

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. C. Ludolph

Matrixmetalloproteinasen in ZNS und Haut bei der ALS und im ALS Modell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von

Friederike Maria Sophia Huber-Abel
aus Schwabmünchen

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Albert C. Ludolph

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriele E. Lang

Tag der Promotion: 10. November 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Die amyotrophe Lateralsklerose	1
1.2 Hautveränderungen bei der ALS	2
1.3 Die Matrixmetalloproteinasen	4
1.4 Matrixmetalloproteinasen und ALS	6
1.5 Ziel und Fragestellungen der Arbeit.....	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Material.....	9
2.1.1 Chemikalien.....	9
2.1.2 Kits	10
2.1.3 Geräte	10
2.1.4 Plastikwaren	11
2.1.5 EDV	12
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Mausmodell und Patienten	13
2.2.2 Probengewinnung.....	16
2.2.3 Homogenisation der Proben	17
2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	18
2.2.5 Bestimmung der Matrixmetalloproteinasekonzentrationen	19
2.2.6 Validierung.....	28
2.2.7 Statistische Auswertung	29
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Wiederfindung des MMP-ELISA	30
3.2 Linearität des MMP-ELISA	31
3.3 Verdünnung der Proben	33

3.4	<i>Ergebnisse beim Menschen</i>	33
3.4.1	Liquor	33
3.4.2	Serum.....	37
3.4.3	Haut.....	40
3.5	<i>Ergebnisse beim Tiermodell</i>	43
3.5.1	Rückenmark	43
3.5.2	Kleinhirn	46
3.5.3	Haut.....	48
4	Diskussion	50
4.1	<i>Generelle Hochregulation der MMP-9</i>	50
4.1.1	Ergebnisse aus früheren Studien	51
4.1.2	Regulation und Hochregulation der MMPs	51
4.2	<i>Geringere Erhöhung der MMP-2 Konzentration</i>	56
4.2.1	Abnahme MMP-2 im Krankheitsverlauf	56
4.2.2	Unterschiedliche Regulation von MMP-2 und MMP-9	57
4.3	<i>Abhängigkeit der MMPs von weiteren Faktoren</i>	58
4.4	<i>Signifikante Veränderungen der MMPs im Kleinhirn</i>	61
4.5	<i>Hochregulation der MMPs in der Haut</i>	61
4.6	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick</i>	62
4.6.1	Gemeinsame Betrachtung der Prozesse in ZNS und Haut	62
4.6.2	Haut als mögliche Biomarkerquelle	63
4.6.3	Ausblick	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
	Anhang	80
	Danksagung	81
	Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

3-NT	3-Nitrotyrosin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ALSFRS	Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale
AP-1	Aktivatorprotein-1
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
Cu	Kupfer
Cra	„cramping“
d	Tage
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK 1/2	„extracellular-signal regulated kinase 1/2“ (extrazelluläre-signal regulierte Kinase 1/2)
ETS	„E-twenty six “ (Familie von Transkriptionsfaktoren)
GC	Guanin-Cytosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IκBα	Inhibitor von NFκB, alpha
IL	Interleukin
JNK	Jun N-terminale Kinase
l	Liter
m	männlich
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
μl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmol	millimolar

MMP	Matrixmetalloproteinase
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MMP-2	Matrixmetalloproteinase-2
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
MRCS	Medical Research Council sumscore
mRNA	„messenger ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
N	Anzahl der Versuche
n	number/Anzahl
NFκB	nukleärer Faktor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p	Signifikanzniveau
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride (Lösung, 1 mmol)
RM	Rückenmark
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
ROS	„reactive oxygen species“ (reaktive Sauerstoffradikale)
SOD	Superoxid Dismutase
Sp-1	„stimulating protein-1“
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TBS	Tris Buffered Saline (20 mM Tris, 500 mM Natrium Chlorid, pH = 7,5)
TDP-43	„transactivation-responsive DNA-binding protein-43“
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
w	weiblich
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die amyotrophe Lateralsklerose

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine Motoneuronerkrankung und wurde erstmals 1869 durch den Franzosen Jean Martin Charcot beschrieben (Charcot 1869).

