

Aus der Abteilung Neurologie  
der Medizinischen Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor Prof. Dr. med. K. Fassbender

**Steigerung des neurotoxischen Potentials von Mikroglia  
durch Expression einer ALS-assoziierten SOD1-Mutante**

Dissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2013

Vorgelegt: von Alik Dawson  
geboren in Cotonou (Benin)

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| I. Zusammenfassung .....  | 1  |
| II. Einleitung.....   | 2  |
| 1. Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) .....   | 2  |
| 1.2 Diagnose.....   | 3  |
| 1.3. Klinik .....   | 5  |
| 1.4 Pathologie .....  | 5  |
| 1.5 Therapie.....   | 6  |
| 1.5.1 medikamentöse Therapie .....  | 6  |
| 1.5.2 Symptomatische Therapie.....  | 7  |
| 2. Amyotrophe Lateralsklerose und Inflammation.....   | 8  |
| 3. Amyotrophe Lateralsklerose und Mikroglia .....   | 8  |
| 4. Amyotrophe Lateralsklerose und die Superoxiddismutase .....  | 10 |
| 5. Amyotrophe Lateralsklerose und ROS.....  | 13 |
| 6. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit: .....  | 16 |
| III. Material und Methoden.....   | 17 |
| 1. Geräte.....  | 17 |
| 2. Materialien .....  | 19 |
| 2.1. Verbrauchsmaterialien .....  | 19 |
| 2.2 Chemikalien und Reagenzien.....   | 20 |
| 2.3 Stimulantien.....   | 21 |
| 2.4 ELISA .....   | 21 |
| 2.5 Antikörper .....  | 22 |
| 2.6 Puffer und Lösungen .....   | 22 |
| 3. Methoden .....   | 25 |
| 3.1. Zellkultur.....  | 25 |
| 3.1.1 Steriles Arbeiten .....   | 25 |
| 3.1.2 Etablierung der Zelllinien .....  | 26 |
| 3.1.3 Kulturbedingungen .....   | 26 |
| 3.1.4 Passage der Zellkulturen.....   | 27 |
| 3.1.5 Trypanblau-Exklusionstest und Bestimmung der Zellmenge.....   | 27 |
| 3.1.6 Zellstimulation.....  | 28 |
| 3.2 Messungen.....  | 33 |
| 3.2.1 Detektion der Zytokinproduktion von aktivierten Makrophagen mittels<br>ELISA (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) ..... | 33 |
| 3.2.2 Nachweis von TNF- $\alpha$ -Sekretion .....   | 35 |
| 3.2.3 Nachweis von IL-6-Sekretion.....  | 37 |
| 3.2.4 Nachweis von NO.....  | 38 |
| 3.2.5 Wasserstoffperoxid-Bestimmung per Fluoreszenz .....   | 39 |
| 3.2.6 Kolometrische Messung der freien Thiolgruppen mittels Ellmans<br>Reagenz.....   | 40 |
| 3.3 Westernblot-Analyse .....   | 41 |
| 3.3.1 Zellyse .....   | 42 |
| 3.3.2 Bradford-Test .....   | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.3 Herstellung eines Sammelgels .....  | 45 |
| 3.3.4 Elektrophorese .....  | 45 |
| 3.3.5 Wet-Transfer .....  | 46 |
| 3.3.6 Markierung der Proteinbanden .....  | 46 |
| 4. Statistische Auswertung .....  | 47 |
| IV. Resultate .....   | 48 |
| 1. Stabile Überexpression der SOD1 und mSOD1 .....  | 48 |
| 2. Die SOD1-Mutation G93A verstärkt die auf dem TLR2-Weg induzierte TNF- $\alpha$ -<br>Sekretion der Mikroglia .....  | 49 |
| 3. Die Generierung von Stickstoffoxid ist nach Stimulation durch<br>PamCys3-SKXXX nicht signifikant erhöht.....   | 54 |
| 4. Das mutierte SOD1-Gen G93A führt zu einer Erhöhung des oxidativen<br>Stresses in Form von erhöhter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung und zu einer erhöhten<br>Sekretion von TNF- $\alpha$ nach Stimulation über den TLR2-Weg..... | 55 |
| V. Diskussion.....  | 57 |
| VI. Limitation der Arbeit .....   | 67 |
| VII. Literaturverzeichnis .....   | 68 |
| VIII. Abkürzungsverzeichnis .....   | 74 |
| IX. Danksagung .....  | 74 |
| X. Lebenslauf.....  | 76 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Schema zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit der Diagnose<br>einer ALS nach revidierten El-Escorial-Kriterien 1998..... | 4  |
| Tabelle 1: SOD1-Varianten.....   | 12 |
| Abbildung 2: Aktivierung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in<br>Phagozyten durch die Phox-Regulator-Proteine.....       | 14 |
| Abbildung 3: Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies .....   | 15 |
| Tabelle 2: Geräte .....  | 17 |
| Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....   | 19 |
| Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien .....  | 20 |
| Tabelle 5: Stimulantien .....  | 21 |
| Tabelle 6: ELISA.....  | 21 |
| Tabelle 7: primäre Antikörper .....  | 22 |
| Tabelle 8: sekundäre Antikörper.....   | 22 |
| Tabelle 9: Puffer und Lösungen.....  | 22 |
| Tabelle 10: Elektrophorese.....  | 23 |
| Tabelle 11: Zellkultur .....   | 24 |
| Abbildung 4: N-Acetyl-Cystein .....  | 30 |
| Tabelle 12: Versuchsaufbau .....   | 32 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 5: schematischer ELISA-Aufbau .....  | 34 |
| Abbildung 6: TNF- $\alpha$ -Verdünnungsreihe.....  | 36 |
| Abbildung 7: NO-Assay schematische Darstellung der Farbreaktion .....  | 38 |
| Abbildung 8: NO-Reaktion und seine Metaboliten .....   | 39 |
| Abbildung 9: Ellman`s Reagenz Reaktionsschema .....  | 41 |
| Abbildung 10: BSA-Verdünnungsreihe .....   | 44 |
| Abbildung 11: Resultat-Überexpression von SOD1 und mSOD1 .....   | 48 |
| Abbildung 12 : Sezernierung von TNF- $\alpha$ nach Stimulation durch<br>Pam3Cys-SK... ..   | 49 |
| Abbildung 13: Sezernierung von IL-6 nach Stimulation durch Pam3Cys-SK... ..  | 50 |
| Abbildung 14: Sezernierung von TNF- $\alpha$ nach Stimulation durch LPS .....  | 51 |
| Abbildung 15: Sezernierung von IL-6 nach Stimulation durch LPS .....   | 52 |
| Abbildung 16: Sezernierung von TNF- $\alpha$ und IL-6 nach Stimulation durch Poly(I:C) .   | 53 |
| Abbildung 17: Sezernierung von NO nach Behandlung mit Pam3Cys .....  | 54 |
| Abbildung 18: Messung von reaktiven Sauerstoffspezies, antioxidativer Kapazität,<br>TNF- $\alpha$ -Sezernierung unter Gabe von Antioxidantien..... | 55 |
| Abbildung 19: TLR2 induzierte Generierung von ROS mit konsekutiver TNF- $\alpha$ -<br>Sezernierung .....   | 66 |

## I. Zusammenfassung

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des 1. u. 2. Motoneurons. Aktivierte Mikroglia, die Träger einer Superoxiddismutase-1 (SOD1)-Mutante sind und diese überexprimieren, stehen im Verdacht an dem Untergang der Motoneuronen beteiligt zu sein. Der genaue Mechanismus, wie die Expressierung der SOD1-Mutante die Aktivierung der Mikroglia beeinflusst und zu einer konsekutiven Zellschädigung der Motoneurone führt, ist noch nicht ganz geklärt.

In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden drei transgene Zelllinien und deren unterschiedliche Reaktionen auf Entzündungsreize untersucht. Zum einen eine Mikrogliazellreihe, die Träger der SOD1-Mutante G93A war, zum anderen eine Mikrogliazellreihe, welche die Wildtyp-SOD1 exprimierte. Als zusätzliche Kontrollzellreihe dienten Mikroglia, die keinerlei SOD1-Expressierung aufwiesen.

Nach Gabe verschiedener Stimuli (PamCys3-SK444, LPS, I:OPoly) deren Signalwege über unterschiedliche Toll-like-Rezeptoren (TLR2, -3 und -4) verlaufen, wurde die konsekutive Sezernierung von TNF- $\alpha$ , IL-6 der einzelnen Zellreihen miteinander verglichen.

Dabei konnte festgestellt werden, dass bei den Trägern der SOD1-Mutante, nach Stimulation mit PamCys3-SK444, welche den TLR2-Signalweg aktiviert, im Vergleich zu den anderen Zellreihen eine signifikant erhöhte Ausschüttung an TNF- $\alpha$  und eine signifikant verminderte Ausschüttung von IL-6 stattfand.

Gleichzeitig konnte nach dieser Stimulation bei den Mutationsträgern eine ebenfalls signifikant erhöhte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und eine verminderte antioxidative Kapazität nachgemessen werden. Interessanterweise war der Effekt der erhöhten TNF- $\alpha$ -Sezernierung nach Gabe von Antioxidantien, welche die ROS-Generierung verminderten, reversibel. Diese Beobachtung führt im Zusammenhang mit neuen Erkenntnissen über das Zusammenspiel zwischen der NADPH-Oxidase und der mutierten SOD1, zu folgender Schlussfolgerung:

Die Expression der mutierten SOD1 begünstigt nach Aktivierung über den TLR2-Signalweg durch die vermehrte Entstehung von ROS eine erhöhte mikrogliale neurotoxische Entzündungsantwort.

## **II. Einleitung**

### **1. Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)**

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine degenerative Systemerkrankung des motorischen Systems. Sie ist durch die Erkrankung des ersten und zweiten motorischen Neurons mit konsekutiver Degeneration und Zelltod der Motoneurone sowohl im Motorcortex und Hirnstamm als auch im Rückenmark charakterisiert. Sie manifestiert sich durch eine progrediente Muskelschwäche mit Atrophie der beteiligten Skelettmuskulatur und durch ein gleichzeitiges Auftreten von Faszikulationen, Spastik und gesteigerten Reflexen. Die Überlebensdauer umfasst eine Bandbreite zwischen 1-20 Jahren, wobei die mittlere Überlebensdauer 3-5 Jahre beträgt. Als prognostischer Faktor hat sich das Alter, in dem die Krankheit zum Ausbruch gelangt, herauskristallisiert. Die Patienten, die vor der fünften Lebensdekade erkranken, zeigen eine geringere Überlebensrate als diejenigen, welche danach erkranken [1]. Letztendlich führt eine respiratorische Insuffizienz zum Tod der Patienten, da eine wirkungsvolle medikamentöse Therapie bisher noch nicht verfügbar ist. Die ALS nimmt in der Häufigkeit des Auftretens mit dem Alter zu, wobei der Häufigkeitsgipfel in der 6. und 7. Lebensdekade liegt. Männer erkranken etwas öfter als Frauen. Diese Diskrepanz ist allerdings altersspezifisch und sinkt kontinuierlich mit steigendem Lebensalter. In der Gruppe der unter 49 jährigen beträgt die Ratio noch 3,9:1, während in der Gruppe der über 55 jährigen die Ratio auf 1,6:1 gesunken ist [2]. In der Literatur wird die europaweite Inzidenz auf ungefähr 2,6 per 100 000 geschätzt. In der großen Mehrzahl der Fälle tritt die ALS sporadisch (SALS) auf. Ging man bisher davon aus, dass sie bei ca. 10 % aller Patienten einem autosomal-dominanten Erbgang folgt, konnte eine Meta-Analyse von 38 Veröffentlichungen zeigen, dass die Rate der familiären ALS (FALS)

eher im Bereich von 5,1% angesiedelt ist [3]. Innerhalb dieses eher kleinen Patientenkollektivs konnte wiederum bei ca. 20 % eine Mutation des SOD1-Gens, das auf dem langen Arm des Chromosoms 21 liegt (21p22), und für die humane Kupfer-Zink-Superoxiddismutase kodiert, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu finden sich SOD1-Mutationen in nur 3% der Fälle bei der SALS [4-5]. Es bleibt zu erwähnen, dass beide Formen der ALS klinisch nicht voneinander unterscheidbar sind und auch in weiteren pathophysiologischen Merkmalen sich gleichen [6].

## 1.2 Diagnose

Die Diagnose der ALS basiert größtenteils auf klinischen Zeichen. Hauptkriterien sind Zeichen der unteren und der oberen Motoneuronenschädigungen, sowie das Fortschreiten der Krankheit und das Fehlen alternativer Erklärungen. 1990 wurden von der worldfederation of neurologists (WFN) die 1998 überarbeiteten und bis heute in Gebrauch stehenden El Escorial-Kriterien definiert [7-8].

Die El-Escorial-Kriterien der World Federation of Neurology (WFN) fordern in ihrer überarbeiteten Form von 1998 für die Diagnose einer ALS den Nachweis von:

1. Zeichen der Degeneration des zweiten Motoneurons (klinisch, elektrophysiologisch oder neuropathologisch)
2. Zeichen der Degeneration des ersten Motoneurons (klinisch)
3. Progredienz der Symptome in einer Region oder Ausweitung auf andere Regionen

Nicht nachweisbar dürfen sein:

1. Elektrophysiologische bzw. pathologische Hinweise anderer Erkrankungen, die die Zeichen des ersten bzw. zweiten Motoneuron erklären könnten
2. Nachweise anderer Erkrankungen in der Bildgebung, die die beobachteten Symptome erklären könnten.

Unglücklicherweise vergeht auch heute immer noch meist 1 Jahr zwischen Ausbruch der Krankheit und der Diagnosestellung [9].

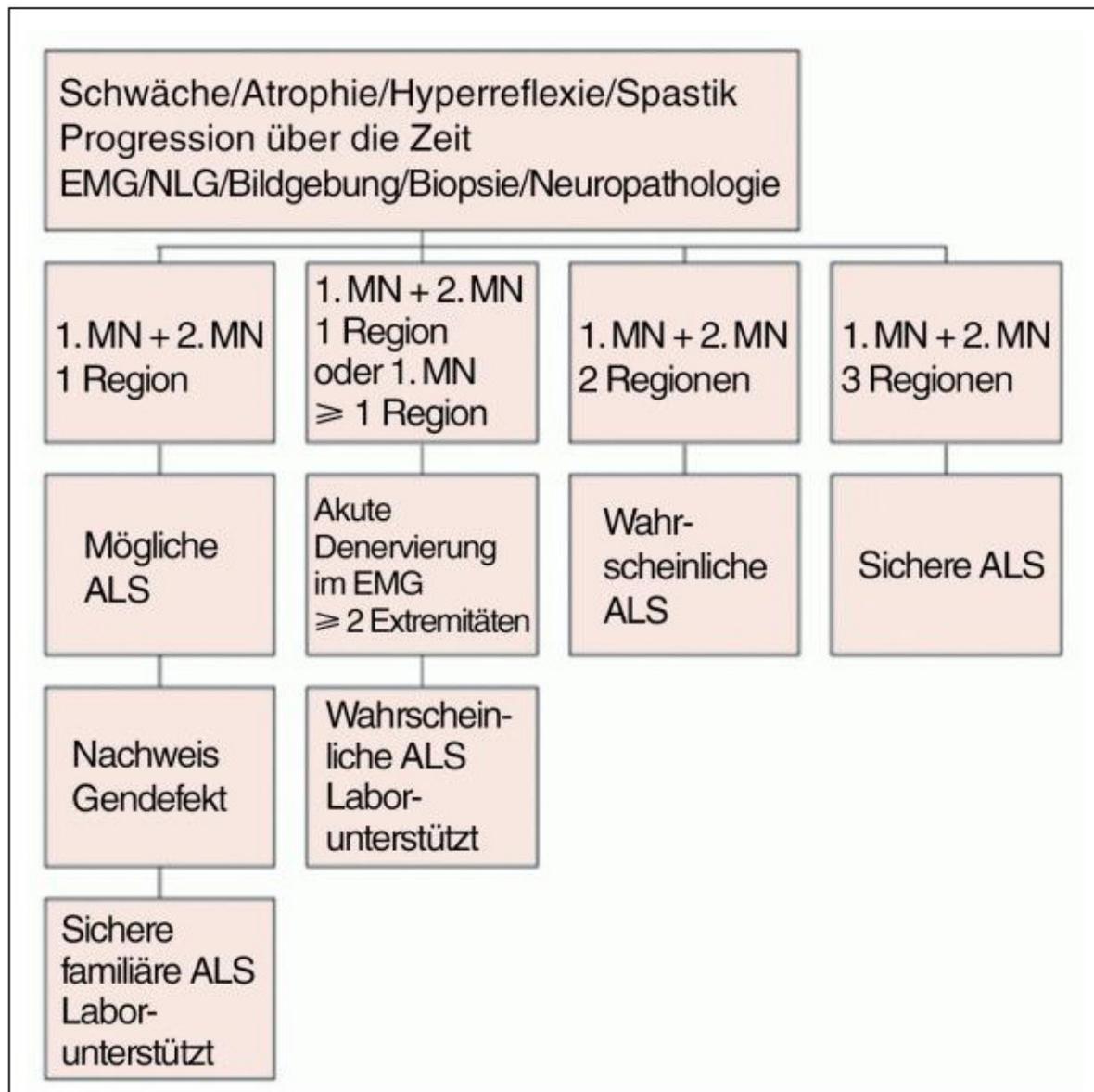


Abbildung 1: Schema zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit der Diagnose einer ALS nach revidierten El-Escorial-Kriterien 1998 (ALS: Amyotrophe Lateralsklerose; EMG: Elektromyographie; MN: Motoneuron)

Quelle: Körner et al, Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 2011; 12 (2): 124-128

### **1.3. Klinik**

Klinisch manifestiert sich der selektive Verlust der Motoneuronen durch eine progressive Parese der Bulbus-, Extremitäten-, und der Atemmuskulatur. Zu Anfang kann sich die Krankheit durch nicht-spezifische Muskelkrämpfe,- zuckungen und einer unbestimmten Schwäche und Müdigkeit manifestieren. Die „klassische“ Form der ALS, auch spinale ALS genannt, äußert sich initial durch eine Schwächung der Muskelgruppen der oberen Extremitäten, kann jedoch ebenfalls in den unteren Extremitäten auftreten. Diese Patienten präsentieren manchmal Gang-schwierigkeiten, wie z.B. ein leicht hinterhergezogenes Bein. In ca. 25% tritt initial eine Schädigung der Bulbus-innervierten Muskulatur auf (bulbäre ALS) [10]. Bulbärsymptome können z.B. Sialorrhoe, Dysarthrie und Dysphagie oder pathologisches Lachen und Weinen sein [8]. Lange Zeit galt die Annahme, dass die sensorischen und kognitiven Funktionen in den meisten Fällen unbeeinträchtigt bleiben. Heute steht allerdings fest, dass frontotemporale Dysfunktionen keine Seltenheit sind und den motorischen Symptomen vorausgehen oder nachfolgen können. Auch haben detaillierte neurophysiologische Untersuchungen an ALS-Patienten in bis zu 20% der Fälle eine Beteiligung des sensorischen und vegetativen Nervensystems festgestellt [11-12]. Bei der klinischen Untersuchung kann man sowohl Zeichen der unteren Motoneuronenschädigung wie Paresen, Muskelatrophien und Faszikulationen, als auch Zeichen der oberen Motoneuronen-schädigung wie Hyperreflexie, erhöhter Muskeltonus, positives Babinski- und Hoffman-Zeichen feststellen.

### **1.4 Pathologie**

Der Befall des ersten motorischen Neurons manifestiert sich in einer Atrophie und Demyelinisation des Tractus corticospinalis, wobei in der Regel die Veränderungen im Rückenmark und im unteren Hirnstamm besonders ausgeprägt sind. In späten Stadien kann auch die supratentorielle Pyramidenbahn im Bereich der inneren Kapsel und des Gyrus praecentralis eine Atrophie aufweisen. Der Befall des zweiten motorischen

Neurons äußert sich in einem progredienten Ganglienzellverlust der motorischen Hirnnervenkerne und spinalen Vorderhörner. Auf zellulärer Ebene finden sich in den Motoneuronen von ALS-Patienten Bunina-Körperchen und Neurofilamenteinschlüsse. Auch ist sowohl bei den post mortem Gehirnen von ALS-Patienten als auch von mSOD1-Mäusen eine erhebliche Inflammation des Nervengewebes einschließlich der Präsenz von aktivierten Mikroglia/Makrophagen und eingewanderten T- und Mastzellen beschrieben [13]. Die beschriebenen pathologischen Korrelate treten sowohl bei der SALS als auch bei der FALS auf.

