
**Die Bedeutung von
CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) β und
Suppressor of Cytokine Signalling (SOCS) 1 & 3
für die Pathogenese der
Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)**

Steffen Franz



München 2007

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Brandt, FRCP)

**Die Bedeutung von CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) β und
Suppressor of Cytokine Signalling (SOCS) 1 & 3
für die Pathogenese der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Steffen Franz
aus
Dachau
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. G.D. Borasio
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H.-G. Klobeck Priv.- Doz. Dr. med. Th. Klopstock
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. J.M.H. Anneser
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	18.10.2007

FÜR MEINE FAMILIE – IN DANKBARKEIT

(...) After all that, they didn't tell me what I had, except that it was not multiple sclerosis, and that I was an a-typical case. I gathered, however, that they expected it to continue to get worse, and that there was nothing they could do, except give me vitamins. I could see that they didn't expect them to have much effect. I didn't feel like asking for more details, because they were obviously bad (...)

(Stephen William Hawking)

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abbildungsverzeichnis	X
II. Verzeichnis der Grafiken	X
III. Tabellenverzeichnis	X
IV. Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Klinik der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)	1
1.1.1 Sporadische und familiäre Form der ALS	2
1.1.2 Die El Escorial- Kriterien	3
1.2 Pathogenese der ALS	3
1.2.1 Risikofaktoren	3
1.2.2 Autoimmunhypothese	4
1.2.3 Exzitotoxische Hypothese	4
1.2.4 Oxidativer Stress	6
1.2.5 Neurofilamente	7
1.2.6 Kalziumbindende Enzyme	8
1.2.7 Genetische Komponenten	8
1.2.7.1 Das transgene SOD1- Mausmodell	9
1.2.7.2 Die Erkenntnisse aus SOD1 und ihrem Mausmodell	10
1.2.8 Entzündliche Prozesse in der ALS	12
1.2.8.1 Zelluläre inflammatorische Veränderungen bei ALS	12
1.2.8.2 Zytochemische inflammatorische Veränderungen bei ALS	14
1.2.9 Das mögliche Zusammenspiel pathogenetischer Faktoren	17
1.2.9.1 Konsolidierung der Hypothesen	17
1.2.9.2 Wahrscheinliche Konsequenz: Gemeinsame Endstrecke Apoptose	18
1.3 Herleitung der Fragestellung	19
1.3.1 Die SOCS- Familie und ihre Rolle im Entzündungsgeschehen	19
1.3.1.1 Die Biochemie der Signalhemmung durch SOCS	20
1.3.1.2 SOCS-1	21
1.3.1.3 SOCS-3	22
1.3.2 CCAAT/enhancer-binding-protein β (C/EBP β)	24
2 Methoden	26
2.1 Verwendetes Tiermodell	26
2.2 Gewebeentnahme und –bearbeitung	27
2.2.1 Gewinnung des Rückenmarks der Mäuse	27

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.2	Humane Rückenmarksproben von Kontroll- und ALS- Patienten	27
2.2.3	Bearbeitung des Gewebes für das Microarray- Experiment	27
2.2.3.1	Isolierung der RNA	27
2.2.3.2	Photometrie und Gel- Elektrophorese	29
2.2.3.3	DNase- Behandlung	30
2.2.4	Bearbeitung des Gewebes für den Western Blot	31
2.2.5	Bearbeitung des Gewebes für die Immunhistochemie	31
2.3	Grundlagen und Technik des DNA Microarray	31
2.3.1	Der verwendete Typ des Microarray	32
2.3.2	Allgemeines Protokoll	33
2.3.3	Design des Microarray Experiments	35
2.4	Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	35
2.5	Grundlagen und Technik des Western Blot	36
2.5.1	Photometrische Proteinbestimmung	37
2.5.2	Allgemeines Protokoll	37
2.5.3	Design des Western Blot- Experiments	39
2.6	Grundlagen und Technik der Immunhistochemie	39
2.6.1	Die Herstellung von Gefrierschnitten	40
2.6.2	Beschichtung der Objektträger	40
2.6.3	Allgemeines Protokoll	41
2.6.4	Design des Immunhistochemie- Experiments	41
2.7	Grundlagen der angewandten Zellkulturtechnik	43
2.7.1	Gewinnung der Liquorproben	43
2.7.2	Gewinnung des Rückenmarks aus Hühnerembryonen	43
2.7.3	Beschichtung der Zellkulturplatten	44
2.7.4	Allgemeines Protokoll	44
2.7.5	Design des Zellkultur-Experiments	45
2.8	Statistische Auswertung	46
2.8.1	Bildanalyse des Western Blot	46
2.8.2	Bildanalyse der Immunhistochemie	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Methodische Überlegungen	49
3.2	Ergebnisse des Microarray	50
3.3	C/EBP β	52

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.1	Das Translationsniveau	52
3.3.2	Immunhistochemie	54
3.4	SOCS-1	55
3.4.1	Das Translationsniveau	55
3.4.2	Immunhistochemie	57
3.5	SOCS-3	58
3.5.1	Das Translationsniveau	58
3.5.2	Immunhistochemie	60
3.6	Die Färbung der glialen Zellen	61
3.7	Die Nissl- Färbung	61
3.8	Das Zellkulturexperiment	62
4	Diskussion	64
4.1	Bewertung und Interpretation des Microarray	64
4.2	SOCS-1, Inflammation und das ZNS	65
4.3	SOCS-3, Inflammation und das ZNS	66
4.4	CCAAT/enhancer-binding-protein β (C/EBP β) und die ALS?	66
4.5	Von der Transkription zur Translation	68
4.6	Die Zellkultur	70
4.7	Mögliche Wechselwirkungen und ihre Relevanz für die ALS	70
4.8	Mögliche Bedeutung für anti- inflammatorische Therapieansätze	74
5	Zusammenfassung und Ausblick	76
6	Literatur	80
7	Anhang	89
7.1	Lösungen und Puffer	89
7.2	Nachweis der verwendeten Biochemika	93
	Danksagung	94
	Lebenslauf	95

VERZEICHNISSE

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der vermutliche Weg zur Degeneration von Motoneuronen bei ALS	18
Abbildung 2: Die negative Regulation durch SOCS- Proteine	20
Abbildung 3: Die SOCS- Proteinfamilie	20
Abbildung 4: Möglicher Funktionsmechanismus der SOCS- Proteine	21
Abbildung 5: Bisher bekannte durch SOCS-3 regulierte Signalwege	24
Abbildung 6: Das Blotting- Sandwich	38
Abbildung 7: Beispiel- WB für Actin (Human)	49
Abbildung 8: WB mit Immunozeptid	50
Abbildung 9: C/EBP β im Tiermodell	52
Abbildung 10: C/EBP β Verlauf im Tiermodell	53
Abbildung 11: C/EBP β humane Probe	54
Abbildung 12: Immunhistochemie im Tiermodell für C/EBP β (weiße Substanz)	54
Abbildung 13: Immunhistochemie im Tiermodell für C/EBP β (Vorderhorn)	55
Abbildung 14: Immunhistochemie für C/EBP β humane Probe	55
Abbildung 15: SOCS-1 im Tiermodell	56
Abbildung 16: SOCS-1 Verlauf im Tiermodell	57
Abbildung 17: SOCS-1 humane Probe	57
Abbildung 18: Immunhistochemie im Tiermodell für SOCS-1 (Vorderhorn)	58
Abbildung 19: Immunhistochemie für SOCS-1 humane Probe	58
Abbildung 20: SOCS-3 im Tiermodell	59
Abbildung 21: SOCS-3 Verlauf im Tiermodell	60
Abbildung 22: SOCS-3 humane Probe	60
Abbildung 23: Immunhistochemie im Tiermodell für SOCS-3 (Vorderhorn)	61
Abbildung 24: Lectin-/ GFAP- Färbungen	61
Abbildung 25: Nissl- Färbungen	62
Abbildung 26: Das Zellkulturexperiment	63

II. Verzeichnis der Grafiken

Grafik 1: SOD1 Microarray	51
Grafik 2: C/EBP β WB	53
Grafik 3: SOCS-1 WB	56
Grafik 4: SOCS-3 WB	59

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die El Escorial- Kriterien	3
Tabelle 2: Bekannte Genmutationen der ALS	9
Tabelle 3: Auswahl von Proteinen die nachweislich mit der Entzündungsreaktion bei ALS assoziiert sind	13
Tabelle 4: Primäre Antikörper	35
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper	36
Tabelle 6: Das Microarray- Experiment	51
Tabelle 7: WB SOD1 C/EBP β	52
Tabelle 8: WB SOD1 Verlauf C/EBP β	53
Tabelle 9: WB ALS C/EBP β	54
Tabelle 10: WB SOD1 SOCS-1	56
Tabelle 11: WB SOD1 Verlauf SOCS-1	57
Tabelle 12: WB ALS SOCS-1	57
Tabelle 13: WB SOD1 SOCS-3	59
Tabelle 14: WB SOD1 Verlauf SOCS-3	60
Tabelle 15: WB ALS SOCS-3	60

VERZEICHNISSE

IV. Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
°C	Grad Celsius
15d-PGJ ₂	15-deoxy-Δ ^{12,14} -prostaglandin J(2)
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
ATP	Adenosin- Triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	basic region leucine zipper
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CD40	Cluster of differentiation 40
CIS	Cytokine-inducible SH2 domain-containing protein
CNTF	ciliary neurotrophic factor
ConA	Lectin concanavalin A
CT	Cardiotrophin
D	Tag/e
DAB	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAAT	excitatory amino acid transporter
EDTA	Ethylendiamintetraacetic-Acid (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	fetales bovines Serum
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
H	Stunde/n
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-2-Hydroxy-Ethyl-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
ICH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
JAK	Janus kinase
kD	Kilodalton (Masseinheit)
LCM	laser-captured microdissection
LIF	leukemia-inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharide
Lt.	laut

VERZEICHNISSE

MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
Min	Minute(n)
MIP	macrophage-inflammatory protein
mM	millimolar
MND	Motoneurondegeneration
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
NaOAc	Natriumacetat
NF- κ	nuclear factor- kappa
Ng	Nanogramm
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OMN	Oberes Motoneuron
PBS	phosphate buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
RANTES	regulated-upon-activation, normal T-Cell expressed and secreted
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RNA	Ribonucleinsäure
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
Rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomale RNA
RSK	ribosomal protein S-6 kinase
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
SDS	Sodium-Duodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SH2	src-homology 2
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
ss-cDNA	single strang complementary DNA
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TGF	transforming (tumor) growth factor
TH2-Zelle	thymusabhängige Helfer-Lymphozyten Typ 2
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	Unter anderem
UMN	Unteres Motoneuron
WB	Western Blot
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch fortschreitenden Untergang bestimmter Populationen an Nervenzellen und deren Ersatz durch Gliagewebe gekennzeichnet. Neuronale Degeneration führt dabei zum Verlust von Hirnparenchym.

Multisystematrophien wie Morbus Alzheimer sowie Systematrophien wie die der Stammganglien (Parkinson- Krankheit, Chorea Huntington), des Frontalhirns (Morbus Pick) oder der Motoneuronen gehören zu dieser degenerativen Erkrankungsform.

Die ALS ist im Speziellen durch die Degeneration der Pyramidenbahn und ferner der Vorderhornzellen charakterisiert. Diese Form der Motoneuronerkrankung (MND) ist die Häufigste. Neben ihr existieren noch wesentlich seltenere Formen von MND, wie zum Beispiel die spastische Spinalparalyse oder die spinale Muskelatrophie (Masuhr und Neumann, 1998).

1.1 Epidemiologie und Klinik der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)

Seit ihrer ersten vollständigen Beschreibung durch Jean Martin Charcot vor mehr als 130 Jahren ist die Pathogenese der von zentraler und peripherer Motoneurondegeneration geprägten Amyotrophen Lateralsklerose weitgehend ungeklärt geblieben.

Mit einer Prävalenz von 6-8 pro 100.000 Einwohner und einer Inzidenz von ca. 2 Neuerkrankungen / 100.000 Einwohner / Jahr ist die Amyotrophe Lateralsklerose eine häufige neurodegenerative Erkrankung und die häufigste degenerative Motoneuronerkrankung des Erwachsenenalters (Brooks, 1996). Mit dem Alter steigt die Prävalenz dieser Erkrankung, sodass im Altersspektrum von 60 - 75 Jahren ein Gipfel von 33 / 100.000 Einwohner für Männer, sowie 14 / 100.000 Einwohner für Frauen erreicht wird (Majoor-Krakauer et al., 2003). Das mittlere Alter bei Beginn der ersten Symptome beträgt 56 Jahre und die mittlere Überlebensdauer beläuft sich im Durchschnitt auf drei Jahre; 10% der Patienten überleben 10 Jahre oder darüber hinaus (Siddique et al., 1996).

Progrediente schlaffe und spastische Paresen sowie Atrophien mit Faszikulationen der willkürlich innervierten Muskulatur gehören zum typischen klinischen Bild. Symptome wie Muskelkrämpfe, Schluckstörungen, Bewegungs- und Sprechunfähigkeit mit Einmündung in eine Ateminsuffizienz sind die Regel, unterscheiden sich jedoch in ihrer Ausprägung und ihrem Verlauf. Pathologisches Lachen und/oder Weinen tritt überwiegend bei bulbärer Symptomatik auf (Borasio & Büttner, 1998). Das autonome und sensorische Nervensystem sind in der Regel genauso wenig klinisch involviert, wie auch die Motilität sämtlicher Augenmuskeln und Sphinkter. Eine Demenz ist eher die Ausnahme. Die Patienten zeichnen sich durch geistige Klarheit aus, wodurch der dramatische Verlauf der Erkrankung stets bei

vollem Bewusstsein erlebt wird. Bei den meisten Patienten können lediglich subtile neuropsychologische Defizite nachgewiesen werden (Abrahams et al., 1997).

Nach wie vor bedeutet die Diagnose der Amyotrophen Lateralsklerose eine fortschreitende Behinderung mit tödlichem Ausgang als Folge einer terminalen Ateminsuffizienz, oft in Assoziation mit einer Aspirationspneumonie.

Zu den prominenten Opfern dieser neurodegenerativen Erkrankung gehören der ehemalige Baseballspieler Lou Gehrig, unter dessen Name die ALS auch in den USA bekannt ist, der Physiker Stephen Hawking, der Schauspieler David Niven, der Komponist Dimitri Schostakowitsch und möglicherweise Mao Tse Tung.

1.1.1 Sporadische und familiäre Form der ALS

In 90% der bekannten Fälle handelt es sich um die sporadische Form der ALS (SALS). Diese Form beginnt im Durchschnitt mit 56 Jahren in einem höheren mittleren Alter, als dies bei der familiären Form der Fall ist. Die Ursachen der sporadischen Form liegen weitgehend im Dunkeln. Medikamentös ist bisher lediglich eine geringe Verzögerung der Progression dieser Erkrankung zu erreichen (Übersicht bei Siddique et al., 1996).

Fünf bis zehn Prozent der Fälle von ALS sind auf eine familiäre Form zurückzuführen (FALS). In der überwiegenden Zahl der Fälle handelt es sich dabei um eine dominant vererbte Form (DFALS). Es existiert aber auch eine Anzahl an Berichten über eine rezessiv vererbte Form der ALS (RFALS).

DFALS ist klinisch von der sporadischen Form der ALS nicht zu unterscheiden. Interessanterweise beginnt sie jedoch im Mittel 10 Jahre früher. Bis zu 20% der Familien mit DFALS weisen eine Mutation auf Chromosom 21q22 (ALS1) im Gen der Superoxiddismutase 1 (SOD1) auf. Näheres hierzu folgt weiter unten. Die Penetranz ist altersabhängig. Fünfzig Prozent der Patienten mit einer DFALS- Mutation sind im Alter von 46 Jahren erkrankt. Im Alter von 70 Jahren sind dann 90% der Mutationsträger erkrankt (Siddique et al., 1996).

Die RFALS weist eine vollkommene Penetranz auf, ist allerdings sehr selten. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 12 Jahre (zwischen 3 und 23 Jahre) und die Dauer dieser Form der Erkrankung liegt zwischen 15 und 20 Jahren. Man unterscheidet drei klinische Varianten dieser juvenilen Form. Zu Beginn dominieren bei der Typ1- RFALS mit schlaffen Paresen die klinischen Zeichen einer Schädigung des peripheren Motoneurons. Erst in späteren Stadien treten Symptome des Ausfalls der oberen Motoneuronen (s.o.) hinzu. Die Typ2- RFALS ist auf die unteren Gliedmaßen beschränkt. Zuletzt zeichnet sich die Typ3- RFALS zunächst durch Schädigungen des oberen Motoneurons und hier durch überwiegende Spastik vor allem

der Gliedmaßen und des Gesichts aus. Es kann auch zum pathologischen Lachen oder Weinen kommen (Übersicht bei Siddique et al., 1996). Diese dritte Form ist mit einem weiteren Gendefekt assoziiert. Auf Chromosom 2q33-34 (ALS2), im Gen ALSin konnte hierbei die Mutation nachgewiesen werden. Eine große Anzahl von molekulargenetischen Analysen haben inzwischen einige weitere Gene hervorgebracht, die bei der Pathogenese der ALS eine Rolle spielen mögen (**Tabelle 2**) (Majoor-Krakauer et al., 2003).

1.1.2 Die El Escorial- Kriterien

Mit dem Ziel eine einheitliche Einteilung für die ALS zu erlangen, führte die WFN (World Federation of Neurology) 1990 die so genannten El Escorial- Kriterien ein. Diese wurden dann in Anbetracht jüngster molekularbiologischer bzw. genetischer Erkenntnisse 1998 weiter modifiziert. Das Ergebnis war ein Katalog an Kriterien, welche die ALS klinisch als primär fortschreitende Degeneration des zentralen und peripheren Motoneurons (UMNs und LMNs) mit dem Fehlen von anderen Krankheitsprozessen definieren (Milonas, 1998). Die klare Abgrenzung von verschiedenen Unterformen sowie offensichtlich verwandten Erkrankungen bleibt nach wie vor schwierig (Meininger, 1999). **Tabelle 1** führt diese Kriterien in kurzer Form auf.

Tabelle 1

Grad der Diagnosesicherheit der ALS	Diagnosekriterien
Gesichert	Schädigungen des oberen Motoneurons (OMN) und des unteren Motoneurons (UMN) auf der bulbären und zwei spinalen Ebenen oder Beteiligung des OMN und UMN auf drei spinalen Ebenen
Wahrscheinlich	Schädigungen des OMN und UMN auf zwei Ebenen, wobei die Zeichen des OMN kranial von denen des UMN liegen müssen.
Möglich	Schädigungen des OMN und UMN auf einer Ebene oder nur Zeichen des OMN auf zwei Ebenen oder die Zeichen des UMN rostral der des OMN
Verdacht auf	Zeichen des UMN auf zwei Ebenen ohne Beteiligung des OMN

Aus: Brandt & Dichgans & Diener, 2003

1.2 Pathogenese der ALS

Viele Erkenntnisse über die Ätiologie und Pathogenese dieses Leidens liegen noch im Dunklen, wengleich es insbesondere während des letzten Jahrzehnts gelang eine Reihe von Pathomechanismen zu identifizieren, die im Prozess des Nervenzelltodes eine Rolle spielen dürften. Im Folgenden soll auf die wichtigsten Hypothesen eingegangen werden.

1.2.1 Risikofaktoren

Assoziationen mit schwerer körperlicher Arbeit, Arbeit in der Elektroindustrie und Schwermetalexposition wurden dokumentiert, konnten aber ebenso wie kausale

Zusammenhänge zwischen spezifischen toxischen Substanzen (z.B. Amalgam, Arsen) und der ALS, nie zweifelsfrei verifiziert werden (Brooks, 1996). Es war genauso wenig möglich eine virale, respektive andere infektiöse Genese schlüssig darzulegen (Übersicht bei Rowland & Shneider, 2001; Barohn et al., 2002). Auf der westpazifischen Insel Guam fand man eine Erkrankung mit Auftreten von Symptomen einer Demenz, des Morbus Parkinson und der ALS. Man war hier bis heute nicht in der Lage einen eindeutigen Zusammenhang zu bestimmten auslösenden Faktoren herzustellen. Das parallele Auftreten von Parkinson, Alzheimer und ALS legt aber zumindest die Vermutung einer pathophysiologischen Verwandtschaft dieser Erkrankungen nahe. Mehrere Studien zeigten, dass in ALS- Familien durchaus ein signifikant höheres Auftreten von anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu verzeichnen ist (Übersicht bei Almer, 2003).

Genetische Prädisposition wie auch Umwelteinflüsse dürften bei der ALS gemeinsam eine entscheidende Rolle spielen (Übersicht bei Majoor-Krakauer et al., 2003). Etwaige Berichte über zunehmende Inzidenzen mögen auf den demographischen Wandel, die höhere Lebenserwartung und bessere medizinische Versorgung, mit häufigerer Diagnosestellung, zurückzuführen sein.

1.2.2 Autoimmunhypothese

Der Verdacht eines autoimmunen Geschehens kam mit Nachweis von Antikörpern gegen Kalziumkanäle vom L-Typ auf. In 75% von ALS- Patientenseren waren diese nachzuweisen (Appel et al., 1995). Vereinzelt *in vitro* und am Tiermodell vorgenommene Versuche konnten diese Hypothese zunächst stützen (Smith et al., 1994; Keep, 2001; Karlsson, 2004). Allerdings bleibt zu beachten, dass die Antikörper nicht unbedingt ursächlich für die Pathogenese sein müssen, sondern vielmehr auch sekundär, also als Epiphänomen der Degeneration gebildet werden könnten. Es gibt erhebliche Argumente gegen eine Autoimmungnese der ALS. Sämtliche Versuche mit immunsuppressiven Medikamenten Erfolge zu erzielen schlugen bisher fehl (Steroide, Cyclophosphamid, CiclosporinA, Plasmapherese, Immunglobuline und Ganzkörperbestrahlung).

Schlussendlich war man in den letzten Jahren nicht in der Lage die Autoimmunhypothese im Rahmen der Amyotrophen Lateralsklerose überzeugend zu belegen.

1.2.3 Exzitotoxische Hypothese

Der Begriff „Exzitotoxizität“ bezieht sich auf das Phänomen, dass exzitatorische Aminosäurerezeptoren durch entsprechende Liganden exzessiv oder verlängert aktiviert werden und dies zu Schaden oder möglicherweise zum Tod der betroffenen Neuronen führt

(Majoor-Krakauer et al., 2003). Auf die ALS übertragen, könnte dies beispielsweise bedeuten, dass über Jahre hinweg leicht erhöhte Glutamatspiegel zum schleichenden Untergang der Motoneurone führen. Wenn dies zuträfe, könnte die neuronale Degeneration durch einen chronisch erhöhten Kalziumeinstrom in die Zelle induziert sein. Tatsächlich hat man bei der ALS in einigen Arbeiten einen leicht erhöhten extrazellulären Gehalt an exzitatorischem Neurotransmitter Glutamat im Liquor finden können. Dabei fand sich der Gehalt an Glutamat im Rückenmark gleichzeitig erniedrigt (Shaw et al., 1995). Nachdem es kalziumabhängig ausgeschüttet wurde, wirkt Glutamat über verschiedene Rezeptortypen (Rothstein, 1996).

Glutamat wird mit Hilfe spezifischer Transporter aus dem synaptischen Spalt in die Zelle wieder aufgenommen. Der im Hinblick auf Veränderungen bisher am meisten unter Verdacht geratene Transporter ist hierbei der EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2), welcher ausschließlich auf Astroglia exprimiert wird. EAAT2 (GLT-1) ist im motorischen Kortex und Rückenmark von ALS- Patienten stark erniedrigt oder fehlt völlig (Rothstein, 1995). Ein Fehlen des EAAT2- Proteins in Ratten kann eine Form von exzitotoxischer neuronaler Degeneration zur Folge haben (Rothstein et al., 1996). Hervorgerufen durch fehlerhaftes Splicing des EAAT2- Gens, sollen bei der ALS bestimmte Introns fälschlicherweise belassen und Exons entsprechend herausgeschnitten werden, womit eine anomale Transkription für das EAAT2- Protein nachgewiesen wäre (Lin et al., 1998). Allerdings konnte ebenso in gesunden Individuen ein variables Splicing des EAAT2- Proteins nachgewiesen werden (Meyer et al., 1999). An Mäusen mit einer Überexpression von hSOD1^{G93A} (einer Mutation im humanen Gen der Superoxiddismutase 1 von transgenen Mäusen – siehe unter 1.2.7.1.) oder hSOD^{wt} (einer für humane wildtyp- SOD1 transgenen Maus) hat man nun unlängst festgestellt, dass diese eine Abregulierung der EAAT2 (GLT-1) Proteinexpression induzieren und damit eine Verringerung der Glutamataufnahme in die Zelle bedingen (Tortarolo et al., 2004). Ebenso konnte an SOD1-Mäusen ein erhöhter Abbau des Transporters EAAT2 an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Vanoni et al., 2004). Nichtsdestotrotz ist nach wie vor nicht endgültig klar, ob der Verlust von EAAT2 ein primärer Grund für die ALS ist, oder ob er infolge eines oxidativen Schadens (siehe 1.2.4) zustande kommt. In jedem Fall ist anzunehmen, dass aufgrund einer Konzentrationserhöhung von Glutamat im synaptischen Spalt die Neurotoxizität verstärkt, und/oder dass der durch oxidativen Stress verursachte Verlust des Transporters, zu einer raschen Progression der Erkrankung führen kann (Bendotti und Carri, 2004).

Obwohl, wie schon oben erwähnt, verschiedene Glutamatrezeptoren bekannt sind, rückten die AMPA/Kainat-Rezeptoren schnell in den Mittelpunkt des Interesses. Bereits vor mehr als

zehn Jahren haben *in vivo* durchgeführte chronische intraventrikuläre Infusionen von AMPA in Ratten, zu dosisabhängigen, verzögert einsetzenden, motorischen Defiziten mit Schädigung der spinalen Motoneuronen geführt (Nakamura et al., 1994). Einige *in vitro* Studien haben den Verdacht nahe gelegt, dass insbesondere über die AMPA/Kainat-Rezeptoren, die Glutamat- Exzitotoxizität auf Motoneurone vermittelt wird (Carriedo et al., 1996; Arundine M & Tymiansky M, 2003; Kawahara et al., 2004). In Kombination mit einer erhöhten extrazellulären Konzentration von Glutamat wirkt sich die damit verstärkte Aktivierung von AMPA- Rezeptoren somit durch ansteigenden Kalziumeinfluss in die Zelle besonders negativ aus.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass Glutamat den wichtigsten exzitatorische Transmitter des ZNS darstellt, dessen Produktion, Freisetzung, Wiederaufnahme und Aktivität an der Synapse und im synaptischen Spalt über komplexe Systeme reguliert wird und bei Störung dieser Systeme der Prozess in Exzitotoxizität mündet (Übersicht bei Heath & Shaw, 2002).

1.2.4 Oxidativer Stress

In der multifaktoriellen Genese und dem Verlauf der Amyotrophen Lateralsklerose scheinen mitochondriale Veränderungen und oxidativer Stress in Motoneuronen ebenso eine ausgesprochene Relevanz zu haben. Unter oxidativem Stress versteht man die Schädigung einer Zelle durch eine Störung der mitochondrialen Atmungskette und damit der Energiegewinnung oder eine Störung bei der Entgiftung toxischer Sauerstoff- (ROS) bzw. Stickstoffverbindungen (RNS).

Das ZNS verarbeitet 20 % des basalen Sauerstoffbedarfs. Diese enorme Menge wird größtenteils zur ATP- Gewinnung benötigt. Dabei fallen nach seiner Verarbeitung in der Atmungskette der Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen 1 - 2 % des aufgenommenen Sauerstoffs (O_2) in Form von ROS an. Hierbei handelt es sich vor allem um das Superoxidanion (O_2^{\bullet}).

Andererseits ist in diesem Zusammenhang das Stickstoffmonoxidradikal (NO^{\bullet}) als RNS zu beachten. Es handelt sich hierbei um ein Radikal mit großer physiologischer Bedeutung, für dessen Bildung drei Isoformen der so genannten NO- Synthase mit verantwortlich sind. Zunächst die neuronale NO- Synthase (nNOS; Typ I), die induzierbare NO- Synthase (iNOS; Typ II), welche während entzündlichen Prozessen in großen Mengen von aktivierten Mikroglia (Makrophagen) synthetisiert wird und die endotheliale NO- Synthase (eNOS; Typ III). Davon entfällt auf die nNOS im Bereich des ZNS der größte Anteil an NO^{\bullet} -Aktivität. Seine Expression wird einerseits durch physiologische, andererseits auch durch

pathophysiologische Stimuli reguliert (Übersicht bei Emerit et al., 2004). Die Erhöhung der Expression von iNOS konnte explizit im Tiermodell der FALS nachgewiesen werden (Almer et al., 1999). Dies konnte schließlich auch für die nNOS im neuronalen Gewebe von an sporadischer ALS verstorbenen Patienten nachgewiesen werden. (Anneser et al., 2001).

Aufgrund ihrer Kalziumabhängigkeit kann zum Beispiel eine erhöhte Kalziumkonzentration im Zytoplasma zur Aktivierung der NO-Synthasen, und damit zur vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxidradikalen (NO^\bullet) führen. Andere kalziumabhängige Enzyme wie Proteasen und Phospholipasen werden dann ebenso aktiviert, sodass auch Superoxidradikale (O_2^\bullet) im höheren Maße produziert werden.

Dieser Umstand wäre im Falle einer Störung des Energiehaushalts gegeben. ATPasen halten im Normalfall die zytoplasmatische Kalziumkonzentration im Vergleich zur extrazellulären um einige Größenordnungen niedriger. Bei einer Störung des Energiehaushalts, zum Beispiel in Form einer Mitochondrienschädigung, sinkt nun die Bereitstellung des Energielieferanten ATP. Dies wiederum führt zu einer Membrandestabilisierung, der ein ansteigender Na^+ - und Ca^{2+} -Einstrom folgt. Zusätzlich kommt es wegen der Membrandepolarisation zu einer Sensitivitätserhöhung der Zelle gegenüber dem exzitatorischen Transmitter Glutamat, welches wie schon oben erwähnt zusätzlich den Kalziumeinstrom erhöht (Übersicht bei Bachus et al., 1997). Zu viele offene Fragen machen es allerdings bis heute kaum möglich den eigentlichen kausalen Stellenwert des oxidativen Schadens endgültig zu beurteilen.

1.2.5 Neurofilamente

Neurofilamente sind essentiell für den bidirektionalen axoplasmatischen Transport, der für die Integrität der Motoneurone unverzichtbar ist. Sie sind aus Untereinheiten zusammengesetzt, die drei Klassen von Polypeptiden entsprechen: eines mit einem niedrigen Molekulargewicht (NF-L, Mg 68.000), eines mit mittlerem Molekulargewicht (NF-M, 150.000) und ein drittes Peptid mit einem hohen Molekulargewicht (NF-H, 200.000) (Bachus et al., 1997)

Einer der häufigsten pathologischen Befunde im Rahmen der ALS ist das Vorhandensein von Ansammlungen anomaler Neurofilamente in den Perikarya und proximalen Anteilen der Axone von Motoneuronen. Die ersten experimentellen Anhaltspunkte für eine ursächliche Beteiligung der Neurofilamente bei der Pathogenese der ALS ergaben sich aus den Ergebnissen einer Studie an transgenen Mäusen. Diese exprimierten drei bis vier Mal so hohe Mengen an Wildtyp NF-L oder Wildtyp NF-H und entwickelten demzufolge einen fortschreitenden Verlust an motorischer Aktivität, Muskelatrophie und Paralyse (Cleveland et al., 1996). Im Verlauf der folgenden Studien entwickelten sich jedoch schwierig zu

interpretierende Ergebnisse. Einerseits führten die Dezimierung der axonalen Neurofilamente und die gleichzeitige Ansammlung entweder von aggregierten Filamenten oder den NF-M und NF-H Untereinheiten offenbar zu einer Verzögerung des Beginns der von SOD1 vermittelten Erkrankung. Andererseits fand man heraus, dass eine verstärkte Expression von NF-H zu einer bedeutenden Verbesserung der Erkrankung führt. Normalerweise würde man durch eine Störung der zytoplasmatischen Architektur eine Verschlechterung des durch die SOD1 vermittelten Zellschadens erwarten. Erklärungsansätze bietet erstens die Idee, dass überschüssige Neurofilamente gewissermaßen als Puffer für andere schädliche Prozesse wirken. Zweitens könnte durch die Verringerung der axonalen Neurofilamente eine Entlastung des axonalen Transports stattfinden, der dann den Schaden durch SOD1-Mutationen verkleinert (Übersicht bei Bruijn et al., 2004).

Zusammenfassend geht man heute davon aus, dass der Gehalt an Neurofilamenten und deren Organisation in der Zelle zumindest einen wichtigen Beitrag, wenn nicht einen Risikofaktor im engeren Sinne für die Krankheit der Amyotrophen Lateralsklerose darstellt.

1.2.6 Kalziumbindende Enzyme

Auf der Suche nach einer Ursache für die selektive Vulnerabilität von Motoneuronen bei der ALS rückten auch die Expression der kalziumbindenden Proteine Calbindin und Parvalbumin ins Zentrum des Interesses, zumal Kalzium eine erhebliche Rolle bei der Pathogenese der ALS zu haben scheint (s.o.) (Übersicht bei Rowland & Shneider, 2001; Alexianu et al., 1994).

1.2.7 Genetische Komponenten

Wie unter *1.1.1.* bereits erläutert sind schon seit über 10 Jahren einige Vererbungsmodi und Mutationen bei der Amyotrophen Lateralsklerose bekannt. Im Laufe der Zeit kristallisierte sich eine Anzahl an Genen mit entsprechenden Mutationen heraus, die auf der einen Seite die ALS mit hoher Wahrscheinlichkeit auslösen (ALS1-ALS6) oder zumindest eine Multisystemdegeneration mit zufälligem Auftreten von ALS (z.B. ALS verbunden mit einer Demenz und Parkinsonoid) bedingen. Sie werden eindeutig monogenetisch vererbt. Auf der anderen Seite wurden Gene entdeckt deren Mutationen auf gewisse Weise mit der Erkrankung assoziiert sind, d.h. zum Beispiel Gene, die Kaskaden der Neurodegeneration triggern (Majoor-Krakauer et al., 2003). Mit **Tabelle 2** soll eine kurze Übersicht der wichtigsten, bis heute bekannten Mutationen und ihrer genetischen Lokalisationen gegeben werden.