Die Krankheit zeichnet sich durch eine rasch progressive Degeneration sowohl des ersten Motoneurons (Betz-Riesenzellen im motorischen Kortex) als auch des zweiten Motoneurons (motorische Vorderhornzellen im Rückenmark, bulbäre Hirnnervenkerne) aus (Cleveland 1999).

Erstsymptome sind Muskelkrämpfe, Faszikulationen oder allgemeine Erschöpfung. Im weiteren Verlauf kommt es zu progredienten Paresen und Atrophien, zu Beginn häufig in den distalen Extensoren der Extremitäten. Die Ausfälle sind zunächst fokal und breiten sich dann kontinuierlich auf andere Körperpartien aus. Durch den Verlust der Sprache, Mimik, Gestik und des Schluckens kann es in späten Stadien zu einem kompletten Verlust der Kommunikation mit der Außenwelt kommen.

Limitierender Faktor für die Lebenserwartung der Patienten ist die respiratorische Insuffizienz. Die mittlere Überlebensdauer der Patienten beträgt etwa 3,5 Jahre nach Symptombeginn. Aufgrund dieser kurzen Überlebenszeit wird die Inzidenz dieser schweren verhängnisvollen Erkrankung oft unterschätzt. Sie ist mit 2,5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner annähernd hoch wie bei der Multiplen Sklerose, einer in der Bevölkerung viel bekannteren Erkrankung (Brooks 1994; Ludolph 2006; Strong and Rosenfeld 2003; Winter 2004).

Bei 90-95% der Patienten tritt die Erkrankung sporadisch auf (sALS), nur 5-10% leiden an der meist autosomal dominant vererbten familiären Form (fALS).

Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 56 bis 58 Jahre, Männer sind bei der sporadischen Form häufiger betroffen als Frauen (1,5:1). Bei der vererbten Form

liegt das Erkrankungsalter bei etwa 46 Jahren, Männer und Frauen erkranken gleich häufig.

Die familiäre ALS beruht bei 10-15% auf einer Mutation im Gen der Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD). Die Entwicklung eines, auf dieser Mutation basierenden, transgenen Tiermodells stellt eine wichtige Grundlage zur Erforschung der Ätiologie und der Pathogenese der ALS dar. Da sich die sporadische und familiäre Form der ALS klinisch sehr ähneln, könnten neue Erkenntnisse in der Pathologie der familiären Form auch auf die sporadische Form übertragen werden können. Gruzman et al. konnten eine Erhöhung eines SOD-beinhaltendes Proteins bei beiden Formen der ALS aufzeigen, was auf gemeinsame zugrunde liegende Prozesse hinweisen kann (Gruzman, Wood et al. 2007).

Die Cu/Zn-SOD ist ein Enzym, welches zur Entgiftung zytotoxischer freier Sauerstoffradikale beiträgt. Es hat sich allerdings gezeigt, dass nicht ein Funktionsverlust dieses Enzyms, sondern eher der toxische Funktionszuwachs des mutierten Gens eine potentielle Ursache für die Schädigung der Motoneurone ist. Durch die Mutation kommt es zu vermehrten freien Radikalen, erhöhtem oxidativen Stress und letztlich zum Zelltod der Motoneurone (Rosen, Siddique et al. 1993; Siddique and Siddique 2008; Winter 2004). Weitere Mechanismen wie Glutamatexzitotoxizität, mitochondrialer Schaden, Gliazellpathologie, Wachstumsfaktormangel, Akkumulation intrazellulärer Substanzen, defekter axonaler Transport oder gestörter RNA Metabolismus werden ebenfalls diskutiert (Rothstein 2009; Shi, Gal et al. 2010; Shi, Wei et al. 2010).