## **1.5 Therapie**

### **1.5.1 medikamentöse Therapie**

Bisher gibt es noch keine wirklichen Behandlungsmöglichkeiten, so dass sich die Therapie auf rein supportive Maßnahmen beschränkt. Als einziges Medikament, das bisher das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen konnte, sei Riluzol genannt, welches als Glutamat-Inhibitor die durch Glutamat hervorgerufene Exzitotoxizität herabsenkt. Dennoch ist der genaue Wirkmechanismus dieses Medikaments hinsichtlich seiner Anwendung in der ALS-Therapie nicht bekannt, da andere Glutamat-inhibitoren keine Wirkung zeigen. Riluzol ist als einziges Medikament für diese Indikation zugelassen. Jedoch beschränkt sich der Therapieerfolg auf eine Verlängerung der Überlebenszeit um wenige Monate [14]. Die Behandlung mit Minocyclin, welche durch die im Tiermodell erlangten Resultate anfangs als vielversprechend gehandelt wurde, konnte in den klinischen Studien die Erwartungen nicht erfüllen [15]. Eine mit Lithium, dem eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird, durchgeführte Studie, die als Ergebnis das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen konnte, ist aufgrund der geringen Teilnehmerzahl und der fehlenden Verblindung wenig aussagekräftig und bedarf weiterer Untersuchungen [16].

### **1.5.2 Symptomatische Therapie**

Die Basistherapie der muskulären Schwäche stellt die regelmäßige und intensive Krankengymnastik auf neurophysiologischer Grundlage dar. Je nach Beschwerdesymptomatik kommen hier bestimmte physiotherapeutische Konzepte wie die propriozeptive Neurofaszilitation (PNF) oder das Bobath-Konzept zum Tragen. Zusätzlich empfehlen sich abgestimmt auf die Symptome die ergotherapeutische Behandlung zum Funktionserhalt der Handfunktion und der Feinmotorik, die logopädische Therapie zum Funktionserhalt von Schluck- und Sprechfunktion, sowie gegebenenfalls auch die Atemtherapie zur Unterstützung des Abhustens, der Sekretmobilisierung und der Hustenfunktion. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Überlebensdauer sind der Ernährungszustand und der Gewichtsverlust. Malnutrition und Gewichtsverlust können unter anderem Folge der eintretenden Dysphagie und des durch die eintretende respiratorische Insuffizienz induzierten Hypermetabolismus sein. In diesem Fall ist die Anlage einer PEG-Sonde indiziert.

Die meisten Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine Schwäche der Atemmuskulatur mit Behinderung des Gasaustausches der Lunge. Frühsymptome können sein: Atemnot bei leichter körperlicher Belastung oder im Liegen, allgemeine Abgeschlagenheit, Tagesmüdigkeit, Konzentrationsstörungen, Schlafstörungen und morgendliche Kopfschmerzen. Die nichtinvasive Maskenbeatmung bewirkt eine direkte Verbesserung der Symptome und somit der Lebensqualität, darüber hinaus eine Verlängerung der Überlebenszeit. Affektstörungen wie pathologisches Weinen oder Lachen werden je nach Leidensdruck des Patienten behandelt. Diese Automatismen laufen ohne wesentliche emotionale Beteiligung bei geringen Auslösern (z.B. Frage nach dem Befinden) ab. Hier gelten die gleichen therapeutischen Prinzipien wie bei depressiven Symptomen. Zum Einsatz kommen hier vorrangig Substanzen wie Amitriptylin und Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, die im Einzelfall durch psychotherapeutische Verfahren ergänzt werden können [17].

## **2. Amyotrophe Lateralsklerose und Inflammation**

Auch wenn die ALS nicht zu den immunologischen Störungen im klassischen Sinne zählt, so ist doch die Beweislage eindeutig, nämlich dass Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle in den pathophysiologischen Prozessen der Krankheit spielen. Der cerebrospinale Liquor von Patienten mit ALS enthält erhöhte proinflammatorische Mediatoren [18]. Die histologische Aufarbeitung von postmortem Gehirngewebe weist aufgrund der Präsenz von aktivierten Mikroglia/Makrophagen und eingewanderten T- und Mastzellen auf eine erhebliche Inflammation des Nervengewebes hin [19]. In transgenen Mäusen und Ratten, die eines der humanen Mutationen des Gens SOD1 (z. B. G37R oder G93A) überexprimieren und somit als Tiermodelle der ALS fungieren, findet man ebenso Anzeichen entzündlicher Reaktionen. Selbst in den anfänglichen Stadien der Krankheit, bevor die klinischen Zeichen als Symptom der Motoneuronschädigungen sichtbar werden, befinden sich die Makrophagen in einem frühen Zustand der Aktivierung und die Werte der entzündlichen Mediatoren sind erhöht. Bei Ausbruch der Symptome und dem Untergang der Motoneuronen beobachtet man vollständig aktivierte Makrophagen, welche proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  ausschütten [20]. Der Grund für diese Entzündungsreaktionen ist unklar. Jedoch weist das Vorhandensein der Entzündung vor Beginn der Symptomatik durch Verlust an Motoneuronen darauf hin, dass sie zur Neurodegeneration beiträgt und nicht nur eine Reaktion auf den Untergang derselben ist. Medikamente, wie z.B. Minocyclin oder COX-2-Hemmer, welche die mikrogliale Aktivierung verhindern können, haben, zumindest im Tiermodell bei mSOD1-transgenen Mäusen, den Ausbruch und das Fortschreiten der Krankheit hinausgezögert [21].

## **3. Amyotrophe Lateralsklerose und Mikroglia**

Mikrogliazellen, die im zentralen Nervensystem ansässigen Makrophagen, stellen ca. 12 % der Gesamtzellzahl des Gehirns dar [22] und spielen eine Schlüsselrolle in der

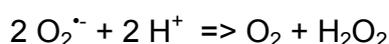
Neuroinflammation [23]. Wie aus dem Namen bereits abgeleitet werden kann, handelt es sich bei den Mikroglia um die kleinsten Gliazellen. Mikroskopisch sieht man schmale, lang gestreckte Zellen, die einen irregulären, länglichen Zellkern mit dichtem Chromatin besitzen. Die Zellfortsätze können fein und sehr verzweigt sein. Mikroglia-Zellen sind in der Lage, sich amöboid fortzubewegen. Dank ihrer hohen Motilität können sie das gesamte ZNS abdecken, um Veränderungen in ihrer Umgebung zu registrieren [24]. Während der embryonalen Phase entspringen die Mikrogliazellen dem hämangioblastischen Mesoderm und wandern über die Blutgefäße in das Gehirn ein [25]. Im Erwachsenenalter wandern Vorläufer von aus dem Knochenmark stammenden Myeloidzellen ins ZNS ein, um dort entweder zu perivaskulären Makrophagen oder gelegentlich Mikrogliazellen zu werden. Das legt den Schluss nahe, dass ein gewisses Kontingent an perivaskulären Makrophagen und Gliazellen ständig durch neu einwandernde myeloische Vorläuferzellen ersetzt wird [26-28]. Das ZNS ist ein Organ, das „immunologisch privilegiert“ in dem Sinne ist, dass es an Immunreaktionen des Organismus nicht direkt beteiligt ist, da durch die Bluthirnschranke bzw. das Fehlen eines lymphatischen Systems das Einwandern von immunkompetenten Zellen normalerweise verhindert wird. Mikroglia verharren im Vergleich zu anderen Gewebemakrophagen in einem relativen Ruhezustand. Doch auch in diesem Ruhezustand verfügen die Mikroglia über ein weitverzweigtes System an zellulären Prozessen, welche den Zustand der Nachbarzellen überwachen. Mikrogliazellen reagieren auf verschiedene Arten von immunologischen Alarmsignalen. Sowohl auf endogene Faktoren wie z.B. Zytokine, Material von apoptotischen Zellen, aggregierte Proteine als auch auf exogene Faktoren wie die Glykoproteine viraler Schutzhüllen. Als Antwort auf diese verschiedenen Signale können Mikroglia in unterschiedliche Stadien der Aktivierung treten, deren letztes die vollständig funktionsbereite Phagozytosezelle ist. Sie können potentiell neurotoxische Moleküle, wie die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1, freie Radikale und Nitroxide sezernieren [29].

Bei transgenen Mäusen, die die SOD1-Mutante G93A trugen und deren Knochenmarkszellen grün-fluoreszierendes Protein exprimierten, konnte im Zuge des Fortschreitens der Krankheit, eine Rekrutierung dieser myeloischen Vorläuferzellen an den Läsionsorten beobachtet werden [30]. Anhand der klinischen Symptome der ALS kann man sehen, dass die Paralyse meist fokal beginnt, sprich den Schaden einer

streng lokalisierten Gruppe von Motoneuronen widerspiegelt und sich erst später wie ein „Buschfeuer“ weiterverbreitet, indem nahegelegene Motoneurone einbezogen werden. Nimmt man diese Ausbreitung der Motoneuronschädigung als Grundlage, so liegt der Schluss nahe, dass die neuronale Schädigung durch Aktivierung von Mikroglia mit konsekutiver Ausschüttung von neurotoxischen Faktoren verursacht wird [31]. Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass Mikroglia als Nachbarzellen der Motoneurone, deren Untergang einleiten und zum Fortschreiten der Krankheit führen. Die Arbeitsgruppe um Cleveland konnte zeigen, dass im Tiermodell mit chimärischen Mäusen, bei denen Wildtyp-Motoneuronen von mSOD1-exprimierenden Gliazellen umgeben waren, sich Aspekte der ALS-Pathologie entwickelten. Im Gegensatz dazu verzögerte sich die Neurodegeneration, bei Motoneuronen, welche eine SOD1-Mutante trugen, aber von Wildtyp-Gliazellen umgeben waren, so dass die Überlebenszeit der Mäuse signifikant erhöht war [32]. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtungen bestätigt, dass die Transplantation von Wildtyp-Myeloid-Vorläuferzellen zu einer verlängerten Überlebenszeit bei transgenen Mäusen, die die SOD1-Mutante (G93A) trugen, führte [33]. Diese Studien werfen die Fragen auf, durch welche Art und Weise die Mikroglia aktiviert werden und ob die Überexprimierung der ALS-assoziierten SOD1-Mutante die inflammatorische Antwort verstärkt.

#### **4. Amyotrophe Lateralsklerose und die Superoxiddismutase**

Die Superoxid-Dismutase (SOD1) ist ein Protein, welches ubiquitär in menschlichen Zellen exprimiert wird. Es kommt sowohl im Zellplasma als auch im Nucleus und dem mitochondrialen Intermembranraum vor, wo es als Radikalfänger fungiert, indem es zwei Superoxid-Moleküle durch Disproportionierung in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umwandelt.



Das so entstandene Wasserstoffperoxid kann im Anschluss durch Peroxidasen und Katalasen in H<sub>2</sub>O umgewandelt werden.

Das Holoprotein ist ein Homodimer, welches aus zwei Untereinheiten besteht. Jede dieser Untereinheit kann eine Disulfidbrücke ausbilden und jeweils ein Zink- und ein Kupfer-Ion in das aktive Zentrum binden. Das Gen, welches für die humane Kupfer-Zink-Superoxiddismutase kodiert, liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 21 (21p22). Bei schätzungsweise 20 % der Patienten mit familiärer ALS liegt eine Mutation dieses Gens vor. Mittlerweile sind über 100 ALS-assoziierte Mutationen beschrieben worden [34]. Bei den meisten handelt es sich um eine Substitution einzelner Aminosäuren innerhalb des SOD1-Polypeptids. Biophysische u. -chemische Untersuchungen haben gezeigt, dass die einzelnen Varianten eine große Bandbreite hinsichtlich ihres Charakters aufweisen. ALS-assoziierte SOD1-Mutationen können zu folgenden Veränderungen führen:

- a) Änderungen des Schmelzpunktes durch Stabilisierung/Destabilisierung der APO-SOD1-Proteinstruktur
- b) Verminderung der Bindungsaffinität für Cu oder Zn
- c) Veränderung der Nettoladung

**Tabelle 1: SOD1-Varianten**

| SOD1-Varianten | Schmelzpunkt (Tm) | Cu,Zn-Bindungsaffinität | Nettoladung (pH 7.4) |
|----------------|-------------------|-------------------------|----------------------|
| G85R           | ↓                 | ↓                       | ↓                    |
| G37R           | ↓                 | —                       | ↓                    |
| G93R           | ↓                 | —                       | ↓                    |
| H48Q           | ↓                 | ↓                       | —                    |
| D125H          | —                 | ↓                       | ↓                    |
| D124V          | ↑                 | ↓                       | ↓                    |
| H46R           | ↑                 | ↓                       | ↓                    |
| <b>G93A</b>    | ↓                 | —                       | —                    |
| A4V            | ↓                 | ↓                       | —                    |
| L38V           | ↓                 | —                       | —                    |
| L84V           | ↓                 | —                       | —                    |
| I113T          | ↓                 | —                       | —                    |
| L144F          | ↓                 | —                       | —                    |
| V7E            | ↓                 | —                       | ↑                    |
| E100G          | ↓                 | —                       | ↓                    |
| S134N          | —                 | ↓                       | —                    |
| D90A           | —                 | —                       | ↓                    |
| E100K          | —                 | —                       | ↓                    |
| D101N          | —                 | —                       | ↓                    |
| N139K          | —                 | —                       | ↓                    |

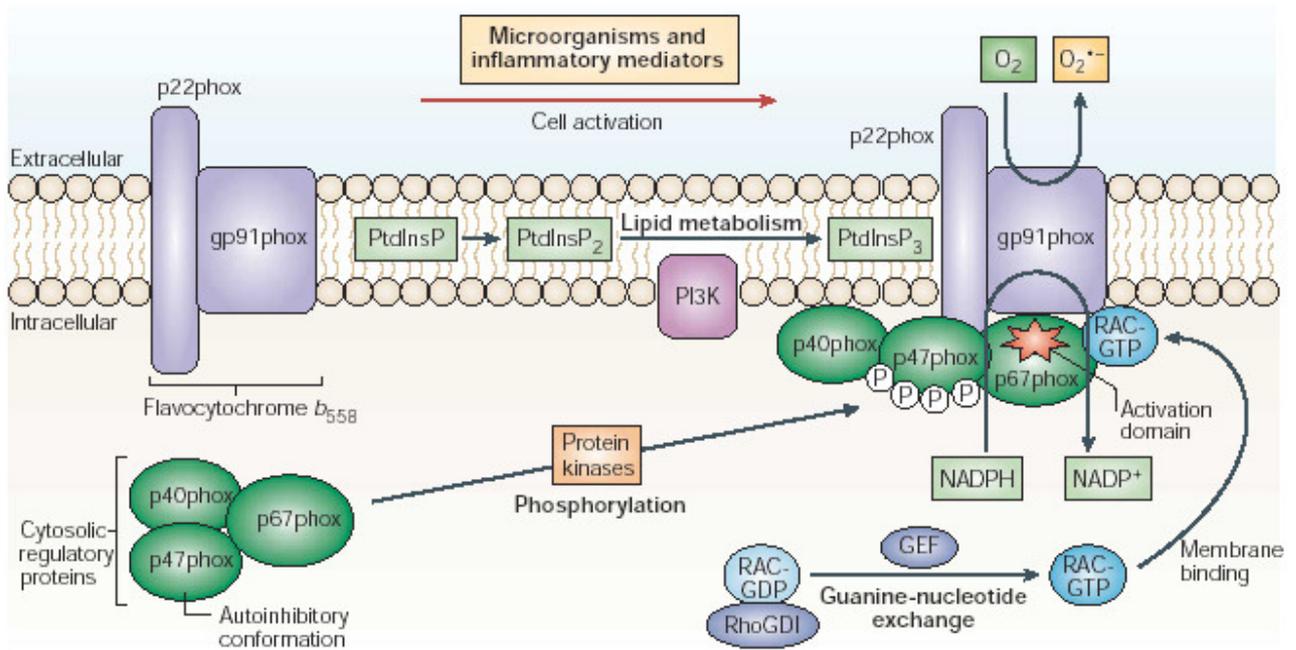
Quelle: modifiziert nach Bryan F. Shaw et al., Trends in Biochemical Sciences Volume 32, Issue 2, 2007  
78 - 85

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Mutation G93A führt die Aminosäure-Substitution zu einer Destabilisierung der Apo-Proteinstruktur, welche in einem niedrigeren Schmelzpunkt resultiert. Dieser bleibt auch nach Metallisierung vorhanden. Netzladung und Bindungsaffinität für Cu und Zn sind unverändert. Die Rolle, welche die SOD1-Mutation in der ALS-Pathogenese spielt, ist bisher noch unklar gewesen. Da jedoch bei der Abwesenheit von SOD1 in Knockout-Mäusen keine ALS-Pathologie auftritt und viele Mutationsvarianten eine normale Enzymaktivität aufweisen, ist davon auszugehen, dass es bei den ALS-assoziierten Mutationen zum Erwerb einer zusätzlichen, in diesem Falle toxischen Funktion kommt, und nicht zu einer Verringerung der natürlichen Funktion [35-37]. Neuere Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass das Enzym in den Regelkreis der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies eingreift [38].

## 5. Amyotrophe Lateralsklerose und ROS

Ein weiteres wichtiges und viel diskutiertes „Puzzle-Stück“ in der Pathophysiologie der ALS stellen die reaktiven Sauerstoffspezies dar. Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) werden durch normale zelluläre Reaktionen in aeroben Organismen gebildet. Die oxidative Phosphorylierung ist der Hauptweg der biologischen Oxidation, wobei der Komplex IV, die Cytochrom C-Oxidase, in einer 4-Elektronen-Reaktion aus molekularem Sauerstoff  $H_2O$  bildet. Unter bestimmten Umständen können jedoch auch nur zwei Elektronen übertragen werden. In diesem Fall entsteht  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid), welches ein Zellgift darstellt und deshalb möglichst rasch entfernt werden muss. Auch Ein-Elektronen-Transferreaktionen sind möglich, wobei das Superoxid-Anionradikal entsteht, aus dem wiederum sehr reaktionsfähige Hydroxyl-Radikale ( $HO\bullet$ ) oder Hydroperoxyl-Radikale ( $HOO\bullet$ ) gebildet werden können. Im Normalfall sorgen spezifisch wirkende Enzyme des antioxidativen Schutzsystems für eine Entsorgung der toxischen Substanzen. Dies sind Katalasen (CAT) und Peroxidasen (POD) für die Eliminierung von Wasserstoffperoxid sowie Superoxid-Dismutasen (SOD), um das Superoxid-Anionradikal zu entfernen. In vivo werden schätzungsweise 1-3 % des in den Mitochondrien anfallenden Sauerstoffes in das Superoxid-Anionradikal umgewandelt. Zu den ROS gehören neben Singulett-Sauerstoff die bei der Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser auftretenden Zwischenprodukte: Superoxidanionen-Radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $OH\bullet$ ). Häufig werden auch Hypochlorid ( $HOCl$ ), Peroxyl-Radikale ( $ROO\bullet$ ), Alkoxy-Radikale ( $RO\bullet$ ) und Stickstoffmonoxid dazu gerechnet [39]. Während einer Entzündungsreaktion kommt es jedoch in den Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems zu einer physiologischen Generierung von Sauerstoffradikalen, welche für die Abwehr von Katalase-positiven Erregern essentiell ist. Die Bildung der Sauerstoffradikale erfolgt über die NADPH-Oxidase. Die NADPH-Oxidase ist ein gut regulierter Multienzymkomplex, der aus den cytosolischen Untereinheiten p67PHOX, p47PHOX, p40PHOX, der regulatorischen Untereinheit Rac2 und den membranständigen Untereinheiten gp91PHOX und p22PHOX besteht. Die Untereinheit gp91PHOX enthält Flavin-Adenin-Dinukleotid und 2 Häm-Komponenten. Bei der Aktivierung der Phagozyten lagern sich die cytosolischen Untereinheiten an die beiden

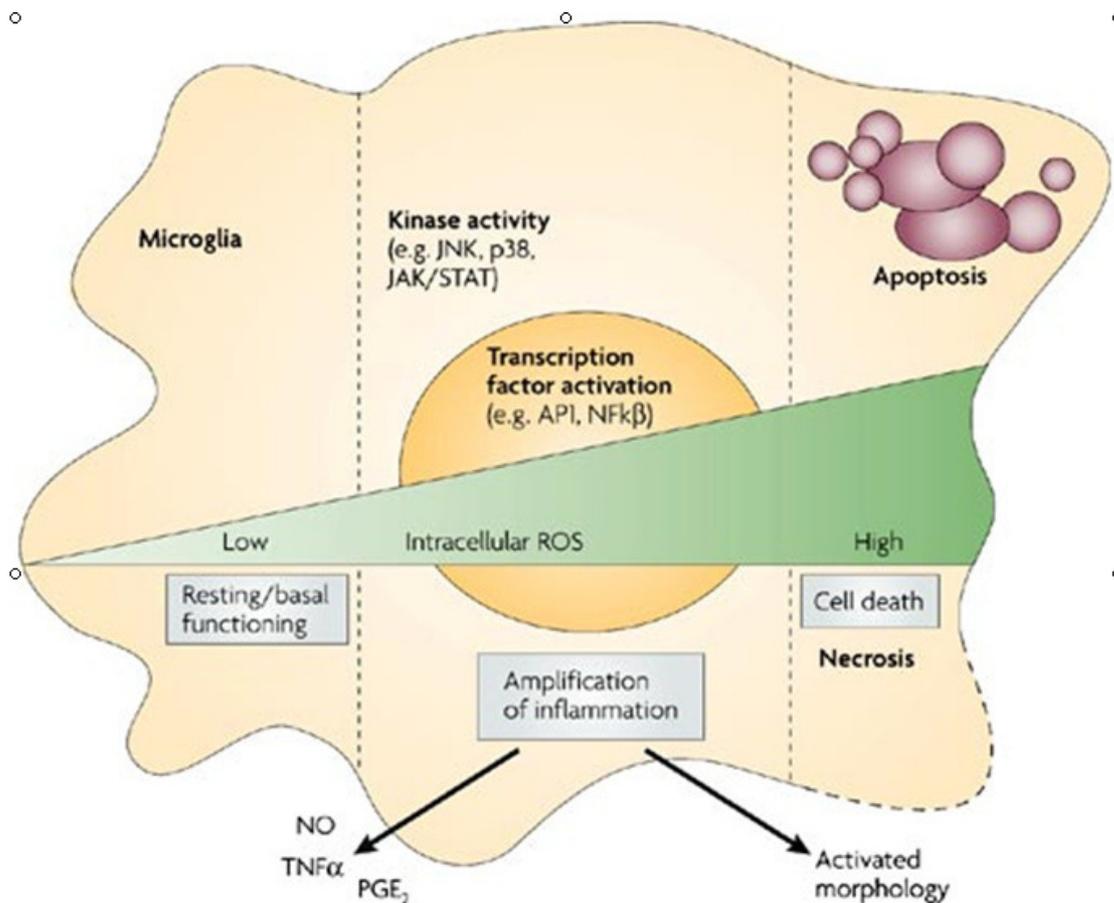
membranständigen Untereinheiten zu aktiver NADPH-Oxidase an. Die NADPH-Oxidase oxidiert NADPH und bildet dabei aus molekularem Sauerstoff das reaktive Superoxid Anion:  $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 \text{Superoxidradikal} + NADP^+ + H^+$ . NADPH-Oxidase ist ein Enzymkomplex, der sich aus mehreren Proteinen zusammensetzt, die auf verschiedenen Chromosomen codiert sind.