Die jüngsten Fortschritte im Bereich der ALS- Forschung sind zu großen Teilen auf die Entdeckung der ALS- assoziierten Mutation am Superoxid-Dismutase-1 (SOD1)-Gen im Jahre 1993 zurückzuführen (Rosen et al., 1993). Inzwischen weiß man, dass bis zu 20% der

FALS- Fälle auf Mutationen im für die Superoxiddismutase kodierenden Gen zurückzuführen sind (s.o.). Diese Erkenntnis unterstreicht die Bedeutung dieser Entdeckung für die Forschung an der ALS.

Tabelle 2

Klassifikation	Gen	Lokalisation	Vererbungsmodus
Gene die zur ALS führen (major genes)			
ALS1	SOD1	21q22	AD/AR
ALS2	ALSin	2q33-34	AR
ALS3	?	Unknown	AD
ALS4	Senataxin	9q34	AD
ALS5	?	15q12-21	AR
ALS6	?	18q21	AD
ALS7	?	20p13	AD
ALS8	VAPB	20q13	AD
FTDP	TAU	17q	AD
FTD		9q21-22	AD
Gene die mit der ALS assoziiert sind (susceptibility genes)			
Neurofilament schwere Kette	NF-H	22q12.2	
Neurofilament leichte Kette	NF-L	8p21	
Peripherin	PRPH	12q12-13	
Glutamat Transporter	EAAT2	11p13-12	
Glutamat Rezeptor	AMPA	5p33	
Apolipoprotein E	ApoE	19q13.2	
Ciliary neurotrophic factor	CNTF	11q12.2	
Debrisoquine hydroxylase	CYP2D	22q13.1	
Apurinic apyrimidinic endonuclease	APEX	14q11-12	
Mitochondriale DNA	COX		
Manganese superoxide dismutase	SOD2	6q25	
P2 Blutgruppe	P2	22q11	
AD, autosomal dominant; AR, autosomal rezessiv; FTD, frontotemporaler Demenzkomplex; FTDP, frontotemporaler Demenz- und Parkinsonkomplex; VAPB, (Vesikel-assoziiierter Membrankomplex)- assoziiertes Protein B.			

Nach: Majoor-Krakauer et al, 2003

Auch VEGF auf Chromosom 14q11.2 konnte bei SALS als mutiert nachgewiesen werden (Greenway et al., 2004), nachdem zuvor eine lebensverlängernde Wirkung von VEGF bei SOD1- Mäusen nachgewiesen werden konnte (Zheng et al., 2004; Azzouz et al., 2004).

1.2.7.1 Das transgene SOD1- Mausmodell

Bald nach der Entdeckung der Mutationen im Gen für die Cu/Zn- Superoxiddismutase (SOD1) von ALS- Patienten gelang die Züchtung von transgenen Mäusen mit verschiedenen humanen Mutationen am SOD1-Gen (FALS- Mäuse) (Gurney et al. 1994). Von den bis jetzt mehr als 100 Mutationen die im Menschen bekannt sind (davon u.a. in jedem der fünf Exons und in einigen Introns), wurden im Rahmen des SOD1- Mausmodells im wesentlichen drei intensiv erforscht. Es sind dies die Mutationen SOD1^{G85R}, SOD1^{G37R} und die SOD1^{G93A}. In diesen Mäusen wird das fehlerhafte humane Gen mindestens vergleichbar stark oder sogar um

das Mehrfache stärker exprimiert als die endogene SOD1. Darüber hinaus werden alle bis auf eine, nämlich die SOD1^{D90A}-Mutation, ausschließlich dominant vererbt. D90A steht dabei für einen Tausch der Aminosäure Aspartat (\rightarrow asp = D) gegen Alanin (\rightarrow ala = A), welche sich an Position 90 des Proteins befindet. In diesem Beispiel folgt dies aus einer Mutation im Basenpaar 1078 des Gens für SOD1, bei der im Basentriplet GAC das Adenin durch Cytosin GCC ersetzt wird. Die Pathologie dieser Mäuse ist der bei dem Menschen auftretenden in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich und das nicht zuletzt wegen der fortschreitenden Schwäche und Paralyse (Übersicht bei Bruijn et al., 2004).

1.2.7.2 Die Erkenntnisse aus SOD1 und ihrem Mausmodell

Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert den Abbau von O_2^\bullet zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches anschließend mittels Katalase, bzw. Glutathionperoxidase weiter zu Wasser abgebaut wird.

Die plausibelste Vermutung nach Entdeckung der SOD1- Mutation war die Annahme, dass dieser genetische Defekt eine Verringerung der Enzymaktivität und damit ein Überhandnehmen der toxischen Substanzen in Form von Radikalen zur Folge hat. Dies führte zur so genannten „loss-of-function-Theorie“ mit konsekutiv erhöhtem Angebot an O_2^\bullet , welche ihrerseits mit NO^\bullet reagieren und über Peroxynitrit ($ONOO^\bullet$) in die beiden stark toxisch wirkenden Radikale NO_2^\bullet und OH^\bullet zerfallen (Bachus et al., 1997; Übersicht bei Almer, 2003). Bald fand man jedoch heraus, dass viele der bekannten Formen von humanen Mutationen am SOD1- Gen mit normalen oder sogar erhöhten Dismutaseaktivitäten einhergehen. Es wäre aber zu erwarten, dass erhöhte Level an SOD1-Aktivität auch zu einer verminderten Toxizität führen müssten. Eine Korrelation zwischen klinischen Werten, wie Krankheitsbeginn und -dauer, sowie der enzymatischen Aktivität, war jedoch nie zu finden. Endgültig wurde diese Theorie dann verworfen als selbst „Knockout-Mäuse“ für SOD1 bei normaler Lebenserwartung weder eine Motoneuronenerkrankung noch entsprechende Symptome entwickelten (Übersicht bei Almer, 2003).

Als nächste Hypothese, die ebenfalls ein oxidatives Geschehen ins Zentrum rückt, ist ein möglicher Zn- Mangel in SOD1 anzusehen. Es wird vorgeschlagen, dass SOD1- Enzyme mit Mangel an Zink einen schnellen neuronalen Zelltod provozieren, der abhängig von nNOS und begleitet von proteingebundenem Nitrotyrosin verursacht wird. Um toxisch zu wirken, sind bei dieser Theorie sowohl ein Mangel an Zink, als auch gebundenes Kupfer vonnöten. Dabei sollte der Mangel an Zink eine verstärkte Reduktion von SOD1-Cu²⁺ zu SOD1-Cu¹⁺ verursachen, sodass der katalytische Prozess rückwärts, in Richtung Superoxid (O_2^\bullet) laufen

sollte, um dann wieder zu intrazellulärem Schaden zu führen. Doch hier stellte sich alsbald heraus, dass *in vivo* viele mutierte- im Vergleich zu wildtyp- SOD1- Enzymen keinen erniedrigten Zn- Anteil aufweisen, und dass eine Limitierung der NO- Synthese mittels Ausschaltung des Gens für nNOS keinen Einfluss auf den Ausbruch, respektive die Progression der Erkrankung hat (Facchinetti et al., 1999; Übersicht bei Cleveland & Rothstein, 2001).

Ähnlich verhält es sich mit einer weiteren Hypothese, bei der eine Toxizität in Abhängigkeit von „Kupfer Chaperon für SOD1“ (CCS) postuliert wird, einem Molekül, welches die Aufnahme von Kupfer in SOD1 erleichtert ohne dabei selbst an der Funktion des Enzyms teilzunehmen. In CCS- null Mäusen, d.h. knockout- Mäusen für das Protein CCS, konnte man *in vivo* ein Fehlen der Kupferaufnahme in SOD1 nachweisen. Allerdings hatte dies bemerkenswerterweise keinen Einfluss auf den Ausbruch, den Verlauf oder die Pathologie der Erkrankung in SOD1^{G93A}, SOD1^{G37R} und SOD1^{G85R} Mäusen, was den Verdacht einer durch CCS bedingten Toxizität durch Kupfer zunächst nicht bestätigen konnte. Allerdings gibt es *in vitro* Ergebnisse, die dafür sprechen könnten, dass es noch einen CCS-unabhängigen Weg gibt, um die Superoxiddismutase mit Kupfer zu beladen (Übersicht bei Bendotti und Carri, 2004; Cleveland & Rothstein, 2001).

Da auch bei dieser Idee des oxidativen Schadens einige „für“ und „wider“ existieren, ist es sehr schwierig plausible Schlussfolgerungen zu ziehen. Alles in allem gibt es ungeachtet der Tatsache, dass die Hypothese des oxidativen Schadens infolge SOD1- Mutation sehr interessant erscheint, drei wesentliche Punkte, die gegen eine in diesem Bezug verursachte primäre Toxizität von SOD1- Mutanten sprechen: zunächst die fehlende Sensitivität auf verschiedene Aktivitätsgrade von SOD1; zweitens ist trotz herabgesetzter Ladung von SOD1 mit Kupfer bei Mäusen keine Verringerung der Toxizität *in vivo* zu erkennen; drittens gibt es nur unzureichende Beweise für erhöhte Marker des oxidativen Schadens in ALS- Patienten sowie transgenen Formen von Mäusen (Cleveland & Rothstein, 2001).

Inzwischen hat sich durchgesetzt, dass die SOD1- vermittelte FALS wohl aus einem „gain-of-function-Mechanismus“ hervorgeht. Ob sich nun dieser Erwerb toxischer Funktionen durch unlösliche, die Zellfunktion behindernde Aggregate oder wie eben diskutiert in Form neuer pro- oxidativer Enzymaktivitäten oder durch beides äußert, ist nach wie vor unklar. Stark für eine „gain-of-function-Theorie“ spricht zum Beispiel auch die Tatsache, dass im Gegensatz zu transgenen Mäusen mit mutierten Genen, Mäuse welche nur die humane *wildtyp*- SOD1 überexprimieren keine Symptome entwickeln.

FALS SOD1- Mäuse scheinen allerdings einerseits einen Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsbeginn und dem Grad der Expression eines Gens und andererseits zwischen der Schwere des Verlaufs und der Art der Mutation im Gen zu zeigen. So ist zum Beispiel der Verlauf der Erkrankung bei transgenen Mäusen mit der humanen Mutation G85R sehr viel kürzer (7-14 Tage) als dies bei Mäusen mit der humanen Mutation G93A (60-110 Tage) der Fall ist (Übersicht bei Bendotti & Carri, 2004).

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass ein großer Vorteil des Tiermodells in der Tatsache begründet liegt, dass dadurch ermöglicht wird, den schrittweisen Ablauf der Erkrankung, ebenso wie mögliche therapeutische Alternativen, zu untersuchen. Bei allem Optimismus darf jedoch nicht vergessen werden, dass es sich hier um ein Modell der FALS handelt, also letztendlich nur für etwa 1 % aller ALS- Erkrankungen repräsentativ ist.

1.2.8 Entzündliche Prozesse in der ALS

ALS- Gewebe zeigt ähnlich, wie dies auch bei einigen anderen neurodegenerativen Erkrankungen der Fall ist (z.B. Alzheimer), klare Zeichen neuroinflammatorischer Veränderungen. Dieses Phänomen ist bemerkenswerterweise darüber hinaus sowohl in der sporadischen, als auch familiären Form von ALS nachzuweisen. Es ist anzunehmen, dass entzündliche Prozesse mit höchster Wahrscheinlichkeit nicht ursächlich für die Erkrankung sind. Aber durch ihre Präsenz in SALS, wie auch FALS, sind sie grundsätzlich ein wichtiger Faktor in der Beeinflussung des Verlaufs von ALS. Damit könnten sich daraus Möglichkeiten für anti- inflammatorische Therapien ergeben.

Im Jahre 1919 gelang es Del Rio Hortega die Mikroglia als Phagozyten des Gehirns mit mesenchymaler Herkunft zu identifizieren. Später fand man das so genannte monozytäre Phagozytosesystem und erkannte, dass sich alle Gewebsphagozyten von Monozyten ableiten und dass sie in das Gewebe wandern, um eine erste „Verteidigungslinie“ zu bilden.

Inzwischen weiß man sicher, dass die Aktivierung der Mikroglia am Beginn eines entzündlichen Prozesses im ZNS steht (Übersicht bei McGeer & McGeer, 2002).

1.2.8.1 Zelluläre inflammatorische Veränderungen bei ALS

Das entscheidende zelluläre Ereignis zu Beginn einer entzündlichen Reaktion des neuronalen Gewebes ist die Anhäufung von aktivierter Mikroglia im degenerierenden Bereich des Gehirns. Ebenso wie Mikroglia sind auch reaktive Astrozyten im Bereich der degenerierenden Zonen des ZNS zu finden. Im Fall der ALS sind dies der motorische Kortex und die Vorderhörner des Rückenmarks (McGeer & McGeer, 2002).

Aktivierte Mikroglia können mittels Immunhistochemie dargestellt werden. Sie sind an ihrer Morphologie zu erkennen. Aktivierte Gliazellen sind hypertroph und weisen deutlich

verdickte und retrahierte Zellfortsätze auf, wohingegen diese bei ruhenden Gliazellen zierlich und lang zur Darstellung kommen (Übersicht bei Almer, 2003).

Astrozyten sind ebenfalls zur Phagozytose befähigte sternförmige Zellen mit zahlreichen Zellfortsätzen. Sie stehen sowohl mit Nervenzellen, als auch mit Blutgefäßen in Kontakt, sorgen für Stoffaustausch und bilden einen Anteil an der Blut-Hirn-Schranke (McGeer & McGeer, 2002).

Ähnlich wie bei SOD1- transgenen Tieren ist eine Ansammlung von reaktiver Mikroglia in betroffenen Arealen eine der auffälligsten neuropathologischen Veränderungen im *post-mortem* Gewebe von ALS- Patienten (Kawamata et al. 1992; Lampson et al, 1990; Troost et al., 1990; Henkel et al., 2004). *In vivo* kann diese lokalisierte mikrogliale Reaktion mittels [³H]PK11195 einem radioaktivem Marker von Mikroglia- Zellen dargestellt werden (Sitte et al., 2001).

Die Aktivierung dieser Zellen hat zur Folge, dass eine Reihe von Proteinen an der Zelloberfläche präsentiert werden, die im ruhenden Zustand der Zelle nicht oder zumindest nicht in relevantem Maße präsentiert werden und damit einer Antigen- Antikörperreaktion zugänglich werden.

Die **Tabelle 3** soll eine Übersicht über einige Proteine geben, die bisher nachweislich mit der Entzündungsreaktion bei ALS assoziiert sind.

Tabelle 3

PROTEIN	FUNKTION
HLA-DR (humanes Leukozyten Antigen DR)	Antigen, welches ein Oberflächenmolekül auf immunkompetenten Zellen präsentiert
CD-11b (Komplement Rezeptor 3)	Phagozyten- Oberflächenrezeptor, welcher ein aktiviertes Komplementfragment von C3 erkennt
LCA (Leukozyten Common Antigen, CD45)	Membrangebundenes Protein - Tyrosinphosphatase, welches auf allen Leukozyten exprimiert wird
Fc _R -1 (Immunglobulin Fc- Region Rezeptor 1)	Rezeptor auf Phagozyten für an Antigen gebundene Antikörper
GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)	Protein, welches stark von aktivierten Astrozyten exprimiert wird
LFA (Leukozyten Funktionsantigen 1, CD11a/CD18)	Erscheint auf aktivierten T- Zellen und fördert die interzelluläre Adhäsion
ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1, CD54)	Zelloberflächen- oder Matrixmolekül, welches die Bindung an LFA-1 fördert
γ-Interferon	Von aktivierten T- Zellen freigesetztes Zytokin
C3d (Komplement C3 Fragment d)	Abbauprodukt von aktiviertem C3
C4d (Komplement C4 Fragment d)	Abbauprodukt von aktiviertem C4
Phospholipase A2	Löst Membranlipide aus, um Arachnidonsäure synthetisieren zu können
COX-1 (Cyclooxygenase-1)	Konvertiert Arachnidonsäure in Prostaglandin H2
COX-2 (Cyclooxygenase-2)	Konvertiert Arachnidonsäure in Prostaglandin H2
IL-6 (Interleukin 6)	Entzündungszytokin, welches aus aktivierten Mikroglia und Astrozyten ausgeschüttet wird
Diese Proteine sind nicht spezifisch für die ALS!	

Nach: McGeer & McGeer, 2002

1.2.8.2 Zytochemische inflammatorische Veränderungen bei ALS

Die gliale Aktivierung im Rahmen einer Entzündungsreaktion müsste von zahlreichen zytochemischen Veränderungen begleitet sein. Bis heute ist dieses Gebiet jedoch größtenteils unerforscht geblieben. Die Alzheimer Erkrankung könnte in jedem Fall Anhaltspunkte bieten, schließlich wurden bei der ALS ähnliche zelluläre Veränderungen beschrieben. Damit sind im Hinblick auf bereits vorhandenes Wissen im Bereich der Alzheimer-Forschung Hinweise aufgezeigt, welche Proteinfamilien auch bei einer Entzündungsreaktion von ALS unter Umständen betroffen sein könnten. Unter ihnen mögen neben Prostaglandinen, Interleukinen, anderen Zytokinen, Chemokinen, Proteinen des Komplementsystems, Integrinen, Anaphylotoxinen, Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren, Akut- Phase- Proteinen, Apolipoproteinen, selektive Proteasen und Proteaseinhibitoren von Bedeutung sein (McGeer & McGeer, 2002). Einiges davon konnte bereits im Bezug auf die ALS publiziert werden. Im Konkreten war es möglich in einem G37R-SOD1-transgenen Mausmodell beispielsweise eine Erhöhung für NF- kappa B, TNF- α oder MCP-1 aufzuzeigen (Nguyen et al, 2001). Man konnte schließlich auch eine Erhöhung von MCP-1, einem Chemokin und eine darauf zurückzuführende Einwanderung von reifen dendritischen Zellen in Fällen von FALS und SALS nachweisen (Henkel et al., 2004). In einer weiteren Arbeit war es möglich, eine erhöhte Expression von IL-12, MIP1 α , MIP-1 β , TGF- β und TNF- α im Rückenmark von G93A-SOD1-transgenen Mäusen zu belegen (Xie et al., 2004). Mehrere Arbeiten zeigten zudem, dass pro-inflammatorische Zytokine nicht nur im ZNS- Gewebe sondern auch im Liquor und im Serum von ALS- Patienten nachgewiesen werden können (Poloni et al., 2000; Almer et al., 2002; Henkel et al., 2004).

Ein wichtiger biochemischer Aspekt, der eine inflammatorische Antwort im Verlauf der ALS stützt, ist eine nachgewiesene Erhöhung von COX-2 (Cyclooxygenase 2) im Rückenmark von an ALS verstorbenen Patienten (Maihofner et al., 2003), nachdem man bereits eine Erhöhung von COX-2 in SOD1-transgenen Mäusen hat feststellen können (Almer et al., 2001). COX-2 ist ein Schlüsselenzym in der Synthese von Prostaglandinen und damit ein pro-inflammatorischer Mediator, ebenso wie TNF- α oder Interleukin-1 β . Die für COX-2 kodierende mRNA kann bei ALS bis zu siebenfach erhöht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen sind jedoch auf die bereits durch Degeneration zerstörten Areale des ZNS beschränkt. COX-2 ist im Gegensatz zu COX-1 durch entzündliches Geschehen stark induzierbar, was auch erklären könnte, dass die COX-1 Werte im Verlauf der ALS relativ unbeeinträchtigt bleiben (Übersicht bei Malaspina & de Bellerocche, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass COX-2 durch entzündliche Prozesse induziert wird und dass COX-2-

Inhibitoren bereits bei chronisch entzündlichen Erkrankungen erfolgreich angewendet werden, ist es durchaus nahe liegend, dass diese auch für die Therapie der ALS relevant sein könnten (McGeer & McGeer, 2002). Durch spezifische Hemmung von COX-2 konnte inzwischen ein Schutz von Motoneuronen und folglich auch ein verlängertes Überleben von FALS- Mäusen nachgewiesen werden (Drachman et al., 2002; Pompl et al. 2003). Am Menschen konnte dieser Umstand, wie in einigen Publikationen bereits diskutiert, jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Maihofner et al., 2003).

Eine Entzündung bedeutet durch die Freisetzung von zytotoxischen Substanzen und Entzündungsmediatoren wie unter anderem die von Radikalen, NO, Zytokinen und Prostaglandinen, oxidativen Stress für die Zelle. Bei Verletzungen oder Entzündungen des ZNS werden Mikroglia aktiviert (Übersicht bei Bruijn et al., 2004). Mikroglia stellen im Bereich des ZNS die größte Quelle für Sauerstoffradikale dar. Als weitere weniger bedeutende Quellen für freie Radikale wären an dieser Stelle die Xanthinoxidase und NOS zu nennen (McGeer & McGeer, 2002). Weitere Indizien für die Verwicklung von Mikroglia in das Entzündungsgeschehen von ALS liefern einige pharmakologische Studien, die eine Verlangsamung der Progression der Erkrankung zum Ziel hatten. Unter Minocyclin, einem Antibiotikum, welches die mikrogliale Aktivierung blockt und die Caspase- Aktivierung inhibiert, fand sich zum Beispiel eine Verlangsamung der Erkrankung in ALS- Mäusen (Übersicht bei Bruijn et al., 2004). Nach zwei kleinen Phase II Studien (Gordon et al., 2004), wurde nun eine Phase III Studie gestartet, um die Wirkung dieses Medikaments bei ALS- Patienten nachzuweisen (Traynor et al., 2006).

Bei der Alzheimer- Erkrankung ist ein wichtiger Bestandteil der entzündlichen Reaktion die Aktivierung des Komplementsystems. Es gibt auch einige Veröffentlichungen, die ähnliches für die ALS postulieren. So konnte man bei ALS eine Erhöhung der mRNAs von C1qB, Clusterin (apoJ) und T-Zell Rezeptor (TCR) in von Degeneration betroffenen Bereichen des Rückenmarks finden (Übersicht bei Malaspina & de Belleruche, 2004). Erhöhte Werte von C4d und dem Zytokin Interleukin-6 konnten im Liquor von ALS- Patienten nachgewiesen werden. Eine Anreicherung von mRNA und Protein des Komplementrezeptors CD11b waren ebenfalls zu verzeichnen. CD11b ist ein charakteristischer Marker der Mikroglia (Übersicht bei McGeer & McGeer, 2002).

Das in einer Gen- Expressionsstudie verwendete „GDA (Gene Discovery Array)- Format“, eine Membran basierte Array- Technologie, hat inzwischen weiter dazu beigetragen verschiedene Transkripte zu identifizieren, die eine Rolle bei der Entzündung des Nervengewebes und bei der Immunantwort spielen könnten (Malaspina et al., 2001). Die

mRNA von IL-1 RAcP (Interleukin I receptor accessory protein) konnte demnach im ALS-Rückenmark als merklich erhöht nachgewiesen werden. Es ist ein Transmembranprotein, welches zu einem Rezeptorkomplex gehört, der an das pro- inflammatorische Protein Interleukin-1 bindet. IL-1 RAcP konnte zusätzlich im Rückenmark von SOD1- G93A-transgenen Mäusen als erhöht nachgewiesen werden. Interleukin vermittelter neuronaler Schaden wird mittlerweile als ein Schlüsselereignis der Neurodegeneration angesehen (Übersicht bei Malaspina & de Bellerocche, 2004). Es wurde zum Beispiel berichtet, dass transgene Mäuse die Interleukin- 3 überexprimieren, eine der ALS stark ähnelnde, selektive Motoneurondegeneration mit Autoimmunreaktion entwickeln (Chavany et al., 1998). In der GDA- Studie konnte als weiteres Beispiel auch die mRNA des Zytokins RANTES als verstärkt exprimiert nachgewiesen werden. RANTES ist ein Mitglied der Unterfamilie von Chemokinen, die zu Beginn einer Entzündung entsprechend CD4- positive T- Zellen, Monozyten und Eosinophile anlocken, sowie Basophile dazu anregen, Histamin freizusetzen (Übersicht bei Malaspina & de Bellerocche, 2004).

Viele dieser nachgewiesenen Veränderungen sind jedoch nicht als spezifisch für die ALS anzusehen, sondern wie erwähnt, auch bei Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu finden.

Die eigentliche Rolle oder der Grund einer Entzündung in der Pathogenese der ALS bleibt nach wie vor ungewiss. Wie angesprochen wird vorgeschlagen, dass die entzündliche Reaktion durch die Bildung freier Radikale getriggert werden könnte. Des Weiteren mag ein „Autotoxizität“ genannter Prozess bei der Entzündungsbildung eine Rolle spielen. Diese Form der Selbstaggression entsteht, wenn die Immunabwehr überreagiert und somit eigenes neuronales Gewebe schädigt. Außerdem konnte bei Alzheimer gezeigt werden, dass Ablagerungen von Amyloid beta dazu führen, dass Astro- bzw. Oligodendrozyten angeregt werden Chemokine zu produzieren (MCP-1 und RANTES), welche dann Mikroglia und Makrophagen anlocken. Letzteres konnte wie oben besprochen auch schon bei ALS bestätigt werden (Henkel et al., 2004). Amyloid- β regt Mikroglia darüber hinaus dazu an, Zytokine und ROS zu sezernieren, was wie bereits besprochen, zu neuronalem Schaden führen kann (Übersicht bei Malaspina & de Bellerocche, 2004). Analog gibt es die Vermutung, dass im Verlauf der ALS Proteinaggregate, oder veränderte zelluläre Proteine, die inflammatorische Reaktion in Gang setzen könnten (Übersicht bei Ross & Poirier, 2004; Strong et al., 2005). In SOD1- Mäusen waren demnach Zelleinschlüsse von SOD1- Aggregaten nachzuweisen (Bruijn et al., 1998; Rakhit et al., 2002). Dabei sind selbst in den Gehirnen von SALS-Patienten entsprechende SOD1- Proteinaggregate nachgewiesen worden, obwohl SOD1

gemeinhin nicht bei sporadischer ALS auffällt und auch *in vitro* normalerweise keine fibrillären Strukturen bildet (Ross & Poirier, 2004).

1.2.9 Das mögliche Zusammenspiel pathogenetischer Faktoren

In Anbetracht der Fülle von Gen- und Umwelteinflüssen, die möglicherweise zu der Pathogenese der ALS beitragen, liegt eine multifaktorielle Genese der Erkrankung auf der Hand.

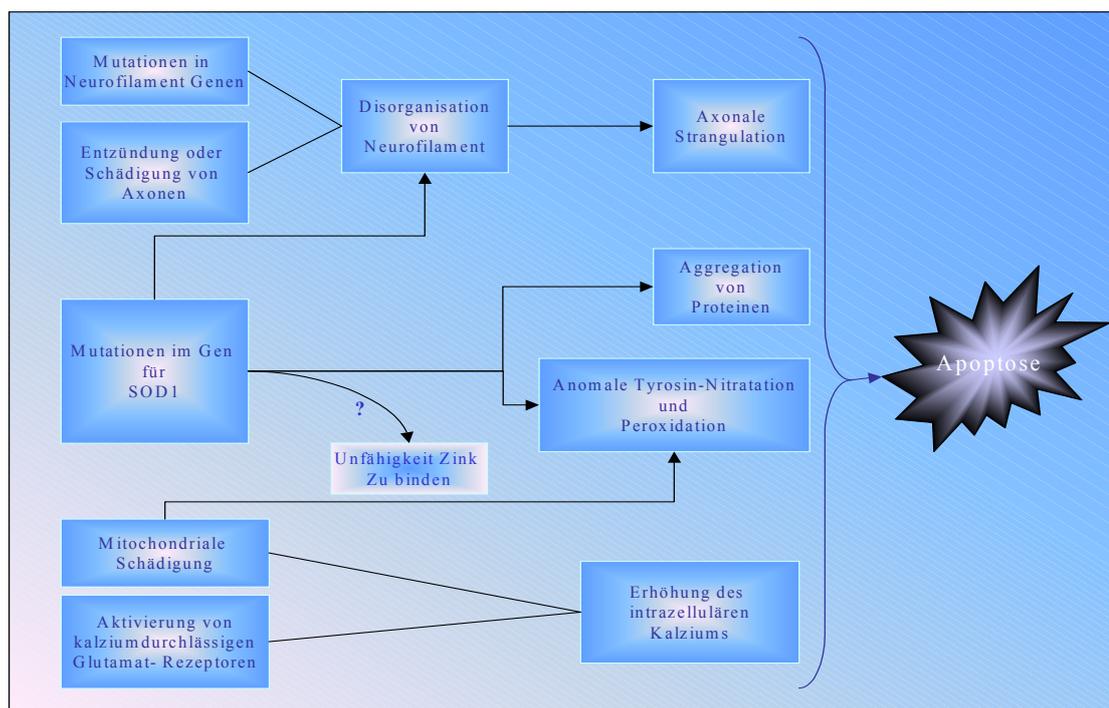
Für die Annahme einer Gen-Gen Interaktion und/oder deren Produkte existieren wichtige Indizien. Die speziell auf Motoneurone fokussierenden schädlichen Auswirkungen von Genmutationen bei der ALS geben unter anderem Grund zu der Annahme, dass ein auf die Motoneurone beschränkter Mangel an Schutz vor schädlichen Einflüssen eine erhebliche Rolle spielen könnte. Einige Experimente mit doppelt transgenen Mäusen (z.B. SOD1 & Neurofilament) zeigten, dass sich die Beeinflussung der unterschiedlichen mutierten Gene in einem modifizierten Verlauf der Erkrankung niederschlagen können (Newbery & Abbott, 2002). Ob diese Beeinflussung aufgrund veränderter Produkte der Gene (Protein-Protein Interaktion) stattfinden, oder diese veränderten Proteine wiederum Einfluss auf die Expression der Gene nehmen (Protein-Gen Interaktion), bleibt zunächst offen (Majoor-Krakauer et al., 2003).

Eine Interaktion zwischen Genen und bestimmten Umwelteinflüssen ist im Zusammenhang mit den so genannten „susceptibility genes“, also mit ALS assoziierten Genen, anzunehmen. Allerdings bleibt es schwierig entsprechende Risikofaktoren zu verifizieren, zumal diese unter Umständen nur eine geringe Erhöhung des Gesamtrisikos bedeuten könnten und sich die ALS genetisch sehr heterogen darstellt. Jedes der mit ALS assoziierten Gene könnte auf einen eigenen anderen Umwelteinfluss als entsprechender Trigger reagieren. Die Identifikation von Gen-Umwelt Interaktionen stellt einen wichtigen Punkt dar. Schließlich könnte man in der Folge nach präventiven Maßnahmen bei exponierten Personen suchen (Majoor-Krakauer et al., 2003).

1.2.9.1 Konsolidierung der Hypothesen

Neuropathologisch sind die verschiedenen Typen von familiärer und sporadischer ALS von zahlreichen Ähnlichkeiten oder Übereinstimmungen geprägt. Diese Tatsache weist auf eine bis zu einem gewissen Grad gemeinsame Endstrecke der Pathogenese dieser Formen von ALS hin. Mit **Abbildung 1** soll ein Versuch gemacht werden die Abläufe, die bisher aller Wahrscheinlichkeit nach zu einer Motoneurondegeneration beitragen, zusammenführen.

Abbildung 1



Nach: Rowland & Shneider, 2001

1.2.9.2 Wahrscheinliche Konsequenz: Gemeinsame Endstrecke Apoptose

Bei der SOD1- vermittelten Form von ALS verdichten sich mehr und mehr die Hinweise, dass die Apoptose (programmierter Zelltod) am Ende einer Kaskade von Ereignissen im Rahmen des Motoneuronuntergangs stehen könnte.

Erste Hinweise in diese Richtung erbrachte eine Studie, mit deren Hilfe man nachwies, dass die Überexpression von bcl-2, einem anti- apoptotischen Protein, einen protektiven Effekt auf Motoneuronen hat, und den Ausbruch der Erkrankung bei transgenen Mäusen verzögert, sowie deren Leben verlängert (Kostic et al., 1997). Gestützt wurde dieses Ergebnis durch den Nachweis einer Aktivierung der Kaspasen 1 und 3 in SOD1- Mäusen. Diesen Enzymen kommt eine entscheidende Rolle bei der Einleitung der Apoptose zu. Im weiteren Verlauf wurden im Tiermodell Erfolge mit Kaspasehemmern (hier im Speziellen zVAD-fmk) verzeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Caspase- 1 im Rückenmark von SOD1- Mäusen bereits präklinisch erhöht ist. Man wies nach, dass selbst in der sporadischen Form der humanen ALS Veränderungen im subzellulären Verteilungsmuster von bcl-2 und bax, zweier Proteine, die sich als anti- bzw. pro- apoptotische Effektoren gegenüber stehen, existieren. Letzteres Ergebnis konnte man auf Ebene der mRNA durch veränderte Expression von bax und bcl-2 weiter erhärten (Übersicht bei Almer, 2003).

Zusammenfassend könnten die vielen verschiedenen Trigger der ALS unterschiedliche zelluläre Funktion in einer solchen Art und Weise beeinträchtigen, dass die Motoneurone

nach und nach beginnen könnten, die Apoptose einzuleiten. Obwohl die Apoptose am Ende der Zelldegeneration steht, mag ihre Beeinflussung einen positiven Effekt auf den Verlauf der Amyotrophen Lateralsklerose haben.

1.3 Herleitung der Fragestellung

In Anlehnung an die bereits diskutierten Proteinfamilien, die Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in der Pathogenese der Amyotrophen Lateralsklerose nehmen könnten, und durch die Tatsache, dass Konzentrationserhöhungen einiger pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in durch ALS geschädigtem Gewebe bereits bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass diese einen relevanten Anteil am Untergang von Motoneuronen im Verlauf dieser Erkrankung haben könnten.

