapitel 4.3 diskutiert, hat keine der beiden Therapieoptionen einen positiven Effekt auf die Motorik gesunder Wildtyp-Mäuse.

Die zweite Hypothese lautete: Miglustat only und/oder die 3er-Kombi-Therapie fördern das räumliche Lernen der Tiere. Auch diese Hypothese wurde in den vorausgegangenen Kapiteln deutlich widerlegt. Miglustat hat keinen positiven Effekt auf das räumliche Lernverhalten oder Gedächtnis der Tiere. Im Gegenteil, es schneidet signifikant schlechter ab, im Vergleich mit der Kombi-Therapie und den scheinbehandelten Tieren. Die Kombi-Therapie hat ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf das Verhalten gesunder Versuchstiere im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren. Sie kann jedoch die Nebenwirkung der Amnesie des Miglustat aufheben. Das Gedächtnis kann aber nicht über das Normale hinaus verbessert werden.

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Obwohl bereits von einigen Arbeitsgruppen ein positiver Effekt der Miglustat- und Kombinationstherapie bei NPC1-mutierten Mäusen nachgewiesen wurden (Davidson et al. 2009, Hovakimyan et al. 2013, Maass et al. 2015, Davidson et al. 2016), profitieren die Wildtyp-Mäuse nicht von den verabreichten Substanzen, da keine therapierte Gruppe signifikant besser war als eine der scheinbehandelten Gruppen.

Die Wirkung der Medikamente auf die motorischen Fähigkeiten der Wildtyp-Mäuse war nicht signifikant. Die Therapie mit Miglustat only beeinträchtigte in unseren Experimenten die räumliche Lernfähigkeit und das Gedächtnis der Versuchstiere. Dieser Effekt wurde durch die kombinierte Therapie von Miglustat mit Cyclodextrin und Allopregnanolon auf das Niveau der Scheinbehandlung verbessert. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass eine zusätzliche Therapie mit Cyclodextrin und Allopregnanolon die meisten der unerwünschten Nebenwirkungen von Miglustat verbessert, jedoch nicht alle.

Zur Kräftigung dieser Aussagen sind weitere Experimente erforderlich. Es sollten mehrere Gruppen mit verschiedenen Monotherapien gegenüber unterschiedlichen Kombinationstherapien bei NPC1-Mutanten untersucht werden, um zu prüfen, welche der Monotherapien (Miglustat oder Cyclodextrin) zur Krankheitsverzögerung bei NPC^{-/-}-Mäusen führt. Des Weiteren sollte geprüft werden, welche Nebenwirkungen die Mono- als auch Kombitherapien auf NPC^{+/+}-Mäuse haben.

5. Literaturverzeichnis

Abel LA, Walterfang M, Fietz M, Bowman EA, Velakoulis D (2009) Saccades in adult Niemann-Pick disease type C reflect frontal, brainstem, and biochemical deficits. *Neurology* 72(12): 1083–1086

Alpay N (2005) Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ A, B und C: Etablierung von Nachweismethoden eines saure Sphingomyelinase-Mangels in verschiedenen humanen Geweben und einer intrazellulären Cholesterintransportstörung in Fibroblasten. Dissertation an der Universität München

Aqul A, Liu B, Ramirez CM, Pieper AA, Estill SJ, Burns DK, Liu B, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM (2011) Unesterified cholesterol accumulation in late endosomes/lysosomes causes neurodegeneration and is prevented by driving cholesterol export from this compartment. *J. Neurosci.* 31: 9404–9413

Backhaus K (2006) *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung.* Springer (11): 45-119

Balogh SA, McDowell CS, Stavnezer AJ, Denenberg VH (1999) A behavioral and neuroanatomical assessment of an inbred substrain of 129 mice with behavioral comparisons to C57BL/6J mice. *Brain Res* 836 (1-2): 38–48

Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F et al (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86 (1): 159–171

Baulieu EE et Schumacher M (2000) Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* 65(10-11): 605–612

Becher A, White JH, McIlhinney RAJ (2008) The γ -aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem* 79: 787–795

Beckley EH, Fretwell AM, Tanchuck MA, Gililand KR, Crabbe JC, Finn DA (2008) Decreased anticonvulsant efficacy of allopregnanolone during ethanol withdrawal in female withdrawal seizure-prone vs. withdrawal seizure-resistant mice. *Neuropharmacology* 54(2): 365–374

Belmatoug N, Burlina A, Giraldo P, Hendriksz CJ, Kuter DJ, Mengel E, Pastores GM (2011) Gastrointestinal disturbances and their management in miglustat-treated patients. *J Inher Metab Dis* 34: 991–1001

Bogo V, Hill TA, Youn, RW (1981) Comparison of accelerod and rotarod sensitivity in detecting ethanol- and acrylamide-induced performance decrement in rats: Review of experimental considerations of rotating rod systems. *Neurotoxicology* 2: 765–787