**Abbildung 2: Aktivierung der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in Phagozyten durch die Phox-Regulator-Proteine**

Quelle: Lambeth JD. Nat Rev Immunol. 2004; 4(3):181-9.

Normalerweise halten sich Neubildung von ROS und die Aktivität der antioxidativen Abwehr die Waage. Verlagert sich jedoch das Gleichgewicht zu Gunsten der ROS, kommt es zum oxidativen Stress. Je nach Ausprägung des oxidativen Stresses kann es zu Zellschäden bzw. letzten Endes zum Zelltod kommen, da Oxidations- und Destruktionsprozesse durch ROS alle biologischen Makromoleküle, wie z.B. Lipide (insbesondere in den Zellmembranen), Proteine und die DNA betreffen können [40].



### Abbildung 3: Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies

JAK: Janus-Kinase; JNK: c-Jun amino (N)-terminal Kinase; NO: Stickstoffmonoxid; PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E<sub>2</sub>; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α

Quelle: Block et al. Nature Reviews Neuroscience 8, 57–69 (January 2007)

Die klassische mikrogliale Aktivierung führt sowohl intra- als auch extrazellulär zu der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Intrazellulär gebildete ROS sind wichtige Voraussetzungen zum einen für die mikrogliale proinflammatorische Funktion, zum anderen für das Überleben der Zellen selbst. Intrazelluläre ROS tragen dazu bei, dass phagozytierte Pathogene lysiert werden können. (Peter Parham, the Immunesystem, 3rd) Als second messengers sind sie auch in der Lage durch Beeinflussung von Kinase-Kaskaden und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Geneexpression zu nehmen. Solange ein basales Level an ROS besteht, welches von den Antioxidationsmechanismen wie z.B. die Phospholipidhydroperoxid-Gluthation-Peroxidase, oder α-tocopherol kompensiert werden kann, funktioniert die Zelle normal. Kommt es jedoch durch einen immunologischen Stimulus zu einer Erhöhung der ROS-Produktion und zur Verminderung der antioxidativen Abwehr, wird aufgrund der second-messenger Funktion, die pro-inflammatorischen Funktion der Mikroglia verstärkt. Die Dysregulation der intrazellulären ROS und die konsekutive erhöhte Expression proinflammatorischer Gene sind sicherlich ein wichtiger Faktor hinsichtlich der neurotoxischen Folgen.

## 6. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Zusammenfassend betrachtet liegt folgende Datenlage vor. Bei ca. 20% der familiär auftretenden ALS liegt eine Mutation des SOD1-Gens vor. Sowohl die untergehenden Motoneuronen, als auch die sie umgebenden Mikroglia sind Träger dieser Mutante. Da in Tiermodellen, in denen nur die Motoneurone Träger sind, die Pathologie erst verzögert entsteht, jedoch bei alleiniger Expressierung durch Mikroglia ein Untergang der Motoneuronen erfolgt, liegt der Verdacht nahe, dass an diesen Ereignissen Mikroglia maßgeblich beteiligt sind [41-42].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht inwiefern sich Mikroglia, die Träger einer SOD1-Mutante sind, von Mikroglia mit der Wildtypvariante des SOD1-Gens unterscheiden. Dabei wurde das Augenmerk auf die Betrachtung der Ausschüttung zentraler Entzündungsmediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-6) als Reaktionen auf unterschiedliche Stimuli gelegt (PamCys3-SKXXX, LPS, I:OPoly) und diese miteinander verglichen. Da bereits vorliegende Arbeiten der Entstehung von ROS, sowohl im Tiermodell als auch bei ALS-Patienten, eine ebenfalls wichtige Bedeutung in der Pathogenese der ALS zusprechen [43-44], war die Generierung der unterschiedlichen Zelllinien von ROS als Folge der Stimulationen sowie die annäherungsweise Betrachtung der Anti-Oxidativen-Kapazität ebenfalls ein Aspekt, dem sich diese Arbeit widmete.

1. Auf welche Stimulantien und ihre voneinander abweichenden Signalwege reagieren die unterschiedlichen Zellpopulationen (G93A-Mutanten-Zellreihe / Wildtyp-SOD1-Zellreihe / SOD1-Knockout-Zellreihe)?

- PamCys3-SKXXX (TLR 2)
- LPS (TLR 4/CD14)
- I:OPoly (TLR 3)

2. Gibt es Unterschiede in den Entzündungsreaktionen? Als Parameter gewählt wurde die Sekretion der zentralen proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und Interleukin 6.

3. Steigt die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies wie Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid in SOD1-Mutanten nach Stimulation mit den verschiedenen Reagenzien? Wie verhält sich die Antioxidationskapazität, gemessen anhand der Anzahl der vorhandenen Thiolgruppen?

4. Kann durch Zugabe von Antioxidantien, sogenannter ROS-Scavengers, die Entzündungsreaktion der einzelnen Zellpopulationen moduliert werden?

### III. Material und Methoden

#### 1. Geräte

Tabelle 2: Geräte

| Geräte  | Hersteller        |
|---|-------------------|
| Sterilbank Laminair Hera Safe                     | Thermo Scientific |
| Heraeus CO <sub>2</sub> -Brutschrank (37°C)       | Thermo Scientific |
| Sunrise Multiskan-ELISA<br>Mikroplatten-Lesegerät | Tecan             |
| Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL                    | Zeiss             |

|  |                    |
|--|--------------------|
| Kühlschränke (4°C und -20°C)                                 | AEG                |
| Neubauer Zählkammer  | Neubauer           |
| Vortexer   | Jahnke & Kunkel    |
| Verschiedene Pipetten (2 bis 1000 µl)                        | Finn und Eppendorf |
| Zentrifuge Centrifuge 5810R                                  | Eppendorf          |
| Zentrifuge 5415R   | Eppendorf          |
| Elektrophoresekammer (Westernblot)                           | BioRad             |
| PowerPac 200 Spannungsgerät<br>(Westernblot)                 | BioRad             |
| Rotator-drive STR4   | Stuart scientific  |
| Safire, Fluorescence, Absorbance and<br>Luminescence Reader  | Tecan              |
| Thermoblock TDB-120  | BioSan             |
| Waschgerät für Mikrotiterplatten<br>Mikrotiterplatten-shaker | BioTek             |

## 2. Materialien

### 2.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

| Materialien  | Hersteller    |
|--|---------------|
| Verschiedene Pipettenspitzen                             | Greiner       |
| 15ml, 50 ml Conical Tubes                                | Falcon        |
| 96-Napf Polystyrol-Flachboden-<br>Microtiterplatte       | Nunc          |
| Zellkulturflaschen, 250 ml, T 75 cm <sup>2</sup>         | BD Falcon     |
| Filterpapier   | Roth          |
| Glasplatten (Miniprotean shortplates,<br>spacers 0.75mm) | Biorad        |
| Plastikpasteurpipetten                                   | Roth          |
| Nitrocellulosepapier                                     | Whatman       |
| Schwämme   | BioRad        |
| Eppendorfgefäße  | Eppendorf     |
| Parafilm   | Brand         |
| Klarsichtfolien  | Tarten        |
| Röntgenfilm (Amersham hyperfilm)                         | GE Healthcare |
| 48-Well-Platten (Multi-well)                             | Falcon        |

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

| <b>Chemikalien und Reagenzien</b>                          | <b>Hersteller</b> |
|--|-------------------|
| Trypanblau   | Gibco             |
| DMEM +Glutamax, 4,5 LD-Glucose,<br>Pyruvate                | Invitrogen        |
| 10% fetales Rinderserum (FBS)                              | PAN BioTech       |
| phosphat buffered saline (PBS)                             | Sigma-Aldrich     |
| Tween20  | Sigma             |
| BSA  | Serva             |
| Penicillin/Streptomycin<br>(10000IE/10000mg/ml)            | Biochrom          |
| 25% Trypsin-EDTA   | Gibco             |
| Protea Proteinmarker blau (7-175 kd)                       | BioSciences       |
| Bradford dye reagent                                       | BioRad            |
| Fluorescent Hydrogen peroxide/<br>Peroxidase detection kit | Sigma             |
| Nitrate/nitrite assay kit colorimetric                     | Sigma             |
| ECL Western Blotting Detection System                      | GE Healthcare     |

## 2.3 Stimulantien

Tabelle 5: Stimulantien

| Stimulantien   | Hersteller          |
|--|---------------------|
| Katalase (2 000 000 U/ml)                            | Sigma               |
| N-Acetylcystein 500 mM                               | Sigma               |
| Pam3Cys-SK KKK 1mg/ml                                | EMC                 |
| Lipopolysaccharid 1mg/ml (E. Coli Serotype R515(RE)) | Alexis Biochemicals |
| Polyinosinic-polycytidilic acid                      | Alexis Biochemicals |

## 2.4 ELISA

Tabelle 6: ELISA

| ELISA   | Hersteller                   |
|---|------------------------------|
| Duoset elisa development kit mouse TNF- $\alpha$ /tnfsf1a | R&D                          |
| Duoset elisa development kit mouse IL-6                   | R&D                          |
| Substrat für ELISA, Reagenz A und B                       | Becton Dickinson, Pharmingen |

## 2.5 Antikörper

Tabelle 7: primäre Antikörper

| Primäre Antikörper  | Spezies | Hersteller      |
|---------------------|---------|-----------------|
| Anti-SOD1 (humanes) | Schaf   | EMD Biosciences |
| Anti-Aktin          | Maus    | Millipore       |

Tabelle 8: sekundäre Antikörper

| Sekundäre Antikörper                 | Spezies   | Hersteller                             |
|--------------------------------------|-----------|--|
| Anti-Schaf-IgG mit HRP<br>konjugiert | Kaninchen | Jackson Immunoresearch<br>Laboratories |
| Anti-Maus-IgG mit HRP<br>konjugiert  | Kaninchen | Jackson Immunoresearch<br>Laboratories |

## 2.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Puffer und Lösungen

| <b>ELISA</b>             |  |
|--------------------------|--|
| ELISA Stopplösung        | 28 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , ad 500 ml H <sub>2</sub> O                                |
| Reagenz-Lösungen         | 1% BSA in PBS, PH 7,2-7,4  |
| Substrat Reagenz A und B | 1:1 Mixtur von Reagenz A(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) und<br>Reagenz B (Tetramethylbenzidine) |
| Waschpuffer              | 0,05% Tween 20 in PBS, PH 7,2-7,4  |

**Tabelle 10: Elektrophorese**

| <b>Elektrophorese (Westerblot)</b>                         |   |
|--|---|
| 5% Acrylamid-Sammelgel                                     | Bisacrylamide; Acrylamide 30%<br><br>Tris/HCL 1M (pH 6,8)<br><br>0,4 % SDS<br><br>25 % Ammoniumpersulfat<br><br>TEMED |
| 12% Acrylamid-Trenngel                                     | Bisacrylamide; Acrylamide 30%<br><br>Tris/HCL 1M (pH 8,8)<br><br>0,4 % SDS<br><br>25 % Ammoniumpersulfat<br><br>TEMED |
| Laufpuffer   | Trisbase 0,25 M<br><br>Glycine 1,92 M<br><br>SDS 1%   |
| Bjerrum-Schafer-Nielsen-<br>Transferpuffer<br><br>(pH 9,2) | 48 mM Tris<br><br>39 mM Glycine<br><br>20 % (w/v) Methanol  |
| Blockier-Puffer  | PBS   |

|                    |                                 |
|--------------------|---------------------------------|
|                    | 5% (w/v) Magermilch             |
| Inkubations-Puffer | PBS<br>1% (w/v) Magermilch      |
| Wasch-Puffer       | PBS mit 0,1% Tween20            |
| Ponceau-Red        | 0,05 Ponceau-Red in 5% AcOH/PBS |

**Tabelle 11: Zellkultur**

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Zellkultur</b> |  |
| Kulturmedium      | D-MEM (GlutaMax,Pyruvat)<br>10 % FCS (FBS)<br>1% Penicillin / Streptomycin           |
| Lysis-Puffer      | Tris pH 8.0 mM<br>Nacl 150 mm<br>1% Triton x-100<br>PMSF 1mM (Roche)<br>steriles H2O |

## **3. Methoden**

### **3.1. Zellkultur**

#### **3.1.1 Steriles Arbeiten**

Um eine Verunreinigung bzw. Kontamination beispielsweise durch Mikroorganismen von außen zu verhindern, wurden alle Schritte der Zellkultur ausnahmslos unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um dies zu gewährleisten, wurden folgende Maßnahmen getroffen. Es wurde darauf geachtet, dass Lösungen, Medien und Materialien steril waren. Nicht steril gelieferte Materialien und Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Die sterilen Arbeitsschritte wurden an einem Reinraumarbeitsplatz (Sterilbank) durchgeführt. Der Brutschrank für die Zellinkubation wurde regelmäßig desinfiziert. Um extreme Luftzirkulationen zu vermeiden, waren beim Herausnehmen der Zellen Türen und Fenster im Arbeitsraum geschlossen. Es wurden die korrekte Lagerung und etwaige Verfallsdaten bei den Substanzen beachtet. Das Zellkulturmedium wurde nach frischer Herstellung als „Sterilprobe“ einige Tage im Wärmeschrank inkubiert. Nur wenn das Medium keinen Farbumschlag und auch keine Trübung zeigte, wurde es für die Zellen verwendet. Die Zellkulturflaschen wurden in regelmäßigen Abständen gewechselt (alle 7-8 Tage). Ein- bis zweimal in der Woche und je nach Größe des Zellrasens, erfolgte eine Zentrifugierung und komplette Neuaufnahme der Zellen in frischem Medium. Des Weiteren wurden die Zellen vor jeder Zellpassage unter dem Mikroskop betrachtet und bezüglich ihrer Vitalität beurteilt (siehe Trypanblau-Eklusionstest).

### **3.1.2 Etablierung der Zelllinien**

Für die Durchführung der Experimente wurden BV-2-Zellen benutzt. Die verwendeten BV-2-Zellen stammen von einer immortalisierten Zelllinie von Maus-Mikrogliazellen [45], (welche freundlicherweise von Professor K. Frei, Universitätsspital Zürich, Schweiz, bereitgestellt wurden). Die Zellen wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 10 % fetalem Kälberserum in einem Brutschrank in einer befeuchteten Atmosphäre mit einem 5 % Co<sub>2</sub>- Anteil bei 37 °C kultiviert. Um bakterielles Wachstum zu verhindern, wurde dem Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin hinzugefügt. Um Zelllinien zu erhalten, die das humane mSOD überexprimieren, wurden die BV-2-Zellen mit pcDNA3.1-wtSOD, pcDNA3.1-mSOD1 (G93A) (welche freundlicherweise von Dr. Kopito, Stanford University/ Stanford, USA, bereitgestellt wurden) sowie einem Vektor, der als Negativ-Kontrolle diente, mit Hilfe von Lipofactamin LTX transfiziert. Alle transfizierten Zellen wurden mit den Antibiotika Geneticin (G418, Sigma, Schnelldorf, Deutschland), Hygromycin B (Sigma) oder durch eine Kombination von G418 und Blasticidin selektioniert, bis sie eine stabile Expression der eingeschleusten Gene erreicht hatten.

### **3.1.3 Kulturbedingungen**

Die Zellkulturen der einzelnen Zelllinien wurden in 250 ml fassende, 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen der Marke Falcon, mit membranhaltigen Schraubverschlüssen, welche einen Gasaustausch der Zellen ermöglichten, herangezuchtet. Die Zellen wurden in 10 ml Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 10 % fetalem Kälberserum in einem Brutschrank in einer befeuchteten Atmosphäre mit einem 5 % Co<sub>2</sub>- Anteil bei 37 °C kultiviert. Um bakterielles Wachstum zu verhindern, wurde dem Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin hinzugefügt. Die Flaschen mit den Zellkulturen wurden täglich unter dem Mikroskop sowohl auf Kontamination als auch auf stattgefundene

Zelladhäsion untersucht. An jedem dritten Tag wurde das Medium in den Flaschen unter einer Sterilbank vorsichtig abgesaugt und frisches Medium hinzugefügt.

### **3.1.4 Passage der Zellkulturen**

Unter Benutzung einer Sterilbank wurde das Medium in den Zellkulturflaschen abgesaugt und mit Hilfe einer Pipette 5 ml Trypsin hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C wurden, um die adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, 9 ml an Kulturmedium hinzugefügt. Nachdem sich durch behutsames Schütteln der Kulturflaschen ein Großteil der Zellen losgelöst hatten, wurden die Zelllösungen in 15ml-Röhrchen pipettiert und anschließend 4 Minuten lang mit 1400 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und pro Röhrchen 4 ml des Kulturmediums hinzugefügt. Anschließend wurde die Zellzahl und die Vitalität der Zellen bestimmt.

### **3.1.5 Trypanblau-Exklusionstest und Bestimmung der Zellmenge**

Mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionstest kann die Vitalität von Zellen bestimmt werden. Grundlage dieser Methode ist das unterschiedliche Verhalten toter und lebender Zellen gegenüber Trypanblau. Dieser makromolekulare saure Farbstoff kann die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht penetrieren (Trypanblau-negative Zellen), hingegen dringt er in geschädigte oder tote Zellen ein und bindet sich dort an Proteine (Trypanblau-positive Zellen). Wichtig ist, dass die Parameter wie Färbedauer, Temperatur, Farbstoffkonzentration und pH-Wert (maximale Aufnahme bei pH 7.5) möglichst konstant gehalten werden, da sie das Ergebnis der Vitalitätsprüfung beeinflussen. Um die Anzahl der vitalen Zellen in der unter Punkt **2.3** genannten Zelllösung zu bestimmen, wurden nach vorsichtigem Durchmischen mit Hilfe einer

Pipette 10 µl der Zelllösung in die Vertiefung einer 96-Well-Platte gegeben und 90 µl Trypanblau hinzugefügt. Nach weiterem sorgfältigen Durchmischen wurden ca. 3 µl in eine Neubauerkammer bei aufgelegtem Deckglas gegeben. Aufgrund der Kapillarkraft saugte sich die Zellsuspension in den definierten Zwischenspalt zwischen Kammer und Deckglas. Um die Höhe des definierten Zwischenspalts nicht zu verändern, wurde beim Auflegen des Deckglases auf die Bildung der so genannten Newtonschen Ringe geachtet. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch Zählung der vitalen Zellen in den äußeren vier Quadraten, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Zellenanzahl in den unterschiedlichen Quadraten relativ gleichmäßig verteilt war. Dabei kam folgende Formel zum Tragen:

$$\frac{X}{4 \times 10^4 \times 10} = \text{Zellzahl pro } \mu\text{l}$$

Anzahl der gezählten vitalen Zellen durch die Anzahl der gezählten Quadrate dividiert (um den Mittelwert zu errechnen)  $\times 10^4$  (Kammerfaktor)  $\times 10$  (Verdünnungsfaktor). Nachdem die Anzahl der in der Zellsuspension enthaltenen Zellen bestimmt wurde, wurden die Zellen, sobald die benötigte Zellzahl erreicht war, wie unter Punkt **3.1.6** beschrieben für die Stimulation auf 48-Well-Platten ausgesät und der Überschuss in eine neue Zellkulturflasche übersiedelt und 10 ml frisches Kulturmedium hinzugefügt.