Durch die Nutzung von Methoden zur Bestimmung der Genexpression, Proteinsynthese, sowie durch die Anwendung immunhistochemischer Techniken, könnten für das Entzündungsgeschehen relevante Gen- bzw. Proteinfamilien identifiziert und auf ihre Bedeutung hin überprüft werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Einzelnen die Proteine SOCS-1, SOCS-3 und C/EBP β ausgewählt. Sie stellen regulatorische Elemente im Zytokinstoffwechsel dar und haben somit ihre Bedeutung in der indirekten Steuerung von Entzündungsreaktionen. Im Folgenden sollen ihre bislang erforschten Funktionen und Aufgaben kurz beleuchtet werden.

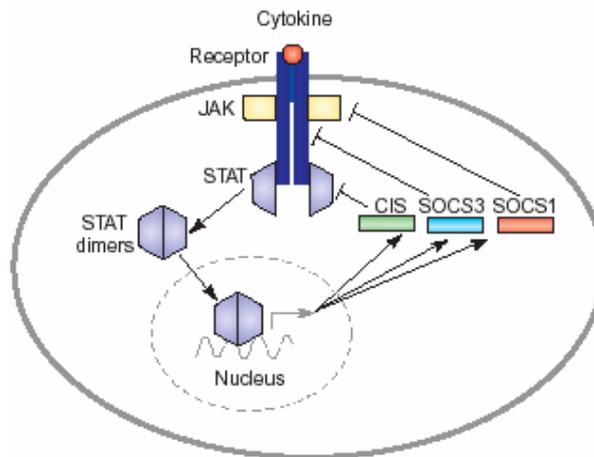
1.3.1 Die SOCS- Familie und ihre Rolle im Entzündungsgeschehen

Die SOCS- Familie umfasst Proteine, welche via Zytokinstimulation induziert werden. In einem klassischen Feedback- Kreislauf wird dabei die weitere Signalübertragung gehemmt (Übersicht bei Krebs & Hilton, 2001 und Wormald & Hilton, 2004).

Die Hypothesen gehen in die Richtung, dass diese Hemmung über den JAK- STAT- Weg vermittelt wird. Die Bindung von Zytokinen an Rezeptoren der Zelloberfläche führt zu einer Oligomerisierung und Aktivierung der zu den Tyrosinkinasen gehörenden JAK- Familie.

Aktivierte JAKs phosphorylieren die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors und bilden dadurch Bindungsstellen für Signalproteine, wie STATs. STATs werden durch JAKs auch phosphoryliert, dimerisieren und wandern anschließend zum Zellkern, wo sie die Transkription von Genen regulieren (Ihle, 1995).

Abbildung 2



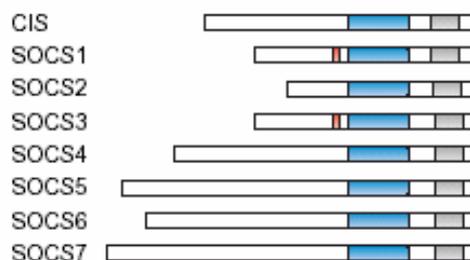
Aus: Elliott & Johnston, 2004

Negative Regulation von Zytokinsignalen durch SOCSs. Die Bindung von Zytokinen an die Oberflächenrezeptoren führt zu einer Rezeptoroligomerisation. Näheres siehe Text.

1.3.1.1 Die Biochemie der Signalhemmung durch SOCS

Zur SOCS- Familie gehören acht Mitglieder: CIS und SOCS-1 bis -7. Alle Familienmitglieder besitzen eine SH2- Domäne und eine konservierte C- terminale SOCS- box. Die SH2- Domänen von SOCS sollen dabei die Zytokinsignale abschwächen, indem sie an die phosphorylierten Tyrosinreste, zum Beispiel von Teilketten des Rezeptors oder an die JAKs binden. Dagegen soll CIS die Ablösung des STAT von dem Zytokinrezeptor blocken, um eine Dimerisierung von STAT zu verhindern (Elliot & Johnston, 2004).

Abbildung 3



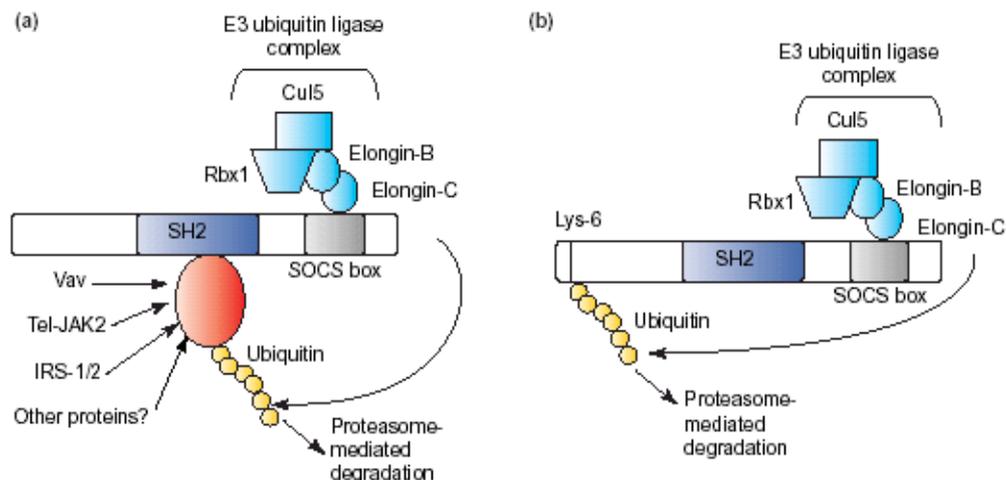
Aus: Elliott & Johnston, 2004

Die SOCS Proteinfamilie. Nur SOCS-1 und -3 besitzen unmittelbar auf die SH2-Domäne folgend eine KIR- Region (Kinase inhibitory region). Sie soll an der Verstärkung, resp. Inhibierung der JAK- Aktivität beteiligt sein.

Rot: KIR
Blau: SH2 Domäne
Grau: SOCS box

Von der SOCS- box glaubt man, dass sie wegen ihrer Assoziation mit Elongin B und C an der Ubiquitin- E3-Ligase- Aktivität beteiligt ist. Ubiquitin spielt beim Abbau von Proteinen eine gewichtige Rolle. Deshalb könnte die Bindung von SOCS an bestimmte Proteine eine Markierung dieser zum Abbau durch Proteasome bedeuten (Kamura et al., 1998).

Abbildung 4



Aus: Elliott & Johnston, 2004

- (a) Möglicher Mechanismus durch den SOCS assoziierte Proteine für den späteren Abbau vorbereiten könnte. Der E3 Ubiquitin Ligase Komplex bindet Ubiquitin an entsprechende Zielproteine wie z.B. JAK2, und tritt dann mit der SH2- Domäne von SOCS in Interaktion.
- (b) Vermuteter Mechanismus über den die versch. SOCS zielgerichtet abgebaut werden könnten. Man glaubt, dass die Bildung des E3 Ligase Komplexes zu einer Ubiquitinierung mittels Bindung an z.B. das N- terminale Lys-6 Ende von SOCS-3 führt.

Die Bedeutung des in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchten Teils der Familie, nämlich von SOCS-2 und SOCS-4 bis -7, begann man erst unlängst zu untersuchen. SOCS-5 scheint bei der T-Zell-Differenzierung eine Rolle zu spielen, SOCS-6 und -7 sind sich recht ähnliche Proteine aus ihrer Familie. SOCS-6 kann nicht mit JAK2 in Interaktion treten, hat aber offensichtlich im Stoffwechsel von Insulin eine Bedeutung. SOCS-2 und CIS sollen die Bindung von STAT an Zytokinrezeptoren verhindern. Es gibt Untersuchungen, die zu der Vermutung Anlass geben, SOCS-2 sei ein möglicher Inhibitor von anderen SOCS- Proteinen (Übersicht bei Elliott & Johnston, 2004).

1.3.1.2 SOCS-1

Abgesehen von der Tatsache, dass SOCS-1 der potenteste Vertreter seiner Familie ist, also die Zytokinsignale am wirkungsvollsten inhibiert, zeigen „knock-out-“ SOCS-1 (SOCS-1^{-/-}) Mäuse im Quervergleich phänotypisch den akutesten Verlauf. Schnell kommt es bei diesen Mäusen zur fettigen Degeneration der Leber, Lymphopenie, Makrophageninfiltration der großen Organe und zur Aktivierung peripherer T-Zellen. Es wird angenommen, dass dies auf die durch eine verstärkte Aktivierung von STAT-1 herbeigeführte unkontrollierte Sekretion von IFN- γ zurückzuführen ist (Starr et al., 1998). Darüber hinaus wurde in einem Mausmodell festgestellt, dass Mäuse die entweder einen Mangel an SOCS-1 und IFN- γ oder und IFN-Rezeptor hatten, nicht in der Neonatalperiode versterben. Damit liegt die Vermutung auf der Hand, dass SOCS-1 ein bedeutender Inhibitor von IFN- γ *in vivo* sein könnte (Marine et al., 1999; Alexander et al., 1999). Allerdings zeigen Langzeitstudien, dass diese SOCS-1^{-/-} und

IFN- $\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Laufe der Zeit durchaus an einer Anzahl von verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise Hautgeschwüren, leiden (Metcalf et al., 2002). Dies könnte laut Elliot et al. Aus dem Jahre 2004 infolge der Wirkung anderer Zytokine wie IL-2, -4, -6, -12 und -14 bedingt sein. Diese Effekte könne man demnach erst durch das fehlen von IFN- γ beobachten (Elliot & Johnston, 2004).

IFN- γ soll die Expression von CD40 sowohl in Makrophagen, als auch Mikroglia induzieren und über dieses dann zu einer Produktion von zahlreichen Chemo- bzw. Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α , MIP-1 α) anregen. Für diese Induktion von CD40 durch IFN- γ besteht danach allerdings eine Abhängigkeit von STAT-1 α . Dies sollte durch die fehlende Induktion bei STAT-1 α defizienten Mäusen bewiesen werden (Nguyen & Benveniste, 2000; Übersicht bei Wesemann et al., 2002).

Zusammenfassend wird von SOCS-1 vermutet, dass es über eine Blockierung der durch IFN- γ vermittelten STAT-1 α Aktivierung zu einer Inhibierung der zytokininduzierten CD40-Expression kommt. Dies wiederum sollte unter anderem zu einer Verminderung der Differenzierung von TH1, der Sekretion von TNF- α und der NF- κ B- Aktivierung und daraus folgender Hemmung der Inflammationsgenese führen (Wesemann et al., 2002).

Es ergaben sich also Verdachtsmomente, wonach SOCS-1 Einfluss auf die T-Zell Differenzierung haben könnte. IFN- γ soll die Differenzierung von TH1- Zellen unterstützen jedoch die von TH2- Zellen inhibieren (Übersicht bei Agnello et al., 2003; Egan et al., 2003). Nach anderen Studien zeigt sich eine hauptsächliche Expression von SOCS-1 in TH1- Zellen und damit eine negative Regulierung der TH1- Differenzierung (Egwuagu et al., 2002).

1.3.1.3 SOCS-3

SOCS-1 und SOCS-3 sind sich zwar strukturell sehr ähnlich, jedoch unterscheiden sie sich nichtsdestotrotz in der Art und Weise die Zytokinwirkung zu hemmen (Elliot & Johnston, 2004). So benötigt SOCS-3 die Bindung an einen Rezeptor, um JAKs inhibieren zu können, wohingegen SOCS-1 seine Hemmung durch direkte Bindung an JAK vermittelt (Übersicht bei Elliot & Johnston, 2004).

Mittlerweile sind zwei Zytokinkaskaden näher untersucht, welche eine Aktivierung des JAK-STAT- Systems über STAT-3 mit sich bringen und damit eine Rolle für SOCS-3 spielen, welches STAT-3 inhibiert. Zum einen über das pro- inflammatorische Zytokin IL-6 und zum anderen über das anti- inflammatorische Zytokin IL-10 (Übersicht bei Kubo et al, 2003).

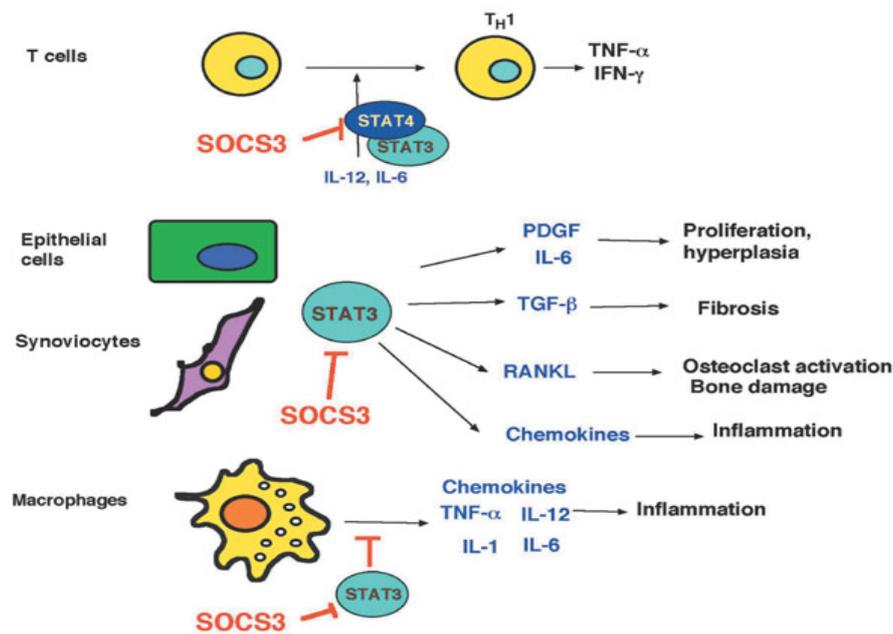
IL-6 wirkt als pro- inflammatorisches Zytokin und bringt letztlich eine Induktion der Akut-Phase-Gene, als die wahrscheinlichste Konsequenz, aus dem Ablauf der Signalkaskade mit

sich (Kishimoto, 2005). Hier wird SOCS-3 also als negativer Regulator fungieren und eine mögliche Entzündungsreaktion hemmen. Näheres hierzu soll unter 4.7 diskutiert werden.

Um die weitere Bedeutung von SOCS-3 im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen *in vivo* zu testen, wurden Mäuse mit einem Mangel an SOCS-3 geschaffen. Es zeigte sich, dass es in den Makrophagen dieser Mäuse zu einer Aktivierung von STAT-3 kommt, welche durch das anti- inflammatorische Zytokin IL-10 vermittelt wird. Demnach ist SOCS-3 außerdem ein negativer Regulator von IL-10. Als Konsequenz kam es zu einer Hemmung der Aktivierung der Makrophagen. Interessanterweise zeigte IL-6 in den Makrophagen dieser Mäuse eine möglicherweise durch verlängerte STAT-1 Aktivierung vermittelte IFN- γ - ähnliche Immunsuppression (Yasukawa et al., 2003). Von IFN- γ ist eine immunsuppressive Aktivität bekannt (Brod, 2002). In Leberzellen und Makrophagen bewirkte eine Deletion von SOCS-3 eine fehlende Inhibition der IL-6 Sekretion (Crocker et al., 2003). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung oder verminderte Bildung von SOCS-3 zu einer verstärkten, durch IL-6 bedingte, STAT-3 Aktivierung und in der Folge zu einer chronisch entzündlichen Reaktion führt (Suzuki et al., 2001). Es wurde auch nachgewiesen, dass eine verstärkte Expression von SOCS-3 zur Suppression der Induktion einer Arthritis im Mausmodell führt (Shouda et al., 2001).

Des Weiteren soll SOCS-3 Einfluss auf den Signalweg von G-CSF haben. Mäuse mit einem Mangel an SOCS-3 in hämatopoetischen Zellen erscheinen lediglich bis zu einem Alter von ca. 17 Wochen normal und zeigen anschließend entzündliche Reaktionen (Kimura et al., 2004). SOCS-3 ist ebenfalls an der T-Zell-Differenzierung beteiligt. Hier zeigt es indes im Vergleich zu SOCS-1, ein entgegengesetztes Expressionsmuster. Im Unterschied zu SOCS-1 weist SOCS-3 eine selektive Expression in TH2- Zellen auf. Dies führte zu der Vermutung, SOCS-3 könnte eher bei der humoralen Immunantwort, also bei beispielsweise atopischen Erkrankungen, von Bedeutung sein (Übersicht bei Elliot & Johnston, 2004; Seki et al., 2003). *Abbildung 5* soll einen Überblick über die bislang bekannten SOCS-3-regulierten Signalwege geben.

Abbildung 5



Aus: Kubo et al., 2003

SOCS-3 reguliert entzündliche Prozesse, indem es IL-6-abhängige Zytokine hemmt. Durch Hemmung der IL-6- und IL-12-Wirkung, hemmt SOCS-3 die Ausreifung der TH1-Zellen und damit die Produktion von TNF- α und IFN- γ . In epithelialen Zellen und Fibroblasten inhibiert SOCS-3 den IL-6-gp130-STAT-3 Signalweg. Die Synthese von Chemokinen und anderen Zytokinen wird direkt oder indirekt von STAT-3 stimuliert. In Makrophagen wirkt STAT-3 jedoch anti- inflammatorisch.

1.3.2 CCAAT/enhancer-binding-protein β (C/EBP β)

Ebenso wie die TATA-Box ist die CCAAT-Box ein DNA-Element welches in einer großen Anzahl von humanen Promotoren zu finden ist (Bucher & Trifonov, 1988; Bucher 1990). CAAT- Boxen sind mögliche Bindungsstellen für eine Vielzahl von Proteinen die unterschiedliche Wirkung auf die Promotoraktivität haben.

bZIP Proteine wirken als Transkriptionsregulatoren in den aller meisten Eukaryonten und können in Gruppen unterteilt werden. Jedes der Gruppenmitglieder erkennt ein bestimmtes DNA- Motif (Übersicht bei Vinson et al., 2002). Die DNA- Bindungsdomäne besteht aus einer Basisregion am N- terminalen Ende, direkt neben einer variablen Sequenz am C-terminalen Ende, die an jeder siebten Position für Leuzin kodiert (Leuzinzipper). Der Leuzinzipper steuert die Homo- bzw. Heterodimerisierung der bZIP Proteine (Landschulz et al., 1988).

C/EBP β ist ein bZIP Transkriptionsfaktor, der als Homodimer an bestimmte für die Regulation von Genen zuständige Regionen der DNA binden kann. Das Protein kann aber auch Heterodimere mit verschiedenen anderen Proteinarten seiner Familie bilden (C/EBP α , C/EBP γ und C/EBP δ). Es ist ein wichtiger Faktor in der Regulation von Proteinen, welche ihrerseits wesentlich an Immun- bzw. Inflammationsreaktionen beteiligt sind. Daneben

wirken die C/EBPs ebenfalls über die Kopplung verschiedener extrazellulärer Prozesse mit intrazellulären, unter anderem auch bedeutend beim Wachstum und der Differenzierung von Zellen mit (Übersicht bei Vinson et al., 2002; Miller et al., 2003).

C/EBP β fungiert nicht ausschließlich als Transkriptionsfaktor, sondern findet wohl auch seine Funktion als Überlebensfaktor für spezielle Leberzellen (McKnight, 2001). Buck et al. zeigten im Jahre 2001 unter anderem, dass an Mäusen mit Mangel an C/EBP β , denen zum Beispiel mittels eines Hepatotoxins zuvor ein Schaden an der Leber zugefügt wurde, eine verstärkte Apoptose nachzuweisen ist (Buck et al., 2001). Die Einführung des C/EBP β - Gens mittels eines Adenovirus als Vektor führte zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebenszeit von Hepatozyten (Isoda et al., 2005). Hieraus ergeben sich Hoffnungen für therapeutische Ansätze, beispielsweise im Hinblick auf das akute Leberversagen. Interessanterweise besteht hier ein Zusammenhang zu COX-2, welches infolge Überexpression von C/EBP β verstärkt induziert wird. Folglich soll es zu einer Verbesserung des Überlebens im Speziellen von Leberzellen kommen, wovon angenommen wird, dass es eine Folge der Synthese von Prostaglandinen und der damit verbundenen Unterstützung des Zellzyklus ist. Die Zellen sollen dadurch resistenter gegenüber apoptotischem oder nekrotischem Zelltod werden (Übersicht bei Isoda et al., 2005). Allerdings bleibt dabei zu beachten, dass abgesehen von diesem Sonderfall, eine verstärkte COX-2-Expression und damit verbundene erhöhte Prostaglandinsynthese zur Förderung von inflammatorischen Prozessen führen kann. Dies soll später unter 4.4 näher diskutiert werden.

2 Methoden

Unter Verwendung eines transgenen Mausmodells wurde die Expression diverser Gene zwischen Kontrollen und SOD1- Mutanten verglichen. Es wurden drei verschiedene Methoden zum Nachweis veränderter Genexpression verwendet.

Zunächst hat man nach Anfertigung eines Microarray das Transkriptionsniveau von bestimmten Genen verifiziert. Um festzustellen in wie weit sich die jeweilige Expression der Gene auf die Translation überträgt, wurde anschließend das Ergebnis durch Western Blot überprüft. Daran wiederum schloss sich eine Immunhistochemie an, mit deren Hilfe die Lokalisation der entsprechenden Auffälligkeiten von Transkription und Translation sichtbar gemacht wurden.

In einem letzten Schritt wurde mit Hilfe einer primären Zellkultur von Gliazellen und anschließender Beimpfung mittels, zum einen Liquor von ALS- Patienten, und zum anderen Liquor von gesunden Kontrollprobanden, sowie daran anschließendem Western Blot, verifiziert, ob die zuvor gefundenen Ergebnisse funktionell induzier- und somit nachvollziehbar sind.

2.1 Verwendetes Tiermodell

Mäuse mit der transgenen humanen G93A (G1H/+) Mutation [B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur, Jackson Laboratories, ME] wurden mit weiblichen, genetisch nicht veränderten B&JL-Mäusen als Hintergrund gekreuzt (Jackson Laboratory). Die F1 Generation wurde mittels PCR der „Schwanz- DNA“ genotypisiert und in den Experimenten verwendet. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit der NIH- Richtlinie für den Schutz und die Verwendung von Labortieren durchgeführt. Als Kontrolltiere fungierten die genetisch nicht veränderten B&JL- Geschwister.

Die initiale Symptomatik war von einem anhaltenden Tremor geprägt. Der Verlauf war durch eine Progression von beginnenden Auffälligkeiten im Gangbild, über Paresen der Hinterläufe, bis hin zu einer annähernd kompletten Paralyse gekennzeichnet. Die erkrankten Mäuse wurden zu einem Zeitpunkt getötet, als sie nicht mehr in der Lage waren, sich innerhalb von 20 sec aufzurichten, nachdem sie zuvor in die Seitlage verbracht wurden. Dieser Zustand trat jeweils in einem Alter zwischen 120 - 140 d ein. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Tiere im Endstadium der Erkrankung. Zum Zwecke der Verlaufsbeurteilung wurden in weiteren Experimenten Tiere im Alter von 60 d und 90 d verwendet. Parallel wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten für jede transgene Maus eine gleichaltrige genetisch nicht veränderte B&JL- Kontrollmaus geopfert.

2.2 Gewebeentnahme und –bearbeitung

Zur Durchführung der Experimente mussten die Rückenmarksproben den Mäusen zunächst sachgemäß entnommen und für die jeweilige Methode nutzbar gemacht werden.

2.2.1 Gewinnung des Rückenmarks der Mäuse

Zunächst wurde den Mäusen intraperitoneal Ketamin verabreicht. Nachdem die Mäuse schliefen, wurden die Tiere auf dem Rücken liegend fixiert. Sobald ein Zugang zum offenen Herzen gegeben war, wurde die linke Herzkammer eröffnet und ein Perfusionsschlauch eingebracht. Die Maus wurde nun mit 5-6 ml eisgekühlter PBS- (für den WB) oder Paraformaldehyd- PBS- (für die IHC) Lösung perfundiert. Nach Eintritt des Herzstillstandes wurde sodann das Rückenmark frei präpariert entnommen und der entsprechenden Weiterverarbeitung zugeführt.

2.2.2 Humane Rückenmarksproben von Kontroll- und ALS- Patienten

Kleinere Rückenmarksproben von Kontrollpatienten konnten im Rahmen von Obduktionen gewonnen werden. Voraussetzung war jedoch das Fehlen einer neurologischen oder onkologischen Grunderkrankung.

Durch eine Patientenverfügung legitimiert, wurden die Gewebeproben von ALS- Patienten nach deren Ableben entnommen.

2.2.3 Bearbeitung des Gewebes für das Microarray- Experiment

Um die Durchführung des Microarray zu ermöglichen (s.u.), musste zunächst die RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert werden. Danach wurde die Ausbeute an RNA mittels Photometrie bestimmt. Zudem musste sichergestellt werden, dass die isolierte RNA nicht zerstört oder abgebaut wurde (z.B. durch Auftauen oder infolge einer zu langen Lagerung). Dafür wurde eine Gel- Elektrophorese vorgenommen, die das Verhältnis von 18S rRNA zu 28S RNA beschreibt (s.u.). Um einer möglichen DNA- Kontamination entgegen zu wirken und zu verhindern, dass während der Markierung und Hybridisierung der cDNA Wechselwirkungen entstehen, wurde zusätzlich die gewonnene Total- RNA mit DNase behandelt.

2.2.3.1 Isolierung der RNA

Für die Isolierung der RNA wurde das „Atlas™ Glass Total RNA Isolation Kit“ (BD Clontech Laboratories, Heidelberg, Best.-Nr. PT3539-1) verwendet. Dabei folgte das Protokoll der Vorgabe von Clontech Lab., Inc. Die verwendeten Chemikalien wurden weitgehend mit dem beschriebenen „Kit“ mitgeliefert.

Nachdem das Rückenmarksgewebe entnommen wurde und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt wurde, wurde das Gewebe in weiterhin gefrorenem Zustand in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde das Gewebe in einem sterilen und gekühlten Reagenzglas gewogen. Entsprechend der Menge/Masse des Gewebes wurden die Volumina der verwendeten Reagenzien dem vorgegebenen Protokoll folgend angepasst. Das allgemeine Protokoll lautet demnach wie folgt:

1. Zugabe der angepassten Menge „Denaturing solution“ (Mind. 1 ml pro 100 mg Gewebe)
2. Zur Homogenisierung, zerreiben der Gewebeproben beispielsweise mittels eines Stößels, auf Eis ($0 - 4\text{ °C}$) für 1 – 2 min.
3. Inkubieren der Probe für 5 – 10 min auf Eis.
4. Um etwaige Zellreste entfernen zu können, zunächst mittels Vortex durchmischen und anschließend bei 12000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugieren.
5. Den Überstand abpipettieren und wie unter 4. beschrieben erneut zentrifugieren.
6. Zugabe der angepassten Menge von gesättigtem Phenol.
7. Für 1 min mit dem Vortex durchmischen und anschließend für 5 min auf Eis inkubieren.
8. Zugabe der passenden Menge Chloroform.
9. Probe schütteln, sodann für 1 – 2 min mittels Vortex bearbeiten und wieder für 5 min auf Eis inkubieren.
10. Erneutes Zentrifugieren des Gemisches mit 12000 rpm bei 4 °C für 10 min.
11. Abpipettieren der oberen Schicht mit der RNA. **CAVE:** Kein Material der weißen Zwischenschicht oder der organischen unteren Schicht abpipettieren!
12. Wiederholen der Phenol- Chloroform- Extraktion sowie anschließend der Schritte 9. – 11.
13. Abpipettieren der oberen RNA- Schicht.
14. Einrühren der passenden Menge Isopropanol.
15. Durchmischen der Probe, danach 10 min auf Eis.
16. Zentrifugieren der Probe mit 12000 rpm für 5 min bei 4 °C . Schnelles und vorsichtiges Abpipettieren des Überstands.
17. Das Sediment lufttrocknen.
18. Lösen des Sediments in so viel RNase- freiem Wasser, dass eine Konzentration von 1 – 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA zu gewährleisten ist.

19. Das Wasser langsam einwirken lassen, anschließend gründliches auflösen des Sediments durch titrieren.
20. Aufbewahren der RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.3.2 Photometrie und Gel- Elektrophorese

A Photometrische Bestimmung der RNA- Ausbeute:

1. Bestimmung des Total- RNA Volumens
2. Umfüllen von 2 – 5 μl der Total- RNA Probe in ein 1,5 ml Reagenzglas.
3. Mit 400 μl OD- Pufferlösung anfüllen und mit einer Pipette mischen.
4. Übertragen des Gemisches in eine 1 ml Glas- Küvette mit 1 cm Durchmesser.
5. Photometrische Messung bei A_{260} und A_{280} , mit dem OD- Puffer als Referenz.
6. Berechnung der RNA- Ausbeute nach folgendem Muster:

RNA- Konstante für 1 cm Wegstrecke des Lichts: 1 A_{260} Einheit der RNA = 40 $\mu\text{g/ml}$

- Total- RNA $A_{260} = A_{260}$ der Messprobe x Verdünnungsfaktor
- Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) = Total- RNA A_{260} x 40 $\mu\text{g/ml}$
- Ausbeute (μg) = Volumen der Total- RNA x Konzentration

7. Berechnen des A_{260}/A_{280} Verhältnisses. Reine RNA weist eine Ratio von 1,9 – 2,1 auf.

B Gel- Elektrophorese:

Zunächst wurde nach folgendem Protokoll ein 1,2 % Agarose/Formaldehyd- Gel angefertigt:

1. Waschen des gesamten Equipments mit entionisiertem Wasser
2. Zugabe von 1,2 g Agarose in ein 250 ml Becherglas mit magnetischem Rührgerät.
3. Zugabe von 87,5 ml Wasser.
4. Mittels Mikrowelle für 2 min erwärmen.

Die folgenden Schritte wurden unter einem Abzug durchgeführt:

5. 2 min unter ständigem Rühren abkühlen lassen.
6. Währenddessen 5 ml des 10 x MOPS- Puffers zugeben und 7,5 ml von 12,3 M Formaldehyd dazu rühren.
7. Weiterrühren für 1 min und anschließendes ausgießen auf die Gelplatte.
8. Das Gel bei Raumtemperatur für mind. 1 h Aushärten lassen. Danach das Gel in 1 x MOPS- Puffer aufbewahren.

Anschließend wurden die RNA- Proben präpariert:

Das Laufreagenz wurde unmittelbar vor Durchführung der Elektrophorese angefertigt (für 6 – 10 Laufproben):

- 45,0 µl Formaldehyd
- 45,0 µl Formamid
- 5,0 µl 10 x MOPS- Puffer
- 3,5 µl EtBr (10 mg/ml)
- 1,5 µl 0,1 M EDTA (pH 7,7)
- 8,0 µl Bromophenol blue dye (in 50 % Glycerol)

1. Gründliches Vermischen von 10 - 15 µl des Laufreagens mit 1 µg Total- RNA.
2. Erwärmen des Gemisches für 10 - 15 min bei 70 °C.
3. Nach 1 min Lagerung auf Eis, laden der Proben auf die Bahnen.
4. Mit 4 - 5 V/cm (entspricht 50 - 60 V bei einer Mini-Gel Box) laufen lassen.

Zu erwartendes Ergebnis:

Laut Protokoll von Clontech Lab., Inc. sollte bei Säugetieren die Total- RNA zwei helle Banden bei 1,9 und 4,5 kb aufweisen (28S und 18S rRNA). Das Intensitätsverhältnis der Banden von 28S zu 18S rRNA sollte dabei um 1,5-2,5:1 liegen. Kleinere Verhältnisse geben ein Indiz für eine Degradation (Abbau) der RNA.

2.2.3.3 DNase- Behandlung

1. Inkubation des Probengemisches (siehe unter 7.2) bei 37 °C für 30 min im Brutschrank.
2. Zugabe von 20 µl „Termination Mix“ (0.1 M EDTA [pH 0.8]; 1 mg/ml Glycogen). Anschließend sorgfältiges Titrieren des Gemisches.
3. Zugabe von 100 µl gesättigtem Phenol und 60 µl Chloroform (CHCl₃), sodann mit dem Vortex gut Durchmischen.
4. Zentrifugieren mit 14000 rpm für 10 min um die Phasen zu trennen.
5. Vorsichtiges Umfüllen der obersten Flüssigkeitsschicht in ein neues 1.5 ml Reagenzglas.
6. Zugabe von 110 µl Chloroform zu der isolierten Flüssigkeitsschicht mit anschließendem gründlichem Vermischen mittels Vortex.
7. Zentrifugieren mit 14000 rpm für 10 min um die Phasen zu trennen.
8. Wiederholen des 5. Schrittes.
9. Zugabe von 10 µl der 2 M NaOAc- Lösung und 280 µl von 96 %- Ethanol.
10. Gemisch gründlich mit dem Vortex vermischen.
11. Zentrifugieren mit 14000 rpm für 20 min.
12. Überstand abpipettieren und das Sediment mit 100 µl 80 % Ethanol inkubieren.
13. Mit 14000 rpm für 10 min zentrifugieren.

14. Erneut Überstand abpipettieren und das Sediment für 10 min lufttrocknen lassen, um Reste des Ethanol verdampfen zu lassen.
15. Auflösen des Niederschlags in 250 µl RNase- freiem Wasser und dem weiteren Prozedere zuführen.

2.2.4 Bearbeitung des Gewebes für den Western Blot

Die für den Western Blot gewonnenen Rückenmarksproben wurden vorab bei – 80 °C aufbewahrt. Für die Extraktion der Proteine aus den gefrorenen Gewebeproben wurde eine Extraktionslösung angefertigt (eine Mischung aus RIPA-Puffer und Proteaseinhibitor), in welche man die Proben einlegte. Unter dem Mikroskop wurden die Proben mittels eines Skalpell in möglichst kleine Fragmente zerschnitten. Daran anschließend nutzte man verschiedenlumige Pipetten um die Gewebefragmente weiter zu titrieren. Nach diesem Schritt legte man das erhaltene Gemisch für 10 min auf Eis. Im Anschluss setzte man das Gemisch jeweils dreimal für fünf Sekunden einem Ultraschall (Labson 200, Firma Bender & Hobein, Neu-Ulm, Deutschland) aus. Zuletzt wurde die gelöste Probe für 15 min auf 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand an Ganzzelllysat abpipettiert und entweder sofort zur Proteinmengenbestimmung (siehe 2.6.1) und Weiterverarbeitung überführt oder in Aliquots von je 10µl bei -80° C aufbewahrt. Dabei war darauf zu achten nicht zu große Mengen Lysat für die Aliquotierung zu wählen, da ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen im Hinblick auf die Stabilität der Proteine zu vermeiden war.