Bortz J, Schuster C (2010) Kovarianzanalyse. In: *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. Springer 7. Auflage: 305–323

Brachet A, Norwood S, Brouwers JF, Palomer E, Helms JB, Dotti CG, Esteban JA (2015) LTP-triggered cholesterol redistribution activates Cdc42 and drives AMPA receptor synaptic delivery. *J Cell Biol* 208: 791–806

Brand M, Muller A, Alsop J, van Schaik IN, Bembi B, Hughes D (2015) Results from a 9-year intensive safety surveillance scheme (IS(3)) in miglustat (Zavesca®)-treated patients. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 24: 329–33

Brosius F (1998) *Professionelle Statistik unter Windows*. International Thomson Publishing Kapitel 20: 479–495

Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang TY, Liscum L, Strauss JF 3rd, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277(5323): 228–231

Carter RJ, Lione, LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP et al (1999) Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 19 (8): 3248–3257

Cologna SM, Jiang X-S, Backlund PS, Cluzeau CVM, Dail MK, Yanjanin NM, Siebel S, Toth CL, Jun H, Wassif CA et al (2012) Quantitative proteomic analysis of Niemann-Pick disease, type C1 cerebellum identifies protein biomarkers and provides pathological insight. *PLoS ONE* 7, e47845

Comerford KB, Artiss JD, Jen K-LC, Karakas SE (2011) The beneficial effects α -Cyclodextrin on blood lipids and weight loss in healthy humans. *Obesity* 19: 1200–1204

Compagnone NA et Mellon SH (2000) Neurosteroids, biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21(1): 1–56

Crocker AC (1961) The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *J Neurochem* 7: 69–80

Crumling MA, Liu L, Thomas PV, Benson J, Kanicki A, Kabara L, Hälsey K, Dolan D, Duncan RK (2012) Hearing loss and hair cell death in mice given the cholesterol-chelating agent hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *PLoS ONE* 7: e53280

D’Arcangelo G, Grossi D, Racaniello M, Cardinale A, Zaratti A, Rufini S, Cutarelli A, Tancredi V, Merlo D, Frank C (2016) Miglustat reverts the impairment of synaptic plasticity in a mouse model of NPC disease. *Neural Plast*: 3830424, doi:10.1155/2016/3830424

Davidson CD, Ali NF, Micsenyi MC, Stephney G, Renault S, Dobrenis K, Ory DS, Vanier MT, Walkley SU (2009) Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS One* 4(9): e6951

Davidson CD, Fishman YI, Puskás I, Szemán J, Sohajda T, McCauliff LA, Sikora J, Storch J, Vanier MT, Szente L, Walkley SU, Dobrenis K (2016) Efficacy and ototoxicity of different cyclodextrins in Niemann-Pick C disease. *Ann Clin Transl Neurol* 3: 366–380

Deisz RA, Meske V, Treiber-Held S, Albert F, Ohm TG (2005) Pathological cholesterol metabolism fails to modify electrophysiological properties of afflicted neurons in Niemann-Pick Disease Typ C. *Neuroscience* 130(4): 867–873

Dixit SS, Jadot M, Sohar I, Sleat DE, Stock AM, Lobel P (2011) Loss of Niemann-Pick C1 or C2 protein results in similar biochemical changes suggesting that these proteins function in a common lysosomal pathway. *PLoS One* 6(8): e23677

D’Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 36: 60–90

Fahrmeier L, Künstler R, Pigeot I, Tutz G (1999) *Der Weg zur Datenanalyse*. Springer 2. Auflage: 497–525

Fan J, Akabane H, Graham SN, Richardson LL, Zhu GZ (2006) Sperm defects in mice lacking a functional Niemann–Pick C1 protein. *Mol Reprod Dev* 73(10): 1284–1291

Ficicioglu C (2008) Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1. *Ther Clin Risk Manag* 4(2): 425–431

Frank C, Rufini S, Tancredi V, Forcina R, Grossi D, D’Arcangelo G (2008) Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Exp Neurol* 212: 407–414

Greten H et al. 2005. Thieme, Innere Medizin 12., komplett überarbeitete Auflage, S. 651f.