1.2 Hautveränderungen bei der ALS

Die ALS, als Multisystemerkrankung, kann mehrere Organsysteme betreffen. Es kann zu Zeichen einer milden frontalen Demenz, Störungen der gastrointestinalen Motilität oder Temperaturregulation, oder zu Leber- und Pankreasfunktionsstörungen kommen. Ebenso können Hautveränderungen auftreten (Winter 2004).

Schon seit längerem ist bekannt, dass ALS Patienten selten einen Dekubitus entwickeln, auch wenn sie in den finalen Stadien der Erkrankung aufgrund kompletter Paralyse über längere Zeit bettlägerig sind (Furukawa and Toyokura 1976). Es wurde gezeigt, dass die Haut von ALS Patienten weniger elastisch ist und dies auf eine veränderte Bindegewebsstruktur zurückzuführen ist (Ono 2000). Ono beschrieb 1989 das „delayed return phenomenon“. Dies beschreibt einen verlangsamten Rückgang der Haut von ALS Patienten in ihre ursprüngliche Stellung und somit die verringerte Elastizität der Haut. Dieses Phänomen wiesen nahezu alle Patienten auf mit einer Erkrankungsdauer von über zweieinhalb Jahren, was auf ein Charakteristikum für die fortgeschrittene ALS hindeutet (Ono, Mannen et al. 1989; Ono, Toyokura et al. 1988).

Es wurde gezeigt, dass diesen Veränderungen ein abnormer Kollagenmetabolismus zugrunde liegt. Das Kollagen Typ IV, Hauptbestandteil der Basalmembran der Haut und Gefäße, ist bei ALS Patienten verändert. Bei histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen fand man in der Haut der Patienten eine verringerte Menge an Kollagen Typ IV mit einem geringeren Durchmesser der Kollagenfibrillen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Zudem befindet sich mehr amorphes Material in der Grundsubstanz, der interfibrilläre Abstand vergrößert sich. Diese Auffälligkeiten sind negativ proportional zur Erkrankungsdauer. Es zeigt sich ebenso eine Verschiebung zu vermehrtem Kollagenabbau. Dies führt bei der ALS zu einer Zunahme des unreifen löslichen Kollagens mit instabilen Cross-Links. Das ist entgegengesetzt zum normalen Alterungsprozess (Kolde, Bachus et al. 1996; Ono 2000; Ono, Imai et al. 1998; Ono, Mannen et al. 1989; Ono, Mechanic et al. 1990; Ono and Yamauchi 1992; Ono and Yamauchi 1992).

Alle diese Veränderungen der Kollagenfibrillen, zusammen mit einem dermalen Ödem und einer nicht-entzündlichen Vaskulopathie der kleinen Hautgefäße, schützen die Patienten in den meisten Fällen vor einem Dekubitus (Kolde, Bachus et al. 1996; Watanabe, Yamada et al. 1987).

Beach et al. zeigten, dass der erhöhte Kollagenabbau auf eine gesteigerte kollagenolytische Aktivität durch Matrixmetalloproteinasen zurückzuführen sein könnte (Beach, Rao et al. 1986).

1.3 Die Matrixmetalloproteinasen

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind eine Gruppe von peptidspaltenden Enzymen mit einem Metallion, meist Zinkion, im aktiven Zentrum. Es handelt sich somit um Zn-Endopeptidasen, deren Hauptaufgabe die Homöostase der Extrazellulärmatrix ist.

Momentan sind 23 verschiedene Matrixmetalloproteinasen bekannt. Sie können nach ihrer Struktur und Substratspezifität in fünf Untergruppen eingeteilt werden. Zum einen die Kollagenasen (MMP-1, -8, -13, -18), die das Kollagen Typ I, II und III abbauen und die Gelatinasen (MMP-2 und -9), die unter anderem das Kollagen Typ IV in der Basalmembran abbauen. Desweiteren die Stromelysine (MMP-3, -10, -11) zum Abbau von Fibronectin, Laminin und Proteoglykane, die Matrilysine (MMP-7 und -26) zur Degradation von Gelatine, Fibronectin und Kollagen IV, und letztlich mehrere membrangebundene MMPs, die mit der Matrix in unmittelbarer Zellnähe interagieren und andere MMPs aktivieren können (Vincenti and Brinckerhoff 2007).