2.2.5 Bearbeitung des Gewebes für die Immunhistochemie

Die aus den mit Paraformaldehyd perfundierten Mäusen gewonnenen Rückenmarksproben wurden nach der Entnahme für 8 h in Paraformaldehyd eingelegt und danach bei – 80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.3 Grundlagen und Technik des DNA Microarray

Microarrays nutzen generell DNA- Moleküle, welche an eine entsprechende DNA-Vorlage spezifisch zu binden oder hybridisieren vermögen. Indem man sich eines mit zahlreichen DNA-Proben versehenen Arrays bedient, ist man in einem einzigen Experiment dazu in der Lage, den Grad der Expression hunderter oder tausender von Genen in einer Zelle zu bestimmen. Allgemein gesprochen wird mit technischen Hilfsmitteln, wie Lasern und Computern, dabei die Menge an DNA, die an den einzelnen Spots des Arrays bindet, sehr präzise gemessen. Vereinfacht dargestellt ist die Menge der jeweils mit einer eigenen fluoreszierenden Farbe (meist rot und grün) markierte Proben- bzw. Kontroll- cDNA anhand der Leuchtintensität zu beurteilen. Dies ermöglicht nun die Genexpression von

unterschiedlichen Zelltypen oder Geweben, zum Beispiel dem Gewebe von erkrankten und gesunden Individuen, zu vergleichen.

Im Folgenden soll diese Technik genauer erläutert und auf die vorliegende Arbeit bezogen, beschrieben werden.

2.3.1 Der verwendete Typ des Microarray

Es existieren grundsätzlich drei verschiedene Typen von Microarrays. Zwei beziehen sich direkt auf das Genom und eine auf die Transkription, also mRNA- Synthese. Sie unterscheiden sich durch die darauf aufbrachte immobilisierte DNA (auf der Array-Platte befindliche DNA) und die Art der Information die aus ihnen abgeleitet wird.

Auf das Genom bezogen ist neben der CGH- Methode (Microarray Comparative Genomic Hybridization), bei der genetische Verluste oder Hinzugewinne überprüft werden, indem man große DNA-Stücke als Ziel nutzt und jeder Spot im Array eine bekannte Stelle auf einem Chromosom repräsentiert, noch die Mutationsanalyse zu nennen. Die immobilisierte DNA besteht dabei üblicherweise aus einem einzigen Gen, um Polymorphismen oder Mutationen in einer Gensequenz zu erkennen.

Zuletzt ist noch die in dieser vorliegenden Arbeit verwendete Microarray Expressionsanalyse zu nennen. Prinzipiell dient sie dem Zweck die Stärke der Expression von bestimmten Genen zu verdeutlichen, diese spezielle Methode soll, in ihrer vorliegend verwendeten Form, nun genauer besprochen und zunächst das grobe Vorgehen beschrieben werden.

Immobilisierte Oligonukleotide, welche von mRNA bekannter Gene ausgehend synthetisiert wurden, dienten dabei als Matrize auf den Arrays. Um eine Hybridisierung zu ermöglichen, musste die zu untersuchende Total- RNA (von Kontrollen oder Kranken) zuvor in cDNA übersetzt werden. Dies geschah enzymatisch mittels reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. 18064-022) und dem oligo-d(T_{15,20})-Primer, der das Angreifen der Transkriptase an den RNA- Strang ermöglicht hat, um den cDNA- Strang zu synthetisieren. Unter die für die Synthese der cDNA benötigten Nukleotide (dNTP) wurden, abhängig von der Art des zu untersuchenden Reagenz (Kontrolle vs. krankes Individuum), auch verschiedenfarbig (grün oder rot) fluoreszierend markierte Nukleotide (Cy₃/Cy₅- dCTP [Amersham Biosciences]) gemischt. Nach dem nächsten Schritt, der Hybridisierung von Oligonukleotiden und zu untersuchender cDNA, folgten ein Waschschrift und schließlich das Scannen und die Datenanalyse des Arrays. Die Laser- Detektion von Cyanin-3 (grün [Absorptionsmax.: 550 nm]) und Cyanin-5 (rot [Absorptionsmax.: 649 nm]) erfolgte von Seiten des GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, 85764 Neuherberg, mittels eines konfokalen Scanners mit zwei Lasern, die Cyaninfärbungen im Bereich der passenden

Wellenlänge anregen. Wenn nun ein Gen bei ALS, ALS- Modell oder in einem Krankheitsstadium der ALS überexprimiert wurde, konnte mehr cDNA des Probengewebes als der Kontrolle am Spot des zu beurteilenden Gens hybridisieren. Als Konsequenz fluoreszierte dieser Spot stärker in der Farbe der Probe als in der, der Kontrolle.

2.3.2 Allgemeines Protokoll

- Alle verwendeten Reagenzien werden steril filtriert.

A Direkte Markierung und Synthese der ss-cDNA aus der Total- RNA:

1. Vermischen von 17,5 µl Total- RNA in RNase- freiem Wasser (50-100 µg) mit 1,0 µl Oligo-d(T_{15,20})-Primer (1 µg/µl).
2. Bei 65 °C für 10 min inkubieren.
3. Bei Raumtemperatur für weitere 10 min inkubieren.
4. Für 2 min auf Eis abkühlen.
5. Zugabe der folgenden Substanzen zum Reaktionsgemisch:
 - 8,0 µl 5x RT- reaction buffer (Superscript II Kit, Invitrogen)
 - 4,0 µl dNTP- Master Mix
 - 4,0 µl 1 mM Cy₃-dCTP oder Cy₅-dCTP
 - 4,0 µl 0,1 M DTT (Superscript II Kit, Invitrogen)
 - 1,5 µl Superscript II (200U, Invitrogen)Das Gemisch vorsichtig schütteln.
6. Gemisch bei 39 °C für 2 h inkubieren.
7. Unterbrechung der Reaktion und Abbau der RNA durch Zugabe von 10 µl 1 M NaOH.
8. Inkubation des Gemisches bei 65 °C für 10 min.
9. Neutralisierung der Mischung durch Zugabe von 10 µl HCl und 200 µl TE- Puffer (pH 7,5).
10. Zum Entfernen der nicht benötigten und damit übrigen dNTPs, Marker und Primer, wird das „PCR Purification Kit (Qiagen)“ den Anweisungen entsprechend verwendet. Waschen der cDNA mit Nuklease- freiem Wasser
11. Die Konzentration der cDNA mit Hilfe einer Probe spectographisch bestimmen.
12. Zusammenführen von mindestens 750 ng - 1 µg von der jeweiligen cDNA (Cy₃ und Cy₅-markierte) in ein Reagenzglas
13. Die markierte und gereinigte cDNA bis beinahe zur vollkommenen Trockenheit verdampfen lassen.
14. Die markierte cDNA kann danach bis zu 2 h auf Eis und bis zu 2 d auf - 20 °C vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

- Da das fluoreszierende Färbemittel durch Licht zerstört wird, sollten sämtliche Arbeitsschritte der cDNA- Synthese unter Lichtschutz stattfinden.

B Hybridisierung

- Vor Durchführung des Experiments wird empfohlen die Handhabung des Gene Frame[®] einzuüben.
 1. Den Hybridisierungspuffer (Salz- basiert) für 10 min bei 42 °C erhitzen.
 2. Markierte cDNA im Hybridisierungspuffer (salt- based hybridization buffer) für 3 min bei 95 °C erhitzen.
 3. Das Hybridisierungsgemisch für max. 3 min auf Eis inkubieren
 4. Falls ein Präzipitat (Niederschlag) entstehen sollte, das Gemisch auf 42 °C erwärmen, bis dieses wieder verschwindet.
 5. Das Gemisch kurz zentrifugieren.
 6. Den mitgelieferten „Array- Finder“ zum auffinden der belegten Bereiche auf dem MWG- Array verwenden.
 7. Auf absolute Sauberkeit und Trockenheit der Oberfläche des Objektträgers achten, welcher mit dem Gene Frame[®] in Berührung kommt.
 8. Entnahme eines „Frames“ und auflegen auf das Microarray, dabei darauf achten, dass keine Lufteinschlüsse zwischen Array und anhaftender Seite des „Frames“ entstehen. Das „Frame“ vorsichtig festdrücken.
 9. Die Polyester- Folie auf der Rückseite des „Frames“ vorsichtig entfernen.
 10. Eine angemessene Menge des Hybridisierungsgemisches an einem Ende des „Frames“ aufpipettieren.
 11. An dem Ende an welchem das Gemisch aufpipettiert wurde, wird nun der Polyester „cover slip“ über das „Frame“ gelegt, anschließend wird gleichmäßiger Druck von dieser zur anderen Seite ausgeübt, sodass sich das Gemisch unter dem „Frame“ ausbreiten kann. Der Überschuss an Puffer wird dann ohne Lufteinschlüsse zu verursachen, zwischen „Frame“ und „cover slip“ quasi ausgepresst. „Frame“ und „cover slip“ haften weiter zusammen.
 12. Für 10 sec einen gleichmäßigen Druck auf den Objektträger ausüben. Danach abdecken des Gene Frames[®].
 13. Den Objektträger in eine feuchte Hybridisierungskammer geben.
 14. Die Hybridisierungskammer in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad geben und auf einem Rüttler bei mittlerer Stufe für 16 - 24 h inkubieren.
 15. Nach der Inkubation wird das Gene Frame[®] entfernt.

16. Sofortiger Beginn der Waschschritte

C Waschschritte

- Sämtliche Waschschritte werden bei 30 °C vollzogen.
 - Alle verwendeten Waschlösungen steril filtrieren.
1. Das hybridisierte Array in 200 ml vorgewärmten Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,1 % SDS) legen und für 5 min auf niedriger Stufe auf einem Rüttler waschen.
 2. Das Microarray im vorgewärmten Waschpuffer 2 (1x SSC) für 5 min waschen.
 3. Das Microarray im vorgewärmten Waschpuffer 3 (0,5x SSC) für 5 min waschen.
 4. Das Array bei Raumtemperatur für 2 min mit 500 g zentrifugieren, dabei die markierte Seite am Boden des Gefäßes zur Zentrifugierung platzieren.

D Scannen und Auswerten der Daten

- Die Auswertung der Daten wurde von Herrn Dr. Matthias Feldmann des GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, 85764 Neuherberg vorgenommen.

2.3.3 Design des Microarray Experiments

Für diese Arbeit wurden zur Gewinnung der Daten, einerseits Rückenmarksproben von Mäusen aus dem eingangs beschriebenen Mausmodell, andererseits Gewebeproben aus dem Rückenmark von verstorbenen ALS- Patienten verwendet. Diese wurden jeweils nach dem beschriebenen Prinzip geeigneten Kontrollen gegenübergestellt. Von speziellem Interesse waren hierbei allgemein inflammationsassoziierte Gene, d.h. Gene, die für Proteine kodieren, welche entweder indirekt regulierend oder direkt auf den Verlauf von Entzündungskaskaden einwirken. Diesbezüglich bot sich das von MWG Biotech hergestellte Inflammatory Array (Human/Mouse) an. Dieser Pool umfasste 136 Gene, welche in engem Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen stehen, darunter die für SOCS-1, -3 und CEBP β kodierenden.

2.4 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Die folgende **Tabelle 4** zeigt die verwendeten Primärantikörper, welche nach dem Ergebnis des Microarray gegen die zu untersuchenden Proteine gerichtet sind:

Tabelle 4

Primäre Antikörper						
Antikörper	Klonalität/ Spezies	Kreuzreaktion	Verdünnung (WB)	Verdünnung (IHC)	Verdünnung (ZK)	Quelle
SOCS-1	Poly/Kaninchen	Human/Maus	1:200	1:200	1:200	Abcam ab3691
SOCS-3	Poly/Kaninchen	Human/Ratte/Maus	1:500	1:200	---	Abcam ab3693
C/EBP β	Poly/Kaninchen	Human/Ratte/Maus	1:1000	1:200	1:1000	Santa Cruz sc-150
Actin	Mono/Maus	u.a. Human/Ratte/Maus	1:1000	---	1:1000	Sigma A 4700

Tabelle 5 gibt wiederum an, welche Sekundärantikörper jeweils bei der entsprechenden Methode verwendet wurden:

Tabelle 5

Sekundäre Antikörper			
Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle
WB: Anti-Rabbit Ig G	Peroxidase konjugiert/Ziege	1:1000	Sigma A 6667
IHC: Anti-Rabbit Ig G (H+L)	Biotynilated/Kaninchen	3:200	Vector Laboratories Q 0219
Actin: Anti-Maus Ig G	Peroxidase konjugiert/Kaninchen	1:1000	Sigma A 9044

2.5 Grundlagen und Technik des Western Blot

Beim Western Blot wurden die durch NuPAGE®SDS Laufpuffer aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose Membran (Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. LC2000) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert.

Als Blotkammer wurde die XCell *SureLock*™ Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. EI0001) verwendet.

Die Immundetektion erfolgte über mehrere Schritte. Um unspezifische Bindungen der nachfolgend verwendeten Antikörper zu verhindern, wurde die Membran zunächst mit den darauf befindlichen immobilisierten Proteinen in eine Blockinglösung gelegt. Anschließend wurden die immobilisierten Proteine mit einem primären, auf das zu überprüfende Protein gerichteten, Antikörper inkubiert. Der danach verwendete sekundäre Antikörper wiederum bindete an den primären und diente letztlich der Ermöglichung einer Chemilumineszenz.

In dieser Arbeit wurde ein von Amersham Biosciences produziertes System verwendet. Es ist eine lichtemittierende nicht-radioaktive Methode zur indirekten Bestimmung von spezifischen Antigenen mittels mit Meerrettich-Peroxidase markierten Antikörpern.

Lumineszenz ist als Emission von Licht definiert, die auf der Dissipation von Energie, von sich in einem energetisch angeregten Zustand befindlichen Substanzen herrührt. Eines der gängigsten Systeme ist hierbei die HRP/Hydrogenperoxid katalysierte Oxidation von Luminol im basischen Milieu. Unmittelbar nach der, durch die mit HRP besetzten sekundären Antikörper katalysierten Oxidation, befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand und fällt via Lichtaussendung sogleich in den energetischen Grundzustand zurück. Durch die Anwesenheit von beispielsweise Phenolen wird die Chemilumineszenz noch unterstützt. Damit kann die Lichtaussendung um das bis zu 1000fache verstärkt werden. Nach 5 bis 20 Minuten erreicht die Reaktion ihren Höhepunkt und verfällt anschließend wieder mit einer Halbwertszeit von annähernd 60 Minuten. Bei 428 nm liegt die Wellenlänge der maximalen Lichtemission.

2.5.1 Photometrische Proteinbestimmung

Um zu gewährleisten, dass in den für den Western Blot verwendeten Proben und Kontrollen die gleichen Mengen an Protein vorhanden waren, wurden die Ganzzelllysate mittels Photometrie auf ihren Proteingehalt hin untersucht.

Die Ganzzelllysate wurden zunächst mit der Färbelösung Roti[®]-Nanoquant versetzt. Anschließend wurden mit dem Photometer UltraspecIII (Pharmacia LKB) bei 450 bzw. 590 nm Messungen vorgenommen.

Zum Zwecke der Proteinmengenbestimmung bediente man sich eines Computerprogramms, welches über die erhaltenen Extinktionswerte (E) mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$; ϵ = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke) die Konzentration (c) und darüber schließlich die Menge an Protein im Ganzzelllysate errechnet.

Aus den Proteinmengen in den Zelllysaten ließ sich nun das Volumen an Lysat errechnen, welches für das Laufreagenz der Kontrolle und Probe benötigt wurde, um in beiden die gleiche Menge an Protein zu erhalten.

2.5.2 Allgemeines Protokoll

A Bestimmung der Proteinmenge im Zelllysate:

1. Ansetzen der Roti[®]-Nanoquant Färbelösung für Kontrolle und Probe.
2. Photometrische Bestimmung der Proteinmenge in Kontrolle und Probe.
3. Abstimmung der für das Laufreagenz verwendeten Menge an Kontroll- bzw. Probenproteinlösung.

B Elektrophorese der Kontrollen und Proben:

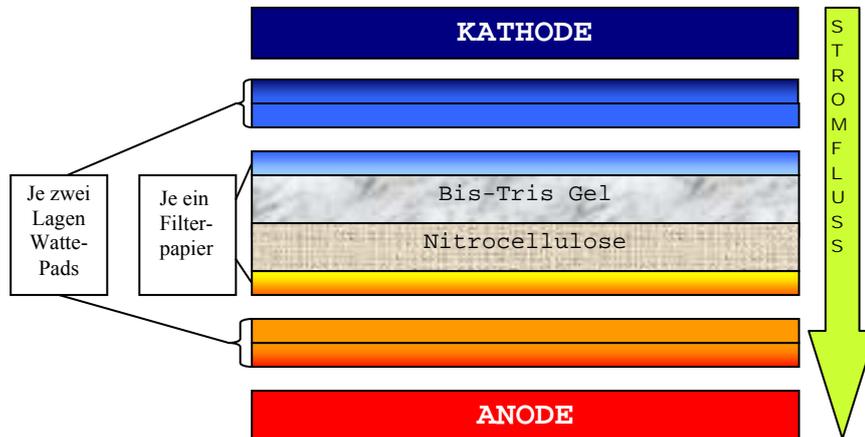
1. Ansetzen des Laufreagenz.
2. Ansetzen des NuPAGE[®]SDS Laufpuffer.
3. NuPAGE[®]Novex Bis-Tris Gel in Kammer installieren.
4. Einfüllen des Laufreagenz mit enthaltener Probe in das NuPAGE[®]Novex Bis-Tris Gel (zwischen 2,5 und 10 μ l pro Well).
5. Auffüllen der inneren und nach Überprüfung der Kammerdichte anschließend der äußeren Kammer mit 200 bzw. 600 ml NuPAGE[®]SDS Laufpuffer. Bei reduzierten Proben zusätzlich 500 μ l NuPAGE[®]Antioxidant in die innere Kammer.
6. Elektrophorese bei konstant 200 V und 125 mA über 50 Minuten starten.

C Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran (Blotting):

1. Ansetzen des NuPAGE[®]Transfer Puffer. Bei reduzierten Proben 1 ml von NuPAGE[®]Antioxidant zugeben.

2. Blotting- Watte für ca. 20 min in 700 ml Transferpuffer einlegen.
3. Nitrocellulose Membran inklusive Filterpapier ca. 10 min vor dem Ende der Elektrophorese ebenfalls in ausreichend Transferpuffer einlegen.
4. Aufbau des Gel/Membran-Blotting-Sandwich (**Abbildung 6**)

Abbildung 6



5. Platzierung des Sandwich im XCell™Blot Module (Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. EI9051). Dabei muss für einen erfolgreichen Transfer das Gel der Kathode (-) am nächsten sein.
6. Verschluss des XCell™Blot Module mittels der Anode (+).
7. Einsetzen des XCell™Blot Module in die Kammer.
8. Einfüllen des Transferpuffer in das XCell™Blot Module bis das Sandwich vollkommen mit Puffer überdeckt ist. Anschließend Dichte überprüfen.
9. Äußere Kammer mit 650 ml Transferpuffer füllen.
10. Kammer verschließen und Blotting bei konstant 30 V und 170 mA für eine Stunde starten.

D Immundetektion

2. Nach dem Blotting wird die Nitrocellulose Membran über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler in Blocking-Lösung eingelegt.
3. Waschen mit PBS-TWEEN® 20 Lösungs- und Waschpuffer 1 x 15 min; 2 x 5 min.
4. Primären Antikörper in entsprechenden Verdünnungen gelöst in Milchpulver- PBS-TWEEN- Lösung auf passende Bahnen des Blots gießen. Danach 60 min rütteln.
5. Waschen mit PBS-TWEEN® 20 Lösungs- und Waschpuffer 1 x 15 min; 2 x 5 min.
6. Sekundäre Antikörper in entsprechenden Verdünnungen gelöst in Milchpulver- PBS-TWEEN- Lösung auf passende Bahnen des Blots gießen. Danach 60 min rütteln.
7. Waschen mit PBS-TWEEN® 20 Lösungs- und Waschpuffer 1 x 15 min; 2 x 5 min.
8. Je 1,5 ml ECL Western Blotting Detection Reagent 1 und 2 zusammen gießen.

9. Nitrocellulose Membran mit ECL Western Blotting Detection Reagent übergießen und eine Minute einwirken lassen.
10. Ablaufen lassen und abtupfen des Reagents.
11. In Dunkelkammer Kodak[®] BioMax Light Film (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit Nitrocellulose Membran für gewünschte Dauer belichten.
12. Entwicklung des Röntgenbildes.

2.5.3 Design des Western Blot- Experiments

Insgesamt standen 12 Bahnen pro Western Blot zur Verfügung. Die jeweils erste und sechste Bahn wurde mit einem Marker beladen. Der MagicMark[™] XP Marker erlaubt eine direkte Visualisierung der Proteinstandardbanden in einem Blot, ohne dabei spezielle Detektionsreagenzien zu benötigen. Die Proteine dieses Markers wurden in *E. coli* exprimiert. Er markiert neun rekombinante Proteine im Bereich zwischen 20-220 kDa. Der Marker wurde ohne jede weitere Verdünnung mit je 2,5 µl pro Bahn geladen.

Bei jedem durchgeführten WB wurde zudem eine Bahn Kontroll- und eine Bahn Probenlysat mit monoklonalem Antikörper gegen Actin, einem so genannten „housekeeping“- Protein und damit in kranken und gesunden Individuen immer in gleicher Menge vorhandenem Protein beladen. Dies diente der Kontrolle um unterschiedliche Proteinmengen in Kontroll- und Probenreagenz anhand gleicher Bandenbreite auszuschließen.

Die Belichtungszeit und Verdünnung wurde je nach Protein und Antikörper variiert. Für Actin zum Beispiel, wurde eine Zeit von 1 min und eine Verdünnung von 1:1000 veranschlagt, da bei längerer Belichtungszeit der Röntgenfilm im Bereich der Actin- Bahnen aufgrund der auf die Verdünnung und Menge an Protein zurückzuführenden Schwärzung nicht mehr auswertbar gewesen wäre. Für die anderen Proteine, bzw. Antikörper wurde die entsprechend passende Belichtungszeit und Verdünnung durch Testung ermittelt.

Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde jeder WB abschließend dreimal unter identischen Bedingungen (Antikörperverdünnung, Belichtungszeit etc.) wiederholt. Die letztlich verwendeten Antikörperverdünnungen sind unter 2.4 beschrieben. Diese Ergebnisse waren dann auch maßgebend für die spätere Auswertung.

2.6 Grundlagen und Technik der Immunhistochemie

Zur Sichtbarmachung der Auffälligkeiten in der Genexpression an den einzelnen Gewebeschnitten bediente man sich der Immunhistochemie. Polyklonale Antikörper wurden dabei in einem Mehrschrittverfahren auf der Basis einer Antigen- Antikörperreaktion mit den Zielproteinen zur Reaktion gebracht.

Das Prinzip dieser Technik beruht darauf, dass das jeweilige Markierungsenzym am Ort seiner Bindung, die über ein Antikörpermolekül erfolgt ist, eine Reaktion katalysiert, durch die aus einem unsichtbaren, löslichen Substrat ein sichtbares, unlösliches Produkt entsteht. Die Immunreaktion wird über die Bildung dieses sichtbaren Produkts angezeigt. Häufig verwendete Enzyme sind die Meerrettich-Peroxidase, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, sowie die alkalische Phosphatase.

Für die Darstellung der zu untersuchenden Proteine in den Rückenmarksschnitten von SOD1- und Kontrollmäusen wurde das „Vectastain ABC-Kit“ verwendet, das nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) arbeitet. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Streptavidin vier Moleküle Biotin in einem festen Komplex zu binden. Der Ablauf dieser Immunenzymtechnik gliedert sich in drei Schritte. Zunächst wird der Gewebeschnitt mit einem unmarkiertem Primärantikörper inkubiert. Im zweiten Schritt wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Durch Zugabe von Meerrettich- Peroxidase konjugiertem Streptavidin, das an den Biotinrest des sekundären Antikörpers bindet, und dem Substrat DAB wird die Immunreaktion kenntlich gemacht.

2.6.1 Die Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die tiefgefrorenen Gewebestücke in Jung – Tissue Freezing Medium[®], einem Einbettmedium, auf Aluminiumgewebehalter aufgeblockt. Die so aufgeblockten Gewebeschnitte wurden in einem Gefriermikrotom (Kryostat CM3050, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) eingespannt.

Es wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 18 µm bei –20°C mit einem Messer des Typs S35 (Microtome Blade, Feather Safety Razor Co.) geschnitten und unverzüglich in auf 4°C temperierte 1x PBS- Lösung übertragen.

2.6.2 Beschichtung der Objektträger

Um für die gefärbten Gewebeschnitte eine bessere Haftung auf den Objektträgern zu ermöglichen und ein Abschwimmen der Schnitte zu vermeiden, wurden die Objektträger zunächst entsprechend beschichtet.

Primär wurden die Objektträger mit 70% Ethanol geputzt, mit entionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Danach wurden die Objektträger für 5 min mit 0,01%iger Poly-L-Lysin-Lösung (1:10 verdünnt mit entionisiertem Wasser) bei Raumtemperatur benetzt. Als nächstes wurde die Poly-L-Lysin- Lösung abpipettiert. Abschließend wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.6.3 Allgemeines Protokoll

A *Blocking*

1. Einlegen der Schnitte in 0,3% H₂O₂- Lösung für 30 min.
2. Waschen aller Schnitte mit 1 x PBS-Lösung 3 x 5 min.
3. Einlegen der Schnitte in 2% BSA- Blocking Lösung für 30 min.
4. Waschen aller Schnitte mit 1 x PBS-Lösung 3 x 5 min.

B *Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper*

1. Primären Antikörper in entsprechenden Verdünnungen gelöst in die einzelnen Wells füllen. Dabei ein Well (z.B. mit SOD1- Schnitt) zur Negativkontrolle lediglich mit 1 x PBS- Lösung füllen. Danach entweder über Nacht bei 4°C oder für 60 min bei Raumtemperatur inkubieren.
2. Waschen aller Schnitte mit 1 x PBS-Lösung 3 x 5 min.
3. Sekundären Antikörper in entsprechenden Verdünnungen gelöst in die einzelnen Wells füllen. Dabei ein zweites Well (diesmal mit einem Kontroll- Schnitt) lediglich mit 1 x PBS- Lösung zur Negativkontrolle füllen. Danach 30 min bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Waschen aller Schnitte mit 1 x PBS-Lösung 3 x 5 min.

C *Färbung und Fixierung der Schnitte*

1. Einlegen der Schnitte in ABC- Lösung, abgedeckt für 30 min.
2. Waschen aller Schnitte mit 1 x PBS-Lösung 3 x 5 min.
3. Einlegen der Schnitte in das Farbsubstrat für 5 min.
4. Waschen aller Schnitte mit 1 x PBS-Lösung 3 x 5 min.
5. Waschen der Schnitte mit entionisiertem Wasser für 3 min.
6. Übertragen der Schnitte auf beschichtete Objektträger.
7. Fixierung mittels Glyceringelatine.

2.6.4 Design des Immunhistochemie- Experiments

Für dieses Experiment wurde die „free-floating-Technik“ angewandt. Pro Durchgang eines Experiments wurden, wie unter 2.6.1 besprochen, je sechs Schnitte eines SOD1, bzw. Kontroll- Rückenmarks angefertigt. Für jedes Rückenmark wurde ein Gewebeschnitt als Negativkontrolle bearbeitet. Dabei hat man einen Schnitt des SOD1- Rückenmarks und einen Kontrollschnitt entweder nur mit dem primären oder nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. An diesen Schnitten war am Ende der Immunhistochemie keine Farbreaktion zu erwarten. Es wurden sowohl tierische, als auch humane Gewebeproben mit dazugehörigen Kontrollen untersucht.

Aufgrund der Tatsache, dass Lectin im ZNS spezifisch von Mikroglia exprimiert wird (Streit & Kreutzberg, 1987), erfolgte zusätzlich eine Lectin- Färbung an den Schnitten von SOD1- und Kontrolltieren. Dies diente der Markierung und damit Identifizierung von Mikroglia in den verwendeten Rückenmarksschnitten. Außerdem wurde eine für Astroglia spezifische Färbung von GFAP vorgenommen (Morrison & Vellis, 1983).

Lectin- Färbung:

Prinzipiell entspricht die Lectin- Färbung mit folgenden Ausnahmen dem Protokoll der in dieser Arbeit durchgeführten Immunhistochemie:

- Lectin- Färbelösung wird im Verhältnis 1:100 verdünnt und statt dem primären Antikörper mit dem Gewebeschnitt inkubiert.
- Der sekundäre Antikörper wird nicht verwendet.

GFAP- Färbung:

Die GFAP- Färbung wird entsprechend dem allgemeinen Protokoll der Immunhistochemie vorgenommen (Verdünnungsverhältnis von 1:100).

Zur weiteren Differenzierung sollte eine Darstellung von Motoneuronen im Bereich der Vorderhörner von Kontrollmäusen, 60 d-, 90 d- und Endstage SOD1 Mäusen erfolgen. Hierzu wurde eine Nissl- Färbung mittels Kresylviolett vorgenommen (Powers & Clark, 1955; Fernstrom, 1958).

Nissl- Färbung mit Kresylviolett

1. ANFERTIGEN DER KRESYLVIOLETT- LÖSUNG:

1.1 **0,05 g** Kresylviolett
werden in
10 ml **1 M** Essigsäure und
80 ml H₂O_{dest.}
unter rühren gelöst.

1.2 *Anschließend werden*

10 ml **1 M** Na-Acetat
hinzugegeben.
→ *Filtrieren*

2. DURCHFÜHRUNG DER KRESYLVIOLETT- FÄRBUNG

2.1 *Einlegen der Schnitte in folgende Lösungen:*

2 min Kresylviolett
90 sec **70 %** EtOH + Ethansäure/5 Tropfen auf 100 ml
30 sec **95 %** EtOH
2 x 1 min **100 %** EtOH
2 min Xylol
5 min Xylol

2.7 Grundlagen der angewandten Zellkulturtechnik

Eine Zellkultur ist die Kultivierung von Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus, d.h. *in vitro*.

In der vorliegenden Arbeit wurden Primärkulturen von Gliazellen angelegt, welche zuvor aus dem Rückenmark von sechs Tagen in einem Inkubator (Typ Comp. S 84, Firma Grumbach, Dipl.-Ing. W. Ehert GmbH, 79312 Emmendingen), bei 38,7 °C bebrüteten Hühnerembryonen gewonnen wurden. Es wurden die Zellen adhärent (auf einer Oberfläche) zum Wachsen gebracht. Das Gewebe wurde mit einer Protease (Trypsin) behandelt, welche die Proteine abbaut, die den Zellverband aufrechterhalten. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren, in einem entsprechenden Medium, konnten die Gliazellen zur Zellteilung angeregt werden. Nach einer Wachstumszeit von sieben Tagen und zweimaligem Austausch des Nährmediums, konnten die Kulturen mit einerseits ALS- Liquor und andererseits gesundem Kontrollliquor beimpft und anschließend dem WB zur Auswertung zugeführt werden.

2.7.1 Gewinnung der Liquorproben

Die für die Zellkultur verwendeten Kontroll- Liquores wurden von Patienten bei Punktionen zur diagnostischen Einordnung von nicht entzündlichen Neuropathien oder zum Ausschluss intrakranieller Blutungen abgenommen, sodass davon auszugehen war, dass diese Proben keine, für eine entzündliche Genese typischen, laborchemischen Veränderungen zeigten.

Von ALS- Patienten wurde der verwendete Liquor im Rahmen der erstdiagnostischen Einordnung entnommen.

Die Proben wurden in jedem einzelnen Fall nach Abgabe einer Einverständniserklärung des Patienten entnommen.

2.7.2 Gewinnung des Rückenmarks aus Hühnerembryonen

Es wurden pro Versuch insgesamt acht Eier (Geflügelzucht und Brüterei Ludwig Hölzl, Blütenstraße 22, 85368 Moosburg a. d. Isar) am unteren Pol kreisförmig eröffnet, der jeweilige Embryo entnommen und in sterile PBS- Lösung eingelegt. Danach folgte bei jedem Embryo dasselbe Protokoll zur Rückenmarksgewinnung.

Unter mikroskopischer Sicht wurden Eingeweide und Kopf abgetrennt. Sodann wurden die Embryonen in eine weitere Schale mit PBS- Lösung gegeben, auf dem Bauch liegend an den Gliedmaßen fixiert und das Rückenmark unter Zuhilfenahme von Pinzetten frei präpariert.

Die Rückenmarksproben wurden danach eisgekühlt in PBS-Glukose-Lösung (PBS-G) 0,6 % (w/v) gelegt und grob in ca. 1 mm messende Stücke zerkleinert. Dieses Rückenmarksgewebe

wurde in 1 ml PBS-Glukose-Lösung (0,6 %) mit 20 µl Trypsin vermischt und bei 37 °C für 15 min inkubiert.

2.7.3 Beschichtung der Zellkulturplatten

Zum Zwecke einer besseren Adhäsion der Zellen an den Untergrund wurden die Zellkulturplatten ca. 24 h vor Beginn des Experiments beschichtet. Dies erfolgte mittels Polyornithin (PORN). Unmittelbar vor Beginn des Experiments wurden ggf. Reste des PORN abpipettiert und die Platten mit destilliertem Wasser gespült.