Griffin LD, Gong W, Verot L, Mellon SH (2004) Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat Med* 10(7): 704–711

Grittner U, Bloomfield K (2013) Mathematical approaches to analysing area-level effects on health. *Neighbourhood Structure and Health Promotion (Book)*: 177–200

Gröger M, Kretzer EK, Woyke A (2001) Cyclodextrine. Science Forum der Universität Siegen

Hatzi P, Mourtas S, Klepetsanis PG, Antimisiaris SG (2007) Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: eEffect of liposome type and lipid composition. *Int J Pharm* 333: 167–176

Herd MB, Belelli D, Lambert JJ (2007) Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* 116(1): 20–34

Héron B, Valayannopoulos V, Baruteau J, Chabrol B, Ogier H, Latour P, Dobbelaere D, Eyer D, Labarthe F, Maurey H et al. (2012) Miglustat therapy in the french cohort of paediatric patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 7: 36, doi:10.1186/1750-1172-7-36

Higashi Y, Murayama S, Pentchev PG, Suzuki K (1993) Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse. *Acta Neuropathol* 85(2): 175–178

Higgins ME, Davies JP, Chen FW, Ioannou YA (1999) Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab* 68(1): 1–13

Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res* 3(3-4): 167–181

Hovakimyan M, Maass F, Petersen J, Holzmann C, Witt M, Lukas J, Frech MJ, Hübner R, Rolfs A, Wree A (2013) Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice. *Neuroscience* 252: 201–211

Hovakimyan M, Petersen J, Maass F, Reichard M, Witt M, Lukas J, Stachs O, Guthoff R, Rolfs A, Wree A (2011) Corneal alterations during combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat in a knock-out mouse model of NPC1 disease. *PLoS One* 6(12): e28418

Huang W, Zheng W, Urban DJ, Inglese J, Sidransky E, Austin CP, Thomas CJ (2007) N⁴-Phenyl modifications of N²-(2-hydroxy)ethyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-1,3,5-triazine-2,4-diamines enhance glucocerebrosidase inhibition by small molecules with potential as chemical chaperones for Gaucher Disease. *Bioorg Med Chem Lett* 17(21): 5783–5789

Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Hua F, Stein DG. (2010) Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp Neurol* 226 (1): 183–190

Jacobson S (1963) Sequence of myelination in the brain of the albino rat. A cerebral cortex, thalamus and related structures. *J Comp Neurol* 121: 5–29

Jarosz PA, Fletcher E, Elserafy E, Artiss JD, Jen K-LC (2013) The effect of α -cyclodextrin on postprandial lipid and glycemic responses to a fat-containing meal. *Metabolism* 62: 1443–1447

Jones BJ, Roberts DJ (1968) A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259 (2): 211

Karl T, Pabst R, von Hörsten S (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55: 69–83

Karlsson U (1967) Observations on the postnatal development of neuronal structures in the lateral geniculate nucleus of the rat by electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 17: 158–175

Kaptzan T, West SA, Holicky EL, Wheatley CL, Marks DL, Wang T, Peake KB, Vance J, Walkley SU, Pagano RE (2009) Development of a Rab9 transgenic mouse and its ability to increase the lifespan of a murine model of Niemann-Pick type C disease. *Am J Pathol* 174(1): 14–20

Karl T, Pabst R, Horsten S von (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55(1): 69–83

Kodam A, Maulik M, Peake K, Amritraj A, Vetrivel KS, Thinakaran G, Vance JE, Kar S (2010) Altered levels and distribution of APP and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia* 58(11): 1267–1281

Kondo Y, Tokumaru H, Ishitsuka Y, Matsumoto T, Taguchi M, Motoyama K, Higashi T, Arima H, Matsuo M, Higaki K et al. (2016) In vitro evaluation of 2-hydroxyalkylated β -cyclodextrins as potential therapeutic agents for Niemann-Pick type C disease. *Mol Genet Metab* 118: 214–219

Kopp J, Lois D (2012) Einführung in die Mehrebenenanalyse (und Anwendung in Mplus/SPSS). Technische Universität Chemnitz 1–76

Kruskal W, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583–621

Kruskal W (1957) Historical note on the Wilcoxon unpaired two-sample test. *Journal of the American Statistical Association*, Band 52: 356–360

Kuhla A, Lange S, Holzmann C, Maass F, Petersen J, Vollmar B, Wree A (2013) Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. *PLoS One* 8(7):e68778

Lachmann RH, te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Reinkensmeier G, Sillence DJ, Fernandez-Guillen L, Dwek RA, Butters TD, Cox TM, Platt FM (2004) Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. *Neurobiol Dis* 16(3): 654–658

Li HR, Joyce J, Valasek MA, Beltroy EP, Turley SD, German DC, Dietschy JM (2005) Molecular, anatomical, and biochemical events associated with neurodegeneration in mice with Niemann-Pick type C disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (4): 323–333

Liu B, Ramirez CM, Miller AM, Repa JJ, Turley SD, Dietschy JM (2010) Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. *J Lipid Res* 51(5): 933–944

Liu B, Turley SD, Burns DK, Miller AM, Repa JJ, Dietschy JM (2009) Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1^{-/-} mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7): 2377–2382