### **3.1.6 Zellstimulation**

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde unter sterilen Bedingungen für jede Zelllinie mit 6,4 ml Kulturmedium eine Zelllösung mit jeweils 1,6 Millionen Zellen zubereitet. Diese wurde mittels einer 1ml-Pipette durchmischt und anschließend auf eine 48-Well-Platte pipettiert, wobei für je eine Zelllinie (G93A-Mutanten, wtSOD1, Kontrollgruppe) jeweils 16 Vertiefungen zur Verfügung standen. In jede Vertiefung wurden 400 µl der

Zelllösung pipettiert, welche jeweils ca.  $10^5$  Zellen enthielten. Nach Befüllen der Vertiefungen wurde die 48-Well-Platte mit den drei Zelllinien 24 Stunden lang in einem Brutschrank in einer befeuchteten Atmosphäre mit einem 5 %  $\text{CO}_2$ - Anteil bei 37 °C inkubiert. Nach Entnahme aus dem Brutschrank wurden die Vertiefungen per Lichtmikroskop auf die stattgefundene Zelladhäsion überprüft. Anschließend wurde das Kulturmedium aus den Vertiefungen abgesaugt und die einzelnen Zellreihen nach Stimulationsplan mit den Substanzen Pam3Cys-SK444 in den Konzentrationen (0,1/1/10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. (LPS in den Konzentrationen 10/100/1000  $\text{ng}/\text{ml}$ ) bzw. Poly(I:C) in den Konzentrationen (25/50/100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert.

Pam3Cys-SK444 ist ein synthetisches triacyliertes Lipopeptid. Es induziert eine Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa\text{B}$ . In menschlichen Alveolarmakrophagen und Bronchialepithelzellen ist eine Stimulation von TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 beschrieben. Dies geschieht durch Bindung an den TLR2/TLR1-Komplex. Es ist das am häufigsten verwendete synthetische Analog zu den natürlich vorkommenden Lipoproteinen [46-48].

Lipopolysaccharide (LPS) sind eine Komponente der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und gelten systemisch verabreicht als potentester Auslöser von Immunreaktionen, welche mit der Zirkulation von unterschiedlichen Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6 assoziiert sind. LPS können Fieber, septischen Schock und Akut-Phase-Reaktionen bei verschiedenen Säugetieren einschließlich Menschen hervorrufen. LPS bindet an das im Serum zirkulierende LPS-bindende-Protein. Dieser neu formierte Komplex interagiert mit dem Membran-Rezeptor CD14 und seinem Co-Rezeptor TLR 4, welcher u.a. auf der Zelloberfläche von mononuklearen Zellen lokalisiert ist [49-50].

Polyinosinic-polycytidylic-Säure (Poly I:C) wirkt aufgrund ihrer strukturalen Ähnlichkeit mit doppelsträngiger RNA, die auch von diversen Virusarten präsentiert wird, als Immunstimulanz und interagiert vornehmlich mit dem Toll-Like-Rezeptor 3. Arbeiten

haben gezeigt, dass sie bei systemischer Applikation im Tierversuch bei Nagetieren die Akut-Phase-Reaktion, Fieber und weitere Krankheitssymptome hervorrufen kann. Sie gilt als potenter Mediator der Interferon-  $\alpha$  und  $\beta$  -Sekretion. Die Induktion von IL-6, IL-12 TNF- $\alpha$  sind in vitro sowohl in menschlichen als auch in Maus-Leukozyten beschrieben [51-53].

Zusätzlich wurde bei einigen der Vertiefungen zu den jeweiligen Stimulantien Anti-Oxidantien (Katalase 1000 U/ml und N-Acetylcystein 1/5 mM/ml) hinzugefügt und inkubiert.

Die Katalase ist eine Hydroperoxidase, die der Gruppe der Oxidoreduktasen angehört, eine Gruppe von Enzymen, die Redoxreaktionen katalysieren. Es handelt sich hierbei um ein tetrameres Enzym, das heißt, dass es aus vier identischen Untereinheiten besteht. Jede dieser Untereinheiten enthält eine Häm-Gruppe im aktiven Zentrum. Die Katalase ist ein Spezialfall, da sie Wasserstoffperoxid auch als Elektronendonator verwendet, so dass zwei Moleküle Wasserstoffperoxid zu zwei Molekülen Wasser und einem Molekül Sauerstoff disproportionieren.

Acetylcystein ist das N-Acetyl-Derivat der natürlich vorkommenden Aminosäure L-Cystein. Die chemische Bezeichnung von Acetylcystein ist N-acetyl-L-cystein (NAC). Acetyl-Cystein stellt einen Bestandteil des Antioxidans Glutathion dar. Aufgrund seiner SH-Gruppe ist es in der Lage freie Radikale zu reduzieren.

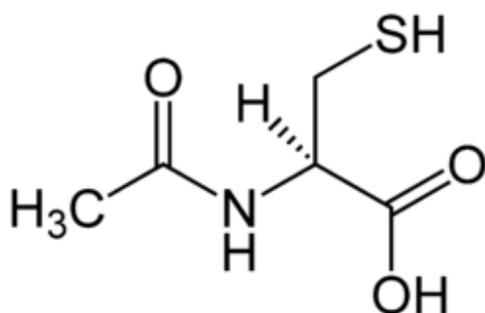


Abbildung 4: N-Acetyl-Cystein

Jeweils eine entsprechende Menge von PAM3CYS-SKXXX bzw. LPS bzw. Poly (I:C) sowie Katalase, NAC und Kulturmedium wurden nach Stimulationsplan in die Vertiefungen zugegeben, um die vorbestimmte Konzentration zu erhalten. Zu jeder Substanzgabe mit jeweils gleicher Konzentration wurden für die einzelnen Zelllinien, zwei Vertiefungsreihen zum Vergleich verwendet. Ebenso gab es zu jeder Substanzgabe mit jeweils gleicher Konzentration eine Vertiefungen ohne Stimulantiengabe als Negativkontrolle. (Das genaue Stimulationschema siehe **Tabelle 12**) Nach Ablauf weiterer 24 Stunden wurden die Überstände der Zellkulturen in Eppendorfgefäße pipettiert und in einer Eppendorfszentrifuge 5 Minuten lang mit 8000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Jeweils 400 µl der zentrifugierten Überstände wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bei -20°C eingefroren.

**Tabelle 12: Versuchsaufbau**

| Drei Zelllinien 48-Well-Platte 1x10 <sup>5</sup> Zellen/Vertiefung |   |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|--|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| BV-2-Zellen  |   | Kontroll-Zellen           |                           | wtSOD1-Zellen             |                           | mSOD1-Zellen (G93A)       |                           |
|  |   | 1                         | 2                         | 3                         | 4                         | 5                         | 6                         |
| non-stimulated cells   | A | Just non-stimulated cells |
|  | B | NAC<br>1 mM               |
|  | C | NAC<br>5 mM               |
|  | D | Katalase 1000 U/ml        |
| stimulated cells   | E | Just stimulated cells     |
|  | F | NAC<br>1 mM               |
|  | G | NAC<br>5 mM               |
|  | H | Katalase 1000 U/ml        |

Prinzipieller Versuchsaufbau:

In jede Vertiefung wurden 400 µl Kulturmedium mit je 10<sup>5</sup> Zellen pipettiert.

Den Vertiefungen der oberen Reihen A-D wurden keine inflammatorischen Stimulantien zugefügt. Sie dienten als Negativ-Kontrollen.

Den Vertiefungen der unteren Reihen E-H wurden zusätzlich 200 µl Kulturmedium mit entweder 0,1/1/10 µg/ml Pam3-Cys-SKKKK oder 10/100/1000 ng/ml LPS oder 25/50/100 µg/ml Poly(I:C) zugefügt.

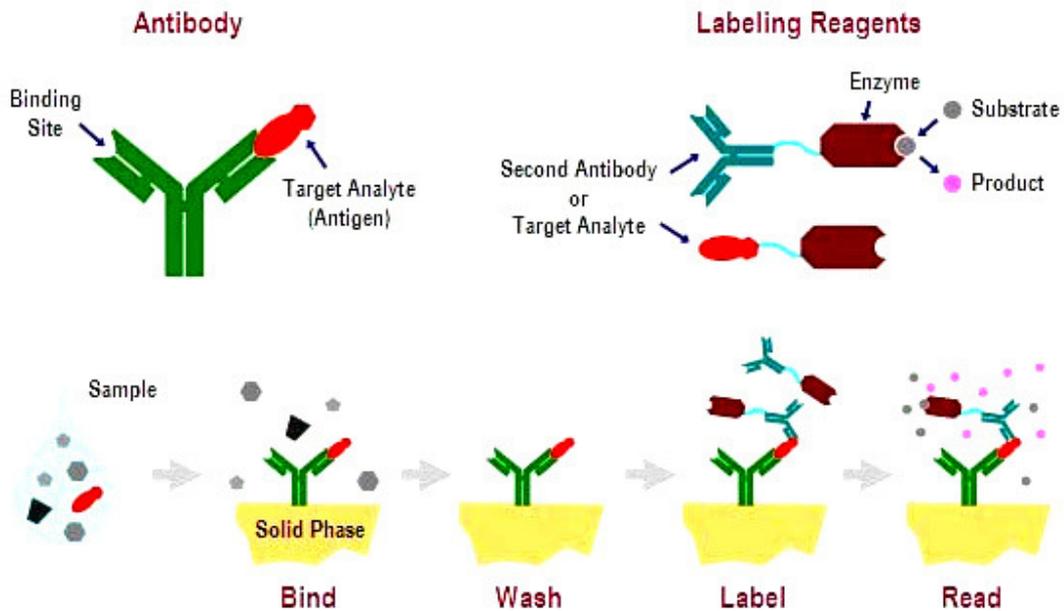
Den Vertiefungen in Reihe B, C, D und F, G, H wurden zusätzlich 200 µl Kulturmedium mit den jeweiligen Antioxidantien in der jeweiligen Konzentration zugefügt. Zu jeder Vertiefung existierte ein Duplikat.

## **3.2 Messungen**

### **3.2.1 Detektion der Zytokinproduktion von aktivierten Makrophagen mittels ELISA (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)**

Das Prinzip eines Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) besteht darin, dass antigenspezifische Antikörper, die das entsprechende Antigen, in diesem Fall die Zytokine TNF- $\alpha$  bzw. IL-6, mit einer hohen Affinität binden, an einen Träger gekoppelt werden. Auf diese Weise können sie das Antigen auf der Trägersoberfläche konzentrieren. Ein weiterer mit einem Enzym markierter Antikörper, der im Vergleich zum ersten, ein anderes Epitop auf dem Antigen erkennt, bindet an dem Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Zugabe eines Substrates kommt es durch das Enzym am 2. Antikörper zu einem Farbumschlag, welcher indirekt abhängig von der Menge des gebundenen Antigens ist. Der Farbumschlag wird photometrisch gemessen. Mit Hilfe einer Standardkurve, die durch Proben mit genau bekannter Antigenkonzentration entsteht, kann das gesuchte Antigen mit hoher Spezifität und Sensitivität quantitativ nachgewiesen werden [54].

# ELISA



**Abbildung 5: schematischer ELISA-Aufbau**

Die Platte wird mit dem so genannten capture-Antikörper beschichtet, welcher das gesuchte Antigen spezifisch bindet. Der darauf hinzugegebene detection-Antikörper bindet an ein unterschiedliches Epitop des gesuchten Antigens. An diesem zweiten Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, das bei Zugabe eines Substrates\* einen Farbumschlag bewirkt. Die Intensität des Farbumschlags korreliert direkt mit der Menge des gebundenen Antigens.

Quelle: biosystemdevelopment.com

In der vorliegenden Arbeit wurde das ELISA-Verfahren verwendet, um in dem Kulturmedium die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6 durch Makrophagen zu messen, welche zum einen mit immunologischen Stimulantien (LPS, Pam3Cys-SK444 und Poly(IC)), und zum anderen mit Antioxidantien (NAC und Katalase) behandelt wurden.

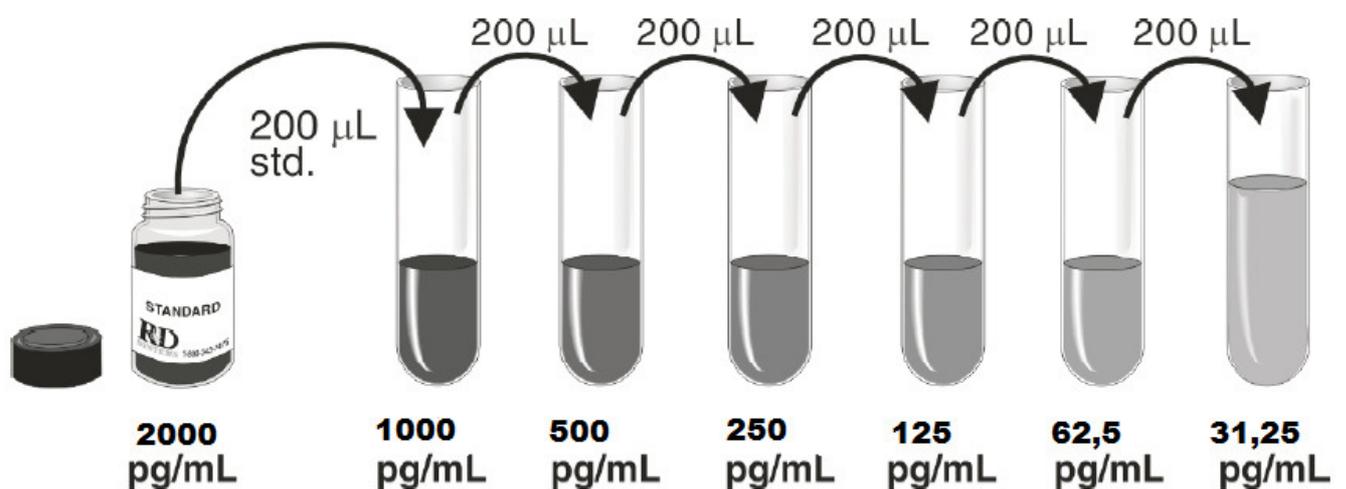
### 3.2.2 Nachweis von TNF- $\alpha$ -Sekretion

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ist ein multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) des Immunsystems, der bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet, aber auch von anderen Zellen der Immunabwehr, beispielsweise Lymphozyten. Interessanterweise sind auch Endothel-, Herzmuskelzellen sowie andere nicht immunkompetente Zellen in der Lage, diesen zu sezernieren. Seine wichtigste Funktion liegt jedoch in der angeborenen Immunabwehr. Dort regelt er die Aktivität diverser Immunzellen im Sinne von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine [55]. Es löst Fieber aus, kann den Zelltod (Apoptose) induzieren und ist an der Entstehung der Kachexie bei bestimmten Krankheiten beteiligt [56]. TNF- $\alpha$  ist ein Vertreter der TNF/TNFR-Superfamilie, eines Zytokinsystems, das wichtige Funktionen in der Immunantwort und in der Organogenese vor allem des Lymphsystems hat. Kommt es jedoch zu einer Dysregulation kann dies zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Immunantwort führen, die in pathophysiologische Zustände wie z.B. chronische Inflammation oder septischer Schock münden können [57].

Um die TNF- $\alpha$ -Sekretion der behandelten Zellen in den Zellkulturüberständen zu quantifizieren wurde ein *mouse*-TNF- $\alpha$ -ELISA Development kit verwendet. 54 Vertiefungen einer 96-Well-Platte (48 für die Überstände der Zellkulturen, 16 für eine duplizierte Standardverdünnung) wurden mit jeweils 100  $\mu$ l des Maus-TNF- $\alpha$ -Bindungs-Antikörper in einer Konzentration von 0,8  $\mu$ g/ml beschichtet, mit Parafilm versiegelt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Platte dreimal unter Zugabe von 400  $\mu$ l PBS-Tween (0,05% Tween 20 in PBS, pH, 2-7,4) pro Vertiefung mittels eines Waschgerätes und nachfolgendem Ausklopfen auf einem saugfähigen Zellulosehandtuch gewaschen. Nach Zugabe von 300  $\mu$ l Blockierungs-Puffer in die beschichteten Vertiefungen, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, wurde nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur die Platte wiederum dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Die aufgetauten

Zellkulturüberstände wurden mit Hilfe des Blockierungs-Puffers in einem Verhältnis 1:3 verdünnt und in die beschichteten Vertiefungen der 96-Well-Platte pipettiert.

Zusätzlich wurde eine TNF- $\alpha$  Standardlösung in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, indem eine Verdünnungsreihe des konzentrierten Standards (Ausgangskonzentration 2000 pg/ml) hergestellt wurde. Dank dieses Vorgehens konnte man 7 unterschiedliche Standardkonzentrationen vorbereiten, was auf der Abb. 3.2 schematisch dargestellt wurde.



**Abbildung 6: TNF- $\alpha$ -Verdünnungsreihe**

Herstellung einer Verdünnungsreihe aus einer TNF- $\alpha$  Standardlösung. In 7 Gefäße wurden jeweils 200 µl Standard/Probe-Verdüner vorgelegt und 200 µl des konzentrierten Standards zum ersten Röhrchen zugegeben. Nach dem sorgfältigen Mischen wurden 200 µl in das nächste Gefäß übertragen und der Vorgang insgesamt 5 mal wiederholt. Dadurch konnte eine Verdünnungsreihe von 2000 bis 31,25 pg/ml hergestellt werden.

Quelle: R&D Product sheet Mouse TNF- $\alpha$  Immunoassay

Nach Befüllen der Vertiefungen, sowohl mit den verdünnten Zellkulturüberständen als auch mit der Maus-TNF- $\alpha$  Verdünnungsreihe, wurde die Platte 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurden in die Vertiefungen je 100 µl des Maus-TNF- $\alpha$  Detektions-Antikörpers in einer Konzentration von 150 ng/ml hinzugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ungebundenen Zweit-Antikörper ausgewaschen, wiederum dreimal mit PBS

Tween 20 und anschließend 100 µl Streptavidin-HRP pro Vertiefung hinzugefügt. Nach einer im Dunkeln stattgefundenen Inkubation von 30 Minuten und dreimaliger Waschung folgte die Füllung jeder Vertiefung mit 100 µl Substrat-Lösung (1:1 Mixtur von Color reagent A und Color reagent B) und eine erneute Inkubation für 20 Minuten bei RT wiederum im Dunkeln. Anschließend wurden pro Vertiefung 50 µl Stop-Lösung (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zugegeben, um die während der Inkubation abgelaufene Farbreaktion zu beenden. Im Anschluss wurde die 96-Well-Platte in ein Multiskan-E-Mikroplattenlesegerät (Thermallabsystems) eingelegt und die Farbintensität, die proportional zur Menge des gebundenen Maus- TNF-α ist, kolorimetrisch als Absorption bei einer Wellenlänge von 450 und 560 nm gelesen. Aus den Duplikaten wurde jeweils die mittlere Absorption berechnet. Die Absorption der als Verdünnungsreihe vorliegenden Standardlösung diente zur Herstellung einer Standardkurve, indem auf der y-Achse die gemessene Absorption bei 450 nm und auf der x-Achse die Maus- TNF-α Konzentration aufgetragen wurde. Von der auf diese Weise aufgezeichneten Standardkurve konnte die Maus-TNF-α Konzentration in den gemessenen Proben abgelesen werden.

### **3.2.3 Nachweis von IL-6-Sekretion**

Interleukin-6 auch als Interferon-β<sub>2</sub> bezeichnet, gehört zu den Interleukinen (bzw. umfassender zu den Zytokinen), welche die Entzündungsreaktion des Organismus regulieren. IL-6 regelt durch Rekrutierung, Aktivierung und Apoptosis von Leukozyten den „switch“ zwischen den Mechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunität [58]. Es spielt ferner eine wichtige Rolle in der Hämatopoese sowie der Tumprogression. Das Interleukin-6 ist in der Abfolge der Entzündungskaskade dem Tumornekrosefaktoralpha untergeordnet. IL-6 gehört zu einer Zytokinfamilie, die die zelluläre Antwort durch einen Rezeptorkomplex steuert, welcher die Rezeptoruntereinheit Glykoprotein gp130 beinhaltet [59].

Die Messung der IL-6-Konzentration in Zellkulturüberständen von stimulierten Makrophagen wurde mittels eines mouse-IL-6 ELISA Development Kit durchgeführt. Der Arbeitsvorgang erfolgte genau so, wie im Material- und Methodennachweis von TNF- $\alpha$ -Sekretion bereits beschrieben.

### 3.2.4 Nachweis von NO

Für die Messung dieses Indikators diente die Reaktion nach Griess. Makrophagen sezernieren nach Stimulation reaktive Sauerstoffverbindungen wie Stickstoffmonoxid (NO), das unter physiologischen Bedingungen schnell zu Nitriten und Nitraten oxidiert. Der Griess Assay ermöglicht die Bestimmung von Nitriten aus Zellkulturüberständen. Nitrite bilden im Assay unter sauren Bedingungen mit Sulfanilamiden ein Diazoniumsalz, das in einem zweiten Schritt mit einem Diamin, in diesem Fall mit 1-Naphthylethylendiamin, zu einem violetten Azofarbstoff reagiert [60]. Als Maß für den Nitritgehalt der Probe kann die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm herangezogen werden.