2.7.4 Allgemeines Protokoll

A Isolierung der Gliazellen:

1. Zugabe von 800 µl Vollmedium, 100 µl BSA- PBS- EDTA- Lösung und 100 µl DNase zum Rückenmarksgewebe.
2. 3 min mit der Hand schütteln.
3. 2 min setzen lassen und anschließend Überstand abpipettieren und auf Eis legen.
4. 800 µl Vollmedium und 100 µl BSA- PBS- EDTA- Lösung über das Sediment und 3 - 5 x titrieren, ggf. häufiger wiederholen.
5. 2 min setzen lassen anschließend Überstand abpipettieren und zum vorangegangenen Überstand auf Eis legen.
6. Schritt 4. und 5. wiederholen, bis kein Sediment mehr vorhanden ist.
7. Vorsichtiges Aufpipettieren der auf Eis liegenden Überstände in ein Reagenzglas, angefüllt mit steriler BSA- PBS- EDTA- Lösung. Nicht vermischen!
8. Zentrifugieren des Überstands durch die BSA- Schicht hindurch, für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C.
9. Abgießen der BSA- Schicht, bis auf das Sediment, anschließend Aufpipettieren von 2 ml Vollmedium auf das Sediment.
10. Sediment- Vollmediumgemisch auf Eis abkühlen.
11. Vorsichtiges Aufpipettieren des gekühlten Gemisches auf HistodenzTM- Lösung (6,8 %). Nicht vermischen!
12. Zentrifugieren des Vollmediumgemisches durch die HistodenzTM- Schicht hindurch, für 15 min bei 1600 rpm und 4 °C.
13. Abgießen des Überstands, im Anschluss 2 ml Vollmedium darüber geben.
14. Zentrifugieren des Vollmediumgemisches entsprechend Schritt 9.

15. Abpipettieren des Überstands bis auf die unterste Sediment- Zellschicht (Gliazellschicht) und Zugabe von 800 µl MEM- Medium- 1 % Pen/Strep- Gemisch plus 200 µl FBS.
 16. Verteilen des Gemisches auf die vorgesehenen Wells.
 17. Medium- Zellgemische für ca. 7 d bei 37 °C in den Brutschrank.
 18. 2 x wöchentlich Wechsel des Nährmediums mit 900 µl MEM- Medium- 1 % Pen/Strep- Gemisch plus 100 µl FBS.
- Verwendete Lösungen: Alle Lösungen werden durch einen 2 µl Filter steril gereinigt.

B Beimpfen der Zellkultur mit Liquor:

1. Wechsel des Nährmediums mit 900 µl MEM- Medium- 1 % Pen/Strep- Gemisch **ohne** FBS.
2. Ggf. Zugabe von 100 µl der entsprechenden Liquorprobe (ALS- oder Kontrollliquor).
3. Inkubation für vorgegebene Zeitdauer (abhängig vom zu untersuchenden Protein).

C Isolierung der Proteine aus Zellen und Medium:

1. Abpipettieren des Medium- Liquor- Gemisches von den Zellkulturen.
 2. Zweimaliges Waschen der Zellkulturen mit 1000 µl D-PBS- Lösung pro Well.
 3. Inkubation der Zellkultur in den Wells mit je 100 µl Extraktionslösung (eine Mischung aus RIPA- Puffer und Proteaseinhibitor) auf Eis (4 – 8 °C) für 5 min.; entsprechend dem WB- Protokoll unter 2.2.
 4. Zugabe von 50 µl Complete[™]-Mini (Proteaseinhibitor) zu jeweils 300 µl Medium (Verhältnis 1:7) zum Schutz der Proteine.
 5. Mittels einer Pipettenspitze, abkratzen der restlichen Zellen vom Boden des Wells und anschließendes Abfüllen sowie entweder Einfrieren auf – 80 °C oder Zuführung zur Proteinmengenbestimmung.
- Für den WB des Mediums wird der unter 1. beschriebene Überstand verwendet.

D Photometrische Proteinbestimmung und Western Blot

- Das Protokoll folgt hierbei dem unter 2.5 beschriebenen Verfahren.

2.7.5 Design des Zellkultur-Experiments

Untersucht wurden wiederum das C/EBP β, SOCS-1 und -3 auf Proteinebene. Analysiert wurden die Proteinmengen, wie bereits vorangehend beschrieben, mittels WB. Diesem wurden nach Inkubation mit dem jeweiligen Liquor (ALS- und Kontroll- Liquor), Proben sowohl ausschließlich aus den Medien als auch aus den Gemischen der glialen Zellen zugeführt. Der Grund hierfür lag in der Verifikation, ob die nach Stimulation von den Glia

synthetisierten Proteine wie erwartet in den entsprechenden Mengenverhältnissen eher in den reinen Zellgemischen vorgefunden werden und demzufolge nicht sezerniert werden oder an das Medium abgegeben werden.

Pro zu untersuchendes Protein wurde je eine gliale Zellkultur nicht oder mit Kontroll- bzw. ALS- Liquor beimpft. Die Liquores der Kontrollen sollten Aufschluss darüber geben ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Proteinexpressionen unter dem Einfluss von „gesundem“ bzw. ALS- Liquor nachzuweisen ist. Die unbeimpften Zellkulturen sollten einen Eindruck von der von jeglichen Einflüssen befreiten basalen Proteinexpression geben. Ferner wurde das Medium der jeweiligen Zellkultur auf das Vorhandensein signifikanter Mengen der zu untersuchenden Proteine überprüft. Die Dauer der Beimpfung richtete sich nach den zu erwartenden Proteinmengen und variierte zwischen 30 min und 48 h. Sie basierte letztlich auf Erfahrungswerten, die aus mehrfachen Wiederholungen der Experimente gewonnen wurden. Im Übrigen entsprach das Design dem unter 2.5.3. beschriebenen Verfahren.

2.8 Statistische Auswertung

Insgesamt wurden für die proteinbiochemischen und immunhistochemischen Experimente je untersuchtes Protein, Gewebeproben von je drei verschiedenen Individuen (Mäuse) verwendet. Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse aus den durchgeführten WB herangezogen. Als Referenz diente die Bestimmung der Intensitätsunterschiede (Densitometrie) der unterschiedlichen zum Vergleich gestandenen Proteine.

Für alle statistischen Auswertungen wurde ein einheitliches Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt. Alle Ergebnisse mit Streuungswert sind als Durchschnitt \pm Standardabweichung angegeben. Bei Durchführung von Tests auf statistische Signifikanz ist der Vergleich der Irrtumswahrscheinlichkeit p mit der α - Fehlerwahrscheinlichkeit angegeben. Angegebene p -Werte wurden mit dem zweiseitigen Studenten t - Test bestimmt.

2.8.1 Bildanalyse des Western Blot

Für die Analyse des WB wurde die Software TINA (TINA Version 2.08e, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) verwendet. Mit dieser Software ist es möglich die Dichte der jeweiligen Banden zu bestimmen und für die statistische Auswertung vergleichend gegenüber zu stellen. Insbesondere wurden bei der Bearbeitung der Hintergrund und die Unschärfe der Bahnen herausgerechnet, sodass eine möglichst große Annäherung an die allein durch das Protein erreichte Dichte erlangt werden konnte. Die für die Dichtebestimmung relevante Fläche wurde für jedes Experiment neu definiert und für Kontrolle sowie Probe bei gleicher Größe (mm^2) belassen. Somit konnte neben der variierenden Dichte auch der

unterschiedlichen Bandenbreite, welche sich je nach Proteinmenge unterschiedlich ausprägte, Rechnung getragen werden. Demnach ergaben sich für die Proben und Kontrollen untergrundkorrigierte Intensitäts-/Dichtewerte pro Flächeneinheit (od-Bkg/mm²), welche zur Auswertung in den t-Test einfließen. Bei jeder Analyse wurde, wie oben bereits erwähnt, zusätzlich die Ausprägung der Actinbanden beachtet. Bei möglichen Dichteabweichungen/mm², floss der entsprechende Faktor des Dichteunterschieds in die Berechnung des jeweiligen Dichteunterschieds von einer Kontrolle zur passenden Probe mit ein.

2.8.2 Bildanalyse der Immunhistochemie

Die Bildanalyse der Immunhistochemie wurde an einem Lichtmikroskop Axioskop (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt, an das über eine CCD- Kamera (F10), Panasonic, Hamburg) ein Computer (Siemens/Nixdorf, München) angeschlossen war. Zur exakten Steuerung der Helligkeit des Mikroskops, war in die Stromversorgung des Mikroskops ein handelsübliches Voltmeter zwischengeschaltet.

3 Ergebnisse

Zusammenfassend ergab sich bei der Untersuchung der Expression von inflammationsassoziierten Genen im Rückenmark der Maus und des Menschen mittels Microarray eine gegensinnige Regulation von SOCS-1 und SOCS-3. Es fiel eine erhöhte Expression von SOCS-1 im Gegensatz zu einer verminderten Expression von SOCS-3 auf. Dies steht im Kontrast zu den bislang publizierten Arbeiten, die die SOCS- Expression in Modellen von ZNS- Erkrankungen untersuchten (s.u.). Der weiterhin untersuchte Transkriptionsfaktor C/EBP β zeigte eine Erhöhung der Expression im Rückenmark der Maus und des Menschen.

Bis auf C/EBP β waren diese Ergebnisse im Wesentlichen auch durch den WB zu bestätigen. C/EBP β war indes als Protein in seiner Menge, im Vergleich zu den Kontrollen, in SOD1-Mäusen und humanen Proben vermindert.

Alle drei Proteine fielen bei einzelnen Mäusen in ersten Untersuchungen im WB durch eine Expressionsveränderung im Krankheitsverlauf auf. Auch gibt es Hinweise für eine schrittweise Verstärkung der Expression von SOCS-1, bei 60 d und 90 d alten sowie SOD1-Mutanten im Endstadium. C/EBP β und SOCS-3 erschienen demgegenüber in ihrer Menge zunehmend reduziert. Dies würde einen Zusammenhang mit der Progression der Erkrankung nahe legen. Näheres hierzu unter 4.5.

In anschließenden immunhistochemischen Experimenten untersuchten wir die SOCS-Expression auf zellulärer Ebene. In gesunden Kontrolltieren fand sich in Neuronen, besonders auch in Motoneuronen, eine deutliche Expression von SOCS-1 mit einem nukleären Verteilungsmuster (*vgl. Abbildung 18*). In erkrankten Tieren war diese nukleäre Expression in überlebenden Motoneuronen nicht mehr zu detektieren. Der Hauptanteil der SOCS-1-Expression fand sich bei erkrankten Tieren in glialen Zellen (*vgl. Abbildung 18*).

Die immunhistochemischen Färbungen mit SOCS-3 zeigten im Kontrolltier vor allem eine neuronale Expression, die besonders auch in den Motoneuronen deutlich ausgeprägt war. Im SOD1 transgenen Tier war dieses motoneuronale Signal - ähnlich wie bei SOCS-1 - im Verlauf nicht mehr zu detektieren (*vgl. Abbildung 23*). Hingegen fand sich eine mäßige Signalerhöhung in glialen Zellen. Insgesamt fand sich im Immunoblot eine Signalverminderung im Vergleich zum Kontrolltier.

Bei C/EBP β fiel eine Änderung der Signalintensität, vor allem im Bereich der weißen Substanz auf.

Interessanterweise konnten wir mittels Nissl- Färbung des Rückenmarks von Kontrollmäusen, asymptomatischen 60 d und symptomatischen 90 d SOD1 transgenen Mäusen eine deutliche Verringerung der Motoneuronen erst bei 90 d aufzeigen (*vgl. Abbildung 25*).

Die beschriebenen Expressionsveränderungen waren also schon präsymptomatisch zu detektieren. Dies stützt die Vermutung die Expressionsveränderungen könnten Auswirkungen auf den Motoneuronuntergang haben (siehe 4.7)

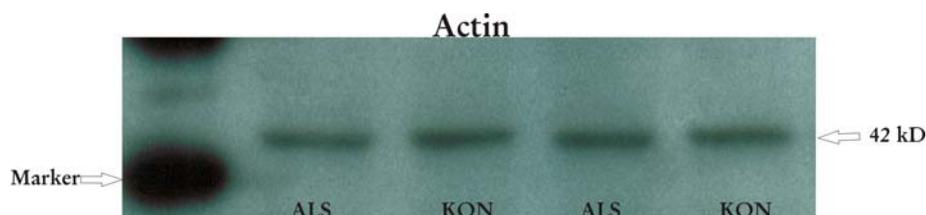
Im letzten Schritt wurde versucht, sämtliche vorgenannten Ergebnisse auch funktionell zu bestätigen, wobei hier nach unseren Versuchen keine Expressionsunterschiede infolge Liquorstimulation mit Liquor von ALS- Patienten verzeichnet werden konnten. Dies soll weiter unten näher erörtert werden. Nachfolgend werden zunächst die genannten Ergebnisse genauer analysiert und beschrieben.

3.1 Methodische Überlegungen

Bei den angewandten Methoden waren mehrfach technisch bedingte Beeinflussungen der Auswertbarkeit von Ergebnissen zu überwinden. So mussten vereinzelt Modifikationen gefunden werden um die Ergebnisse verifizierbar zu machen.

Grundsätzlich wurden, wie bereits im Methodenteil erwähnt, bei jedem neuen Aliquot einer Gewebeprobe mindestens zwei Bahnen zur Actindetektion, für Probe und Kontrolle, mitlaufen gelassen. Hierdurch konnten Proteinmengenunterschiede in den aliquotierten Gewebeproben erkannt und entsprechend bei der Auswertung berücksichtigt werden (*Abbildung 7*).

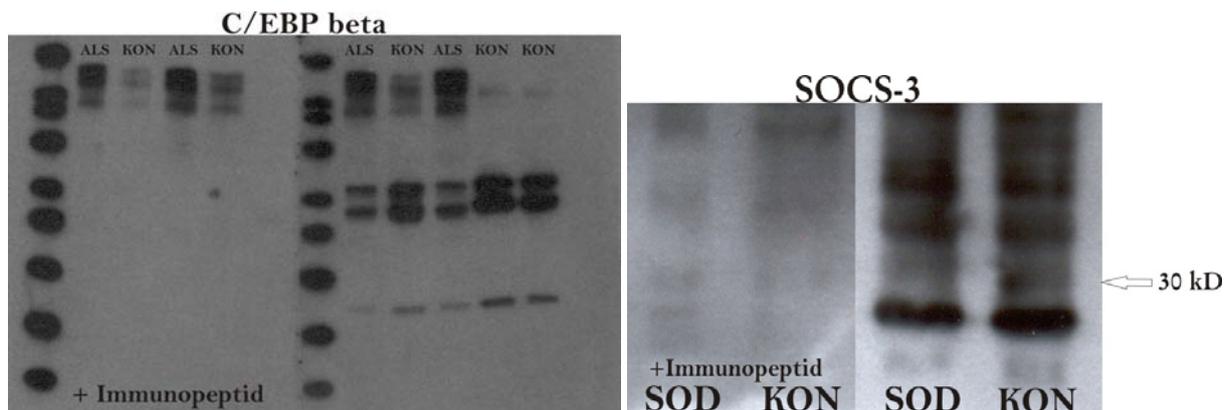
Abbildung 7



Da abgesehen vom Actin- AK alle verwendeten Antikörper polyklonalen Ursprungs waren, kam es im Rahmen der WB- Experimente zur Bildung von unspezifischen Banden auf dem Röntgenfilm. In einigen Fällen führte dies zu dem Problem, dass trotz Kenntnis über die Masse des jeweiligen Proteins, die spezifische Bande nicht mit letzter Sicherheit abzugrenzen war. So etwa bei der Untersuchung von C/EBP β und SOCS-3. Um unter den gegebenen Umständen dennoch eine Auswertung zu ermöglichen, bediente man sich immunogener Peptide (C/EBP β blocking peptide, Santa Cruz Biotechnology, Best.-Nr.: sc-150 X; SOCS3 peptide (206-225), Abcam Ltd. – Acris Antibodies, Best.-Nr.: ab16199). Mit deren Hilfe

wurden zuvor die Antikörper in den entsprechenden Spezies generiert. Wenn man diese sogenannten „Blocking- Peptide“ mit den verwendeten Antikörpern inkubiert, werden die Antikörper an selbige gebunden und damit verbraucht, sodass sie im Verlauf des WB nicht mehr für eine spezifische Bindung an das zu untersuchende Protein zur Verfügung stehen. Folglich verschwindet die spezifische Bande aus dem Röntgenbild und kann so, stellt man sie dem WB gegenüber, welcher ohne „Blocking- Peptid“ behandelt wurde, ermittelt werden (*Abbildung 8*).

Abbildung 8



Desgleichen folgte im Falle von SOCS-1, bei welchem kein „Blocking-Peptid“ zur Verfügung steht, die Bestätigung der Lokalisation der spezifischen Bande mit Hilfe eines Zelllysats (Jurkat Whole Cell Lysate, Santa Cruz Biotechnology Inc., Bestell-Nr. sc-2204), also einer Positivkontrolle. Dieses bildet im Bereich der Molekülmasse von SOCS-1 (24 kDa) eine Bande.

Insgesamt waren damit - hinsichtlich der Molekülmasse - etwaige Laufungenauigkeiten des bei jedem WB verwendeten Markers zu erfassen und einzuordnen.

In der Zellkultur wurde zum verwendeten Medium jeweils FBS zugegeben. Damit dieser Zusatz jedoch nicht im später durchgeführten WB stören konnte, indem zum Beispiel zusätzliche Schlieren oder unspezifische Banden generiert würden, wurde beim letzten Wechsel des Mediums darauf verzichtet und lediglich der jeweilige Liquor (ALS oder Kontrolle) hinzu gegeben.

3.2 Ergebnisse des Microarray

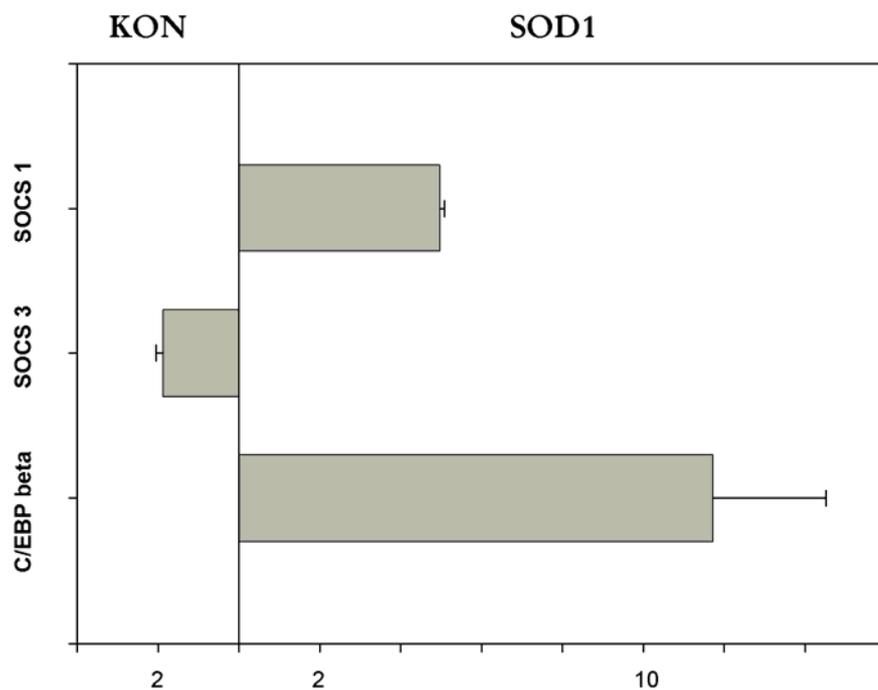
In *Tabelle 6* werden die Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels Microarray von SOCS-1/3 und C/EBP β dargestellt. Es sind jeweils die Faktoren der Veränderung von KON zu SOD1 aufgeführt, d.h. SOCS- 3 wird beispielsweise in den Kontroll- Mäusen im Mittel 1,87-

fach stärker exprimiert, als dies in den SOD1- Mutanten der Fall ist. In **Grafik 1** wird dies nochmals mittels Balkendiagramm illustriert.

Tabelle 6

x – fache Veränderung der Expression im Vergleich KON zu SOD1		
PROTEIN	KON	SOD1
SOCS- 1		4,8
		4,98
		5,03
		5,06
	MITTEL	
STANDARDABWEICHUNG		0,11644026
SOCS- 3	1,93	
	2,01	
	1,93	
	1,61	
	MITTEL	
STANDARDABWEICHUNG	0,17738846	
C/EBP β		7,83
		13,46
		11,61
		14
	MITTEL	
STANDARDABWEICHUNG		2,79106312

Grafik 1



Faktor der Expressionserhöhung im Vergleich von korrespondierenden Mäusen (KON- vs. SOD1- Maus)

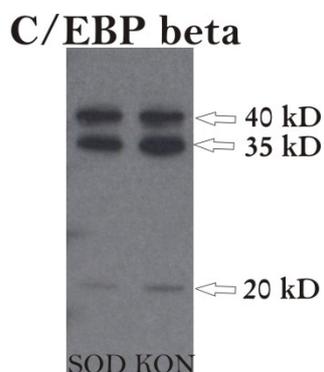
3.3 C/EBP β

Das Gen für C/EBP β kodiert mehrere Isoformen, welche durch alternative Aktivierung der Translation an verschiedenen AUG- Startseiten, und damit verkürzten transkriptionsaktivierenden Domänen, zustande kommen. Von den unterschiedlichen AUG- Startseiten ausgehend, bilden sich Isoformen des C/EBP β mit 40 kD, 35 kD, 20 kD und 8,5 kD (Xiong et al., 2001; Hsieh et al., 1998).

3.3.1 Das Translationsniveau

Abbildung 9 zeigt ein zur Auswertung herangezogenes Beispiel eines WB mit C/EBP β . Schon mit bloßem Auge ist der zugunsten der Kontrollen ausgeprägte Dichteunterschied der Banden aus der SOD- Mutation, bzw. Kontrollprobe zu erkennen.

Abbildung 9

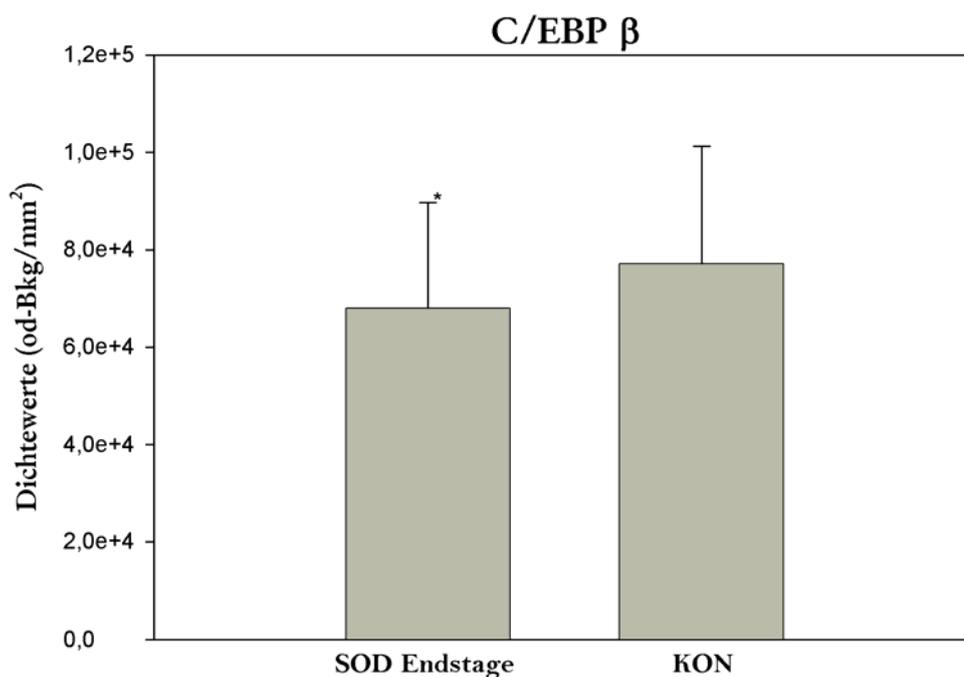


Im Rahmen der Datenanalyse der letztendlich verwendeten WB von Endstage- und Kontrollmäusen ergab sich für C/EBP β eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 2,14 \%$ ($67911 \text{ od-Bkg/mm}^2 \pm 21861$ vs. $77071 \text{ od-Bkg/mm}^2 \pm 24172$) und damit ein signifikantes Ergebnis (**Tabelle 7** – Ausgleichsfaktor bereits eingerechnet/ **Grafik 2**).

Tabelle 7

	SOD1 (od-Bkg/mm ²)	KON (od-Bkg/mm ²)	Ausgleichsfaktor (Actin)
C/EBP1701	42816	49392	KON x 1,06
C/EBP1301	82822	94029	KON x 1,06
C/EBP1101	78096	87791	KON x 1,06
SIGNIFIKANZ		0,02144778	

Grafik 2



Im Verlauf ist dabei im Vergleich einer 60 d und 90 d alten SOD1- Maus eine Verringerung der Synthese von C/EBP β zu erkennen (*Abbildung 10 / Tabelle 8*).

Abbildung 10

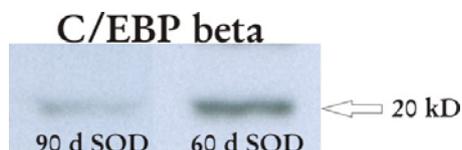


Tabelle 8

	SOD1 (od-Bkg/mm ²)	Ausgleichsfaktor (Actin)
C/EBP 60 d (20 + 35 + 40 kD Banden)	81824	60 d x 1,01
C/EBP 90 d (20 + 35 + 40 kD Banden)	57926	

Ebenso war es in ersten Versuchen möglich mit humanen Gewebeproben konforme Ergebnisse zu erzielen. C/EBP β erscheint hier in den ALS- Proben desgleichen in seiner Proteinmenge reduziert (*Abbildung 11 / Tabelle 9*). Die für diese (humanen) Proben bestimmten Actinmengen sind in *Abbildung 7* zu sehen.

Abbildung 11

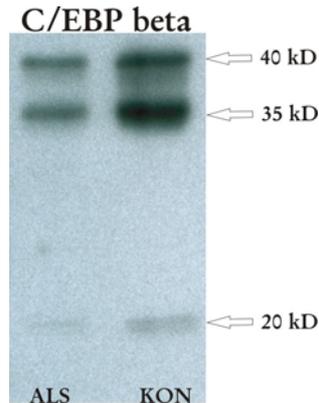


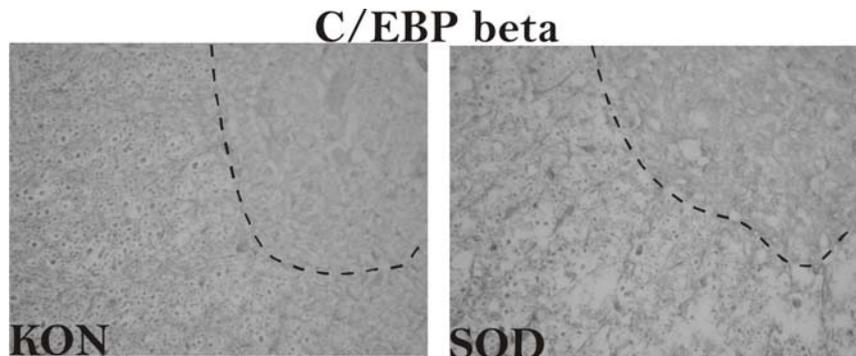
Tabelle 9

	ALS (od-Bkg/mm ²)	KON (od-Bkg/mm ²)
C/EBP (20 + 35 + 40 kD Banden)	19452	42670

3.3.2 Immunhistochemie

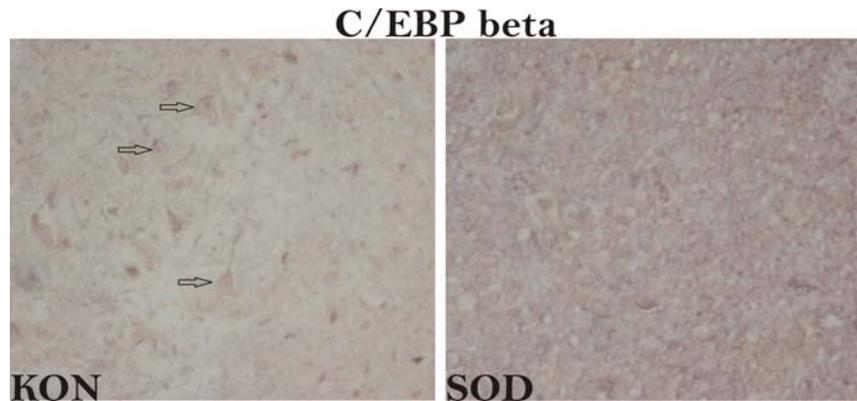
In der Immunhistochemie war für C/EBP β eine Variation der Anfärbung vornehmlich im Bereich der weißen Substanz zu erkennen (**Abbildung 12**). Oberhalb der gestrichelten Linie befindet sich ein Ausschnitt aus dem Vorderhorn des Rückenmarkschnitts einer entsprechenden Maus, unterhalb dieser Linie stellt sich die weiße Substanz dar.

Abbildung 12



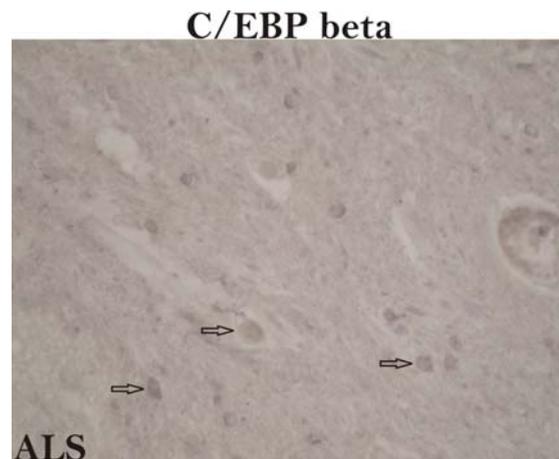
Vergrößerte Ausschnitte aus den Vorderhörnern von Kontroll- bzw. SOD1 transgenen Mäusen (**Abbildung 13**) zeigen im Vergleich ein zu erwartendes Verschwinden von Motoneuronen (Pfeile) sowie einen stärker angefärbten Hintergrund im Vorderhorn der SOD1- Maus.

Abbildung 13



In **Abbildung 14** zeigt sich eine deutliche Anreicherung von C/EBP β in nicht-neuronalen Zellen der Vorderhörner (Pfeile), in durch ALS geschädigten humanen Rückenmarksschnitten. Bei diesen Patienten ist eine augenfällige Dezimierung von Motoneuronen vorzufinden.

Abbildung 14



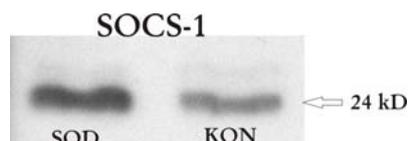
3.4 SOCS-1

Laut Datenblatt von Abcam Ltd. zeigt der SOCS-1 Antikörper im WB eines HEK 293 Zelllysats eine spezifische Bande auf Höhe von 24 kDa, was dem eigentlichen Molekulargewicht entspräche.

3.4.1 Das Translationsniveau

In **Abbildung 15** sind SOCS-1 Banden aus den Versuchsreihen mit Rückenmarksgewebe von Mäusen dargestellt. Es ist eine deutlich dichtere Bande für das Zelllysate einer SOD1-Maus zu erkennen.

Abbildung 15

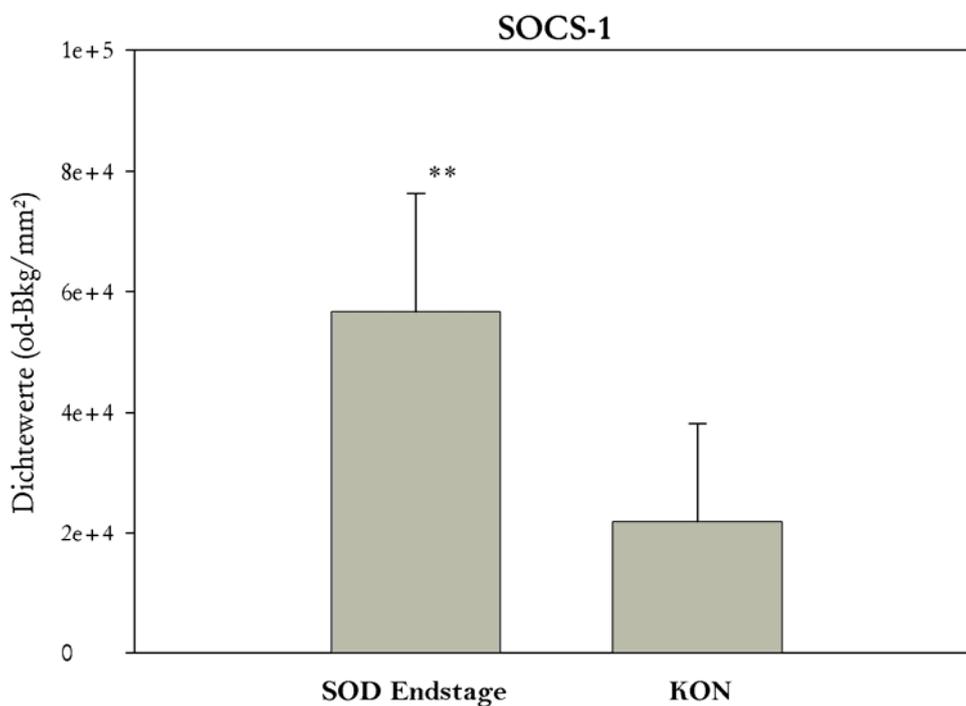


Die Datenanalyse der Western Blots (**Tabelle 10** – Ausgleichsfaktor bereits eingerechnet/**Grafik 3**) ergab demnach auch ein zu erwartendes Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,34 \%$ ($56617 \text{ od-Bkg/mm}^2 \pm 19715$ vs. $21950 \text{ od-Bkg/mm}^2 \pm 16266$).