Liu QY, Chang YH, Schaffner AE, Smith SV, Barker JL (2002) Allopregnanolone activates GABA(A) receptor/Cl(-) channels in a multiphasic manner in embryonic rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 88(3):1147–1158

Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Galione A, Platt FM (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* 14(11): 1247–1255

Loftus SK, Morris JA, Carstea ED, Gu JZ, Cummings C, Brown A, Ellison J, Ohno K, Rosenfeld MA, Tagle DA, Pentchev PG, Pavan WJ (1997) Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277(5323): 232–235

Lope-Piedrafita S, Totenhagen JW, Hicks CM, Erickson RP, Trouard TP (2008) MRI detects therapeutic effects in weanling Niemann-Pick type C mice. *J Neurosci Res* 86(12): 2802–2807

Lopez AM, Terpack SJ, Posey KS, Liu B, Ramirez CM, Turley SD (2014) Systemic administration of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin to symptomatic NPC1-deficient mice slows cholesterol sequestration in the major organs and improves liver function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41: 780–787

Maass F (2013) Dissertation: Funktionelle und morphologische Veränderungen im Tiermodell von Morbus Niemann-Pick Typ C1 unter Einfluss der SRT/BPT-Kombinationstherapie

Maass F, Petersen J, Hovakimyan M, Schmitt O, Witt M, Hawlitschka A, Lukas J, Rolfs A, Wree A (2015) Reduced cerebellar neurodegeneration after a combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat in NPC1: A mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. *J Neurosci Res* 93: 433–442

Mann H et Whitney D (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of mathematical Statistics* 18: 50–60

Matsuo M, Togawa M, Hirabaru K, Mochinaga S, Narita A, Adachi M, Egashira M, Irie T, Ohno K (2013) Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick type C disease. *Mol Genet Metab* 108(1): 76–81

Maue RA, Burgess RW, Wang B, Wooley CM, Seburn KL, Vanier MT, Rogers MA, Chang CC, Chang T, Harris BT, Graber DJ, Penatti CAA, Porter DM, Szwergold BS, Henderson LP, Totenhagen JW, Trouard TP, Borbon IA, Erickson RP (2012) A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Hum Mol Genet* 21(4):730–750

Maulik M, Ghoshal B, Kim J, Wang Y, Yang J, Westaway D, Kar S (2012) Mutant human APP exacerbates pathology in a mouse model of NPC and its reversal by a b-cyclodextrin. *Hum Mol Genet* 21(22): 4857–4875

Mellon S, Gong W, Griffin LD (2004) Niemann Pick tType C disease as a model for defects in neurosteroidogenesis. *Endocr Res* 30(4): 727–735

Millat G, Marçais C, Rafi MA, Yamamoto T, Morris JA, Pentchev PG, Ohno K, Wenger DA, Vanier MT (1999) Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet* 65(5): 1321–1329

Miyawaki S, Yoshida H, Mitsuoka S, Enomoto H, Ikehara S (1986) A mouse model for Niemann-Pick disease. Influence of genetic background on disease expression in spm/spm mice. *J Hered* 77(6): 379–384

Morris MD, Bhuvaneshwaran C, Shio H, Fowler S (1982) Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. I. Description of the disease and genetics. *Am J Pathol* 108(2): 140–149

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11(1): 47–60

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O’Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681–683

Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M, Lobel P (2000) Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 290(5500): 2298–2301

Neefjes J und van der Kant R (2014) Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system. *Trends in Neuroscience* 37 (2): 66–76

Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JF 3rd, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1999) The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem* 274(14): 9627–9635

Nonaka N, Farr SA, Nakamachi T, Morley JE, Nakamura M, Shioda S, Banks WA (2012) Intranasal administration of PACAP: uptake by brain and regional brain targeting with cyclodextrins. *Peptides* 36: 168–75

Ormerod KG, Rogasevskaia TP, Coorssen JR, Mercier AJ (2012) Cholesterol-independent effects of methyl- β -cyclodextrin on chemical synapses. *PLoS ONE* 7: e36395

Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, Wehner JM (1997) Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80(4):1087–1099

Palladino G, Loizzo S, Fortuna A, Canterini S, Palombi F, Erickson RP, Mangia F, Fiorenza MT (2015) Visual evoked potentials of Niemann-Pick type C1 mice reveal an impairment of the visual pathway that is rescued by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Orphanet J Rare Dis* 10: 133

Park WD, O'Brien JF, Lundquist PA, Kraft DL, Vockley CW, Karnes PS, Patterson MC, Snow K (2003) Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum Mutat* 22(4): 313–325

Pastores GM (2006) Miglustat: substrate reduction therapy for lysosomal storage disorders, associated with primary central nervous system involvement. *Recent Pat CNS Drug Discov* 1(1): 77–82

Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE (2007) Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol* 6(9): 765–772