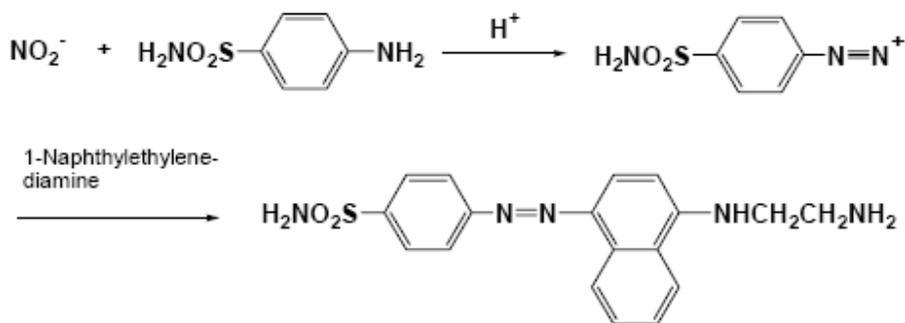
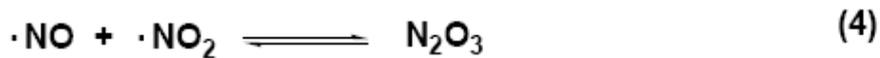
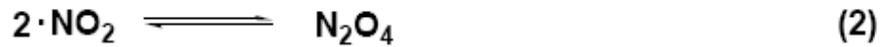


Abbildung 7: NO-Assay schematische Darstellung der Farbreaktion



**Abbildung 8: NO-Reaktion und seine Metaboliten**

Quelle: Sigma-Aldrich Product sheet Nitrate/Nitrite Assay Kit Colometric

Herstellung einer Nitritkalibrierungskurve durch das Befüllen von vier Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit einer Nitritlösung in den Konzentrationen 0,25,50 und 100 mM und anschließender Messung der Absorption bei 560 nm mittels eines ELISA-Readers. Auf der x-Achse wurde die Konzentration an  $\text{NO}_2$ , auf der y-Achse die Absorption bei 560 nm aufgetragen. Die aufgetauten Überstände der Zellkulturen wurden im Verhältnis 5:1 mit der Pufferlösung verdünnt und 100  $\mu\text{l}$  in die Vertiefungen gefüllt. Anschließend wurden sie mit 50  $\mu\text{l}$  Griess -A-Lösung und 50  $\mu\text{l}$  Griess -B-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption wiederum bei 560 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen und die  $\text{NO}_2$ -Konzentration bestimmt.

### 3.2.5 Wasserstoffperoxid-Bestimmung per Fluoreszenz

Bei diesem Verfahren wird 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP), ein nicht-fluoreszentes Reagenz, das mit Wasserstoffperoxid reagiert, verwendet. Während dieser 1:1 stöchiometrischen Reaktion, katalysiert durch die Merettichperoxidase, wird

ADPH zu dem fluoreszierenden Substrat Resorufin oxidiert. Diese Substanz hat ein Exzitationsmaximum von 563 nm und ein Emissionsmaximum von 587 nm und kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Lesegerätes analysiert werden [61].

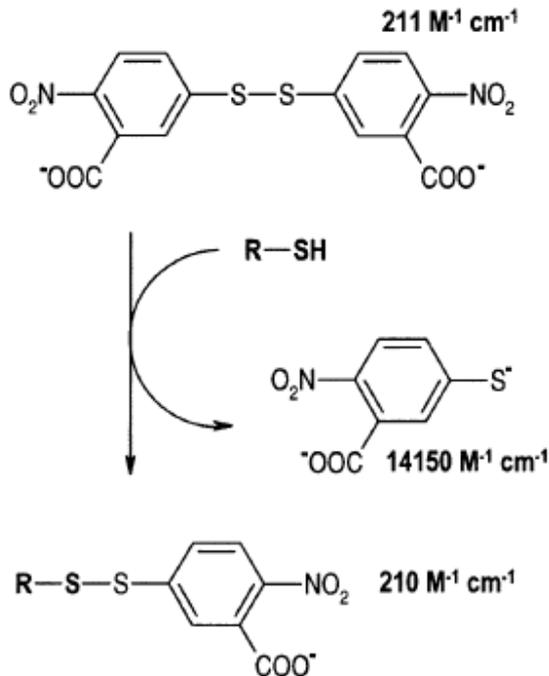
Die vorliegende 20 mM Wasserstoffperoxidlösung wurde zu Standardlösungen mit den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8, und 10  $\mu$ M verdünnt, welche zur Kalibrierung einer Standardkurve dienen. Auf eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte wurden jeweils 50  $\mu$ l der aufgetauten Zellkulturüberstände und der Standardlösungen pipettiert und pro Vertiefung 50  $\mu$ l des Reaktionsgemisches hinzugefügt. Nach Inkubation der 96-Well Mikrotiterplatte für zehn Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur, wurde diese anschließend in ein Fluoreszenz-Lesegerät eingelegt und bei einer Exzitation von 530-571 nm und einer Emission von 590-600 nm der  $H_2O_2$ -Gehalt der Proben bestimmt.

### **3.2.6 Kolormetrische Messung der freien Thiolgruppen mittels Ellmans Reagenz**

Um die Anti-oxidative-Kapazität abschätzen zu können, wurde nach Behandlung der unterschiedlichen Zelllinien über 24 h mit entweder 0,1 mg/ml Pam3Cys-SK KKK oder 10ng/ml LPS eine Zellyse durchgeführt. (Lysepuffer: 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 sowie Proteaseinhibitorcocktail von Roche Applied Science). Daraufhin fand mittels Ellmans Reagenz eine kolormetrische Messung der in den Zelllysaten vorhandenen freien Thiolgruppen bei 412 nm statt [62]. Zum Generieren einer Standardkurve wurden 10mM Cystein benutzt. Beide Substanzen wurden von Sigma erworben.

Prinzip:

Ellmans Reagenz 10mM 5,5'-Dithio-bis[2-nitrobenzoesäure] (DTNB) reagiert mit freien Thiolgruppen unter Abspaltung von 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB). TNB ist intensiv gelbgefärbt.



**Abbildung 9: Ellman's Reagenz Reaktionsschema**

Quelle: Riener CK, Kada G, Gruber HJ (2002). "Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine". *Anal Bioanal Chem* **373** (4-5): 266–76

### 3.3 Westernblot-Analyse

Um nachzuweisen, dass in den mit pcDNA3.1-wtSOD sowie mit pcDNA3.1-mSOD1 (G93A) transfizierten Zelllinien eine stabile SOD-Überexprimierung stattfand und die Kontrolle-Zelllinie keinerlei SOD1 exprimierte, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen lysiert und die Proteinbestandteile per Elektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt.

### **3.3.1 Zellyse**

Die kultivierten Zellen wurden, wie unter Punkt 3.1.4 und Punkt 3.1.5 Methoden und Material beschrieben, den Kulturflaschen entnommen und die Zellzahl bestimmt. Für jede Zelllinie wurde eine Zellsuspension mit 1 Millionen Zellen auf 2 ml Kulturmediumlösung in einem 15ml-Röhrchen hergestellt. Diese Zellsuspension wurde in einer Eppendorfszentrifuge 5810R mit 1400 rpm für 4 Minuten bei 4°C Grad zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 3 ml eisgekühltem PBS dreimal gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml PBS in ein Eppendorfgesäß transferiert. Dieses wurde nach Zugabe von 100 µl Lysispuffer für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend, um nichtlösliches Material zu entfernen, in einer Eppendorfszentrifuge 5415 R für 10 Minuten mit 13,200 rpm bei 25°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß pipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

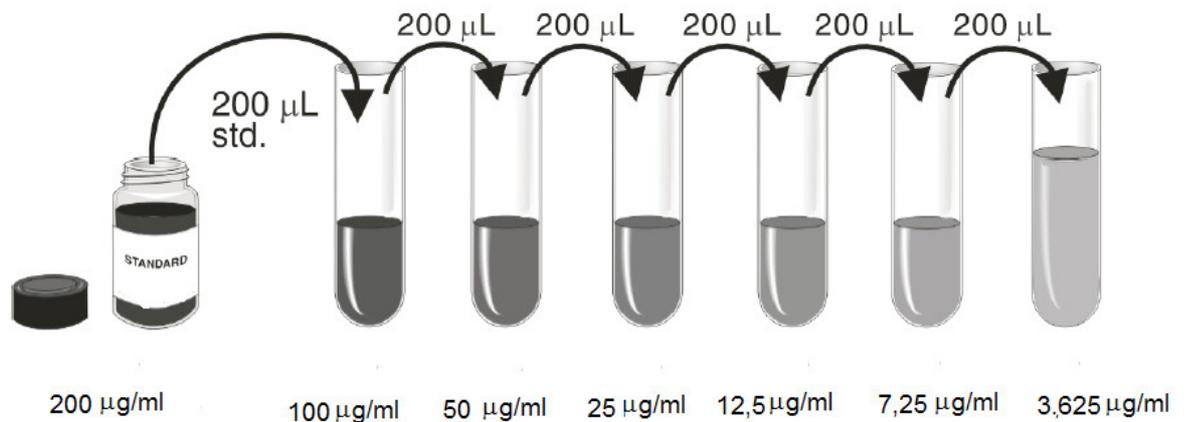
### **3.3.2 Bradford-Test**

Um die Proteinmenge in den Überständen der verschiedenen Zelllinien zu bestimmen und eine gleichmäßige Beladung der SDS-Segel während des Westernblots zu gewährleisten, wurde ein Bradfordtest durchgeführt. Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, die sehr empfindlich ist (im Bereich Mikrogramm pro Milliliter). Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Das Absorptionsspektrum der ungebundene (kationische), rotgefärbten Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, das Absorptionsspektrum verschiebt sich auf ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes außerdem sehr viel höher als

der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung [63-65]. Das Ausmaß der Farbreaktion ist von Protein zu Protein verschieden. Man braucht zur genauen Konzentrationsbestimmung deshalb idealerweise eine Kalibrationslösung des zu bestimmenden Proteins. Wenn dieses nicht gereinigt zur Verfügung steht, bzw. wenn die Proteinkonzentration von Gemischen bestimmt werden soll, werden so genannte Standardproteine zur Kalibrierung eingesetzt (z.B. BSA).

- BSA 8 mg/ml (Sigma, cat. No 12153)
- BioRad dye reagent (cat. No 500-0006)
- Mikroplattenreader (ELISA-Reader Team-Sunrise)

Um eine Verdünnungsreihe herzustellen, wurde eine BSA-Standardlösung (Sigma) benutzt. Zuerst wurde im ersten Eppendorfgefäß 400 µl der BSA-Standardlösung mit einer Konzentration von 200 µg/ml hergestellt. In 6 weitere Eppendorfgefäße wurden jeweils 200 µl H<sub>2</sub>O pipettiert und 200 µl der Standardlösung zum zweiten Röhrchen zugegeben. Nach dem sorgfältigen Mischen wurden 200 µl in das nächste Gefäß übertragen und der Vorgang insgesamt fünfmal wiederholt. Dadurch konnte eine Verdünnungsreihe mit 7 unterschiedlichen Konzentrationen von 200 bis 3,625 µg/ml hergestellt werden (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: BSA-Verdünnungsreihe**

Quelle: modifizierte Abbildung R&D Product sheet Mouse TNF- $\alpha$ -Immunoassay

Anschließend wurden je 20 µl der Verdünnungsreihe als Tripletts auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Als letztes Sample der Verdünnungsreihe wurden jeweils in eine Vertiefung 20 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Die aufgetauten Zellkulturüberstände wurden mit H<sub>2</sub>O unterschiedlich stark verdünnt (1:5, 1:20), und ebenfalls 20 µl pro Sample, als Tripletts auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Danach wurden pro Vertiefung 200 µl der mit H<sub>2</sub>O auf 1:5 verdünnten BioRad-Färbereagenzlösung hinzugefügt und mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Shakers die Lösungen durchmischt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit im Dunkeln wurde die 96-Well-Platte in ein Multiskan-ELISA-Mikroplattenlesegerät (Sunrise, Tecan) eingelegt und die Absorption, welche proportional zur Menge der vorhandenen Proteinmenge ist, kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Aus den Tripletts wurde jeweils die mittlere Absorption berechnet. Die gemessene Absorption der als Verdünnungsreihe vorliegenden Standardlösung diente zur Herstellung einer Standardkurve, indem auf der y-Achse die Extinktionswerte bei 595 nm und auf der x-Achse die Konzentration der Standardlösung aufgetragen wurde. Von der auf diese Weise aufgezeichneten Standardkurve wurde die Proteinkonzentration in den gemessenen Proben abgelesen und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.

### **3.3.3 Herstellung eines Sammelgels**

In einen Gelrahmen wurde ein 0,75 mm dickes 12 % Acrylamid-Trenngel gegossen. Eine kleine Menge an Wasser wurde hinzugefügt, um eine ebene Kante zu erzielen. Nach ca. 30 Minuten wurde das Wasser mittels Filterpapier abgetupft und auf das bereits polymerisierte Trenngel ein 5% Acrylamidsammelgel gegossen. Bevor dieses sich verfestigte, wurde zur Bildung von Taschen ein Kamm mit 10 Zinken hineingesteckt. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurde die Gelplatte aus dem Gelrahmen in den Elektrodenstand gesteckt. Gegenüberliegend wurde eine Blindplatte eingesetzt, so dass eine innere Kammer entstand, die wiederum in den Pufferbehälter gesteckt wurde. Sowohl innere Kammer als auch Pufferbehälter wurden mit dem 1x Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer gefüllt.

### **3.3.4 Elektrophorese**

Derweil wurden aus den aufgetauten Überständen der unter Punkt 3.1.1 beschriebenen Zellkulturüberstände jeweils ein Sample von 20 µl mit einer Proteinmenge von 5 µg zubereitet und zur Denaturisierung jeweils 5 µl an 5x Lämmli-Puffer mit 2-Mercaptanol hinzugefügt. Die Proteinlösung sowie eine Probe mit 5 µl Proteinmarker mit einer Bandbreite von 7-175 kd, wurde ca. 10 Minuten bei 95°C in einem Thermoblock erhitzt und anschließend mit Hilfe einer Pipette in die Taschen des Sammelgels geladen, wobei die erste Tasche den Marker enthielt, die nächsten Taschen Zelllysate der verschiedenen Zellkulturüberstände. Die Elektrophorese wurde mit 160 V durchgeführt und dauerte ca. 1 ¼ Stunden.

### **3.3.5 Wet-Transfer**

Nach der Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese wurde das Segel an einer Seite durch Abtrennen einer Ecke markiert und zusammen mit zwei Schwämmen, 2 Filterpapieren und einer Nitrozellulosemembran für 15 Minuten in einem Behälter mit Bejerrum/Schafers-Nielsen-Transfer-Puffer 48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20 % (w/v) methanol (pH 9,2) eingelegt. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten zu einem Sandwich zusammengelegt, wobei die Schwämme außen lagen, gefolgt von den 3mm Filterpapieren. Innen lag die Nitrozellulosemembran dem Gel an. Es musste beachtet werden, dass die Nitrozellulosemembran zur positiv geladenen Seite der Transferkammer hin lag, da die negativ geladenen Proteine in diese Richtung wandern. Das Sandwich wurde mit Hilfe einer Haltevorrichtung in die Transferkammer (BioRad systems) eingelegt, welche mit 1x Tris/Glycin/SDS-Laufpuffer + 20% Methanol gefüllt wurde. Nach Hinzufügen eines Eis-Pack, wurde der Transfer gestartet und lief mit 150 mA für eine Stunde. Nach Entnahme aus der Transferkammer wurde die Nitrozellulosemembran für ca. 30 Sekunden in einem Behälter mit Ponceau-Red (0,05% Ponceau-Red in 5% AcOH/PBS) gebadet und anschließend mit deionisiertem Wasser abgespült.

### **3.3.6 Markierung der Proteinbanden**

Nach Blockierung der Nitrozellulosemembran für ca. 30 Minuten in 5% Magermilch in PBS, wurde diese in einem zugeschweißten Plastikbeutel mit 5 ml 1% Magermilch in PBS / 0,2 % Tween 20 und dem 1. Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000(humanes SOD) über Nacht bei kontinuierlicher Rotation und 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Nitrozellulosemembran gewaschen, indem sie dreimal in PBS 0,1% Tween20 für 15 Minuten gebadet und abgespült wurde. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran wiederum in einen zugeschweißten Plastikbeutel gelegt und mit 5 ml 1% Magermilch in PBS / 0,2 % Tween 20 und dem 2. Antikörper HRP-konjugiertes

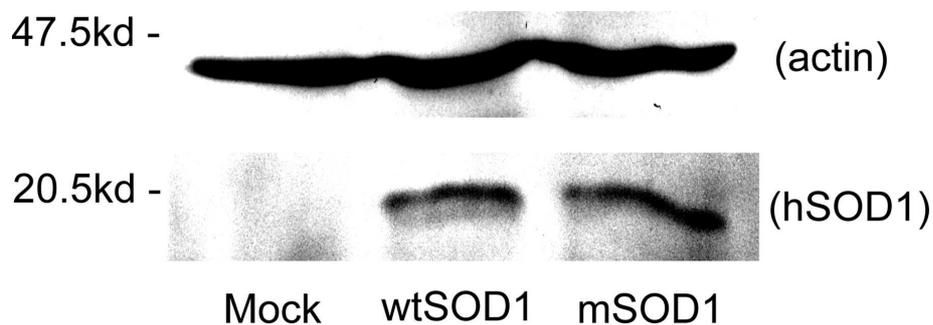
Hasen Anti-Schaf-IgG in einer Verdünnung von 1:500 (Anti-Schaf) für 2 Stunden bei kontinuierlicher Rotation und 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf eine Frischhaltefolie gelegt und zur späteren Detektion auf einem Röntgenfilm mit einem Gemisch aus den beiden Lösungen aus dem ECL-Kit (GE Healthcare) 1:1 beschichtet. Im alkalischen Milieu katalysiert die auf dem sekundären Antikörper gebundenen horse radish peroxidase die Oxidation von in den Lösungen enthaltenem Luminol. Dieses gelangt dadurch in einen angeregten Zustand und sendet Licht der Wellenlänge 428 nm aus. Die Membran wurde mit einem Papiertuch trockengerieben, zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt, wobei entstehende Luftblasen ausgestrichen wurden, und im Anschluss mit einem für Lichtemissionen sensiblen Film (Kodak) in eine Kassette gelegt. Nach einer Belichtungszeit von ca. 2 Minuten wurde der Film entnommen und anschließend mit einem Entwickler- und Fixierbad behandelt. Auf die Filme wurden die Markierungsbanden für die Proteingewichte der jeweiligen Membran übertragen. Auf diese Weise konnte das Proteingewicht, das den Proteinbanden auf dem Film zugrunde liegt, in seiner Größenordnung eingeordnet und auf seine Richtigkeit überprüft werden. Die Blots wurden nochmals mit Mäuse-anti-Actin und und hrp-konjugiertem Hasen-anti-Maus-IgG behandelt, um eine gleichgroße Proteinmenge sicherzustellen.

#### **4. Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des T-Tests, wobei wie üblich die Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet wurde. Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Berechnungen und Messungen statistisch signifikante Unterschiede ergaben, benutzten wir Tukey's HSD oder Tamhane's T2 post hoc test (nicht-parametrischer Test für multiple Stichproben) und Two-independent-samples t test. Zur statistischen Datenanalyse stand uns das Softwarepaket SPSS 11.0 für Windows (SPSS, Chicago, IL) zur Verfügung.

## IV. Resultate

### 1. Stabile Überexpression der SOD1 und mSOD1

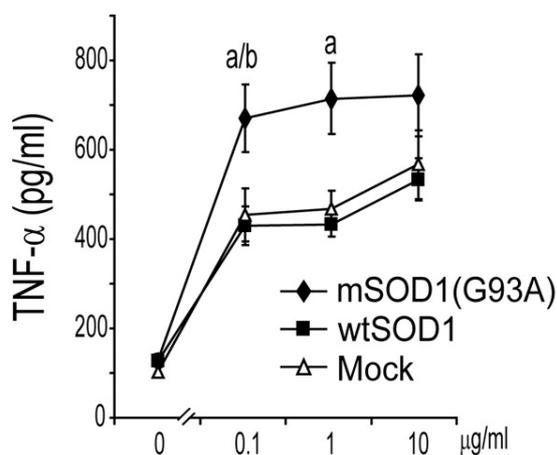


**Abbildung 11: Resultat-Überexpression von SOD1 und mSOD1**

Um zu überprüfen, ob die Grundvoraussetzung für das Experiment, die stabile Transfektion der BV-2-Zelllinien mit den unterschiedlichen Expressionsvektoren für das SOD1-Wildtyp-, sowie für das mutierte SOD1-Gen G93A gegeben war, wurden einige Generationen später Zelllysate aus den unterschiedlichen Zellpopulationen hergestellt und per Western Blot analysiert. Wie man anhand der Abbildung sehen kann, sind bei 25,5 kD, was dem Molekulargewicht des SOD1-Proteins entspricht, bei den transgenen Zelllinien wSOD1 und mSOD1, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die per Antikörper markierten Proteinmengen deutlich erhöht. Dies spricht für eine gesteigerte Expressierung der SOD1-Gene, wohingegen die SOD1-Expression bei der mit einem Negativ-Vektor transfizierten Kontrollzelllinie nicht vorhanden ist. Als Kontrolle wurden zusätzlich Antikörper gegen das in den Mastubuli enthaltene Aktin zugefügt. Dieses sammelt sich bei 47,5 kD, und ist erwartungsgemäß bei den unterschiedlichen Zellpopulationen gleichstark exprimiert.