Tabelle 10

	SOD1 (od-Bkg/mm ²)	KON (od-Bkg/mm ²)	Ausgleichsfaktor (Actin)
SOCS1-1	37800	6102	SOD x 1,08
SOCS1-2	54930	21144	SOD x 1,22
SOCS1-4	77121	38604	KON x 1,06
SIGNIFIKANZ		<u>0,0033686</u>	

Grafik 3



Für SOCS-1 ergibt sich im Vergleich einer 60 d alten SOD1 transgenen Maus mit einer 90 d alten Maus, nach Abzug des Hintergrunds, eine zu erwartende Erhöhung der Proteinmenge (**Abbildung 16 / Tabelle 11**).

Abbildung 16

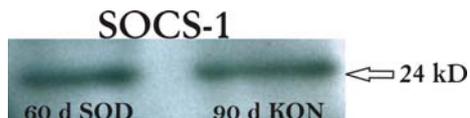


Tabelle 11

	SOD1 (od-Bkg/mm ²)	Ausgleichsfaktor (Actin)
SOCS-1 60 d	14576	60 d x 1,01
SOCS-1 90 d	26544	

SOCS-1 zeigte im humanen Rückenmarksgewebe dem Tierversuch entsprechende Synthesemengen (*Abbildung 17 / Tabelle 12*). Die für diese (humanen) Proben bestimmten Actinmengen sind in *Abbildung 7* zu sehen.

Abbildung 17

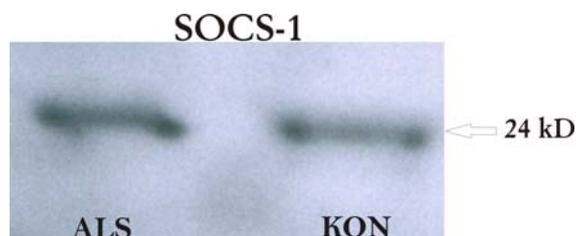


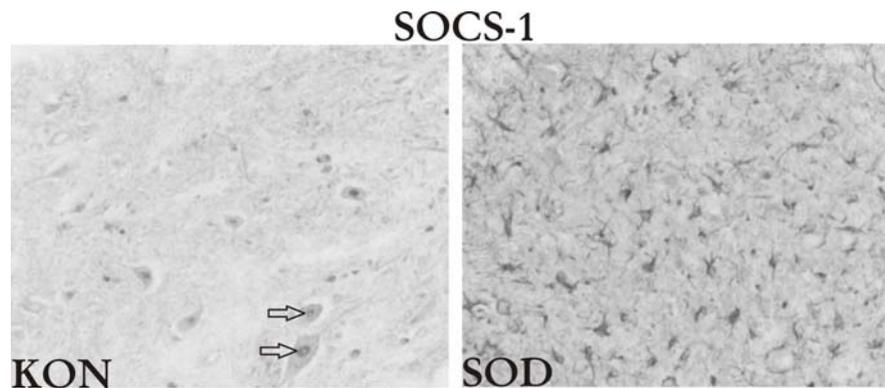
Tabelle 12

	ALS (od-Bkg/mm ²)	KON (od-Bkg/mm ²)
SOCS-1	22360	20815

3.4.2 Immunhistochemie

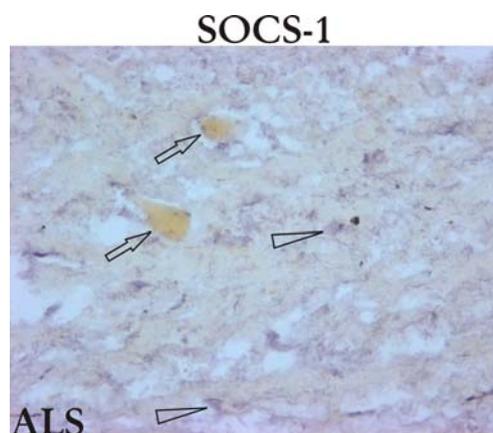
Abbildung 18 zeigt den Vergleich eines Ausschnitts aus einem Vorderhorn einer gesunden Kontrollmaus gegenüber einer SOD1 transgenen Maus. Eindeutig zu erkennen ist ein nukleäres Verteilungsbild von SOCS-1 in den Motoneuronen der Kontrollmaus (Pfeile). Im Vergleich hierzu findet sich in der SOD1 transgenen Maus eine auffallende Anfärbung aktivierter glialer Zellen. Deren Morphologie entspricht dem unter *1.2.8.1* beschriebenen Bild. Motoneurone sind in diesem Bild, bei einem Krankheitszustand im Endstadium, nicht mehr abzugrenzen.

Abbildung 18



Eine augenscheinliche Reaktion im Bereich glialer Strukturen ist auch in *Abbildung 19* zu erkennen (Pfeilspitzen). Hierbei handelt es sich um einen Vorderhornausschnitt aus dem Rückenmark eines ALS- Patienten. Auffallend sind außerdem die stark dezimierten Motoneurone. Durch das angereicherte Lipofuszin (McHolm et al., 1984), einem Abbaupigment aus dem Fettstoffwechsel, sind die verbliebenen Motoneurone eindeutig abzugrenzen (Pfeile).

Abbildung 19



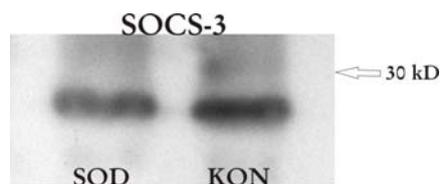
3.5 SOCS-3

Der SOCS-3 Antikörper weist laut Datenblatt im WB eines HEK 293 Zelllysats eine Bande bei 27 kDa auf.

3.5.1 Das Translationsniveau

In *Abbildung 20* ist ein Ausschnitt eines WB für SOCS-3 am Mausmodell dargestellt. Nach dem Augenschein mit höherer Dichte für das Protein SOCS-3 in einer Kontrollmaus.

Abbildung 20

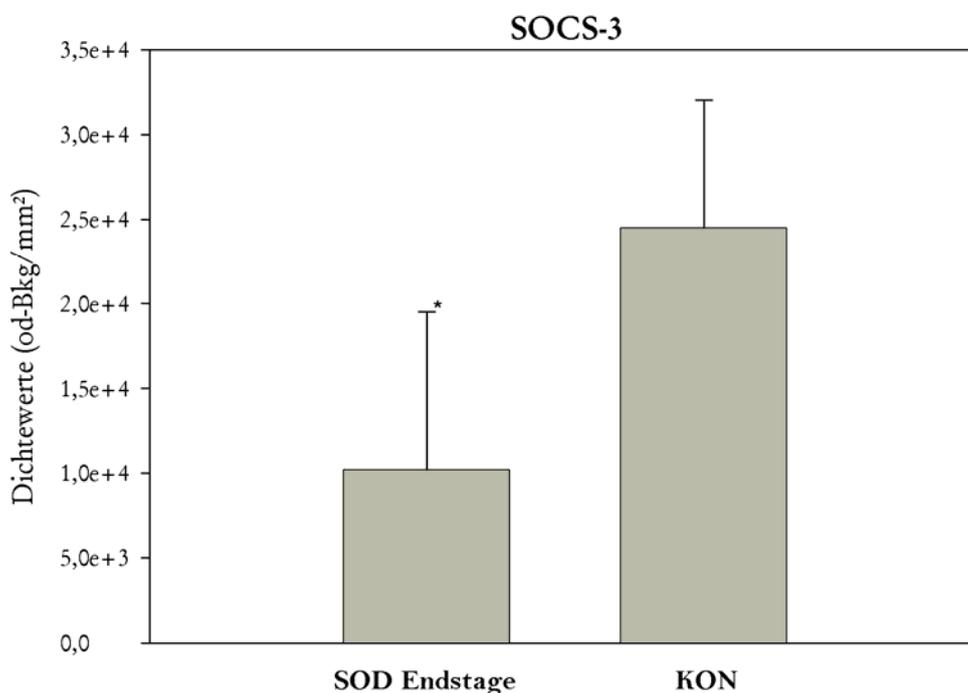


In diesem Fall ergab die Analyse der Versuchsergebnisse ebenfalls eine Bestätigung des Augenscheins mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,53 \%$ ($10211 \text{ od-Bkg/mm}^2 \pm 9292$ vs. $24491 \text{ od-Bkg/mm}^2 \pm 7538$) (*Tabelle 13* – Ausgleichsfaktor bereits eingerechnet/*Grafik 4*).

Tabelle 13

	SOD1 (od-Bkg/mm ²)	KON (od-Bkg/mm ²)	Ausgleichsfaktor (Actin)
SOCS3-1603	2615	18683	KON x 1,07
SOCS3-1904	7446	21780	KON x 1,10
SOCS3-2401	20571	33010	KON x 1,06
SIGNIFIKANZ		<u>0,00534207</u>	

Grafik 4



Im Verlauf der Erkrankung einer SOD1- Maus war für SOCS-3 eine geringere Proteinmenge zu verzeichnen (*Abbildung 21 / Tabelle 14*). Schwärzungen unterhalb der 27 kD Bande stellen unspezifische Bindungen des polyklonalen Antikörpers dar. Verifiziert nach dem unter 3.1 beschriebenen Prinzip.

Abbildung 21

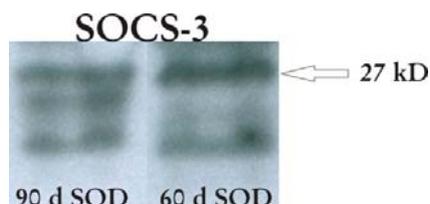


Tabelle 14

	SOD1 (od-Bkg/mm ²)	Ausgleichsfaktor (Actin)
SOCS-3 60 d	62267	60 d x 1,01
SOCS-3 90 d	45388	

Für SOCS-3 ergaben sich anhand des humanen Rückenmarksgewebes ebenfalls Anhaltspunkte für eine dem Tierversuch entsprechende Veränderung der Synthese (*Abbildung 22 / Tabelle 15*). Bemerkenswert ist in diesem Fall die offensichtliche Auslöschung des Signals im post- mortem Gewebe bei ALS. In der humanen Kontrollprobe ergibt sich ein vergleichsweise schwaches Signal, was aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus von SOCS-3 im gesunden Gewebe (siehe unter 4.3) nicht weiter verwundert. Die für diese (humanen) Proben bestimmten Actinmengen sind in *Abbildung 7* zu sehen.

Abbildung 22



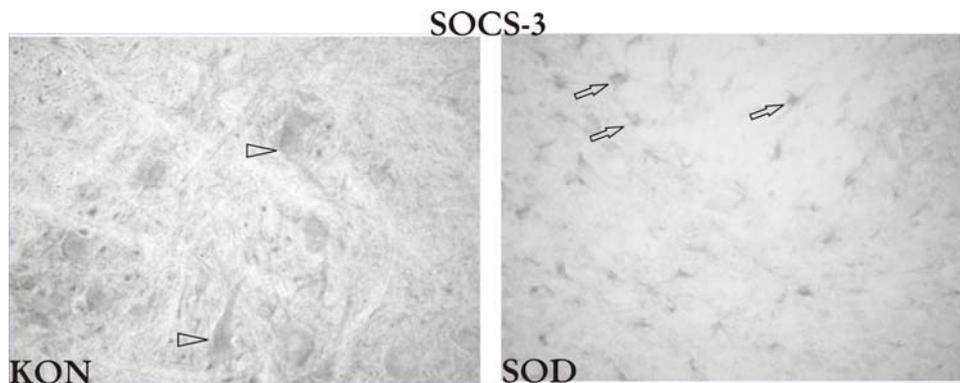
Tabelle 15

	ALS (od-Bkg/mm ²)	KON (od-Bkg/mm ²)
SOCS-3	2,3	44

3.5.2 Immunhistochemie

Auch für SOCS-3 ist eine auffallende Veränderung des Ortes der Synthese zu erkennen. SOCS-3 wird, wie in *Abbildung 23* zu sehen, in gesunden Kontrollmäusen in den Motoneuronen synthetisiert (Pfeilspitzen), wohingegen im Vorderhorn von SOD1 transgenen Mäusen (Endstage), eine deutliche Anreicherung von SOCS-3 in aktivierten glialen Zellen zu verzeichnen ist (Pfeile).

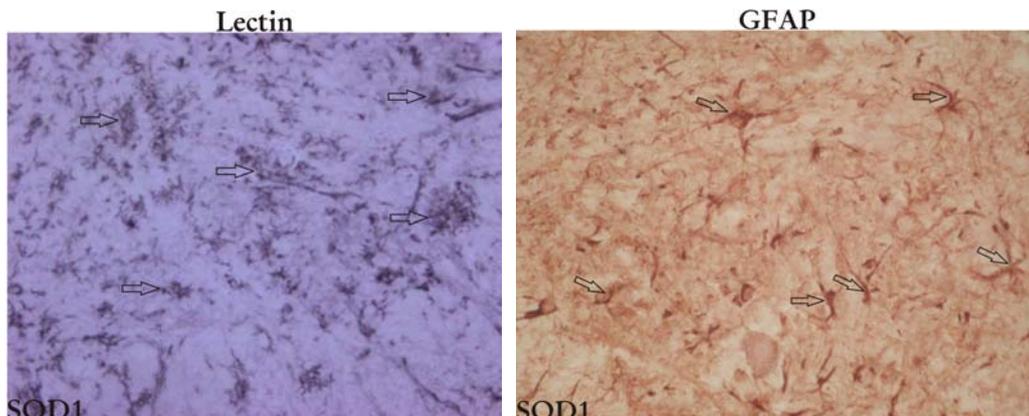
Abbildung 23



3.6 Die Färbung der glialen Zellen

In den folgenden Abbildungen sind, jeweils mit Pfeilen markiert, Färbungen von Astroglia (GFAP) und Mikroglia (Lectin), in den Vorderhörnern des Rückenmarks von SOD1-Endstage- Mäusen zu sehen (*Abbildung 24*). Anhand der Morphologie der hier gefärbten nachweislich glialen Zellen (siehe 2.6.4), wird die Lokalisation der zuvor gezeigten immunhistochemischen Darstellungen der untersuchten Proteine verdeutlicht.

Abbildung 24



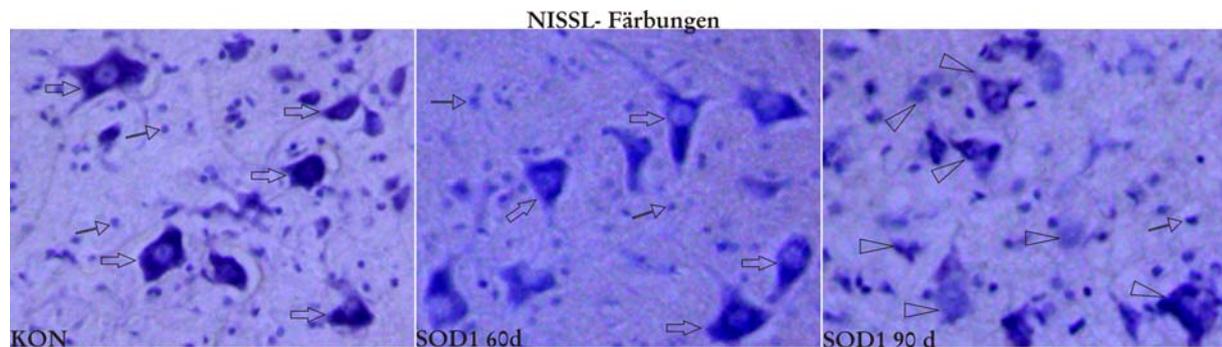
3.7 Die Nissl- Färbung

Im Folgenden (*Abbildung 25*) sind die unter 2.6.4 beschriebenen Nissl- Färbungen zu sehen. Hierbei zeigte sich in den untersuchten Mäusen eine eindeutige Zäsur im Vergleich zwischen präsymptomatischen 60 d alten SOD1- und symptomatischen 90 d alten SOD1- Mäusen. Motoneurone sind mit breiten Pfeilen, offensichtlich untergehende Motoneurone mit Pfeilspitzen (nur in 90 d SOD1- Mäusen) und gliale Zellen mit schmalen Pfeilen markiert. Vereinzelt finden sich auch in 90 d alten SOD1- Mutanten noch morphologisch unauffällige Motoneurone (hier nicht abgebildet).

Dies sind somit im zeitlichen Verlauf konkordante Beobachtungen zu den Veränderungen im Rahmen der Expression, von den in dieser Arbeit untersuchten Zytokinen. Offensichtlich

könnte der spezifische motoneuronale Untergang in engem Zusammenhang mit den zytochemischen und zellulären inflammatorischen Veränderungen bei der ALS stehen (näheres hierzu unter 4).

Abbildung 25

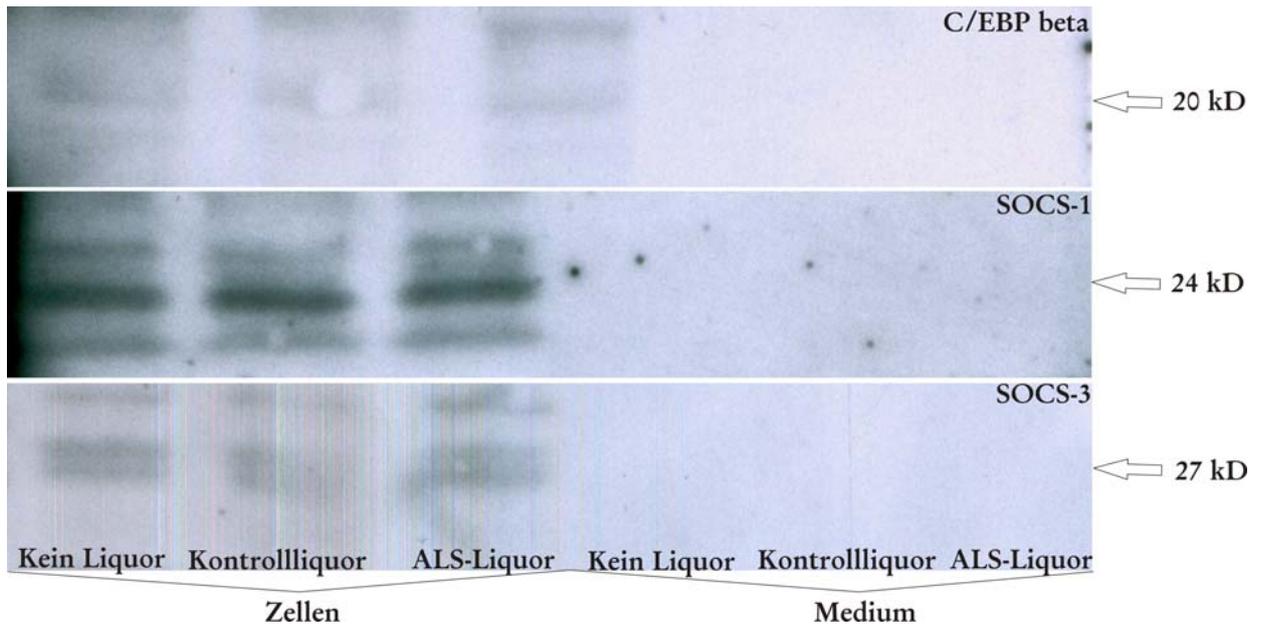


3.8 Das Zellkulturexperiment

In der Vergangenheit gelang es unserer Gruppe, bereits *in vitro* nachzuweisen, dass eine Stimulierung von neuronalen und glialen Zellkulturen mit ALS- Liquor zu einer glialen Proliferation und Astrogliose führt (Anneser et al., 2004). Außerdem konnten wir nachweisen, dass eine Blockade des metabotropen Glutamatrezeptors der Gruppe I *in vitro* einen protektiven Effekt auf den neuronalen Zelluntergang hat (Anneser et al., 2006). Somit ergab sich der Verdacht, mit dieser Methode ähnlich erfolgreiche Befunde im Hinblick auf SOCS-1/3 und C/EBP β erhalten zu können. Dieser Nachweis blieb jedoch insuffizient. Es war für keines der drei untersuchten Proteine möglich nach Stimulierung mit ALS- Liquor eine Erhöhung, respektive Verringerung der jeweiligen Proteinmenge nachzuweisen.

In **Abbildung 26** sind drei Ausschnitte aus den durchgeführten *in vitro* Experimenten dargestellt. Die drei Bahnen auf der linken Seite entsprechen dem Ergebnis eines Versuchs mit glialen Zellen, die rechten Bahnen wurden mit Proben aus dem jeweiligen Zellmedium beladen. Es zeigt sich ein Signal lediglich auf den mit Zellproben beladenen Bahnen, da die untersuchten Proteine intrazellulär zu erwarten sind. Allerdings ist auch deutlich zu erkennen, dass je nach Beimpfungsform der Kulturen, kein Mengenunterschied des Proteins zu verifizieren ist.

Abbildung 26



4 Diskussion

Die oben genannten Ergebnisse bieten verschiedene Anknüpfungsmöglichkeiten, um die Entzündungsprozesse während der Pathogenese von ALS zu interpretieren. Es finden sich Expressionserhöhungen sowohl von den Entzündungsprozess offensichtlich fördernden Faktoren, als auch von solchen, die diesen in einem möglichen Feedbackmechanismus blockieren könnten. Das Wissen um eine Expressionserhöhung zahlreicher Zyto- und Chemokine aus dem durchgeführten Microarray gab hierbei den initialen Hinweis welche Faktoren von besonderem Interesse sein könnten.

4.1 Bewertung und Interpretation des Microarray

Generell gilt es zu beachten, dass es sich bei der überwiegenden Anzahl der bisher bekannten Arrays, wie u.a. bei Jiang et al. 2005, Dangond et al. 2004, Ishigaki et al. 2002 oder Malaspina et al. 2001, nicht um solche handelt, die sich ausschließlich auf Parameter des Entzündungsgeschehens konzentrieren. Demzufolge spiegeln diese nur ein schmales Spektrum der möglicherweise in ein Inflammationsgeschehen verwickelten Gene mit ihren Transkriptionsprodukten wider. In der vorliegenden Arbeit war dies jedoch anders. Es wurden ausschließlich Gene untersucht, deren Transkriptionsprodukte gemeinhin mit Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht werden. Zumal nicht längst alle untersuchten Gene signifikant in ihrer Transkription verändert waren, überrascht es demnach nicht, dass beispielsweise bestimmte Zytokine in anderen Arbeiten als nicht signifikant verändert vorgefunden wurden. Darüber hinaus wurden die in unserem Fall diskutierten Proteine (SOCS-1, SOCS-3, C/EBP β) noch in keiner anderen Arbeit in diesem Zusammenhang untersucht.

Unlängst beschrieben Jiang et al. mittels mit LCM kombinierter Microarray- Technologie die Genexpression degenerierter Motoneurone aus dem Rückenmark von an SALS verstorbenen Patienten (Jiang et al., 2005). Im Rückenmark von ALS- Patienten sind die Motoneurone stark dezimiert und eine deutliche gliale Zellreaktion zu verzeichnen (siehe 1.2.8.1). Die LCM ermöglicht die Isolation einzelner Neurone aus neuronalem Gewebe, wobei die mRNA qualitativ gut erhalten bleibt (Luo et al., 1999; Ando et al., 2003). Zusätzlich wurden in diesem Experiment die real-time RT-PCR und die *in situ*- Hybridisierung angewandt, um eine Verstärkung der mRNAs zu erreichen, und dabei deren individuelle Mengenrelation zu wahren. Die Motoneurone zeigten dabei ein komplett verändertes Expressionsprofil. Es zeigten sich Auffälligkeiten für Gene, die mit dem Zytoskelett, axonalem Transport, mit Transkription und Oberflächenantigenen, bzw. Rezeptoren, mit dem Zelltod aber auch mit der Inhibition des Zelltods oder mit der Neuroprotektion assoziiert sind. Gene, die in

Zusammenhang mit Inflammationsprozessen stehen, zeigten hier indessen keine überzeugenden Veränderungen (Jiang et al., 2005).

In wiefern SOCS-1, SOCS-3 und C/EBP β in der Pathogenese der ALS und der bei ihr auftretenden MND eine besonders interessante Stellung einnehmen könnten, soll im Folgenden diskutiert werden.

4.2 SOCS-1, Inflammation und das ZNS

Die basale Expression von SOCS-1 ist im ZNS der Maus sehr niedrig, jedoch findet sich eine starke Induktion dieser Subtypen zum Beispiel in Modellen einer entzündlichen ZNS-Erkrankung (Maier et al., 2002). Ganz ähnlich verhält es sich im Übrigen mit SOCS-3 (siehe unter 4.3).

SOCS-1 gilt, wie unter 1.5.1.2 beschrieben, u.a. als negativer Regulator von IFN- γ und dieses wiederum als Induktor von CD40, unter anderem in Mikroglia. CD40, welches in reaktiven Gliazellen bei ALS wohl verstärkt exprimiert wird (Henkel et al., 2004), scheint dementsprechend einen Anteil an dem Verlust von Motoneuronen in FALS- Mäusen zu haben, indem es auch die Synthese von COX-2 verstärkt induziert (Okuno et al., 2004). Auf die Bedeutung von COX-2 bei der ALS wurde bereits unter 1.2.8.2 ausführlich eingegangen. Von CD40 war bisher schon bekannt, dass es durch die Interaktion mit seinem Liganden CD40L, welcher hauptsächlich von aktivierten CD4- positiven T-Lymphozyten exprimiert wird, entscheidenden Einfluss auf die zelluläre, respektive humorale Immunantwort hat. Eine mikrogliale Expression von CD40 wurde schon bei Multipler Sklerose, HIV-Enzephalitis oder Alzheimer nachgewiesen, was Ähnliches auch bei ALS vermuten lassen könnte (Übersicht bei Okuno et al., 2004).

Die Expression von SOCS-1 könnte - durch IL-6 induziert - zu einer Blockierung der Wirkung von IFN- γ , und damit schließlich zur Inhibierung der TH1-Ausreifung führen (Diehl et al., 2000). Zusammenfassend wird von SOCS-1 vermutet, dass es über eine Blockierung der durch IFN- γ vermittelten STAT-1 α Aktivierung zu einer Inhibierung der zytokininduzierten CD40- Expression kommt. Dies wiederum sollte unter anderem zu einer Verminderung der Differenzierung von TH1, der NF- kappa B- Aktivierung und der Sekretion von TNF- α und daraus folgender Hemmung der Inflammationsgenese führen (Wesemann et al., 2002). Wobei nach jetzigem Stand der Kenntnisse die letzteren Punkte in der Pathogenese der ALS die relevante Rolle spielen sollten.

4.3 SOCS-3, Inflammation und das ZNS

Die im Hinblick auf ein entzündliches Geschehen bislang erforschten Funktionen von SOCS-3 wurden bereits unter 1.5.1.3 erläutert. Bezogen auf seine mögliche Bedeutung für inflammatorische Pathologien im Bereich des ZNS, ist bisher jedoch äußerst wenig untersucht worden.

Von SOCS-3 ist schon länger seine Bedeutung als Regulator in der Inhibierung von neuroendokrinen Zytokinen und Hormonen bekannt (Auernhammer & Melmed, 2001).

Unter physiologischen Bedingungen soll SOCS-3, ähnlich wie SOCS-1 (s.o.), in niedrigen Dosen exprimiert werden (Wang & Campbell, 2002). Nichtsdestotrotz kann auch die SOCS-3- Genexpression im ZNS durch periphere Vermittlung von Zytokinen oder peripherer Immunstimulation mit unter anderem Lipopolysacchariden (Lebel et al., 2000), Leptin (Bjorbaek et al., 1998), IL-1 (Auernhammer et al., 1998), signifikant erhöht werden (Maier et al. 2002). Im Gegensatz hierzu bleiben CIS und SOCS-1 oder SOCS-2 durch periphere Stimuli unbeeinflusst (Übersicht bei Wang & Campbell, 2002).

Im Speziellen erlangte man bislang lediglich den Nachweis einer Erhöhung der SOCS-3- Genexpression infolge akuter cerebraler Ischämie, traumatischem Hirnschaden und Verletzungen des Rückenmarks (Übersicht bei Carmichael, 2003).

Angesichts dieser knappen Einsichten bleiben viele Fragen offen, die eine genauere Einordnung der Bedeutung von SOCS-3 im Bereich des ZNS zulassen würden. Nichtsdestotrotz wird anhand der bereits gefundenen Erkenntnisse aus anderen Erkrankungen und Entzündungsreaktionen weiter unten (siehe 4.7) versucht werden, Interpretationsmöglichkeiten der in dieser Arbeit gefundenen Auffälligkeiten vorzuschlagen.

4.4 CCAAT/enhancer-binding-protein β (C/EBP β) und die ALS?

Welche mögliche Relevanz hat das Zytokinregulator- Protein C/EBP β für die ALS? Orientierend kann hier ein Blick auf die bereits bekannten Funktionen des Proteins in der Pathogenese neurologischer und im Speziellen neurodegenerativer Erkrankungen helfen.

Dass COX-2 eine wichtige Rolle im Wesen der Pathogenese von ALS spielt wurde in dieser Arbeit schon wiederholt diskutiert (Almer et al., 2001; Maihofner et al., 2003). Neuere Arbeiten zeigen wie unter 1.3.2 besprochen, nunmehr auch eine Abhängigkeit der Induktion von COX-2 durch die Expression von C/EBP β . Hier wird C/EBP β aus der Sicht seiner Aufgabe als Transkriptionsfaktors beleuchtet. Eine Wechselwirkung von Salicylaten wie Celecoxib oder Acetylsalicylsäure (z.B. Aspirin[®]) mit C/EBP β soll zu einer Störung der Bindung von C/EBP β an seine Andockstelle im Bereich des Promotors/Verstärkers des

COX-2-Gens führen und damit die Vermittlung von entzündlichen Prozessen via Prostaglandinsynthese hemmen (Übersicht bei Wu, 2003b). Interessanterweise sollen laut Wu KK Salicylate neben der Prostaglandinsynthese auch iNOS inhibieren, was durchaus für die Pathogenese von ALS von Bedeutung sein könnte (*siehe 1.2.4.*) (Wu, 2003a). Die Störung der Bindung von C/EBP β an das COX-2-Motif soll auf einer durch Salicylate gehemmten Phosphorylierung von C/EBP β via RSK beruhen. Hier liegt dann unter Umständen auch ein möglicher Angriffspunkt für therapeutische Anstöße (Wu et al., 2005). C/EBP β bindet außerdem im IL-6-Gen an das IL-1- Bindungselement, ebenso wie an genregulierende Regionen von einigen Akut-Phase-Proteinen oder Genen für Zytokine (Akira et al., 1990).

Die Rolle von C/EBP β im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen ist bisher kaum erforscht. Die Induktion der Transkriptionsfaktoren C/EBP β und C/EBP δ durch proinflammatorische Zytokine in Astrozyten konnte im Jahr 2000 durch Cardinaux et al. nachgewiesen werden. Überprüft wurde unter anderem die Wirkung der Zytokine IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und IL-6. Es wurde eine mögliche Relevanz für die Inflammationsprozesse bei Alzheimer diskutiert (Cardinaux et al., 2000). Man schloss aus den Ergebnissen, C/EBP β könnte während bestimmten, innerhalb des ZNS ablaufenden Entzündungsprozessen, an der Expression von Akut-Phase-Proteinen durch Astrozyten beteiligt sein. Bisher dachte man, dass etwa ausschließlich die Aktivierung von NF- κ B- oder STAT- Proteinen durch proinflammatorische Zytokine zur Aktivierung von Akut-Phase-Proteinen ausreicht. Inzwischen weiß man jedoch, dass es einer Proteinsynthese und damit zusätzlichen Transkriptionsfaktoren bedarf. Die erstgenannten Proteine liegen vor ihrer Aktivierung durch Zytokine als inaktive Vorstufen in den Zellen vor, spielen also per se keine Rolle bei der Proteinsynthese. Es fehlte folglich ein Bindeglied, von dem man nun glaubt, es in den Transkriptionsfaktoren C/EBP β bzw. δ gefunden zu haben. Sie sollen zusammen mit NF- κ B und STAT die Induktion der Akut-Phase-Proteine steuern (Übersicht bei Cardinaux et al., 2000).

In einer reinen Microarray Expressionsanalyse von gad- Mäusen (einem Mausmodell für die Parkinsonerkrankung) fand man ebenfalls eine verstärkte Synthese des C/EBP β . Dort wird dem C/EBP β eine besondere regulatorische Bedeutung für die Fgf- Genfamilie, einer Familie mit Aufgaben im Bereich der Entwicklung und Funktion des ZNS, zugeschrieben (Bonin et al., 2002). In diesem Fall wird C/EBP β als positiver Regulator, im Gegensatz zu seinen Geschwistern (C/EBP γ und ζ) mit negativen Regulationsaufgaben, nicht ubiquitiniert und durch Proteasome abgebaut (Hattori et al., 2003). Diese Tatsache könnte auch hinsichtlich

einer möglichen inflammationsstützenden Wirkung bei der ALS, z.B. im Sinne einer Förderung der entzündlichen Reaktion durch fehlenden Abbau, von Bedeutung sein.

In einer Arbeit über die HIV- assoziierte Demenz war es möglich, einen positiven, d.h. verstärkenden Einfluss von C/EBP β auf die Transkription von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) in humanen Astrozyten zu verifizieren. Dabei soll dieser Effekt durch Zusammenwirkung von C/EBP β und dem so genannten HIV-1 Tat-Protein zustande kommen (Abraham et al., 2005). Auch bei der ALS war es möglich, erhöhte Werte für MCP-1 im Rückenmark nachzuweisen (Henkel et al., 2004). MCP-1 wird u.a. als Folge von Exzitotoxizität, hauptsächlich von Astrozyten aber auch von Neuronen und Mikroglia synthetisiert, und kann als Chemokin bekanntermaßen zu einer Exazerbation von entzündlichen Reaktionen führen (Übersicht bei Henkel et al., 2004).

Um noch eine, der ALS nahe stehende Erkrankung zu erwähnen, hat man bei einem Modell der X-chromosomal vererbten bulbospinalen Muskelatrophie Kennedy, einer weiteren Motoneuron- Erkrankung, ebenfalls eine Erhöhung der Expression des C/EBP β nachweisen können (Lieberman et al., 2002). Und auch hier war es bemerkenswerterweise so wie bei den zuvor genannten Untersuchungen, dass die Veränderung der Expression von C/EBP β zu den frühesten Ereignissen gehörte.