Patterson MC, Vecchio D, Jacklin E, Abel L, Chadha-Boreham H, Luzy C, Giorgino R, Wraith JE (2010) Long-term miglustat therapy in children with Niemann-Pick disease type C. *J Child Neurol* 25: 300–305

Patterson MC, Mengel EW, Frits A, Muller AS, Barbara DH et al (2013) Disease and patient characteristics in NP-C patients: findings from an international disease registry. *Orphanet J Rare Dis* 8: 12

Peake KB, Vance JE (2012) Normalization of cholesterol homeostasis by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in neurons and glia from Niemann-Pick C1 (NPC1)-deficient mice. *J Biol Chem* 287(12): 9290–9298

Pentchev PG, Gal AE, Booth AD, Omodeo-Sale F, Fouks J, Neumeyer BA, Quirk JM, Dawson G, Brady RO (1980) A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochim Biophys Acta* 619(3): 669–679

Petersen J (2013) Dissertation: Verhaltensanalyse und cerebelläre Quantifizierung in einem Mausmodell von Niemann-Pick Typ C1 unter pharmakologischer Therapie mit Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon

Piel G, Piette M, Barillaro V, Castagne D, Evrard B, Delattre L (2007) Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrins and their effect on the integrity of liposomes. *Int J Pharm* 338: 35–42

Pierret C, Morrison JA, Kirk MD (2008) Treatment of lysosomal storage disorders: focus on the neuronal ceroid-lipofuscinoses. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68(3): 429–442

Pineda M, Perez-Poyato MS, O’Callaghan M, Vilaseca MA, Pocovi M, Domingo R, Ruiz Portal L, Verdú Pérez A, Temudo T, Gaspar A et al. (2010) Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann–Pick disease type C: a case series. *Mol Genet Metab* 99: 358–366

Pineda M, Wraith JE, Mengel E, Sedel F, Hwu WL, Rohrbach M, Bembi B, Walterfang M, Korenke GC, Marquardt T, Luzy C, Giorgino R, Patterson MC (2009) Miglustat in patients

with Niemann-Pick disease type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab* 98(3): 243–249

Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12(2): 87–92

Platt FM, Jeyakumar M (2008) Substrate reduction therapy. *Acta Paediatr* 97, 88–93

Platt FM, Neises GR, Dwek RA, Butters TD (1994) N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem* 269(11): 8362–8365

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999) The frequency of lysosomal storage diseases in the Netherlands. *Hum Genet* 105(1-2): 151–156

Pressey SNR, Smith DA, Wong AMS, Platt FM, Cooper JD (2012) Early glial activation, synaptic changes and axonal pathology in the thalamocortical system of Niemann-Pick type C1 mice. *Neurobiol Dis* 45 (3): 1086–1100

Rajewski RA et Stelle VJ (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. in vivo drug delivery. *J Pharm Sci* 85(11): 1142–1169

Reis AH, Almeida-Coburn KL, Louza MP, Cerqueira DM, Aguiar DP, Silva-Cardoso L, Mendes FA, Andrade LR, Einicker-Lamas M, Atella GC et al. (2012) Plasma membrane cholesterol depletion disrupts prechordal plate and affects early forebrain patterning. *Dev Biol* 365: 350–362

Robel P et Baulieu EE (1994) Neurosteroids biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab* 5(1): 1–8

Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K (1999) Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 961–974

Rogers DC, Jones DN, Nelson PR, Jones CM, Quilter CA, Robinson TL, Hagan JJ (1999) Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 105(2):207–217

Rosenbaum AI, Zhang G, Warren JD, Maxfield FR. (2010) Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proc Natl. Acad Sci USA* 107(12): 5477–5482

Rosenbaum AI, Maxfield FR (2011) Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *J Neurochem* 116(5): 789–795

Royle SJ, Collins FC, Rupniak HT, Barnes JC, Anderson R (1999) Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res* 816: 337–349

Rudolf M, Müller J (2012) *Multivariate Verfahren*. HOGREFE Verlag 2. Auflage: 37–125

Sarna JR, Larouche M, Marzban H, Sillitoe RV, Rancourt DE, Hawkes R (2003) Patterned purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. *J Comp Neurol* 456: 279–291

Santos-Lozano A, Villamandos Gracia D, Sanchis-Gomar F, Fiuza-Luces C, Pareja-Galeano H, Garatachea N, Nogales Gadea G, Lucia A (2015) Niemann-Pick disease treatment: a systematic review of clinical trials. *An. Transl Med* 3: 360, doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.04.