## 2. Die SOD1-Mutation G93A verstärkt die auf dem TLR2-Weg induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion der Mikroglia

Da im Rückenmark von ALS-Mäusen die Immunrezeptoren TLR2 und CD14 sehr stark exprimiert werden [66], war eine der Fragestellungen, ob die SOD1-Mutation die Aktivierung der Mikroglia über diese beiden Immunrezeptoren beeinflusst. Daher wurden die drei BV-2-Zelllinien, der SOD1-Wildtyp, die SOD1-Mutante G93A und die Kontrollzellen ohne SOD1-Expression, mit den jeweiligen Liganden der Rezeptoren stimuliert. Es wurden Pam3Cys-SK<sub>4</sub>, ein TLR2-Ligand [46-48], LPS, ein CD14/TLR4-Ligand [49-50], sowie als Stimulationskontrolle Poly(I:C), welche als TLR3-Ligand beschrieben ist [51-53], verwendet. Anschließend wurden die Überstände auf die Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 hin überprüft. Die Auswertung der Zytokinsekretion ist anhand der Abbildung 12 a-f dargestellt. Insgesamt ergab sich erwartungsgemäß eine starke Aktivierung der Zellen durch die einzelnen Stimulatoren.

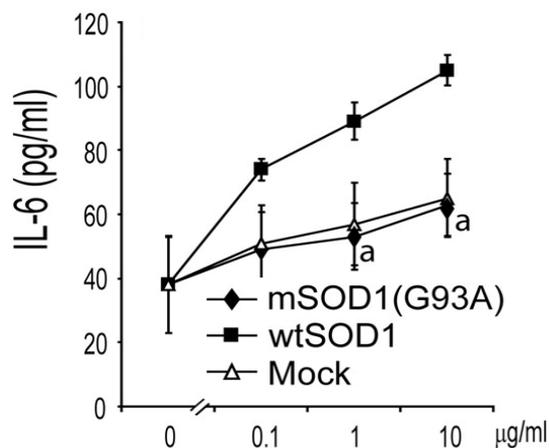


**Abbildung 12 : Sezernierung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch Pam3Cys-SK<sub>4</sub>**

a: Signifikanz gegenüber den wtSOD1-Zellen per Anova post-hoc errechnet

b: Signifikanz gegenüber den Kontrollzellen per Anova post-hoc errechnet

**Abbildung 12** stellt die Sezernierung der einzelnen Zellpopulationen von TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch Pam3Cys-SK444 dar. Interessanterweise ergab sich nach Stimulation durch den TLR 2-Liganden Pam3Cys-SK444 bereits im Bereich niedriger Konzentrationen (0,1 und 1  $\mu\text{g/ml}$ ) eine signifikant erhöhte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  innerhalb der SOD1-Mutanten-Zellpopulation im Vergleich zu der SOD1-Wildtyp- und der Kontrollzellpopulation. Diese Unterschiede zwischen der TNF- $\alpha$ -Sezernierung der unterschiedlichen Zelllinien verminderten sich bei Erhöhung der Pam3Cys-SK444-Konzentration auf 10  $\mu\text{g/ml}$ . Zwischen den Zelllinien der SOD1-Wildtyp-Population und der Kontrollzellpopulation konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Betrachtet man die absoluten Werte der gemessenen TNF- $\alpha$ -Sezernierung im Vergleich zu den anderen Stimulanzen LPS und Poly(I:C), so rangiert sie im mittleren Bereich.

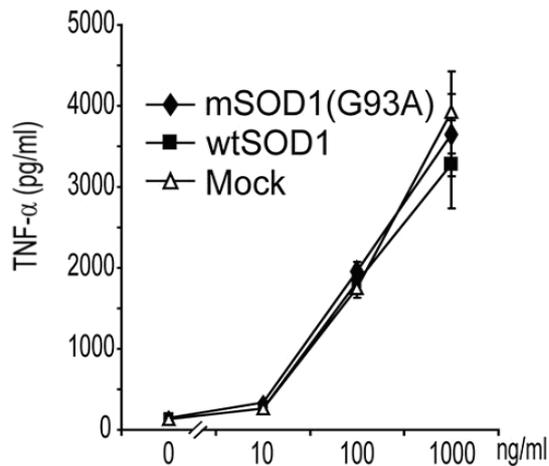


**Abbildung 13: Sezernierung von IL-6 nach Stimulation durch Pam3Cys-SK444**

a: Signifikanz gegenüber den wtSOD1-Zellen per Anova post-host errechnet  
b: Signifikanz gegenüber den Kontrollzellen per Anova post-host errechnet

Wie **Abbildung 13** zeigt, verhielt es sich überraschenderweise anders mit der gemessenen IL-6- Sezernierung. Diese war nach Pam3Cys-SK444-Stimulation bei der SOD1-Mutanten-Zellpopulation im Vergleich zu der SOD1-Wildtyppopulation deutlich reduziert. Besonders fällt dies auf nach Stimulation durch Pam3Cys-SK444 im Bereich

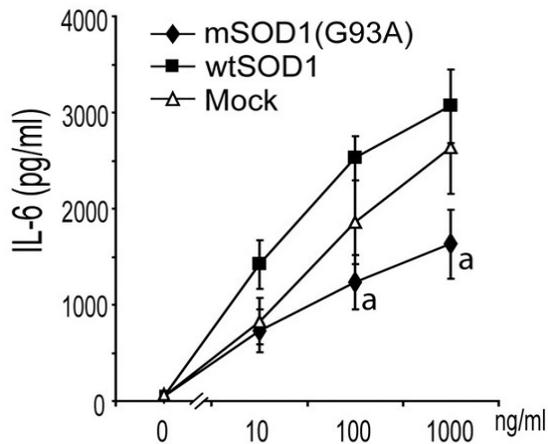
der höheren Konzentrationen (1 und 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Auch hier sind die absoluten Werte der IL-6-Sezernierung im Vergleich zu der Reaktion durch die anderen Stimuli im mittleren Bereich verortet.



**Abbildung 14: Sezernierung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch LPS**

a: Signifikanz gegenüber den wtSOD1-Zellen per Anova post-hoc errechnet  
b: Signifikanz gegenüber den Kontrollzellen per Anova post-hoc errechnet

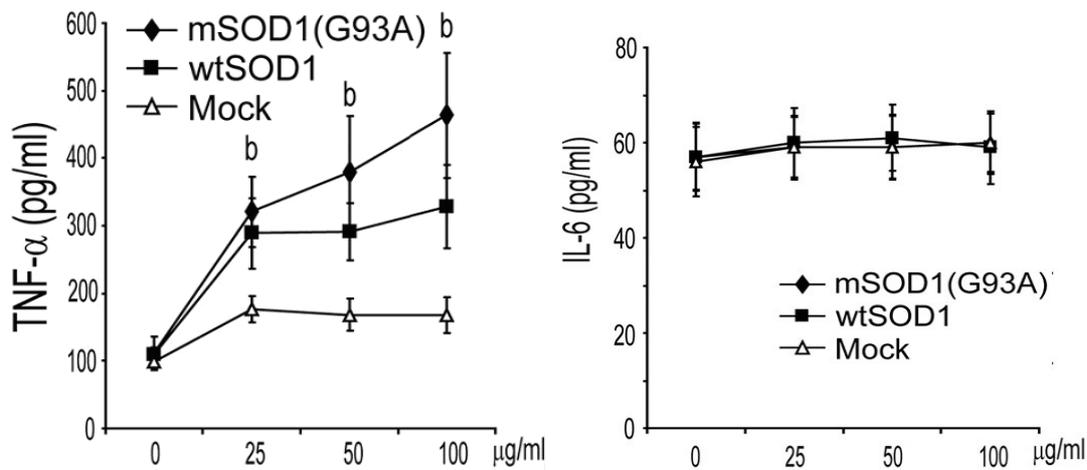
**Abbildung 14** stellt die Sekretion der einzelnen Zellpopulationen von TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch den CD14/TLR4-Liganden LPS dar. Zwar führte die Stimulation zu einem Anstieg der Sekretion, die absolut gesehen deutlich höher war als die der anderen Stimulanzien, jedoch gab es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den SOD1-Mutanten und den beiden anderen Zelllinien.



**Abbildung 15: Sezernierung von IL-6 nach Stimulation durch LPS**

a: Signifikanz gegenüber den wtSOD1-Zellen per Anova post-hoc errechnet  
 b: Signifikanz gegenüber den Kontrollzellen per Anova post-hoc errechnet

Hinsichtlich der in **Abbildung 15** dargestellten Werte der IL-6-Sezernierung nach LPS-Stimulation, trat dasselbe Phänomen wie nach der Stimulation durch PamCys3-SKXXX auf. Auch hier war die IL-6-Sezernierung der SOD1-Mutante im Vergleich zu den SOD1-Wildtypträgern signifikant geringer. Allerdings waren die gemessenen absoluten Werte mit einer um ein 30faches erhöhten Sezernierung, die stärkste beobachtete Reaktion. Der Unterschied der Werte zwischen der SOD1-Mutante und der Kontrollzellpopulation war hingegen nicht signifikant.



**Abbildung 16: Sezernierung von TNF- $\alpha$  und IL-6 nach Stimulation durch Poly(I:C)**

a: Signifikanz gegenüber den wtSOD1-Zellen per Anova post-hoc errechnet

b: Signifikanz gegenüber den Kontrollzellen per Anova post-hoc errechnet

Die **Abbildung 16** zeigt das Sekretionsverhalten der unterschiedlichen Zellpopulationen nach Stimulation durch Poly(I:C). Diese Stimulation über den TLR3-Weg führte zwar im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Sekretion der SOD1-Mutanten-Zellpopulation, jedoch gab es zu der SOD1-Wildtyppopulation keine signifikante Erhöhung. Hinsichtlich der Sekretion von IL-6 nach Stimulation durch poly(I:C) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen. Insgesamt stellte sich, gemessen an den absoluten Werten der Sekretion, sowohl von TNF- $\alpha$  als auch von IL-6, die schwächste Reaktion dar. Im Falle von IL-6 war sie sogar nicht messbar.

### 3. Die Generierung von Stickstoffoxid ist nach Stimulation durch PamCys3-SK444 nicht signifikant erhoh4t

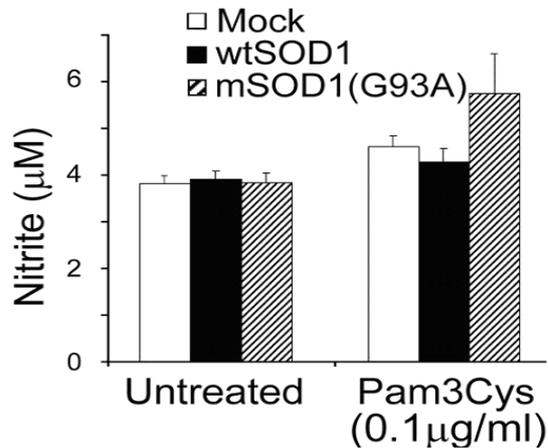
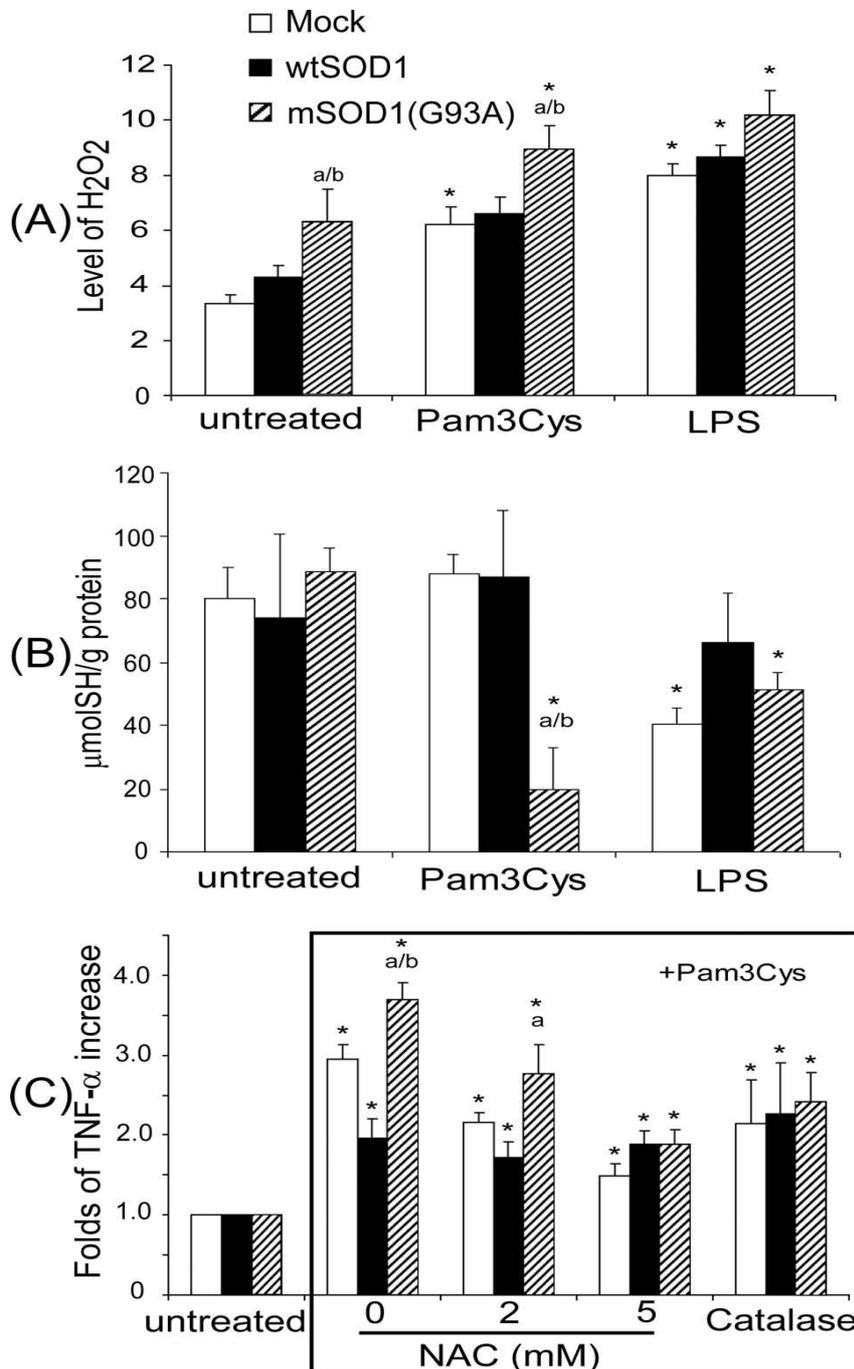


Abbildung 17: Sezernierung von NO nach Behandlung mit Pam3Cys

Ein weiterer Parameter, dessen Sezernierung nach Stimulation der Zellpopulationen durch den TLR2-Liganden PamCys3-SK444 gemessen wurde, ist NO (Stickstoffoxid). Wie in **Abbildung 17** zu sehen ist, zeigt diese zwar bei der SOD1-Mutanten-Zellpopulation bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml gegenuber den unbehandelten Zellen erhoh4te Werte, jedoch nicht im signifikanten Bereich.

**4. Das mutierte SOD1-Gen G93A führt zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses in Form von erhöhter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung und zu einer erhöhten Sekretion von TNF- $\alpha$  nach Stimulation über den TLR2-Weg**



**Abbildung 18: Messung von reaktiven Sauerstoffspezies, antioxidativer Kapazität, TNF- $\alpha$ -Sekretion unter Gabe von Antioxidantien**

Die basale TNF- $\alpha$ -Sezernierung der unterschiedlichen Zellreihen ist gleich 1 gesetzt und die TNF- $\alpha$ -Sezernierung nach Stimulation ist als das Vielfache dazu aufgetragen

\*:Signifikanz gegenüber der Basalsezernierung errechnet per t-Test

a: Signifikanz gegenüber den wtSOD1-Zellen per Anova post-host errechnet

b: Signifikanz gegenüber den Kontrollzellen per Anova post-host errechnet

Da oxidativer Stress als wichtiger Bestandteil der pathogenen Ereignisse sowohl bei ALS-Patienten als auch bei Tiermodellen bekannt ist [43-44], wurde in dieser Arbeit die Rolle von freien Radikalen hinsichtlich der Sekretion von TNF- $\alpha$  von Mikrogliazellen näher untersucht. Die unterschiedlichen Zellreihen wurden zum einen mit 0,1  $\mu$ g/ml PamCys3-SK $\alpha$ KKK, zum anderen mit 10 ng/ml LPS für 24 Stunden inkubiert. Wie in Abbildung **18 a-c)** dargestellt, reagierten die mSOD1- sowie die Kontrollzellpopulationen beide auf Stimulationen durch PamCys3-SK $\alpha$ KKK und LPS, sowohl mit einer signifikanten Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Sezernierung **a)** als auch durch Verminderung ihrer antioxidativen Kapazität **b)**, welche in diesem Fall durch die Messung der Menge an Thiolgruppen in Zelllysaten bestimmt wurde. Im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien reagierte die SOD1-Wildtyp-Zelllinie nur auf die Stimulation durch LPS mit einem signifikanten Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Sezernierung, während bei der Messung der Thiolgruppen keine Verminderung festzustellen war.

Vergleicht man die Menge der ROS-Freisetzung zwischen den verschiedenen Zelllinien, kann man feststellen, dass durch die Stimulation mit LPS die Intensität des oxidativen Stresses bei allen gleichmäßig gesteigert wurde, während die Stimulation durch PamCys3-SK $\alpha$ KKK spezifischer auf die mSOD1-Zelllinie wirkte. Stimuliert über den TLR2-Weg sezernierte diese Zelllinie signifikant mehr H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und hatte eine signifikant kleinere antioxidative Kapazität als die beiden anderen Zelllinien. Auch hier ist zu beobachten, dass, nimmt man die absoluten Werte, die stärkste Reaktion bei der Stimulation durch LPS zu beobachten ist.

Daraufhin wurden die Zelllinien gleichzeitig sowohl mit den Antioxidantien N-Acetylcystein mit 2 bzw. 5 mM und Katalase (1000 U/ml) als auch mit PamCys3-SK $\alpha$ KKK

stimuliert. Hier zeigte sich, dass nach alleiniger Behandlung mit PamCys3-SK444 wie aus den vorherigen Experimenten zu erwarten war, es zu einer erhöhten Sezernierung von TNF- $\alpha$  kam, welche im Vergleich zu den anderen Zelllinien bei den Trägern der Mutantenpopulation signifikant erhöht war. Interessanterweise konnte mit zusätzlicher Behandlung der antioxidativ wirkenden Substanz N-Acetylcystein bei steigender Konzentration, die vermehrte Sekretion von TNF- $\alpha$  der mSOD1-Zelllinie wieder verringert werden, wobei die TNF- $\alpha$ -Sekzernierung der Wildtyp-Population davon nicht beeinträchtigt wurde c).

## V. Diskussion

Mikroglia als Ursache der ALS?

Letztendlich sind die Ursachen für die verschiedenen Formen der ALS (SALS und FALS) bisher nicht vollständig geklärt. Jedoch scheint die Neuroinflammation ein konstantes Merkmal dieser Erkrankung zu sein. Darauf weisen die Beschreibungen der Anwesenheit von aktivierten Mikrogliazellen sowie eingewanderter Lymphozyten in der Umgebung untergehender Motoneurone in Rückenmarksgewebeproben von ALS-Erkrankten, sowohl SALS als auch FALS hin. Ebenfalls festgestellt werden konnte die erhöhte Expression von M-CSF (Macrophage colony-stimulating-factor) und MCP-1, ein Monozyten und dendritische myeloische Zellen aktivierendes Zytokin. Interessanterweise korrelierte die Höhe der Expression mit dem Ausmaß und der Progressivität der Erkrankung [67]. Dies hat zu der Frage geführt, ob es sich bei dem Untergang der Motoneurone um zellautonome, sprich intrazelluläre pathophysiologische Prozesse handelt oder ob noch andere Zellen involviert sind. Jedoch haben die Forschungsergebnisse der letzten Jahre dazu beigetragen, dass sich die Hinweise darauf verdichten, dass Mikrogliazellen, die Träger von FALS-assoziierten SOD1-Mutationen sind, einen nicht unerheblichen Anteil am Untergang der Motoneuronen und dem Fortschreiten der Krankheit haben. Aufgrund der Tatsache, dass bei der FALS ca. 20% der Patienten Träger einer Mutation der SOD1 sind [4-5], wurden Tiermodelle mit

transgenen Mäusen entwickelt, die ebenfalls eine Mutation der SOD1 tragen. Diese Tiere zeigen ebenfalls Zeichen eines Untergangs des 1. u. 2. Motoneurons sowie nach histologischer Aufarbeitung Anzeichen einer Neuroinflammation in Form von Einwanderung von Mikroglia [68] und eine erhöhte Sekretion von Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  [69].