In jedem Fall gilt mittlerweile als gesichert, dass C/EBP β vielschichtige Aufgaben zu erfüllen hat. Und diese beschränken sich nicht nur auf seine Rolle als Transkriptionsfaktor. Noch ist man nicht in der Lage die unterschiedlichen Funktionen vollständig in Zusammenhang zu bringen oder ihre Tragweite entsprechend zu erfassen. Zusammenfassend gehören zu den in diesem Zusammenhang relevanten Zielgenen, die einer Regulation durch C/EBP β unterliegen, das MCP- 1, Cyclooxygenase 2 (COX2) und CD 14. Für alle genannten Genprodukte ist eine Erhöhung im ALS- Mausmodell, bzw. bei der menschlichen Erkrankung gezeigt worden (Nguyen et al., 2001; Henkel et al., 2004; Almer et al., 2001).

4.5 Von der Transkription zur Translation

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden in den ersten Schritten zunächst Nachweismethoden verwendet, die nicht unterscheiden, welcher Herkunft die untersuchten Proteine sind. Es handelte sich also um Gemische von Proteinen, die aus der Summe der im Rückenmark der untersuchten Mäuse befindlichen Zellen und Zellstrukturen zusammengesetzt waren. Darüber hinaus machte der erste Schritt – Microarray – lediglich Aussagen über die Verhältnisse auf Transkriptionsebene. Hier war aber insbesondere von Interesse zu demonstrieren, ob und wenn ja, in welchen Strukturen im Speziellen die auf Transkriptionsebene gefundenen Ergebnisse auf die Translation umgesetzt werden. Auf der Basis des bei ALS nachgewiesenen

entzündlichen Geschehens wurde zumindest damit gerechnet, eine signifikant veränderte Expression der überprüften Proteine, in den für die Vermittlung des Entzündungsgeschehens im ZNS verantwortlichen Mikroglia vorzufinden.

SOCS-1 wurde in seiner Expression als erhöht nachgewiesen, was sich gemäß des WB dann auch auf Proteinebene bestätigen lies. Dies entspricht folglich der Erwartung. Wie oben besprochen sind die verschiedenen SOCS- Proteine wesentlich an der Inhibierung von Zytokinvermittlungen beteiligt. Es wäre nahe liegend, dass SOCS-1 als Folge der Aktivierung von beispielsweise Mikroglia als protektiver Faktor verstärkt synthetisiert werden könnte.

SOCS-3 wiederum stellte sich in der Transkription verringert dar, was durch den durchgeführten WB und die passende Immunhistochemie bestätigt werden konnte. Dies mag zunächst verwundern, dennoch sollen weiter unten (siehe 4.7) mögliche Erklärungen diskutiert werden. Von Bedeutung war in diesem Fall jedoch insbesondere die Tatsache, dass SOCS-3 im Verlauf (60 d; 90 d) der Erkrankung bei Mäusen, eine Expressionsveränderung in der Hinsicht durchmacht, als dass die Expression in den verbliebenen Motoneuronen verschwindet und in den glialen Strukturen entsprechend verstärkt auftritt (siehe 3.4.3) aber insgesamt in seiner Menge reduziert wird (siehe 3.4.2). Näheres hierzu unter 4.7.

Das Protein C/EBP β war genauso wie SOCS-1 im Microarray in seiner Expression erhöht. Diese Erkenntnis bestätigt zunächst die unter 4.4 diskutierten bisher schon bekannten Erkenntnisse über die Funktion des Proteins. Jedoch war es uns nicht möglich die gefundenen Auffälligkeiten im WB zu bestätigen. Hier zeigte sich C/EBP β , nicht nur im Mausmodell, sondern auch in humanen Proben in seiner Menge als Protein, im Vergleich zu den Kontrollen, reduziert. Darüber hinaus ergab sich in ersten Untersuchungen, vergleichbar mit den Befunden bei SOCS-3, der Verdacht auf eine Verringerung der Proteinmenge im Verlauf (60 d; 90 d) der Erkrankung. Eine Inhibierung der Translation des C/EBP β - Gens durch einen so genannten „upstream open reading frame“ (uORF) ist bereits vorbeschrieben (Lincoln et al., 1998). Bei der ALS womöglich als Schutzreaktion hinsichtlich der bekannten pro-inflammatorischen Wirkung von C/EBP β ? Wenn dies hier der Fall sein sollte, bliebe die Frage offen, auf welche Art eine solche Reaktion vermittelt werden könnte.

In der nachgeschalteten Immunhistochemie war darüber hinaus überraschenderweise eine deutliche Reduzierung der Anfärbung in Bereichen der weißen Substanz von SOD1 transgenen Mäusen zu registrieren. Hier hätten wir eher in den Vorderhörnern, speziell im Bereich glialer Strukturen mit Veränderungen gerechnet. Wie unter 4.4. diskutiert, fungiert C/EBP β als Transkriptionsfaktor bei entzündlichen Vorgängen und würde somit, angesichts der Entzündungsreaktion bei ALS, dieser Rolle nicht gerecht werden. Ob dies nun

letztendlich Auswirkungen auf die Pathogenese der ALS hat, bleibt fraglich, zumal wie oben beschrieben, C/EBP als Transkriptionsfaktor vielmehr inflammationsfördernd wirkt und eine Mengenreduzierung sich damit eher positiv auf die Pathogenese auswirken sollte. Wieso also im vorliegenden Fall seine Synthese, d.h. die Translation, nach offensichtlich verstärkter Transkription, gestört ist, ist damit zum jetzigen Zeitpunkt nicht suffizient zu beantworten.

Mittels angewandter Immunhistochemie war es aber möglich jeweils eine eindeutige Veränderung hinsichtlich des Ortes der Synthese jedes einzelnen der besprochenen Proteine, in der Maus und im Menschen, nachzuweisen. Für SOCS-1 und SOCS-3 war insbesondere abzuleiten, dass sich deren Synthese im Verlauf in gliale Strukturen verlagert. In gesunden Mäusen scheint die Synthese auf eher niedrigem Niveau von den Neuronen auszugehen (nukleäres Verteilungsmuster). Gerade aus diesen Befunden heraus drängt sich die Bedeutung der Zytokinvermittlung für die Pathogenese der ALS auf (siehe unter 3).

4.6 Die Zellkultur

Als *in vitro* Methode wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente in Form von Zellkulturen angewandt. Zielsetzung war das funktionelle Ansprechen von glialen Zellen und Motoneuronen auf die Inkubation mit einerseits ALS- Liquor und andererseits Kontroll-Liquor zu prüfen. Es war also von Interesse, ob nach einer solchen Inkubation der Zellen mit Liquor, eine den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche entsprechende Veränderung der untersuchten Proteine und ihrer Mengen zu verifizieren war. Wie unter 3.5 dargelegt, war uns dies selbst nach mehrfachen Modifikationen der Methodik nicht möglich, womit die deskriptiv gefundenen Auffälligkeiten bislang funktionell nicht untermauert werden konnten.

4.7 Mögliche Wechselwirkungen und ihre Relevanz für die ALS

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass SOCS-1, SOCS-3 und C/EBP β im SOD1- Mausmodell und im humanen *post- mortem* Rückenmarksgewebe von ALS-Patienten, in ihrer Expression auffällig verändert sind. Insbesondere wurde dabei deutlich, dass diese Veränderungen, mit Ausnahme von C/EBP β , letztlich bis auf Proteinebene nachzuweisen sind, und damit zu proteinphysiologischen Effekten führen können. Wie vorangehend erläutert, sind diese Proteine bereits bei anderen Erkrankungen im Rahmen von entzündlichen Vorgängen, auch im ZNS, als bedeutende Mediatoren identifiziert, mögliche Konsequenzen diskutiert und entsprechende Hypothesen aufgestellt worden. Mit dem in dieser Arbeit geführten Nachweis, dass alle hier untersuchten Proteine im SOD1- Mausmodell und dem Anschein nach auch in humanen Proben, von glialen Strukturen in ihrer Menge auffallend verändert synthetisiert werden, ist der Bogen zur ALS und den bei ihr, unter

anderem im Bereich der Vorderhörner des Rückenmarks ablaufenden entzündlichen Prozessen geschlagen.

Um einzuordnen, welchen Einfluss diese Mediatoren wirklich auf den entzündlichen Teil der Pathogenese von ALS haben könnten, muss man sich die bisher gefundenen Zusammenhänge klar machen und ihre Relevanz für die Neurodegeneration bewerten.

Wie unter 1.2.8 aufgeworfen, mögen gliale Zellen eine Schlüsselrolle in der Steuerung des entzündlichen Geschehens spielen. Bislang ist von aktivierten Mikroglia bekannt, dass sie verschiedene an Entzündungen beteiligte Proteine, wie zum Beispiel TNF- α , IL-6, COX-2 und Stickoxide, sezernieren (Hanisch, 2002). Auch Astroglia (Astrozyten) sind an Prozessen der Neuroinflammation beteiligt (Dong & Benveniste, 2001). So ist bekannt, dass Astrozyten die Expression von neurotrophen Faktoren hemmen, und sich selbst an der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren beteiligen, nachdem sie durch Mediatoren stimuliert wurden, welche ihrerseits von Mikroglia sezerniert wurden. Dies führt wiederum zur Förderung der Aktivierung von Mikroglia und somit in einen Kreislauf der gegenseitigen Signalverstärkung (Streit, 2002; Übersicht bei Weydt & Möller, 2005). Dabei blieb bisher offen, in wiefern die Neurone selbst aktiv an diesen Prozessen beteiligt sind. Eine Aktivierung von Mikroglia in Regionen der Motoneuronschädigung bei *post-mortem* FALS- Patienten, wie unter anderem im primären motorischen Kortex oder im Bereich der Vorderhörner des Rückenmarks, konnte schon histologisch belegt werden (Ince et al., 1996). Dabei fiel auch eine Aktivierung in den durch Motoneuronuntergang noch schwächer betroffenen Regionen auf. Dies, ebenso wie die Tatsache, dass an asymptomatischen transgenen Mäusen eine mikrogliale Aktivierung gezeigt werden konnte (Hall et al., 1998; Alexianu et al., 2001), spricht für cerebrale entzündliche Reaktionen schon bevor klinische Symptome einer Motoneuronschädigung auftreten. Mit Hilfe funktioneller Bildgebung in Form von PET-Untersuchungen konnte man inzwischen eine cerebrale mikrogliale Aktivierung bestätigen (Turner et al., 2004).

Eine verstärkte Expression von pro- inflammatorischen Mediatoren im Rahmen der ALS wurde bereits unter 1.2.8 diskutiert. Nichtsdestotrotz wurde, wie schon mehrfach angedeutet, bisher noch nie die zelluläre Lokalisation der Expression dieser Faktoren untersucht. Da die ALS im Gegensatz zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen (wie z.B. Enzephalomyelitis disseminata oder Alzheimer), einen Einstrom von immunkompetenten Zellen aus der Peripherie erst in den Endstadien der Erkrankung aufweist (Bruijn et al., 2004; Kawamata et al., 1992), muss bei der ALS die inflammatorische Komponente durch eine Interaktion von Mikroglia, Neuronen und anderen Glia, wie Astrozyten aufrecht gehalten werden (Weydt & Möller, 2005).

Wir haben nunmehr versucht aus diesen einzelnen Erkenntnissen einen Zusammenhang für mögliche Pathomechanismen der ALS herzustellen.

Dementsprechend konnten wir sowohl am SOD1-Mausmodell, als auch dem Anschein nach in humanen Proben, nachvollziehbar belegen, dass eine gliale Aktivierung in Verbindung mit Expressions- und Translationsveränderungen von entzündungsregulierenden Proteinen (SOCS-1 & SOCS-3) in diesen Zellen, bei gleichzeitigem Fehlen einer Expression in Motoneuronen im Krankheitsprogress, zu verzeichnen ist.

Ein Schlüsselzytokin mag dabei das IL-6 sein. Es wird auf entsprechende Stimuli hin (u.a. IL-1, TNF- α) von zahlreichen Zelltypen synthetisiert. Unter anderem von glialen Zellen (Übersicht bei Hirano, 1998). Eine verstärkte Expression ist bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Parkinson (Müller et al., 1998), M. Alzheimer (Strauss et al., 1992) und auch bei der ALS (Nguyen et al., 2001) gezeigt worden. Hierbei sind einerseits direkte neuroprotektive Effekte von IL-6 beschrieben (Jüttler et al., 2002): IL-6 gehört zu einer Gruppe von strukturell verwandten Zytokinen, die auch die neurotrophen Faktoren CNTF, IL-11, LIF und Cardiotrophin (CT-1) mit einschließt. Andererseits vermittelt IL-6, vor allem durch seine pro- inflammatorische Wirkung und über die Aktivierung von Gliazellen und Makrophagen, neurodegenerative Mechanismen im ZNS. Dies ist deutlich am Modell von IL-6 überexprimierenden Mäusen gezeigt worden, die schwere neuroinflammatorische und neurodegenerative Veränderungen aufwiesen (Campbell et al., 1993). Diese Schäden werden offensichtlich durch die Induktion von Genen, die zur Generierung neurotoxischer Substanzen führen ausgelöst. Ein wesentlicher Signalweg ist hierbei die Induktion von C/EBP β . Es existieren zwei Signalkaskaden die durch IL-6 aktiviert werden: zum einen über das JAK-STAT-System, im Speziellen über STAT-3, und zum anderen über die Transkriptionsfaktoren NF-IL-6 und C/EBP, die auch von manchen Autoren synonym verwendet werden (Übersicht bei Kishimoto, 2005; Diehl & Rincón, 2002). Somit könnten die via IL-6 vermittelten Kaskaden sowohl über SOCS-3, als auch durch C/EBP β beeinflusst werden. Zum Beispiel indem einerseits die IL-6-Wirkung durch SOCS gehemmt und vice versa über IL-6 die Expression von SOCS- Proteinen gefördert wird. Oder andererseits der inflammationsfördernde Transkriptionsfaktor C/EBP β durch IL-6 in seiner Expression angeregt und C/EBP β selbst wiederum positiv auf die IL-6-Synthese wirkt (Kishimoto, 2005; Cardinaux et al., 2000).

An dieser Stelle ist auch die Verbindung zu einer weiteren Signalkaskade zu setzen, an deren Ende neben der Induktion des Gens für COX-2, auch die des Gens für TNF- α und iNOS steht. Das ebenfalls untersuchte SOCS-1 greift, wie bereits besprochen, im JAK-STAT-System über

STAT-1(α) hemmend in den Signalweg zur Entzündungsinduktion ein. Demgemäß soll IFN- γ , wie bereits diskutiert, über STAT-1 und CD40 zu einer Induktion der Transkriptionsfaktoren NF-kappa B und C/EBP β sowie daraus folgend zu einer Expressionserhöhung von COX-2 (Okuno et al., 2004), iNOS (Jana et al. 2001) und TNF- α (Jana et al., 2002) führen. COX-2 kann über die verstärkte Synthese von PGE₂ zu einer verstärkten Glutamatausschüttung aus den Astrozyten (Bezzi et al., 1998) und folglich über eine erhöhte Exzitotoxizität zum Motoneuronuntergang beitragen (siehe unter 1.2.3). TNF- α wiederum kann dementsprechend über eine Stimulierung der Freisetzung von IL-6 nochmals die zuerst beschriebene Signalkaskade fördern und infolgedessen das Entzündungsgeschehen weiter unterstützen.

Insgesamt mag bezüglich der inflammatorischen Komponente der Pathogenese von ALS eine Unausgewogenheit des via IL-6 vermittelten Regelungskreislaufs die ausschlaggebende Rolle spielen. Hierbei könnte es zu einer Schwächung in bestimmten Bereichen des Regelkreises, mit anschließend folgenden Gegenregulationen kommen.

SOCS-3 welches durch STAT-3 zu einem Teil die IL-6- Wirkungen reguliert, wird, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, in symptomatischen SOD-1-Mäusen als in seiner Expression verringert vorgefunden. Die SOCS-3-Synthese könnte im Verlauf gewissermaßen überlastet werden, d.h., es könnte zu einem bisher nicht nachvollziehbaren Verlust der Synthesemöglichkeit für SOCS-3 kommen. Oder SOCS-3 könnte zumindest in seiner Menge nicht ausreichend synthetisierbar sein, um seine entzündungshemmende Wirkung unter pathologischen Bedingungen ausreichend zu vermitteln. Selbst wenn dies, wie von uns ebenfalls gezeigt (siehe 3.5.2), nach dem Untergang von Motoneuronpopulationen, durch eine Syntheseverstärkung von SOCS-3, in glialen Strukturen, augenscheinlich zu kompensieren versucht wird. Ebenso gilt es die nachgewiesene Stimulierbarkeit von SOCS- 3 (im Gegensatz zu SOCS-1) in diesem Zusammenhang zu bedenken. Letztlich war es möglich nachzuweisen, dass ein Auffüllen der intrazellulären Proteinreserven von SOCS-3, eine über Zytokine vermittelte, mittels SEB, LPS und ConA induzierte, mit massiver Apoptosereaktion einhergehende, akute Leberentzündung supprimieren kann (Jo et al., 2005). Dazu waren die Zellen zuvor *in vivo* durch alleinige endogene SOCS-3-Produktion nicht in der Lage. Warum dies auf das unter anderem IFN- γ regulierende SOCS-1 nicht zutrifft, bleibt dabei dahingestellt, jedenfalls wäre eine kompensatorische, respektive protektive Aufregulierung seiner Expression, infolge fehlender anti- inflammatorischer Vermittlung durch SOCS-3 denkbar. Ein anderer Gedanke wäre, zu untersuchen, ob STAT-3, wie schon weiter oben beschrieben, neben der Aktivierung der Makrophagen, auch die der Mikro- bzw. Astroglia, im

Verlauf, der ALS hemmt. Folglich könnte es als natürliche Reaktion zu einer Abregulierung von SOCS-3 kommen um eine beispielsweise via IL-10 vermittelte Aktivierung von STAT-3 nicht zu beeinträchtigen. Damit wären aus zwei prinzipiell unterschiedlichen Erwägungen heraus, Erklärungsansätze für die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse gegeben.

Nochmals unterstrichen sei an dieser Stelle, dass nach unseren Erkenntnissen SOCS-1 und SOCS-3 in den Neuronen von gesunden Kontrolltieren und hier insbesondere in Motoneuronen, eine deutliche basale Expression von nukleärem Verteilungsmuster aufweist. In transgenen Tieren waren SOCS-1 und -3 indessen in den Gliazellen, jedoch nicht mehr in Neuronen, in ihrer Synthese nachzuweisen. Im Vergleich Kontroll- zu SOD1- Maus, war SOCS-1 im Gegensatz zu SOCS-3 schon im asymptomatischen Stadium (60 d) augenfällig als verstärkt exprimiert nachzuweisen (siehe 3.4.2/3.5.2). Hierbei wäre, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, eine möglicherweise insuffiziente Schutzfunktion der Proteine gegenüber den Motoneuronen, welche durch Syntheserhöhung von SCOS- 1 zu kompensieren versucht wird, im Rahmen von ablaufenden entzündlichen Reaktionen denkbar.

4.8 Mögliche Bedeutung für anti- inflammatorische Therapieansätze

Aus den vorangehend diskutierten Erkenntnissen ergeben sich durchaus möglich denkbare therapeutische Ansätze für die ALS. Es drängt sich nunmehr auf, dass eine Beeinflussung der Regulationseinheiten für die Zytokinvermittlung ein gewisses Potential in sich birgt.

Aktuell hat man in SOD1-G93A-transgenen Mäusen, nach oraler Verabreichung des Antidiabetikums Pioglitazon, von welchem als PPAR γ -Rezeptor-Agonist, eine hohe anti-inflammatorische Potenz vermutet wird, einen Profit im Verlauf der Erkrankung nachweisen können (Schütz et al., 2005). Demzufolge konnten die untersuchten Mäuse von einer im Verlauf verbesserten Muskelkraft, Muskelmasse und einem verzögerten Krankheitsausbruch profitieren. Zudem überlebten die Tiere in diesem Versuch signifikant länger als unbehandelte SOD1-G93A-Mäuse. Laut Schütz et al. konnte sogar ein eindeutiger Schutz der Neuronen vor dem Untergang sowie ein Rückgang der Aktivierung von Mikroglia nachgewiesen werden. Von besonderem Interesse ist hier der Umstand einer Reduktion der Proteinmengen von COX-2 und iNOS, im Vergleich zu unbehandelten Tieren und darüber hinaus einer Erhöhung der mRNA der SOCS-1 und -3 Gene. SOD1- mRNA- und Proteinmengen blieben hingegen unbeeinflusst. Insgesamt sollen diese Effekte nach Schütz et al. unter anderem durch die Vermittlung des PPAR γ - Rezeptors zustande kommen (Übersicht bei Schütz et al., 2005).

Die Erhöhung der mRNA von SOCS-1 und -3 soll über eine durch PPAR γ vermittelte Induktion der Transkription ihrer Gene in aktivierten Astro- und Mikroglia erfolgen. Dies wurde bereits in 2003 von Park et al. gezeigt, die unter der Einwirkung von 15d-PGJ₂ und

Rosiglitazon eine Suppression der Entzündungskaskade via JAK-STAT belegten. Das JAK-STAT-System wird wie weiter oben erläutert u.a durch SOCS-1 und -3 inhibiert (Park et al, 2003). Schütz et al. äußern dabei auch die Vermutung, dass die Hemmung des JAK-STAT-Systems zu der beobachteten Suppression von iNOS und COX-2 beitragen könnte.

Auf diesen Erkenntnissen basierend, lässt sich ein möglicher therapeutischer Ansatz formulieren, insofern man die gewonnenen Erkenntnisse mittels funktioneller Untersuchungen weiter verifizieren kann. Zur Überprüfung des Effekts eines SOCS-1-Mangels wurde inzwischen ein Modell entwickelt, welches sich „small- interfering RNA“ (siRNA) zunutze macht um eine Translation der mRNA des SOCS-1-Gens zu verhindern (Übersicht bei Kobayashi & Yoshimura, 2005). Dabei konnte eine verstärkte Aktivierung von dendritischen Zellen belegt werden (Shen et al., 2004). Interessant ist auch eine unlängst erschienene Publikation, welche sich mit der Regulation des Blutglucosehaushalts beschäftigt. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Resistin, einem Hormon der Adipozyten, welches den Insulinsignalweg hemmt, untersucht. Dabei fiel unter anderem auf, dass dieses Hormon die Aktivierung von SOCS-3 fördert und damit der erste insulinunabhängige zelluläre Effekt von Resistin ist (Steppan et al., 2005). Hier stellt sich natürlich die Frage in wie weit diese Erkenntnisse Potential für die Therapie der ALS bieten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Nach wie vor findet sich ein breites Feld an unerforschten Gebieten in der Pathogenese der ALS. Leider ist es in den letzten Jahren zu einer Abschwächung der Anstrengungen mit dem Ziel einer Entschlüsselung dieser komplexen Vorgänge gekommen. Nicht zuletzt die bislang nur minimalen Fortschritte hinsichtlich therapeutischer Optionen mögen dabei eine wesentliche Rolle gespielt haben.

Weit über 50 Substanzen wurden bisher unter kontrollierten Bedingungen auf ihre Wirksamkeit hin untersucht, u.a. verschiedene Aminosäuren, Vitamine, Hormone, Interferone, Kalziumantagonisten, Immunsuppressiva. Bis dato blieben alle Versuche mehr oder weniger erfolglos (Übersicht bei Mitsumoto, 1995; McGeer & McGeer, 2005)

Mitte der neunziger Jahre gelang es erste kleine Erfolge zu verzeichnen. In klinischen Studien wurden im Hinblick auf die exzitotoxische Hypothese mehrere Glutamatantagonisten auf ihre schützende Wirkung bei der sporadischen Form der ALS getestet. Erste Versuche mit dem NMDA- Antagonisten Dextromethorphan misslangen ebenso wie Ansätze mit Lamotrigin (Hemmung der Glutamatausschüttung). Auch Gabapentin (Glutamatsynthesehemmer), welches im Tierversuch vielversprechend getestet wurde, konnte die Erwartungen im Experiment am Menschen nicht erfüllen. Erst die Testung von Riluzol, einem Glutamatantagonisten, erbrachte in zwei Studien mit insgesamt 1114 Patienten eine geringe, jedoch signifikante dosisabhängige Verlängerung der Lebenserwartung um drei Monate, in einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996). Ein Einfluss auf die Progredienz konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Seit dem Sommer 1996 ist Riluzol zur Behandlung der ALS in der Europäischen Union zugelassen. Wegen der geringen Wirksamkeit, die vom Patienten subjektiv nicht bemerkt wird, und den möglichen Nebenwirkungen (Müdigkeit, gastrointestinale Beschwerden u.a.) sollte dessen ungeachtet die Verschreibung nur nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch mit dem Patienten und im Rahmen eines palliativmedizinischen Gesamtkonzepts stattfinden.

Neurotrophe Faktoren wirken zwar auf Motoneurone *in vitro* und *in vivo*, doch gibt es noch keine Hinweise, die auf eine Beteiligung dieser Faktoren im Speziellen in der Pathogenese von ALS hindeuten könnten. Dennoch besteht die Hoffnung einer Verzögerung der Motoneurondegeneration im Zuge der Verabreichung von hohen Dosen an neurotrophen Faktoren. Drei Faktoren wurden dabei bisher in klinischen Studien untersucht: CNTF (ciliary neurotrophic factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und IGF-I (insulin-like growth factor I) (Miller et al., 1996; Lotz et al., 1996; Ochs et al., 2000; Ekester, 2004). Für

BDNF und CNTF konnten demnach bei intrathekaler oder subkutaner Gabe bislang keine positiven Ergebnisse gefunden werden. Das rekombinante humane IGF-I zeigte innerhalb zweier Studien widersprüchliche Ergebnisse (Borasio et al., 1998; Lai et al., 1997). Eine weitere Studie, mit allerdings nur neun Patienten, bei der IGF-I intrathekal verabreicht wurde, zeigte einen gewissen positiven Effekt auf die motorischen Funktionen (Nagano et al., 2005). Die Auswertung einer aktuellen Studie steht noch aus. Somit kann aufgrund der unzureichenden Datenlage bezüglich IGF-I insgesamt noch kein abschließendes Urteil gefällt werden (Mitchell et al., 2002; Ley & Herdegen, 2004).

Zuletzt fassten Traynor et al. 2006 potenzielle neuroprotektive Faktoren, die, wie zuvor beschrieben, schon im Tiermodell oder Phase I/II Studien getestet wurden, hinsichtlich ihrer Eignung zur Anwendung in Phase III Studien für ALS- Patienten zusammen. Hierbei konnten 20 aussichtsreiche Substanzen gesammelt werden, deren Wirksamkeit für die ALS es nun zu überprüfen gilt. Unter ihnen Tamoxifen, Minocyclin, Ceftriaxon, Thalidomid oder CoQ10 einem Antioxidant.

Es gibt jedoch auch erfolgversprechende Ansätze in anderen, noch nicht so detailliert erforschten Bereichen der Pathogenese von ALS. So war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein wenig mehr Einblick in die endogene Regulation und Gegenregulation des Entzündungsgeschehens in der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) zu bringen. Es sollte dessen Rolle näher beleuchtet und vielleicht ein Ansatz für das Verständnis der komplizierten Abläufe und möglicher anti- inflammatorischer Therapieoptionen geschaffen werden.

Die Bedeutung des Entzündungsgeschehens im Rahmen der ALS ist inzwischen kaum mehr abzustreiten. Auch wenn die entzündliche Reaktion in der Pathogenese nicht am Beginn der Kausalzusammenhänge stehen mag, könnte sie doch einen erheblichen Beitrag zum Ausmaß und Tempo der klinischen Entwicklung leisten. Bislang wurden lediglich einige erfolglose Versuche mit unspezifisch entzündungshemmenden Medikamenten am Menschen unternommen (Übersicht bei McGeer & McGeer, 2005), jedoch hat man bisher weder dezidiert die exakten Entzündungsabläufe untersucht, noch versucht an spezifischen Orten der Regulation von Entzündungskaskaden anzugreifen.

Rückblickend konnten in dieser Hinsicht vielversprechende Ergebnisse gefunden werden, die zumindest Anlass dazu geben, weiterführende Untersuchungen anzustellen. SOCS-1 und SOCS-3 mögen nach unserer Auffassung erfolgversprechende Anwärter sein. Die Ergebnisse zeigen über alle in dieser Arbeit angewandten deskriptiven Methoden hinweg eine überzeugende Konkordanz in ihren Aussagen. Zusammenfassend ergab sich bei der Untersuchung der Expression von SOCS-1 und SOCS-3 im Rückenmark der Maus eine

gegenseitige Regulation. Es fiel bis auf die Proteinebene eine erhöhte Expression von SOCS-1 im Gegensatz zu einer verminderten Expression von SOCS-3 auf. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist im Besonderen SOCS-3 von Interesse, da es auffallend eng mit dem IL-6-Signalweg in Zusammenhang steht und darüber hinaus nachgewiesen wurde, dass es Einfluss auf immunkompetente Zellen nehmen kann (Übersicht bei Kubo et al, 2003; Yasukawa et al., 2003; Kishimoto, 2005). Der weiterhin untersuchte Transkriptionsfaktor C/EBP β indessen zeigte im Microarray eine Erhöhung der Expression, jedoch in seiner Menge als Protein, im Vergleich zu den Kontrollen, eine Verminderung. Seine Rolle bleibt dennoch interessant, auch wenn die hier gefundenen Ergebnisse zunächst schwer zu interpretieren sein mögen. So konnte bereits vor zehn Jahren nachgewiesen werden, dass es im Sinne einer zusätzlichen post- transkriptionellen Kontrolle des Gens, zu einer Inhibierung und/oder Modifizierung der Translation von C/EBP β - mRNA kommen kann (An et al., 1996; Lincoln et al., 1998; Calkhoven et al., 2000). Diese Erkenntnis wäre eine adäquate Erklärung für die in dieser Arbeit gefundene Diskrepanz zwischen der Menge an C/EBP β - mRNA im Vergleich zur letztendlich nachgewiesenen Proteinmenge. Jedoch bleibt bis dato offen, ob die mögliche Translationshemmung wirklich als eine bedingte Gegenregulation zur inflammationsfördernden Wirkung von C/EBP β zu werten ist. Abgesehen davon wird die Bedeutung von C/EBP β durch den zweifelsfrei nachgewiesenen Einfluss sowohl auf die durch SOCS-1, als auch SOCS-3 regulierten Signalwege unterstrichen (Übersicht bei Kishimoto, 2005; Diehl & Rincón, 2002; Cardinaux et al., 2000).

Schließlich nicht zuletzt die Tatsache der übereinstimmenden Befunde an von uns untersuchten Gewebeproben von ALS- Patienten ergeben eindeutige Anhaltspunkte für die Relevanz, speziell dieser untersuchten Entzündungsregulatoren hinsichtlich der Pathogenese der ALS. Diesbezüglich bedarf es allerdings noch weiterer Nachforschungen, um eine Signifikanz der von uns gefundenen Auffälligkeiten in humanem Gewebe zu beweisen.

In weiteren unsererseits aktuell durchgeführten Untersuchungen deuteten sich bemerkenswerte Unterschiede sowohl im Ort der Expression als auch in der Expressionsmenge von SOCS-3 im zeitlichen Verlauf an. Demzufolge wird SOCS-3 von 60 d alten prä- symptomatischen SOD1 transgenen Mäusen bereits kaum noch in den Neuronen, aber deutlich in glialen Zellen exprimiert, wobei diese in ihrer Morphologie noch klar von aktivierten Glia zu unterscheiden sind (unpublizierte Daten). Hier werden entsprechende Untersuchungen für SOCS-1 folgen.

Nach obigen Ausführungen wird klar, dass gerade auch das Zeitgitter der inflammatorischen Veränderungen genauerer Untersuchungen bedarf. Deskriptiv gefundene Auffälligkeiten, wie

die einer unerwartet veränderten Synthese von C/EBP β im WB oder in der Immunhistochemie, sollten in jedem Fall funktionell überprüft werden, um die Einflüsse und Dynamik der fokussierten Proteine, respektive Enzyme *in vitro* widergeben zu können.

Hier wäre es interessant zu eruieren, ob es einen Unterschied in der Synthese von SOCS-1/3 oder C/EBP β zwischen dem in dieser Arbeit untersuchten, chronisch geschädigten Gewebe und den akut, durch toxischen ALS- Liquor beeinflussten Zellen gibt. Zudem wäre in der Folge beispielsweise an „knock-out-“ Mäuse zu denken, die einen Mangel an den beschriebenen Regulationseinheiten aufweisen. Aber auch ein Tiermodell welches eine Überexpression von SOCS-1, respektive SOCS-3 aufweist, wäre eine Möglichkeit zur weiteren Verifizierung. Methoden die sich „small- interfering RNA“ (siRNA) zunutze machen, könnten ebenfalls von Interesse sein.

Am Ende dieser Prozesse sollte eine therapeutische Option für an ALS leidende Menschen stehen. Die Zielsetzung ganz allgemein kann in diesem Zusammenhang der Einsatz von direkt oder indirekt inflammationshemmenden Substanzen sein. Diese sollten dann beispielsweise an die SOCS- Regulationseinheiten angreifen. Wenn auch nicht mit kurativem Ansatz, könnte dann im Idealfall diese fatale Erkrankung in ihrer Progredienz gehemmt werden.