Schlegel V, Thieme M, Holzmann C, Witt M, Grittner U, Rolfs A, Wree. Pharmacologic treatment assigned for Niemann Pick type C1 disease partly changes behavioral traits in wild-type mice. *Int J Mol Sci* 17(11). pii: E1866 IF: 3,257; 2015)

Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghoumari AM (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci* 6: 1–26

Sévin M, Lesca G, Baumann N, Millat G, Lyon-Caen O, Vanier MT, Sedel F (2007) The adult form of Niemann–Pick disease type C. *Brain* 130(Pt 1): 120–133

Spiegel R, Raas-Rothschild A, Reish O, Regev M, Meiner V, Bargal R, Sury V, Meir K, Nadjari M, Hermann G, Iancu TC, Shalev SA, Zeigler M (2009) The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. *Am J Med Genet A* 149(3): 446–450

Tamhane AC (1977) Multiple comparisons in model I one-way ANOVA with unequal variances. *Communications in Statistics - Theory and Methods* Band 6(1): 15–32

Tanaka J, Nakamura H, Miyawaki S (1988) Cerebellar involvement in murine sphingomyelinosis: a new model of Niemann-Pick disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 47(3): 291–300

Tanaka Y, Ishitsuka Y, Yamada Y, Kondo Y, Takeo T, Nakagata N, Higashi T, Motoyama K, Arima H, Matsuo M et al. (2014) Influence of NPC1 genotype on the toxicity of hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a potentially therapeutic agent, in Niemann–Pick type C disease models. *Mol Genet Metab Rep* 1: 19–30

Taylor AM, Liu B, Mari Y, Liu B, Repa JJ (2012) Cyclodextrin mediates rapid changes in lipid balance in NPC1^{-/-} mice without carrying cholesterol through the bloodstream. *J Lipid Res*, 53(11): 2331–2342

Timby E, Hedström H, Bäckström T, Sundström-Poromaa I, Nyberg S, Bixo M (2011) Allopregnanolone, a GABA-A receptor agonist, decreases gonadotropin levels in women. a preliminary study. *Gynecol Endocrinol* 27(12): 1087–1093

Treiber A, Morand O, Clozel M (2007) The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. *Xenobiotica* 37: 298–314

Turkmen S, Backstrom T, Wahlstrom G, Andreen L, Johansson IM (2010) Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor. *Br J Pharmacol* 162(2): 311–327

Urbach YK, Bode FJ, Nguyen HP, Riess O, von Hörsten S (2010) Neurobehavioral tests in rat models of degenerative brain diseases. In *Rat Genomics: Methods and Protocols*; Anegon, I., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, pp. 333–356

Vance JE, Karten B (2014) Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J Lipid Res* 55: 1609–1621

Vance JE, Peake KB (2011) Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. *Curr Opin Lipidol* 22 (3): 204–209

Van Dam D, Lenders G, De Deyn PP (2006) Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains. *Neurobiol Learn Mem* 85: 164–172

Van Gaalen MM, Steckle, T (2000) Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav Brain Res* 115: 95–106

Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5: 16

Vázquez MC, Balboa E, Alvarez AR, Zanlungo S (2012) Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. *Oxid Med Cell Longev* 205713

Vöikar V, Rauvala H; Ikonen E (2002) Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *Behav Brain Res* 132 (1): 1–10

Walkley SU, Suzuki K (2004) Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim Biophys Acta* 1685(1-3): 48–62

Wilcoxon F (1945) Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin* 1: 80–83

Ward S, O'Donnell P, Fernandez S, Vite CH (2010) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with Niemann-Pick type C disease. *Pediatr Res* 68: 52–56

Wraith JE, Vecchio D, Jacklin E, Abel L, Chadha-Boreham H, Luzy C, Giorgino R, Patterson MC (2010) Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Mol Genet Metab* 99, 351–357

Xie C, Richardson JA, Turley SD, Dietschy JM (2006) Cholesterol substrate pools and steroid hormone levels are normal in the face of mutational inactivation of NPC1 protein. *J Lipid Res* 47(5): 953–963

Yamada A, Saji M, Ukita Y, Shinoda Y, Taniguchi M, Higaki K, Ninomiya H, Ohno K (2001) Progressive neuronal loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain Dev* 23(5): 288–297

Zampieri S, Mellon SH, Butters TD, Nevyjel M, Covey DF, Bembi B, Dardis A (2009) Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J Cell Mol Med* 13(9B): 3786–3796

Zervas M, Somers KL, Thrall MA, Walkley SU (2001) Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Curr Biol* 11(16): 1283–1287

Zervas M, Dobrenis K, Walkley SU (2001) Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol* 60 (1): 49–64