Boillee et al. konnten in ihrer Arbeit beobachten, dass durch Verringerung der mutierten SOD1-Proteine in Mikroglia der Progress der Erkrankung in späteren Stadien im Tiermodell abgeschwächt wird, wohingegen die gleiche Modifikation in Motoneuronen zu einer Verzögerung des Krankheitsausbruchs führte [70].

Des Weiteren konnten Clement et al. in ihren Arbeiten zeigen, dass in chimerischen Mäusen, Motoneurone mit der Wildtyp-SOD1, welche von Gliazellen mit einer SOD1-Mutante umgeben waren, untergingen, während Motoneurone, die Träger einer SOD1-Mutante waren, aber von Wildtyp-SOD1 Gliazellen umgeben waren, länger überlebten [32].

Die Arbeitsgruppen um Gong und Pramatarova haben sogar beobachtet, dass der Phänotyp im Tiermodell nur reproduzierbar ist, solange die SOD1-Mutation ubiquitär exprimiert wird. In ihren Arbeiten, die sich darauf beschränkten, nur in Astrozyten oder Motoneuronen eine Expressierung dieser Mutation hervorzurufen, konnten sie weder eine wie auch immer geartete Degeneration von Motoneuronen, noch sonstige neurologisch signifikante Phänotypen beobachten [71-72].

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen, welche Beers et al. bei ihren Experimenten mit Mäusen, die keine myeloiden oder lymphoiden Zellreihen ausbilden konnten, erhielten. Das Applizieren von mSOD1 tragenden Mikroglia konnte bei Mäusen, welche über den Wildtyp-SOD1 tragenden Motoneuronen verfügten, keinen Krankheitsausbruch induzieren. Allerdings wirkte die Zugabe von wSOD1-Mikroglia bei Mäusen, welche die mSOD1 in allen anderen Zellen trugen, neuroprotektiv. Es scheint, dass für den Ausbruch der Krankheit sowohl Mikroglia als auch andere Gliazellen sowie Motoneurone, Träger der Mutation sein müssen [33].

Diese Ergebnisse deuten stark auf einen Krankheitsmechanismus hin, der nicht autonom innerhalb einer Zelle abläuft, sondern auf Beteiligung anderer Zellen von außen angewiesen ist. Allerdings sind die Mechanismen, auf welche Art und Weise die SOD1-Mutation Einfluss auf die Aktivierung der Mikrogliazellen und der darauf

folgenden Schädigung der Neuronen nimmt, noch ungeklärt. Die Tatsache, dass inflammatorische Vorgänge schon vor dem erkennbaren Untergang von Motoneuronen auftreten, ist ein weiterer Hinweis, dass möglicherweise die Inflammation sich kausal zur Neurodegeneration verhält, und nicht nur eine Folge derselben ist, da beim Untergang der Motoneurone immunologische Ereignisse im Vordergrund stehen [73-75].

Weil in der Literatur den Mikroglia eine immer bedeutendere Rolle zugesprochen wird, war es das Anliegen dieser Arbeit, mögliche Auswirkung zu untersuchen, welche die SOD1-Mutation auf die Entzündungsreaktion haben könnte. Daher wurden drei unterschiedliche Zellpopulationen von Mäusemikroglia miteinander verglichen und ihre Entzündungsreaktionen nach Stimulation durch verschiedene Substanzen gegenübergestellt. Diese drei Zelllinien bestanden zum einen aus einer Population, welche die mutierte SOD1 G93A, überexprimierte. Die Entscheidung für die G93A-Mutante, bei der eine Glycin→Alanin-Substitution stattgefunden hat, wurde aufgrund der Tatsache gefällt, dass sie schon im Fokus vieler anderer Arbeiten hinsichtlich der Erforschung der ALS-assoziierten SOD1-Mutationen stand [70, 76-77]. Zum anderen aus einer Population, welche die Wildtyp-SOD1 überexprimierte. Als dritte Population wurde eine als Kontrollgruppe fungierende Zellreihe genommen, die keine SOD1 exprimieren konnte.

Was im Kontext dieser Arbeit beobachtet werden konnte, ist, dass die Überexprimierung des mit der ALS-assoziierten mutierten SOD1-Gens G93A im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien (Überexpression des SOD1-Wildtyps, Kontrollzellen ohne SOD1-Exprimierung), nach Stimulationen mit PamCys3-SK444 zu einer Steigerung der mikroglialen Ausschüttung des proinflammatorisch wirkenden Zytokins TNF- $\alpha$  führte. TNF- $\alpha$  ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine und kann eine große Bandbreite unterschiedlicher Reaktionen auslösen, unter anderem die neuronale Apoptose. Es übt seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptoren aus: TNF-R1 und TNF-R2. Bei der Untersuchung lumbaler Rückenmarksproben von G93A-Mäusen konnte bereits im präsymptomatischen Stadium der Erkrankung eine Erhöhung der mRNA sowohl von TNF- $\alpha$  als auch seines Rezeptors TNF-R1 festgestellt werden. Während des fortschreitenden Krankheitsverlaufs nimmt die Expression von Ligand und

Rezeptor weiterhin zu [78]. Dies ist insofern interessant als dass durch frühere Arbeiten die Vermutung, dass TNF- $\alpha$  eine schädliche Wirkung auf die Motoneurone ausübt, bestätigt werden konnte [79]. Kiaei et al. zeigten, dass beim Tiermodell durch medikamentöse Hemmung von TNF- $\alpha$ , das Fortschreiten der Krankheit verlangsamt wurde [80]. Analog dazu konnte die Arbeitsgruppe um Bigini herausfinden, dass durch den Einsatz eines TNF- $\alpha$ -binding Proteins, die Symptomatik im Mausmodell aufgehalten werden konnte [81]. Des Weiteren beschrieben Poloni et al erhöhte Serumwerte für TNF- $\alpha$  und dem gelösten TNF-R1 bei ALS-Patienten [82].

Gleichzeitig war zu beobachten, dass im Gegensatz zur gesteigerten TNF-a-Sekretion, nach Stimulation durch PamCys3-SK444 die Sekretion von IL-6, bei den Trägern der SOD1-Mutante G93A im Vergleich zu den Trägern des SOD1-Wildtyps überraschenderweise deutlich reduziert war. IL-6 ist unter anderem ein multifunktionales Mitglied der neuropoetischen Zytokinfamilie [83].

Die Ergebnisse mehrerer Arbeiten deuten darauf hin, dass IL-6 das neuronale Überleben verlängert, Neurotoxizität verringert und die axonale Regeneration günstig beeinflusst, insgesamt also eine eher neuroprotektive Funktion einnimmt [84-86].

Somit liegen zwei Eigenschaften des inflammatorischen Verhaltens von G93A überexprimierenden Mikroglia vor, zum einen die erhöhte Sekretion des nachgewiesenen neurotoxischen TNF- $\alpha$ , zum anderen die erniedrigte Sekretion des wahrscheinlich neuroprotektiven IL-6, in denen sie sich von ihren Wildtyp-Verwandten unterscheiden. Dieses veränderte Verhalten zeigt deutlich, welches erhöhte Gefahrenpotential in der Mutation des SOD1-Gens enthalten ist. Durch eine verstärkte Bereitschaft zur proinflammatorischen Sezernierung ist auch eine verstärkte Anzahl an unterzuehenden Motoneuronen zu erwarten.

Die ausgesuchten Stimulantien PamCys-SK444, LPS und (Poly I:C) besitzen unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Rezeptoren der Toll-Like-Rezeptor (TLR)-Familie. Pam3Cys-SK444 bindet an den TLR2 [46-48], LPS an den TLR4 [49-50], während (Poly I:C) ein TLR3-Ligand ist [51-53].

Die Familie der Toll-Like-Rezeptoren ist eines der Werkzeuge aus dem mannigfaltigen Arsenal der Mikroglia, welche die erste Verteidigungslinie gegenüber eindringenden ZNS-Pathogenen darstellen. Diese Rezeptoren erkennen bestimmte hochkonservierte strukturelle Motive, sogenannte PAMPS (pathogen-associated molecular-patterns) von Mikroorganismen [87-88]. Durch Signaltransduktion kann die Aktivierung dieser Rezeptoren die Expression zahlreicher Gene der Immunantwort regulieren, inklusive proinflammatorische Zytokine und Chemokine.

Seit längerem schon wird diskutiert, ob Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, wie TLR2 und TLR4, eine Rolle in den pathologischen Mechanismen der ALS spielen. Versuche haben gezeigt, dass in den ALS-Maus-Modellen eine deutliche Hochregulierung der Expression von TLR2 und CD14, einem CO-Rezeptor von TLR4, stattfindet [66, 88]. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass in den präsymptomatischen Stadien, eine chronische Stimulation durch LPS, einem TLR4-Liganden, den Ausbruch der Krankheit im Sinne der verstärkten neuronalen Degeneration bewirkt [89].

Da durch LPS und (Poly I:C), zwar auch eine gesteigerte Sezernierung von TNF- $\alpha$  bewirkt werden konnte, im Falle von LPS absolut gesehen sogar die höchste, diese jedoch zwischen den Vergleichsgruppen nicht signifikant unterschiedlich gewesen ist, wird durch die gewonnenen Ergebnisse nahegelegt, dass die verstärkte Reaktion der mSOD1-Mikrogliazellen hauptsächlich durch einen TLR2-abhängigen Weg induziert wird. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Casua et al konnte im Rückenmarksgewebe von ALS-Patienten durch immunhistochemische Analyse nicht nur zeigen, dass u.a. TLR2 und TLR4 eine erhöhte Expression aufwiesen, sondern dass TLR2 hauptsächlich in Zellen der Mikroglia/Makrophagen-Linie zu finden war, wohingegen TLR4 deutlich vor allem in Astrozyten erhöht war [88]. Wie eingangs erwähnt, löst die Bindung eines Liganden an einen TLR eine Signaltransduktion aus. Ein zentrales Protein, welches „Downstream“-Prozesse reguliert, ist das Adapterprotein MyD88. Dieses wird auch von IL-1- und IL-18-Rezeptoren als „Messenger“-Molekül verwendet. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass die TLR-MyD88-Kaskade, die eine zentrale Rolle in der mikroglialen Reaktion auf PAMPs einnimmt [90], nicht nur durch exogene Pathogene, sondern auch durch endogene Liganden ausgelöst werden kann [91]. Hitzeschockproteine (HSP), die nachgewiesenermaßen die Aggregation von

mSOD1 zu toxischen Proteinen verhindern [92], können mit TLR2, TLR4 und CD14 interagieren [93-94]. Auch die Überreste nekrotischer Zellen sind in der Lage, über den TLR2-Signalweg eine Immunantwort zu induzieren [95].

Dies lässt Raum für Spekulationen hinsichtlich der möglichen Existenz von endogenen Liganden für diese Rezeptoren im zentralen Nervensystem, welche auch für die ALS relevant sein könnten, auch wenn diese bislang noch nicht identifiziert werden konnten. Unsere Hypothese ist, dass die Rezeptoren der angeborenen Immunität eine nicht unerhebliche Rolle für die Regulierung der toxischen Effekte der mikroglialen Aktivierung in der Pathogenese der ALS spielen. Auf diese Weise könnte die Exprimierung der SOD1-Mutation durch Interaktion mit der Rezeptor-vermittelten inflammatorischen Signalkette, zur neurotoxischen Wirkung der Mikroglia beitragen.

Auffällig ist, dass in der vorliegenden Arbeit die modulierende Wirkung der mSOD1-Überexpression auf die inflammatorische Aktivität der Mikroglia, nur über den TLR2-, nicht jedoch den TLR4-Weg erfolgt. Zumal berichtet wurde, dass es im Tiermodell durch chronische LPS-Stimulation ebenfalls zum Ausbruch der Degeneration von Motoneuronen kommt [89]. Eine Arbeit von Babcock et al scheint jedoch unsere Ergebnisse zu untermauern. Bei TLR2-knockout-Mäusen, denen stereotaktisch artifizielle axonale Schädigungen zugefügt wurden, kam es in der Anfangsphase zu deutlich geringerer Mikrogliaaktivierung und –einwanderung sowie signifikant erniedrigten Mengen an TNF- $\alpha$  und anderen Zytokinen. Hingegen konnte bei TLR4-knockout-Mäusen dieser Effekt nicht erzielt werden [96]. Es stellt sich die Frage, welches die Querverbindung zwischen der Expression des mutierten SOD1-Gens und der vermehrten TNF- $\alpha$ -Sekretion durch den TLR2-Signalweg ist.

Eine mögliche Querverbindung ist der nächste Aspekt, dem sich diese Arbeit angenommen hat, die Rolle von ROS. Oxidativer Stress steht schon seit langem in der Diskussion, einen Anteil an den pathologischen Prozessen der ALS zu haben. Oxidativer Stress kommt durch eine Überproduktion von aus Sauerstoff entstandenen Spezies, beispielsweise Superoxid-Anionradikale, Hydroxyl-Radikale und Hydroperoxyl-Radikale, zustande. Durch die mannigfaltigen Wirkungen von ROS auf biologische Moleküle konnten mehrere neue Marker bestimmt werden, durch welche es möglich ist,

nach postmortem Untersuchungen unterschiedlicher Gewebe das Vorhandensein von oxidativem Schaden festzustellen. Als Beispiele sind u.a. zu nennen oxidierte DNA-Basen, Fettsäureprodukte und als früheste Anzeichen Tyrosinnitrierung [43]. Sowohl im Plasma als auch im Liquor von ALS-Patienten konnte eine signifikante Steigerung von Malondialdehyd und 8-Hydroxylguanosin, zwei weiteren Markern oxidativen Schadens gemessen werden. Diese korrelierten auch mit dem Fortschreiten der Erkrankung [97-98]. Im Maus-Modell mit transgenen mSOD1-Mäusen finden sich in Rückenmarksgewebeproben ebenfalls Marker einer Protein- und Lipidoxidierung, sowohl in prä- als auch in symptomatischen Stadien [99-100].

Aufgrund der vielen möglichen Entstehungsorte in der Zelle und den mannigfaltigen Angriffspunkten der reaktiven Sauerstoffspezies [44] ist die Pathophysiologie der durch das mutierte SOD1-Gen induzierten Genese der ROS sehr kompliziert. Die reaktiven Sauerstoffspezies werden mit exzitotoxischen Schädigungen der Motoneuronen in Zusammenhang gebracht. Sie spielen auch eine Rolle in verschiedenen Signalwegen, welche die neuronale Apoptose, mitochondriale Schädigungen und SOD1-Aggregation betreffen. Die ROS werden hauptsächlich von Zellen des Immunsystems produziert, und regulieren wiederum die inflammatorische Aktivität. Daher richtete sich das Augenmerk dieser Arbeit nicht nur auf das Sezernierungsverhalten der unterschiedlichen Zellpopulationen hinsichtlich TNF- $\alpha$  und IL-6, sondern auch auf die Freisetzung von ROS und als möglicher Marker für die Antioxidationskapazität, die Menge an Thiolgruppen in den Zelllysaten. Als ROS-Marker fungierte die Produktion von NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Überraschenderweise fand sich entgegen der Erwartung zwar ein leichter, aber dennoch kein signifikanter Anstieg der NO-Generierung nach Pam3Cys-SKKKK – Stimulation. NO ist einer der bei der ROS-Generierung entstehenden stabilen Metaboliten. Im Gegensatz dazu konnte bei der Betrachtung des anderen Markers für die ROS-Generierung festgestellt werden, dass nach Stimulation mit Pam3Cys-SKKKK über den TLR2-Weg, die G93A-überexprimierenden Mikroglia im Vergleich zu beiden anderen Zelllinien, eine signifikant erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Sekretion und eine signifikant erniedrigte Antioxidationskapazität aufwiesen. Die Diskrepanz zwischen der Entstehung von NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist sicherlich ein Punkt dieser Arbeit, der schwer zu erklären ist, da beide zwar Produkte unterschiedlicher Seitenarme der ROS-Generierung sind, jedoch

parallel verlaufen und zumindest laut den chemischen Reaktionsmodellen schwer voneinander zu trennen sind. Weitere Untersuchungen sind nötig, ob es sich hierbei um eine zu niedrige Sensitivität unseres Assays zur NO-Bestimmung handelte. Denn die signifikant erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung und erniedrigte Thiolgruppenanzahl deuten klar auf eine vermehrte Generierung von ROS hin. Da ROS jedoch nicht nur Folge einer Entzündungsreaktion ist, sondern auch modulierenden Einfluss auf diese nimmt, ist schwer zu differenzieren, was Folge und was Ursache ist. Aus diesem Grunde schien es uns sinnvoll, nochmals die TNF- $\alpha$ -Sekretion nach Pam3Cys-SKKKK-Stimulation zu messen, diesmal jedoch nach Vorbehandlung der einzelnen Zellpopulationen mit den Antioxidantien N-Acetyl-Cystein und Katalase. Interessanterweise war es durch Zugabe dieser Antioxidantien möglich, die mit der G93A-Überexpression assoziierte verstärkte Freisetzung von TNF- $\alpha$  aufzuheben. Die Gabe der Antioxidantien beeinträchtigt vermutlich hauptsächlich die Generierung von ROS, nicht aber den TLR2-Stimulus Pam3Cys-SKKKK. Dennoch kommt es zu einer Modulation im Sinne eines Rückgangs der TNF- $\alpha$ -Sekretion bei den G93A-überexprimierenden Mikroglia. Dies legt den Schluss nahe, dass die Generierung von ROS den federführenden Part in Hinblick auf die erhöhte TNF- $\alpha$ -Sekretion hat.

Eine Studie, welche diese Vermutung untermauert und möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der Generierung von ROS und der TLR2-abhängigen erhöhten TNF- $\alpha$ -Sekretion sieht, wurde von Liu et al. durchgeführt. Sie konnten nachweisen, dass die vermehrte Sekretion auf einer posttranskriptionalen Ebene beeinflusst werden muss. Insbesondere konnten sie die Rolle der TNF- $\alpha$ -converting-enzymes ADAM10 und 17 näher beleuchten. Durch das Ausschalten dieser Enzyme konnten sie ebenfalls den Effekt einer TLR2-abhängigen vermehrten Sekretion von TNF- $\alpha$  umkehren [101]. Interessanterweise können ADAM10 und ADAM17 beide durch ROS aktiviert werden, wie die Arbeit von Zili Zhang et al. belegen, so dass sich hier ein möglicher Modulationsmechanismus durch die ROS-Generierung auftut [102]. Mehrere Autoren [38, 103] haben über die pathogenetische Rolle des NADPH-Oxidase-Komplexes, welcher als Antwort auf inflammatorische Signale reaktive Sauerstoffspezies freisetzt, im Zusammenhang mit der ALS berichtet.

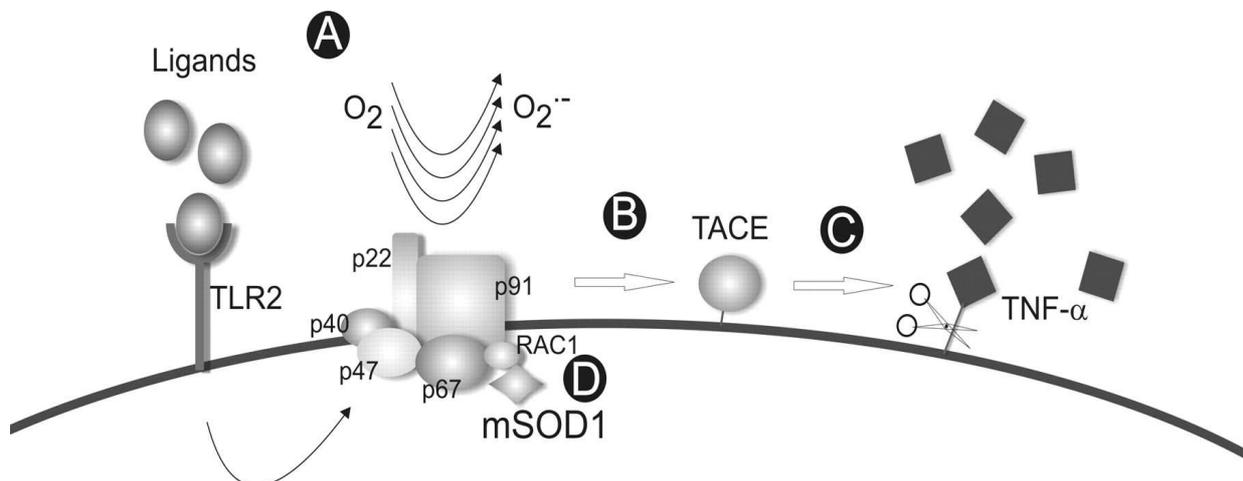
Dieser NADPH-Oxidase-Komplex besteht zum einen aus zwei miteinander assoziierten Transmembranproteinen (p22-Phox und gp91-Phox) und zum anderen aus drei cytosolischen Bestandteilen (p-47, p67-, und p40-Phox). Nach Zellaktivierung wird p47-phox phosphoryliert. Dies führt dazu, dass der Cytosolkomplex sich an die Zellmembran anlagert. Die kleine GTPase Rac1 gilt als wichtiger Aktivator dieser Oxidase. Interessanterweise kann die Superoxiddismutase, die eigentlich ein cytosolisches Enzym ist, das die Umwandlung von Superoxid zu  $H_2O_2$  ermöglicht, an Rac1 binden. Auf diese Weise dient sie als selbstregulierender Redox-Sensor für die NADPH-abhängige Genese von reaktiven Sauerstoffspezies. Die ALS-assoziierten Mutationen des SOD1-Gens stören jedoch diesen Mechanismus der Selbstlimitierung, was zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führt [38].