6 Literatur

- Abraham S**, Goldstein LH, Al-Chalabi A, Pickering A, Morris RG, Passingham RE, Brooks DJ, Leigh PN (1997) Relation between cognitive dysfunction and pseudobulbar palsy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62: 464-472
- Abraham S**, Sweet T, Sawaya BE, Rappaport J, Khalili K, Amini S (2005) Cooperative interaction of C/EBP β and Tat modulates MCP-1 gene transcription in astrocytes. *J Neuroimmunol* 160(1-2): 219-227
- Agnello D**, Lankford CSR, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immun* 23: 147-161
- Akira S**, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is member of C/EBP family. *EMBO J* 9: 1897-1906
- Alexander WS**, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ (1999) SOCS-1 is a critical inhibitor of interferon γ signalling and prevents the fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98: 597-608
- Alexianu ME**, Ho B-K, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36: 846-858
- Alexianu ME**, Kozovska M, Appel SH (2001) Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57: 1282-1289
- Almer G**, Vukosavic S, Romero N, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 72: 2415-2425
- Almer G**, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S (2001) Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 49(2): 176-185
- Almer G**, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, Przedborski S (2002) Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* 58: 1277-1279.
- Almer G** (2003) Amyotrophe Lateralsklerose: Überlegungen zu Ursprung und Pathophysiologie der Erkrankung. *J Neurol Neurochir Psychiatr* 4 (4): 6-12
- An MR**, Hsieh CC, Reisner PD, Rabek JP, Scott SG, Kuninger DT, Papaconstantinou J (1996) Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBP α and C/EBP β isoform expression during the Lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. *Mol Cell Biol* 16(5): 2295-2306
- Ando Y**, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G (2003) Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord : a study using laser microdissection and real time RT-PCR. *Neurochem Res* 28: 839-846
- Anneser JM**, Cookson MR, Ince PG, Shaw PJ, Borasio GD (2001) Glial cells of the spinal cord and subcortical white matter up-regulate neuronal nitric oxide synthase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 171(2): 418-421
- Anneser JM**, Chahli C, Ince PG, Borasio GD, Shaw PJ (2004) Glial proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(8): 831-840
- Anneser JM**, Chahli C, Borasio GD (2006) Protective effect of metabotropic glutamate receptor inhibition on ALS-CSF toxicity *in vitro*. *Neuroscience* 141(4): 1879-1886
- Appel SH**, Smith RG, Alexianu MF, Engelhardt JI, Stefani E (1995) Autoimmunity as an etiological factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 68: 47-57
- Arundine M**, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34: 325-337

- Auernhammer CJ**, Melmed S (2001) The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* 108: 1735-1740
- Azzouz M**, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND (2004) VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429(6990): 413-417
- Bachus R**, Claus A, Meyer T, Riepe M, Ludolph AC (1997) Molekularbiologische Befunde bei der amyotrophen Lateralsklerose. *Der Nervenarzt* 68: 785-791
- Barohn RJ**, Rowland LP (2002) Neurology and gulf war veterans. *Neurology* 59(10): 1484-1485
- Bendotti C**, Carri MT (2004) Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *Trends Mol Med* 10(8): 393-400
- Bensimon G**, Lacomblez L, Meininger V (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 330: 585-591
- Bezzi P**, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391: 281-285
- Bonin M**, Poths S, Osaka H, Wang Y-L, Wada K, Riess O (2002) Microarray expression analysis of gad mice implicates involvement of Parkinson's disease associated UCH-L1 in multiple metabolic pathways. *Mol Brain Res* 126: 88-97
- Borasio GD**, Robberecht W, Leigh PN, Emile J, Guilloff RJ, Jerusalem F, Silani V, Vos PE, Wokke JH, Dobbins T (1998) A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study group. *Neurology* 51(2): 583-586
- Borasio GD**, Anneser J: Motoneuron-Erkrankungen. In: Brandt T, Dichgans J, Diener HC, Hrsg., Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. Kohlhammer, Stuttgart (2003), 1056-1065
- Brod SA** (2002) Ingested type I interferon: a potential treatment for autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res* 22(12): 1153-1166
- Brooks BR** (1996) Clinical epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin.* 14: 399-420
- Bruijn LI**, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-1854.
- Bruijn LI**, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27: 723-749
- Bucher P** (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter 02 unrelated promoter sequences. *J Biol* 212(4): 563-578
- Bucher P**, Trifonov EN (1988) CCAAT box revisited: bidirectionality, location and context. *J Biomol Struct Dyn* 5(6): 1231-1236
- Buck M**, Poli V, Hunter T, Chojkier M (2001) C/EBP β Phosphorylation by RSK Creates a Functional XEXD Caspase Inhibitory Box Critical for Cell Survival. *Mol Cell* 8(4): 807-816
- Calkhoven CF**, Muller C, Leutz A (2000) Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression. *Genes Dev* 14(15): 1920-1932
- Campbell IL**, Abraham CR, Masliah E, Kempder P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10061-10065

- Cardinaux J-R**, Allaman I, Magistretti PJ (2000) Pro-Inflammatory Cytokines Induce the Transcription Factors C/EBP β and C/EBP β in Astrocytes. *Glia* 29: 91-97
- Carmichael ST** (2003) Gene expression changes after focal stroke, traumatic brain and spinal cord injuries. *Curr Opin Neurol* 16(6): 699-704
- Carriedo SG**, Yin HZ, Weiss JH (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated injury *in vitro*. *J Neurosci*. 16 (13): 4069-4079
- Chavany C**, Vicario-Abejon C, Miller G, Jendoubi M (1998) Transgenic mice for interleukin 3 develop motor neuron degeneration associated with autoimmune reaction against spinal cord motor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11354-11359
- Cleveland DW**, Bruijn LI, Wong PC, Marszalek JR, Vechio JD, Lee MK, Xu X-S, Borchelt DR, Sisodia SS, Price DL (1996) Mechanisms of selective motor neuron death in transgenic mouse models of motor neuron disease. *Neurology* 47(4)(Supplement 2): 54-62
- Cleveland DW**, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2(11): 806-819
- Croker BA**, Krebs DL, Zhang J-G, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Förster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling *in vivo*. *Nature Immunol* 6: 540-545.
- Dangold F**, Hwang D, Camelo S, Pasinelli P, Frosch MP, Stephanopoulos G, Brown RH Jr., Gullans SR (2004) Molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of post-mortem spinal cord gray matter. *Physiol Genomics* 16(2): 229-239
- Diehl S**, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincón M (2000) Inhibition of Th1 Differentiation by IL-6 Is Mediated by SOCS1. *Immun* 13: 805-815
- Diehl S**, Rincón M (2002) The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immuno* 39: 531-536
- Dong Y**, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180-190
- Drachman DB**, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teisman P, Almer G, Przedborski S, Rothstein JD (2002) Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 48: 771-778
- Egan PJ**, Lawlor KE, Alexander WS, Wicks IP (2003) Suppressor of cytokine signalling-1 regulates acute inflammatory arthritis and T cell activation. *J Clin Invest* 111: 915-924
- Egwuagu CE**, Yu C-R, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I (2002) Suppressors of cytokine signalling proteins are differentially expressed in TH1 and TH2 cells: implications for TH cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 168: 3181-3187
- Ekesterne E** (2004) Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 1(1-3): 88-100
- Elliot J**, Johnston A (2004) SOCS: Role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends in Immuno* 25(8): 434-440
- Emerit J**, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58: 39-46
- Facchinetti F**, Sasaki M, Cutting FB, Zhai P, McDonald JE, Reif D, Beal MF, Huang PL, Dawson TM, Gurney ME, Dawson VL (1999) Lack of involvement of neuronal nitric oxide synthase in pathogenesis of a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 90: 1483-1492
- Fernstrom RC** (1958) A durable Nissl stain for frozen and paraffin sections. *Stain Technol* 33(4): 175-176

- Gordon PH**, Moore DH, Gelinas DF, Qualls C, Meister ME, Werner J, Mendoza M, Mass J, Kushner G, Miller RG (2004) Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 62(10): 1845-1847
- Greenway MJ**, Alexander MD, Ennis S, Traynor BJ, Corr B, Frost E, Green A, Hardiman O (2004) A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology* 63(10): 1936-1938
- Gurney ME**, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264: 1772-1775
- Hall ED**, Oostveen JA, Gurney ME (1998) Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23: 249-256
- Hanisch UK** (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140-155
- Hattori T**, Ohoka N, Inoue Y, Hayashi H, Onozaki K (2003) C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene* 22: 1273-1280
- Heath PR**, Shaw PJ (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26(4): 438-458
- Henkel JS**, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Googman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH (2004) Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55(2): 221-235
- Hirano T** (1998) Interleukin 6 and its receptor: 10 years later. *Int Rev Immunol* 16: 249-284
- Hsieh CC**, Xiong W, Xie Q, Rabek JP, Scott SG, An MR, Reisner PD, Kuninger DT, Papaconstantinou J (1998) Effects of age on the posttranscriptional regulation of CCAAT/enhancer binding protein alpha and CCAAT/enhancer binding protein beta isoform synthesis in control and LPS-treated livers. *Mol Biol Cell* 2: 1479-1494
- Ihle JN** (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature* 377: 591-594
- Ince PG**, Shaw PJ, Slade JY, Jones C, Hudgson P (1996) Familial amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase gene: pathological and immunocytochemical changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 92: 395-403
- Ishigaki S**, Niwa J, Ando Y, Yoshihara T, Sawada K, Doyu M, Yamamoto M, Kato K, Yotsumoto Y, Sobue G (2002) Differentially expressed genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis spinal cords – screening by molecular indexing and subsequent cDNA microarray analysis. *FEBS Lett* 531(2): 354-358
- Isoda K**, Koide H, Kojima M, Arita E, Ikkaku M, Higashiyama S, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J, Kawase M, Yagi K (2005) Stimulation of hepatocyte survival and suppression of CCl4-induced liver injury by the adenovirally introduced C/EBPbeta gene. *Biochem Biophys Res Commun* 329(1): 182-187
- Jana M**, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K (2001) Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *JBiol Chem* 276: 44527-44533
- Jana M**, Dasgupta S, Liu X, Pahan K (2002) Regulation of tumor necrosis factor- alpha expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. *J Neurochem* 80: 197-206
- Jiang Y-M**, Yamato M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J-I, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G (2005) Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57: 236-251
- Jo D**, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J (2005) Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med* 11(8): 892-898
- Jüttler E**, Tarabin V, Schwanninger M (2002) Interleukin-6 (IL-6): A possible neuromodulator induced by neuronal activity. *The Neuroscientist* 8: 268-275

- Kamura T**, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW (1998) The elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in the members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12: 3872-3881
- Karlsson J**, Fong KS, Hansson MJ, Elmer E, Csiszar K, Keep MF (2004) Life span extension and reduced neuronal death after weekly intraventricular cyclosporin injections in the G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosurg* 101(1): 128-37
- Kawahara Y**, Kyoko I, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S (2004) Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427: 801
- Kawamata T**, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol* 140(3): 691-707
- Keep M**, Elmer E, Fong KS, et al (2001) Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Res* 894: 327-331
- Kimura A**, Kiniyo I, Matsumura Y, Mori H, Mashima R, Harada M, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A (2004) SOCS3 is a physiological negative regulator for granulopoiesis and granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling. *J Biol Chem* 279(8): 6905-6910
- Kishimoto T** (2005) Interleukin 6: From basic science to medicine – 40 years in immunology. *Ann Rev Immunol* 23: 01-21
- Kobayashi T**, Yoshimura A (2005) Keeping DCs awake by putting SOCS1 to sleep. *Trends Immunol* 26(4): 177-179
- Kostic V**, Jackson-Lewis V, De Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S (1997) BCL-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 277: 559-562
- Krebs DL**, Hilton DJ (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signalling. *Stem Cells* 19: 378-387
- Kubo M**, Hanada T, Yoshimura A (2003) Suppressors of cytokine signalling and immunity. *Nat Immunol* 4(12): 1169-1176
- Lacomblez L**, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V (1996) Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 347: 1425-1431
- Lai EC**, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinas DF, Kratz R, Murphy MF, Natter HM, Norris FH, Rudnicki SA (1997) Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study group. *Neurology* 49(6): 1621-1630
- Lampson LA**, Kushner PD, Sobel RA (1990) Major histocompatibility complex antigen expression in the affected tissues in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28(3): 365-372
- Landschulz WH**, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins *Science* 240: 1759-1764
- Ley L**, Herdegen T (2004) Neuroprotektive Therapien für neurodegenerative Erkrankungen. *Arzneimitteltherapie* 22: 328-335
- Lieberman AP**, Harmison G, Strand AD, Olson JM, Fischbeck KH (2002) Altered transcriptional regulation in cells expressing the expanded polyglutamine androgen receptor. *Hum Mol Gen* 11(17): 1967-1976
- Lin C-LG**, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD (1998) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20: 589-602
- Lincoln AJ**, Monczak Y, Williams SC, Johnson PF (1998) Inhibition of CCAAT/Enhancer-binding Protein α and β Translation by Upstream Open Reading Frames. *J Biol Chem* 273(16): 9552-9560

- Lotz B**, Brooks B, Sanjak M, Weasler C, Roelke K, Parnell J, Neville H, Ringel S, Brinkmann J, Singh K, Burns D, Pestronk A, Lopate G, Florence J, Blume G, Elliott J, Mitsumoto H, Levin K, Szirony K, Caldwell M, Bosch P, Smith B, Verehijde J, Carr S (1996) A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 46: 1244-1249
- Luo L**, Salunga RC, Guo H, Bittner A, Joy KC, Galindo JE, Xiao H, Rogers KE, Wan JS, Jackson MR, Erlander MG (1999) Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med* 5: 117-122
- Maier J**, Kincaid C, Pagenstecher A, Campbell IL (2002) Regulation of signal transducer and activator of transcription and suppressor of cytokine-signaling gene expression in the brain of mice with astrocyte-targeted production of interleukin-12 or experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 160(1): 271-288
- Maihofner C**, Probst-Cousin S, Bergmann M, Neuhuber W, Neundorfer B, Heuss D (2003) Expression and localization of cyclooxygenase-1 and -2 in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 18(6): 1527-1734
- Majoer-Krakauer D**, Willems PJ, Hofman A (2003) Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Genet* 63: 83-101
- Malaspina A**, Kaushik N, de Belleruche J (2001) Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected, using gridded cDNA arrays. *J Neurochem* 77: 132-145
- Malaspina A**, de Belleruche J (2004) Spinal cord molecular profiling provides a better understanding of amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Brain Res* 45: 213-229
- Marine, JC**, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle JN (1999) SOCS-1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 98: 609-616
- Masuhr KF und Neumann M**. Degenerative (atrophische) Prozesse des Gehirns und Rückenmarks. In: Bob A und K, Hrsg., Neurologie. 4. Auflage, Hippokrates, Stuttgart (1998)(Duale Reihe): 183-220
- McGeer PL**, McGeer EG (2002) Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26: 459-470
- McGeer EG**, McGeer PL (2005) Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *BioDrugs* 19(1): 31-37
- McHolm GB**, Aguilar MJ, Norris FH (1984) Lipofuscin in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 41(11): 1187-1188.
- McKnight SL** (2001) McBindall – A Better Name for CCAAT/Enhancer Binding Proteins. *Cell* 107: 259-261
- Meininger V** (1999) Getting the diagnosis right: beyond El Escorial. *J Neurol* 246(3): III/10-III/12
- Metcalf D**, Mifsud S, Di Rago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (2002) Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 99(2): 943-948
- Meyer T**, Fromm A, Munch C, Schwalenstocker B, Fray AE, Ince PG, Stamm S, Gron G, Ludolph AC, Shaw PJ (1999) The RNA of glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. *J Neurol Sci* 170(1): 45-50
- Miller M**, Shuman JD, Sebastian T, Dauter Zbigniew, Johnsn PF (2003) Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/Enhancer-binding protein β . *J Biol Chem* 278(17): 15178-15184

- Miller RG**, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, Hoagland RJ, Parry GJ, Ross MA, Stromatt SC, Belsh JM, Buchman AS, Donofrio PD, Eisen AA, Gan RA, Gutmann L, Horowitz SH, Jackson WS, Johnston WS, Kelly JJ, Malta E, Mandler RN, Massey JM, McGuire D (1996) A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39: 256-260
- Milonas I** (1998) Amyotrophic lateral sclerosis: an introduction. *J Neurol* 245(2): 1-3
- Mitchell JD**, Wokke JH, Borasio GD (2002) Recombinant human insuline-like growth factor I (rhIGF-I) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD002064
- Mitsumoto H** (1995) New therapeutic approaches: rationale and results. In: Leigh PN, Swash M (eds.) *Motor Neuron Disease*, Springer, London: 419-441
- Morrison RS**, de Vellis J (1983) Differentiation of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Brain Res* 285(3): 337-345
- Müller T**, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W (1998) Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 98: 142-144
- Nagano I**, Shiote M, Murakami T, Kamada H, Hamakawa Y, Matsubara E, Yokoyama M, Moritaz K, Shoji M, Abe K (2005) Beneficial effects of intrathecal IGF-I administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 27(7): 768-772
- Nakamura R**, Kamakura K, Kwak S (1994) Late-onset selective neuronal damage in the rat spinal cord induced by continuous intrathecal administration of AMPA. *Brain Res* 654: 279-285
- Newbery HJ**, Abbott CM (2002) Of mice, men and motor neurons. *Trends Genet* 8: 88-92
- Nguyen VT**, Benveniste EN (2000) Involvement of STAT-1 and Ets Family Members in Interferon- γ Induction of CD40 Transcription in Microglia/Macrophages *J Biol Chem* 275: 23674-23684
- Nguyen MD**, Julien JP, Rivest S (2001) Induction of proinflammatory molecules in mice with amyotrophic lateral sclerosis: no requirement for proapoptotic interleukin-1 β in neurodegeneration. *Ann Neurol* 50(5): 630-639
- Ochs G**, Penn RD, York M, Giess R, Beck M, Tonn J, Haigh J, Malta E, Traub M, Sendtner M, Toyka KV (2000) A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1(3): 141
- Okuno T**, Nakatsuji Y, Kumanogoh A, Koguchi K, Moriya M, Fujimura H, Kikutani H, Sakoda S (2004) Induction of cyclooxygenase 2 in reactive glial cells by the CD40 pathway: relevance to amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 91: 404-412
- Park EJ**, Park SY, Joe EH, Jou I (2003) 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-Stat inflammatory signalling through induction of suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J Biol Chem* 278(17): 14747-14752
- Poloni M**, Facchetti D, Mai R, Mecheli A, Agnoletti L, Francolini G, Mora G, Campana C, Mazzini L, Bachetti T (2000) Circulating levels of tumor necrosis factor- α and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 287: 211-214.
- Pompl PN**, Ho L, Bianchi M, McManus T, Qin W, Psinetti GM (2003) A therapeutic role for Cyclooxygenase-2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 17(6): 725-727
- Powers MM**, Clark G (1955) An evaluation of cresyl echt violet acetate as a Nissl stain. *Stain Technol* 30(2): 83-88
- Rakhit R**, Cunningham P, Furtos-Matei A, Dahan S, Qi XF, Crow JP, Cashman NR, Kondejewski LH, Chakrabartty A (2002) Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 277: 47551-47556

- Rosen DR**, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62
- Ross CA**, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10: 10-17
- Rothstein JD** (1995) Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis *Adv Neurol* 68: 07-20
- Rothstein JD** (1996) Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 47(4) (Supplement 2): 19-26
- Rothstein JD**, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686
- Rowland LP**, Shneider NA (2001) Medical progress: Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344: 1688-1700
- Schütz B**, Reinmann J, Dumitrescu-Ozimek L, Kappes-Horn K, Landreth GE, Schürmann B, Zimmer A, Heneka MT (2005) The oral antidiabetic Pioglitazone protects from neurodegeneration and amyotrophic lateral sclerosis-like symptoms in superoxide dismutase-G93A transgenic mice. *J Neurosci* 25(34): 7805-7812
- Seki Y**, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston JA, Yoshimura A, Kubo M (2003) SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses. *Nat Med* 9: 1047-1054
- Shaw PJ**, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ (1995) CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: Elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4: 209-216
- Shen L**, Evel-Kabler K, Strube R, Chen SY (2004) Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat Biotechnol* 22(12): 1546-1553
- Shouda T**, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A (2001) Induction of cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108: 1781-1788
- Siddique T**, Nijhawan D, Hentati A (1996) Molecular genetic basis of familial ALS. *Neurology* 47(4) (Supplement 2): 27-35
- Sitte HH**, Wanschitz J, Budka H, Berger ML (2001) Autoradiography with [³H]PK11195 of spinal tract degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 101(2): 75-78
- Smith RG**, Alexianu ME, Crawford G, Nyormoi O, Stefani E, Appel SH (1994) Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3393-3397
- Starr, R**, Metcalf D, Elefanti AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS (1998) Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signalling-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14395-14399
- Steppan CM**, Wanf J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA (2005) Activation of SOCS-3 by Resistin. *Mol Cell Biol* 25(4): 1569-1575
- Strauss S**, Bauer J, Ganter U, Jonas U, Berger M, Volk B (1992) Detection of interleukin-6 and alpha-2 macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab invest* 66: 1633-1639
- Streit WJ**, Kreutzberg GW (1987) Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 16: 249-260
- Streit WJ** (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-139

- Strong MJ**, Kesavapany S, Pant HC (2005) The Pathobiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Proteinopathy? *J Neuropathol Exp Neurol* 64(8): 649-664
- Suzuki A**, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 193: 471-481
- Tortarolo M**, Crossthwaite AJ, Conforti L, Spencer JP, Williams RJ, Bendotti C, Rattray M (2004) Expression of SOD1 G93A or wild-type SOD1 in primary cultures of astrocytes down-regulates the glutamate transporter GLT-1: lack of involvement of oxidative stress. *J Neurochem* 88 (2): 481-493
- Traynor BJ**, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, Cudkovicz ME (2006) Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology* 67(1): 20-27
- Troost D**, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JM (1990) Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 16(5): 401-410
- Turner MR**, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004) Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15(3): 601-609
- Vanoni C**, Massari S, Losa M, Carrega P, Perego C, Conforti L (2004) Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Cell Sci* 117(22): 5417-5426
- Vinson CR**, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR, Bonovich M (2002) Classification of human b-ZIP proteins based on dimerization properties *Mol Cell Biol* 22(18): 6321-6335
- Wang J**, Campbell IL (2002) Cytokine Signaling in the Brain: Putting a SOCS in It? *J Neuroscience Res* 67: 423-427
- Wormald S**, Hilton DJ (2004) Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279: 821-824
- Wesemann DR**, Dong Y, O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN (2002) Suppressor of Cytokine Signaling 1 Inhibits Cytokine Induction of CD40 Expression in Macrophages. *J Immunol* 169: 2354-2360
- Weydt P**, Möller T (2005) Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 16(6): 527-531
- Wu KK** (2003a) Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. *Thrombos Res* 110: 273-276
- Wu KK** (2003b) Aspirin and other cyclooxygenase inhibitors: new therapeutic insights. *Semin Vasc Med* 3(2): 107-112
- Wu KK**, Liou JY, Cieslik K (2005) Transcriptional Control of COX-2 via C/EBP β . *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 25: 679-685
- Xie Y**, Weydt P, Howland DS, Kliot M, Möller T (2004) Inflammatory mediators and growth factors in the spinal cord of G93A SOD1 rats. *Neuroreport* 15(16) 2513-2516
- Xiong W**, Hsieh CC, Kurtz AJ, Rabek JP, Papaconstantinou J (2001) Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nucleic Acids Res* 29: 3087-3098
- Yasukawa H**, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS-3 in macrophages. *Nat Immunol* 4: 551-556
- Zheng C**, Nennesmo I, Fadeel B, Henter JI (2004) Vascular endothelial growth factor prolongs survival in transgenic mouse ALS model. *Ann Neurol* 56(4): 564-567

7 Anhang

7.1 Lösungen und Puffer

MOPS- Puffer

10x MOPS- Puffer enthält 0,4 M MOPS, 0,1 M NaOAc und 10 mM EDTA (jeweils bei pH 7,0).

Zur Herstellung von 1 Liter 10x MOPS- Puffer werden benötigt:

83,72 g MOPS

8,20 g NaOAc

2,92 g EDTA

Die Substanzen werden in entionisiertem Wasser gelöst.

OD- Pufferlösung

OD- Pufferlösung enthält 50 mM Tris- Puffer und 0,1 mM EDTA (jeweils bei pH 7,5).

Zur Herstellung von 1Liter OD- Puffer werden benötigt:

7,88 g Trispuffer

0,03 g EDTA

Die Substanzen werden in entionisiertem Wasser gelöst.

Probenmischung zur DNase- Behandlung der RNA- Proben

Die folgenden Reagenzien werden in einem für die Zentrifuge passenden 1.5 ml Reagenzglas angemischt:

500 µl Total RNA (1 mg/ml)

100 µl 10x DNase I Puffer

50 µl DNase I (1 Einheit/µl)

350 µl entionisiertes Wasser

SSC- Puffer Stammlösung

20x SSC- Puffer Stammlösung enthält 3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat

Für 1 Liter Stammlösung werden benötigt:

175,32 g NaCl

88,23 g Natriumcitrat

Die Substanzen werden in entionisiertem Wasser gelöst.

Proteinextraktionslösung

Complete™ -Mini (Proteaseinhibitor): 1 Tablette wird in 1,5ml entionisiertem Wasser gelöst

Für eine 3x konzentrierte Lösung werden verwendet:

200 µl RIPA- Puffer

100 µl Complete™ -Mini-Lösung

Proteinbestimmung mittels Roti®-Nanoquant Färbelösung

Für die Bestimmung der Proteinmenge in einem Zelllysate werden benötigt:

200 µl entionisiertes Wasser

1 µl Protein- Probenlösung

auf

160 µl entionisiertes Wasser

640 µl Roti®-Nanoquant

Laufreagenz für die Elektrophorese

	<i>reduzierte Probe:</i>	<i>nicht-reduzierte Probe:</i>
Probe	x µl	x µl
NuPAGE® LDS Probenpuffer	10 µl	10 µl
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10 x)	4 µl	--
entionisiertes Wasser	Bis zu 26 µl	Bis zu 30 µl
Gesamtvolumen	40 µl	40 µl

Anschließend die Proben für 10 Minuten bei 70°C erhitzen

NuPAGE®SDS Laufpuffer

40 ml MOPS SDS Laufpuffer

760 ml entionisiertes Wasser

NuPAGE® Transfer Puffer

Zur Herstellung von 1 Liter 1x NuPAGE® Transfer Puffer werden benötigt:

50 ml 20x NuPAGE® Transfer Puffer

100 ml Methanol

850 ml entionisiertes Wasser

PBS-Stammlösung

10x PBS enthält 1,3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄ und 30 mM NaH₂PO₄.

Zur Herstellung von 1 Liter 10x PBS werden benötigt:

75,79 g NaCl

9,93 g wasserfreies Na₂HPO₄

4,68 g NaH₂PO₄·xH₂O

Die Substanzen werden in entionisiertem Wasser gelöst.

PBS-TWEEN® 20 Lösungs- und Waschpuffer

0,1% PBS-T enthält:

500 ml 1x PBS-Lösung

500 µl TWEEN® 20

Blocking-Lösung:

Zur Herstellung einer 100ml Milchpulverlösung von 5% werden verwendet:

5 g fettarme Trockenmilch
100 ml PBS-TWEEN®20 Lösungspuffer

Milchpulver- PBS-TWEEN- Lösung zur Antikörperverdünnung beim Western Blot:

Für 5 ml Milchpulver- PBS-TWEEN- Lösung werden benötigt:

500 µl Milchpulverlösung (Blocking-Lösung)
4500 µl PBS-TWEEN® 20 Lösungs- und Waschpuffer

BSA- Blocking Lösung für Immunhistochemie

Für 10 ml einer 2 % BSA-Lösung werden benötigt:

10 ml 1x PBS-Lösung
0,2 g BSA

Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Lösung für Immunhistochemie

Für eine 0,3 % H₂O₂- Lösung werden benötigt:

50 ml 1xPBS-Lösung
500 µl H₂O₂ (30%)

ABC-Lösung für Immunhistochemie:

5 ml 1x PBS-Lösung
2 Tropf. Vectastain Reagent A
2 Tropf. Vectastain Reagent B
Die Lösung soll 30 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubieren

Farbsubstrat für Immunhistochemie

13 µl H₂O₂
200 mg NiSO₄
250 µl DAB
auf 10 ml 1x PBS- Lösung

PBS/EDTA- Gemisch für die Zellkultur

Für eine 0,16 %- Lösung werden benötigt:

80 mg EDTA
auf
500 ml PBS (DULBECCO'S)

BSA- Lösung für die Zellkultur

Für eine 4 %- Lösung werden benötigt:

0,8 g BSA

auf

20 ml PBS/EDTA- Gemisch

Vollmedium für die Zellkultur

Für 50,65 ml Vollmedium werden benötigt:

1,25 ml NaHCO₃ (7,5 %)

2,5 ml Glucose (7,2 %)

1 ml Pferde- Serum (2 %)

500 µl Penicillin/Streptomycin-Gemisch

auf 45,4 ml L-15 Medium

Histodenz™- Lösung für die Zellkultur

Für 5 ml einer 6,8 %- Lösung werden benötigt:

0,34 g Histodenz™

auf

5 ml PBS/EDTA- Gemisch

MEM Alpha Medium- Pen/Strep- Gemisch

5 ml Pen/Strep- Gemisch

auf

500 ml MEM-Alpha Medium (Gibco)

7.2 Nachweis der verwendeten Biochemika

Complete™-Mini Proteaseinhibitor:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Best.-Nr. 1.836.153
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. A 9539
Bromophenol Blue Dye	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 11,439-1
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. A 2153-50G
C ₄ H ₁₁ NO ₃ x HCl (Trispuffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. T 3253
CH ₃ COONa (NaOAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. S 2889
DNase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Best.-Nr. 1.284.932
ECL Western blotting	Amersham Biosciences, Freiburg, Best.-Nr. RPN2106-V1/V2
Detection Reagent 1 und 2	
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. ED
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 24,511-9
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. E 8751
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. F 8775
Formamide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. F 9037
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. G 7021
H ₂ O ₂ – Wasserstoffperoxid 30%- Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. H 1009
HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. H 0636
Histodenz™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. D 2158
Hybridization buffer 5 ml (salt- based)	MWG Biotech, Ebersberg, Best.-Nr. 1180 - 200000
Jung – Tissue Freezing Medium®	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Best.-Nr. 0201 06926
KAISERS Glyceringelatine	E. Merck, Darmstadt
KCl	E. Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.04938.0500
L-15 Medium (Leibovitz) liquid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. L 1518
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. LC5602
MEM-Alpha Medium (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. 22571-020
Methanol	E. Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.06009.2500
MgCl ₂	E. Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 8.14733.0500
Milchpulver - Blotting grade	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Best.-Nr. T 145.1
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 69947
MWG Inflammation Array - Human	MWG Biotech, Ebersberg, Best.-Nr. 2188
MWG Inflammation Array - Mouse	MWG Biotech, Ebersberg, Best.-Nr. 2189
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei):	E. Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.06566.0500
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 71376
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 71505
NaHCO ₃ (7,5 % Lsg.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. S 8761
NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 72082
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 71402
NiSO ₄ x 6H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. N 4882
Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich (0,2 µm Pore Size, 20/pk.):	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. LC2000
NuPAGE® LDS Probenpuffer:	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. NP0007
NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer:	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. NP0001
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel:	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. NP0322BOX
NuPAGE® Transferpuffer:	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. NP0006-1
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. NP0005
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Best.Nr. NP0004
Paraformaldehyd (CH ₂ O) _n	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 76240
PBS DULBECCO'S (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. 14190-094
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. 15140-148
Poly-L-Lysine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. P 8920
Polyornithin (PORN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. P 4957
PVDF Membrane Filter Paper Sandwich (0,2 µm Pore Size, 20/pk.)	Invitrogen, Karlsruhe, Best.-Nr. LC2002
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Best.-Nr. 28104
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. R 0278
Roti®-Nanoquant:	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Best.-Nr. K880.2
TE- Puffer (Tris-EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. 93302
TWEEN® 20:	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Best.-Nr. P 1379
Vectastain ABC-KIT	Vector Lab. Inc., Burlingame, CA- USA

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Borasio für die großzügige Unterstützung dieser Dissertation bedanken.

Zu besonders herzlichem Dank bin ich Frau Dr. Anneser verpflichtet, für die freundliche Überlassung des Themas, das ausgezeichnete Engagement in der Betreuung, sowie die ausnahmslos fruchtbaren Diskussionen und Beratungen in allen Stadien der Entstehung dieser Arbeit. Insbesondere danke ich Frau Dr. Anneser für die beispielgebende Vermittlung von Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten.

Besonders hervorgehoben sei auch die enorme Hilfsbereitschaft und Motivation von Frau Christine Chahli. Ich danke ihr auf das Herzlichste für die außerordentliche Unterstützung bei der Laborarbeit. Überdies danke ich Frau Chahli für die immerwährend anregenden und herzlichen Gespräche.

Herrn PD Dr. Lorenzl danke ich ebenfalls für die stete und überaus freundliche Hilfsbereitschaft, die Überlassung des Tiermodells und die dafür notwendige Vermittlung des Verständnisses in praktischer und theoretischer Hinsicht.

Außerdem möchte ich mich aufrichtig bei Frau Franziska Anneser bedanken, für die zahlreichen ermutigenden und hilfreichen Gedankenaustausche und nicht zuletzt für die äußerst freundliche Unterstützung.

Namentlich möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. Hecht für seine freundliche Unterstützung in Sachen EDV bedanken.

Bei den übrigen Mitarbeitern der Neurologischen Klinik im Forschungslabor A des Klinikums Großhadern bedanke ich mich für deren allzeit kollegiale Hilfe.

Abschließend möchte ich dafür danken, dass es mir ermöglicht wurde, mit Motivation und Freude diese Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen.

Lebenslauf

Steffen Franz

Geburtsdatum: 27. März 1979

Geburtsort: Dachau

Familienstand: ledig

Ausbildung

Seit Juli 2006 Assistenzarzt in Weiterbildung und Wissenschaftlicher Assistent
Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg

*Oktober 2001 –
April 2006* Approbation als Arzt am 28.04.2006
Technische Universität München
3. Staatsexamen im April 2006
2. Staatsexamen im August 2004
1. Staatsexamen im August 2002
Klinisches Studium der Humanmedizin

*Oktober 1999 –
September 2001* Ludwig - Maximilians - Universität München
Physikum im August 2001
Vorklinisches Studium der Humanmedizin

*September 1989 –
Juni 1998* Louise - Schroeder - Gymnasium München
Abitur im Juni 1998

*September 1985 –
August 1989* Grundschule an der Grandlstraße München

Wehrersatzdienst

*August 1998 –
September 1999* Katholische Pfarrgemeinde Leiden Christi München Obermenzing