5.1 Internetquellen

[1] http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/policy/index_en.htm (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[2] <http://www.niemann-pick-c.com/HCP/Symptoms/Symptomatic-manifestations-of-Niemann-Pick-type-C-disease> (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[3] <http://www.niemann-pick-c.com/HCP/Diagnosing-Niemann-Pick-type-C-disease> (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[4] <http://www.niemann-pick-c.com/HCP/Management-of-Niemann-Pick-type-C-disease> (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[5] http://www.ema.europa.eu/docs/en_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000435/WC500046726.pdf. (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[6] http://www.ats.ucla.edu/stat/examples/msm_goldstein/goldstein.pdf (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[7] http://www.uni-wuerzburg.de/fileadmin/10040800/user_upload/hain/SPSS/ANOVA.pdf (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[8] <http://www.uni-saarland.de/fak5/excops/download/QM2-15.pdf> (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[9] [http://web.fh-ludwigshafen.de/fb1/student.nsf/Files/FC30343F66DE7C7CC125789200239F62/\\$FILE/erbsl_and_gip_Statistik_Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse_SS11.pdf](http://web.fh-ludwigshafen.de/fb1/student.nsf/Files/FC30343F66DE7C7CC125789200239F62/$FILE/erbsl_and_gip_Statistik_Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse_SS11.pdf) (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[10] <http://eswf.uni-koeln.de/lehre/stathome/statcalc/v2501.htm> (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

[11] http://www.math.uni-frankfurt.de/~ismi/schneider/StatBiol/V6a_Web.pdf (zuletzt geöffnet 07.02.2017)

6. Thesen

1. Der Morbus Niemann-Pick Typ C1 ist eine seltene, lysosomale Speicherkrankheit, die autosomal-rezessiv vererbt wird.
2. Die Erkrankung entsteht durch einen Gendefekt für das Transmembranprotein NPC1 oder ein kleineres, lösliches NPC2-Protein, dadurch ist der intrazelluläre Cholesterin-Transport gestört und es kommt durch einen noch nicht genau definierten Mechanismus zu einer ausgeprägten Neurodegeneration.
3. Das klinische Spektrum dieser Erkrankung ist sehr heterogen, es reicht von Manifestationen bei Neugeborenen oder sogar in der Perinatalperiode, in der die Erkrankung meist rasch tödlich verläuft, bis hin zu einer im höheren Alter (zum Beispiel siebtes Lebensjahrzehnt) chronisch verlaufenden, neurodegenerativen Erkrankung. Die häufigsten neurologischen Symptome sind Demenz, cerebelläre Ataxie, Epilepsie und Kataplexie.
4. Die NPC1-Tiermodelle dienen der Erforschung neuer Therapieansätze für die seltene Niemann-Pick-Krankheit Typ C1, für welche bis heute lediglich Miglustat als Therapie zugelassen ist.
5. Am häufigsten wird heutzutage das BALB/c-Mausmodell angewendet. Die Mäuse dieses Modells besitzen das *NPC1-NIH*-Allel, welches lediglich bei Homozygotie zur Ausprägung kommt. Somit basiert das Modell auf einer spontan vorkommenden Mutation mit Sequenzinsertion und Sequenzdeletion im *NPC1*-Gen. Diese Sequenzveränderungen führen zum Funktionsverlust des NPC1-Proteins, für welches das NPC1-Gen codiert.
6. Die am Mausmodell beschriebene Kombinationstherapie aus Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon hat eine synergistische Wirkung, welche zum verzögerten Symptomausbruch und zur Erhöhung der Lebenszeit der Versuchstiere führt.
7. Bis heute existieren keine Studien an gesunden Wildtyp-Mäusen zur Erforschung der Nebenwirkungen einer Miglustat only- oder Kombinationstherapie.
8. Im Accelerod-Test an P35 wurde bei gesunden Wildtyp-Mäusen kein motorischer Unterschied zwischen Miglustat only-, kombinations- oder scheinbehandelten Tieren festgestellt.
9. Im Accelerod-Test an P60 wurde bei gesunden Wildtyp-Mäusen kein motorischer Unterschied zwischen Miglustat only-, kombinations- oder scheinbehandelten Tieren festgestellt.

10. Im Morris Water Maze-Test an P49 wurde bei gesunden Wildtyp-Mäusen kein motorischer Unterschied zwischen Miglustat only-, kombinations- oder scheinbehandelten Tieren festgestellt.
11. Eine Miglustat-Dauertherapie hat eine Amnesie als Nebenwirkung.
12. Im Morris Water Maze-Test an P49 wurde bei gesunden Wildtyp-Mäusen ein signifikanter Unterschied zwischen den Miglustat only- und kombinationsbehandelten Versuchstieren festgestellt. Die Mäuse, welche mit Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon therapiert wurden, hielten sich signifikant häufiger im ehemaligen Plattform-Bereich auf, als die Miglustat only-therapierten gesunden Wildtyp-Mäuse.
13. Die Kombinationsbehandlung kann die durch Miglustat hervorgerufene Amnesie bei den gesunden Versuchstieren durch Cyclodextrin und Allopregnanolon aufheben.