Aus diesem Grund konnte sowohl durch das Entfernen des Gens für gp91-Phox als auch durch Gabe von Apocynin, dass die Aggregation des NADPH-Komplexes hemmt, die Lebensspanne bei transgenen G93A-Mausmodellen verlängert werden.

In unserer Arbeit konnten wir nachweisen, dass G93A-überexprimierende Mikrogliazellen, welche mit dem Liganden PamCys3-SK444 stimuliert wurden, im Vergleich zu den beiden anderen Zellpopulationen eine deutlich erhöhte Ausschüttung des neurotoxischen  $TNF-\alpha$  aufwiesen. Diese Stimulation auf dem TLR2-Weg führte auch zu einer gesteigerten Generierung von ROS und somit zu vermehrtem oxidativen Stress, während sich gleichzeitig die antioxidative Kapazität der Zellen verringerte. Zusätzlich fand eine verminderte Sekretion des neuroprotektiven IL-6 statt. Diese Ergebnisse reihen sich in die Beobachtungen zahlreicher Arbeitsgruppen ein, dass mikrogliale Träger der Superoxiddismutase, einen schwerwiegenden Anteil an dem Zugrundegehen der Motoneurone im Rahmen der familiären ALS haben. Auch die Tatsache der erhöhten ROS-Generierung fügt sich in die Überlegungen hinsichtlich eines möglichen Pathomechanismus ein, der die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies berücksichtigt. Bezieht man die Ergebnisse vorheriger und weiterführender Studien ein, so verdichtet sich der Verdacht, dass durch ein Zusammenspiel von bestimmten Immunrezeptoren, ihrer spezifischen Liganden sowie einer dysregulierten Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies und der damit konsekutiven Ausschüttung neurotoxischer Zytokine, der Untergang der Motoneurone induziert wird. Ein möglicher Kandidat wäre die mSOD1. Zhao et al haben in einer Arbeit

nachgewiesen, dass extrazelluläre mSOD1 über den TLR2/CD14-Signalweg zu einer erhöhten Aktivierung von Mikroglia führen kann [104]. Auch wenn in dem hier vorliegenden Zellmodell die Gabe von Antioxidantien zu einer Umkehr der erhöhten Zytokinsekretion führte, so scheint es doch, betrachtet man die komplexen Interaktionen zwischen dem oxidativen Stress und anderen pathologischen Mechanismen, unwahrscheinlich, dass das Fortschreiten der Krankheit durch einen einzigen therapeutischen Angriffspunkt aufzuhalten ist. Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass durch den Konsum des Antioxidants Vitamin E der Ausbruch der Krankheit im präklinischen Stadium aufgehalten werden kann. Jedoch zeigte eine Meta-Analyse, welche alle randomisiert oder quasi-randomisiert kontrollierten klinischen Studien zur Grundlage hatte, die mit Antioxidantien therapierten, die Ineffizienz dieser Behandlung [105].

Die Verbindung zwischen der Mutation des SOD1-Gens, dem oxidativen Stress sowie dem angeborenen Immunsystem mag für zukünftige Therapien jedoch ein wichtiger Ansatz sein.



**Abbildung 19: TLR2 induzierte Generierung von ROS mit konsekutiver TNF- $\alpha$ -Sekernierung**

## **VI. Limitation der Arbeit**

Bei dieser Arbeit wurde ein etabliertes Zellmodell mit Zellen, welche die G93A-SOD1-Mutante überexprimierten, verwendet. Die Mutation löst in vivo bei Mäusen der ALS ähnliche Symptome aus. Diese Mutation findet sich allerdings größtenteils bei Patienten, welche an der familiären Form der ALS erkrankt sind. Dieses Patientenkollektiv macht insgesamt nur einen sehr kleinen Prozentsatz aller ALS-Erkrankten aus. Ca. 95% der Patienten erkranken an der spontanen ALS. Die Tatsache, dass der Phänotyp der Krankheit sowohl bei der familiären als auch bei der spontanen ALS gleich zu sein scheint, gibt Hoffnung, dass durch Erforschung der ersteren, auch Hinweise auf die pathophysiologischen Vorgänge der spontanen ALS zu Tage kommen.

Ein Zellmodell ist selbstverständlich nur eine sehr ungefähre Annäherung an die komplexen Wechselwirkungen, welche sich zwischen den einzelnen Zellen und ihrer Umgebung abspielen. Einzelne Punkte, die herausgelöst von der Gesamtheit des zu untersuchenden Systems und näher beleuchtet wurden, mögen nicht unbedingt die ganze Realität in vivo widerspiegeln. Bei dieser Arbeit wurde gezielt nur einer der mannigfaltigen Akteure ausgewählt, und dieser losgelöst vom Kontext seiner Nachbarschaft (Motoneurone, Gliazellen, etc.) betrachtet. Dabei wurde im Anschluss versucht, die beobachteten Resultate im Zusammenhang mit bisherigen Beobachtungen in ein Erklärungsmodell zu integrieren.

## VII. Literaturverzeichnis

1. Magnus, T., et al., *Disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: predictors of survival*. Muscle Nerve, 2002. **25**(5): p. 709-14.
2. McCombe, P.A. and R.D. Henderson, *Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis*. Gend Med, 2010. **7**(6): p. 557-70.
3. Logroscino, G., et al., *Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(4): p. 385-90.
4. Andersen, P.M., et al., *Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2003. **4**(2): p. 62-73.
5. Ticozzi, N., et al., *Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis*. Arch Ital Biol, 2011. **149**(1): p. 65-82.
6. Bruijn, L.I., T.M. Miller, and D.W. Cleveland, *Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS*. Annu Rev Neurosci, 2004. **27**: p. 723-49.
7. Chaudhuri, K.R., et al., *The validation of El Escorial criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathological study*. J Neurol Sci, 1995. **129 Suppl**: p. 11-2.
8. Gallagher, J.P., *Pathologic laughter and crying in ALS: a search for their origin*. Acta Neurol Scand, 1989. **80**(2): p. 114-7.
9. Traynor, B.J., et al., *Effect of a multidisciplinary amyotrophic lateral sclerosis (ALS) clinic on ALS survival: a population based study, 1996-2000*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003. **74**(9): p. 1258-61.
10. Murray, B. and B. Mitsumoto, *Disorders of upper and lower motor neuron*. . Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, editors. Neurology in clinical practice. 5th edn. **In: Philadelphia: Butterworth-Heinemann and imprint of Elsevier Inc.; .** : p. p. 2183–220. .
11. Isaacs, J.D., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis with sensory neuropathy: part of a multisystem disorder?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007. **78**(7): p. 750-3.
12. Pugdahl, K., et al., *Generalised sensory system abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: a European multicentre study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007. **78**(7): p. 746-9.
13. Graves, M.C., et al., *Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and T cells*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2004. **5**(4): p. 213-9.
14. Miller, R.G., et al., *Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)*. Cochrane Database Syst Rev, 2002(2): p. CD001447.
15. Gordon, P.H., et al., *Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial*. Lancet Neurol, 2007. **6**(12): p. 1045-53.
16. Meininger, V., J. Shefner, and M. Cudkowicz, *Lithium therapy in ALS*. Amyotroph Lateral Scler, 2008. **9**(2): p. 122.
17. Schiffer, R.B., R.M. Herndon, and R.A. Rudick, *Treatment of pathologic laughing and weeping with amitriptyline*. N Engl J Med, 1985. **312**(23): p. 1480-2.
18. Wilms, H., et al., *Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration*. J Neuroimmunol, 2003. **144**(1-2): p. 139-42.

19. Troost, D., J.J. Van den Oord, and J.M. Vianney de Jong, *Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1990. **16**(5): p. 401-10.
20. Sargsyan, S.A., P.N. Monk, and P.J. Shaw, *Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis*. *Glia*, 2005. **51**(4): p. 241-53.
21. McGeer, E.G. and P.L. McGeer, *Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis*. *BioDrugs*, 2005. **19**(1): p. 31-7.
22. del Rio-Hortega, P., *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (ed. Hocker, P. P.) (Penfeld Wed, New York, ). 1932.
23. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(1): p. 57-69.
24. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. *Science*, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
25. Streit, W.J. and Q.S. Xue, *Life and death of microglia*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2009. **4**(4): p. 371-9.
26. Bechmann, I., et al., *Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages*. *Eur J Neurosci*, 2001. **14**(10): p. 1651-8.
27. Hickey, W.F. and H. Kimura, *Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo*. *Science*, 1988. **239**(4837): p. 290-2.
28. Simard, A.R. and S. Rivest, *Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia*. *FASEB J*, 2004. **18**(9): p. 998-1000.
29. Coull, J.A., et al., *BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain*. *Nature*, 2005. **438**(7070): p. 1017-21.
30. Solomon, J.N., et al., *Origin and distribution of bone marrow-derived cells in the central nervous system in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. *Glia*, 2006. **53**(7): p. 744-53.
31. Monk, P.N. and P.J. Shaw, *ALS: life and death in a bad neighborhood*. *Nat Med*, 2006. **12**(8): p. 885-7.
32. Clement, A.M., et al., *Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice*. *Science*, 2003. **302**(5642): p. 113-7.
33. Beers, D.R., et al., *Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(43): p. 16021-6.
34. Rosen, D.R., et al., *Genetic linkage analysis of familial amyotrophic lateral sclerosis using human chromosome 21 microsatellite DNA markers*. *Am J Med Genet*, 1994. **51**(1): p. 61-9.
35. Hough, M.A., et al., *Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: structures of motor neuron disease mutants*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(16): p. 5976-81.
36. Reaume, A.G., et al., *Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury*. *Nat Genet*, 1996. **13**(1): p. 43-7.
37. Shaw, B.F. and J.S. Valentine, *How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein?* *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(2): p. 78-85.

38. Harraz, M.M., et al., *SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 659-70.
39. Devlin, T.M., *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. 2002. **5th**, Wiley-Liss, New, York, USA, , [ISBN] 0-471-411361.
40. Halliwell, B. and C.E. Cross, *Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 10**: p. 5-12.
41. Di Giorgio, F.P., et al., *Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model*. Nat Neurosci, 2007. **10**(5): p. 608-14.
42. Yamanaka, K., et al., *Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7594-9.
43. Ischiropoulos, H. and J.S. Beckman, *Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?* J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 163-9.
44. Simpson, E.P., A.A. Yen, and S.H. Appel, *Oxidative Stress: a common denominator in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15**(6): p. 730-6.
45. Blasi, E., et al., *Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus*. J Neuroimmunol, 1990. **27**(2-3): p. 229-37.
46. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. Science, 1999. **285**(5428): p. 736-9.
47. Shin, H.S., et al., *Bacterial lipoprotein TLR2 agonists broadly modulate endothelial function and coagulation pathways in vitro and in vivo*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 1119-30.
48. Zahringer, U., et al., *TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity*. Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 205-24.
49. Andersson, J., et al., *Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level*. Immunol Rev, 1992. **127**: p. 69-96.
50. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
51. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
52. Fortier, M.E., et al., *The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(4): p. R759-66.
53. Manetti, R., et al., *Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha and interleukin-12*. Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2656-60.
54. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-8.
55. Clauss, M., et al., *A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1321-9.
56. Malik, S.T. and F.R. Balkwill, *Antiproliferative and antitumor activity of TNF in vitro and in vivo*. Immunol Ser, 1992. **56**: p. 239-68.
57. Hehlgans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.

58. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
59. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
60. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 175-95.
61. Zhou, M., et al., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. Anal Biochem, 1997. **253**(2): p. 162-8.
62. Riener, C.K., G. Kada, and H.J. Gruber, *Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine*. Anal Bioanal Chem, 2002. **373**(4-5): p. 266-76.
63. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
64. Compton, S.J. and C.G. Jones, *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Anal Biochem, 1985. **151**(2): p. 369-74.
65. Rubin, R.W. and R.W. Warren, *Quantitation of microgram amounts of protein in SDS-mercaptoethanol-tris electrophoresis sample buffer*. Anal Biochem, 1977. **83**(2): p. 773-7.
66. Letiembre, M., et al., *Innate immune receptor expression in normal brain aging*. Neuroscience, 2007. **146**(1): p. 248-54.
67. Henkel, J.S., et al., *Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue*. Ann Neurol, 2004. **55**(2): p. 221-35.
68. Alexianu, M.E., M. Kozovska, and S.H. Appel, *Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression*. Neurology, 2001. **57**(7): p. 1282-9.
69. Hensley, K., et al., *Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 2002. **82**(2): p. 365-74.
70. Boillee, S., et al., *Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1389-92.
71. Gong, Y.H., et al., *Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration*. J Neurosci, 2000. **20**(2): p. 660-5.
72. Pramatarova, A., et al., *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment*. J Neurosci, 2001. **21**(10): p. 3369-74.
73. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1998. **12 Suppl 2**: p. S1-6.
74. Moisse, K. and M.J. Strong, *Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(11-12): p. 1083-93.
75. Weydt, P., et al., *Neuro-inflammation as a therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis*. Curr Opin Investig Drugs, 2002. **3**(12): p. 1720-4.
76. Gurney, M.E., et al., *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*. Science, 1994. **264**(5166): p. 1772-5.

77. Hensley, K., et al., *Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation*. J Neuroinflammation, 2006. **3**: p. 2.
78. Yoshihara, T., et al., *Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 2002. **80**(1): p. 158-67.
79. Robertson, J., et al., *Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha*. J Cell Biol, 2001. **155**(2): p. 217-26.
80. Kiaei, M., et al., *Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurosci, 2006. **26**(9): p. 2467-73.
81. Bigini, P., et al., *Recombinant human TNF-binding protein-1 (rhTBP-1) treatment delays both symptoms progression and motor neuron loss in the wobbler mouse*. Neurobiol Dis, 2008. **29**(3): p. 465-76.
82. Poloni, M., et al., *Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. Neurosci Lett, 2000. **287**(3): p. 211-4.
83. Bazan, J.F., *Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold*. Neuron, 1991. **7**(2): p. 197-208.
84. Hirota, H., et al., *Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2627-34.
85. Ikeda, K., et al., *Neuroprotective effect of various cytokines on developing spinal motoneurons following axotomy*. J Neurol Sci, 1996. **135**(2): p. 109-13.
86. Zhong, J., et al., *Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice*. J Neurosci, 1999. **19**(11): p. 4305-13.
87. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
88. Casula, M., et al., *Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue*. Neuroscience, 2011. **179**: p. 233-43.
89. Nguyen, M.D., et al., *Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurosci, 2004. **24**(6): p. 1340-9.
90. Esen, N. and T. Kielian, *Central role for MyD88 in the responses of microglia to pathogen-associated molecular patterns*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6802-11.
91. Beg, A.A., *Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 509-12.
92. Liu, J., et al., *Elevation of the Hsp70 chaperone does not effect toxicity in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 2005. **93**(4): p. 875-82.
93. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15028-34.
94. Vabulas, R.M., et al., *The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20847-53.
95. Sauter, B., et al., *Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 423-34.

96. Babcock, A.A., et al., *Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation*. J Neurosci, 2006. **26**(49): p. 12826-37.
97. Bogdanov, M., et al., *Increased oxidative damage to DNA in ALS patients*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(7): p. 652-8.
98. Oteiza, P.I., et al., *Evaluation of antioxidants, protein, and lipid oxidation products in blood from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients*. Neurochem Res, 1997. **22**(4): p. 535-9.
99. Andrus, P.K., et al., *Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 1998. **71**(5): p. 2041-8.
100. Cutler, R.G., et al., *Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 2002. **52**(4): p. 448-57.
101. Liu, Y., et al., *Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TLR2*. J Biol Chem, 2009. **284**(6): p. 3691-9.
102. Zhang, Z., et al., *Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate*. FASEB J, 2001. **15**(2): p. 303-5.
103. Wu, D.C., et al., *The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12132-7.
104. Zhao, W., et al., *Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury*. Glia, 2010. **58**(2): p. 231-43.
105. Orrell, R.W., R.J. Lane, and M. Ross, *Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis / motor neuron disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. CD002829.

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| ALS:            | amyotrophe Lateralsklerose  |
| FALS:           | familiäre amyotrophe Lateralsklerose  |
| SALS:           | spontane amyotrophe Lateralsklerose   |
| SOD1:           | Superoxiddismutase 1  |
| wSOD1:          | Wildtyp-Superoxiddismutase  |
| mSOD1:          | Mutanten-Superoxiddismutase   |
| PAMCys3-SKXXX:  | N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine |
| LPS:            | Lipopolysaccharid   |
| I:OPoly:        | Polyinosinic-polycytidylic-Säure  |
| TLR:            | Toll-like-Rezeptor  |
| TNF- $\alpha$ : | Tumornekrosefaktor- $\alpha$  |
| IL-6:           | Interleukin-6   |
| ROS:            | reaktive Sauerstoffspezies  |
| PNF:            | propriozeptive neuromuskuläre Fazilitation  |
| PEG-Sonde:      | perkutane endoskopische Gastrostomie-Sonde  |
| COX-2-Hemmer:   | Cyclooxygenase-2-Hemmer   |
| ZNS:            | zentrales Nervensystem  |
| NO:             | Stickstoffoxid  |
| Cu:             | Kupfer  |
| Zn:             | Zink  |
| DNA:            | Desoxyribonukleinsäure  |
| mM:             | Milimol   |
| $\mu$ g:        | Mikrogramm  |
| ng:             | Nanogramm   |
| NAPDH-Oxidase   | Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase  |

## **IX. Danksagung**

Meinen Dank möchte ich vor allem Dr. med. Liu, Prof. Dr. med. Faßbender und dem Team der AG Faßbender aussprechen, die mir alle während der Zeit meiner Labortätigkeit unterstützend und beratend zur Seite gestanden haben. Dr. med. Liu insbesondere, dass er mir das Thema dieser Doktorarbeit überließ und mir immer wieder anregende Impulse gab, wenn ich so manches Mal kein rettendes Ufer mehr sehen konnte. Des Weiteren den guten Seelen des Teams Fr. Schottek und Frau Commercon, denn ohne die kompetenten, hilfsbereiten und verständigen MTAs wäre ich als frisch beginnender Doktorand sicherlich rettungslos verloren gewesen. Ebenfalls gebührt Prof. Dr. med. Faßbender großer Dank, dass er sich trotz der langen Pause, die zwischen Abschluss der letzten Experimente und dem Einreichen der Doktorarbeit entstand, die Mühe gemacht hat, sich derselbigen nochmals anzunehmen. Es war eine sehr intensive und ereignisreiche Zeit, in der es viele Gelegenheiten gab, die Höhen und Tiefen des Lebens auszuloten.

Ein nicht in Worte zu fassender Dank an meine Mutter, der ich so vieles verdanke. Ein Gruß an meinen Vater, an welchem Ort er nun auch sein mag, ich bin sicher, dass ihn dies mit Freude erfüllen wird.

Zuletzt möchte ich mich bei all den Menschen um mich herum bedanken, die mich während dieser Zeit privat begleitet haben und mir mit ihren Gedanken und Meinungen, Ratschlägen und ihrer bloßen Anwesenheit das Gefühl gegeben haben, mich nicht „weinend aus diesem Bund stehlen zu müssen“ .

## X. Lebenslauf

Persönliche Daten: Alik Dawson, geboren am 05.11.1979 in Cotonou (Benin)

Werdegang:

|             |   |
|-------------|---|
| 1999        | Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Max-Mannesmann-Gymnasium (Duisburg Huckingen)                      |
| 1999-2000   | Wehrdienst als Sanitäter im 1. Wachbataillon  |
| 2001        | Immatrikulation an der med. Fakultät der Georg-August-Universität in Göttingen                              |
| 2003        | Abschluss des Physikums mit der Gesamtnote „gut“  |
| 2007        | Wechsel an die med. Fakultät der Universität des Saarlandes<br>Beginn mit der Promotion in der AG Faßbender |
| 2008        | Abschluss des Medizinstudiums mit der Note „gut“  |
| 2009-2010   | Assistenzarzt in der Frauenheilkunde der Caritas Klinik St. Theresia (Saarbrücken)                          |
| Seit 2011   | Assistenzarzt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik des Saarlandes  |
| Interessen: | Theater (sowohl aktiv als auch als Zuschauer)<br>Sport (Badminton und Squash)                               |