7. Anhang

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich versichere an Eides statt, dass die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe, abgesehen von den Hilfestellungen, auf die in der Danksagung hingewiesen wird, verfasst und ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich verwendeten Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock, 07.02.2017

.....

Victoria Schlegel

Danksagung

Mein ersten Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. med. Andreas Wree wenden. Der mir meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie möglich machte. Ich habe mich zutiefst über die Möglichkeit einer experimentellen Studie gefreut. Des Weiteren war die Literaturrecherche zu diesem noch relativ unerforschten Themas sehr lehrreich. Zusätzlicher, besonderer Dank gilt der stets kurzfristigen Verfügbarkeit im Rahmen sämtlicher Fragen, egal zu welcher Tageszeit.

Des Weiteren danke ich Prof. Arndt Rolfs für seine stets konstruktive Kritik und die umfangreiche Hilfe beim Zustandebringen dieser Studie.

Weiterer Dank gilt Dr. rer. nat. Carsten Holzmann für die zahlreichen Hilfestellungen und seine Geduld bei der Erarbeitung der Statistik sowie dem langwierigen Schreiben der Publikation. In diesem Zusammenhang möchte ich zusätzlich besonders Dr. phil. Ulrike Grittner danken, die ebenfalls eine große Hilfe bei der Erarbeitung und dem Verstehen der aufwendigen statistischen Tests war.

Zusätzlicher Dank gilt Markus Thieme für die Zusammenarbeit und Hilfe bei den Tierexperimenten. An dieser Stelle möchte ich auch Dr. med. Fabian Maass und Dr. med. Jana Petersen für die Einarbeitung in die Durchführung der Experimente und die Hilfe bei der Aufarbeitung des Themas danken.

Des Weiteren wäre diese Studie ohne die zahlreichen Mitarbeiter des Instituts für Anatomie, wie Mathias Lietz und Susann Lehmann, die tatkräftig bei der Pflege, der Therapie und dem Umgang mit den Tieren halfen, nicht möglich gewesen. Einen großen Dank dafür.

Abschließend richte ich einen herzlichen Dank an meine Eltern sowie an Christian Baudner für die ständige Unterstützung im Verlauf des Studiums, der Dissertation und dem Rest meines Lebens.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name, Vorname: Schlegel, Victoria
Geburtsdatum: 05.02.1989
Geburtsort: Ribnitz-Damgarten
Familienstand: ledig

Ärztliche Tätigkeit

15.02.2016 - heute Assistenzärztin in Orthopädie der Universitätsklinik
Rostock

Hochschulausbildung

Oktober 2008 - Dezember 2015 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
August/September 2011 1. Staatsexamen
Oktober 2014 2. Staatsexamen
Dezember 2015 3. Staatsexamen
seit Januar 2012 Dissertation in der Anatomie bei Prof. Dr. med. A. Wree
09.11.2016 Veröffentlichung der Ergebnisse
Schlegel et al. Pharmacologic treatment assigned for
Niemann Pick type C1 disease partly changes
behavioral traits in wild-type mice. Int J Mol Sci 17(11).
pii: E1866

Praktisches Jahr

17.11.2014 - 06.03.2015 Klinik für Innere Medizin III - Haemato-Onkologie,
Haemostaseologie, Palliativ- und Komplementärmedizin des
Klinikum Südstadt Rostock
09.03. - 28.06.2015 Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie des
Klinikum Südstadt Rostock
29.06. - 18.10.2015 Abteilung für Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Rostock

Famulaturen

13.02. - 14.03.2012	Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie des Klinikum Südstadt Rostock
23.07. - 23.08.2012	Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Handchirurgie des Klinikum Südstadt Rostock
27.08. - 27.09.2012	Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock
13.08. - 12.09.2013	Famulatur in der Praxis von Dr. Frank Bartel (spezialisiert auf spezielle Schmerztherapie und Chirotherapie)

Zusatzqualifikationen

WS 13/14 - SS 2014	studentische Tutorin an der Universitäts - Kinder - und Jugendklinik Rostock
seit Oktober 2014	Spritzendienste im Klinikum Südstadt Rostock
07.05. - 16.06.2015	Hospitation am Notarzdienst des Notarzteinsatzfahrzeuges 1 des Brandschutz-Rettungsamtes der Hansestadt Rostock (20 Einsätze)
Fremdsprachen	Englisch - fließend in Wort und Schrift

Schulausbildung

1995 - 1999	Grundschule in Wismar
1999 - 2008	Gymnasium (Gerhart-Hauptmann-Gymnasium) in Wismar Abschluss mit 1,1
2005 - 2006	Schuljahr in Oregon, USA (High School Degree - Abschluss)

Hobbys

Handball beim Rostocker Handball Club (in der 2. und 3. Handball-Bundesliga)
Snowboarden
Fahrradfahren