Die MMPs haben mehrere strukturelle Eigenschaften gemeinsam. Sie alle zeichnen sich durch eine Signalpeptid-Domäne, ein Propeptid, eine katalytische Domäne mit der zinkbindenden Sequenz für das Zinkion, eine Hinge-Region und in den meisten Fällen durch eine C-terminale Hämopepsin-Domäne für die Substratspezifität aus. Die Propeptidsequenz enthält ein Cystein, das mit dem katalytischen Zinkion einen Komplex bildet. So ist das Enzym in einer inaktiven Form stabilisiert. Mehrere Faktoren können diese Verbindung lösen und durch diesen sogenannten „Cys-switch“ kommt es zu einer Freilegung des aktiven Zentrums in der katalytischen Domäne und somit zur Enzymaktivierung. Die für diese Arbeit hervorzuhebenden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 besitzen als Besonderheit drei zusätzliche Fibronectin-Typ II Module in der katalytischen Domäne (siehe Abbildung 1) (Clark, Swingle et al. 2008; Renaud and Leppert 2007; Vincenti and Brinckerhoff 2007).

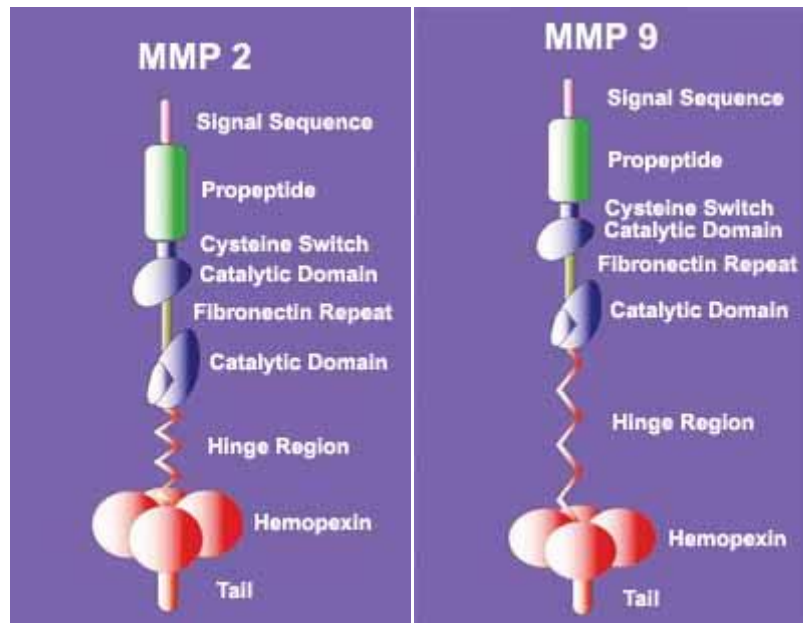


Abbildung 1: formelle Struktur der Matrixmetalloproteinase (MMP) 2 und 9 (Sigma-Aldrich 2011)

Neben der Proenzym-Aktivierung werden die MMPs über Gentranskription, Speicherung in Granula und durch spezifische (TIMP = tissue inhibitor of metalloproteases) und unspezifische Enzyminhibitoren reguliert (Renaud and Leppert 2007).

Im zentralen Nervensystem werden die MMPs von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia produziert (Cuzner, Gveric et al. 1996; Gottschall and Deb 1996).

Die MMPs tragen nicht nur zum Abbau der Extrazellulärmatrix bei. In den letzten Jahren ist bekannt geworden, dass sie auch für andere Bereiche wichtig sind. Sie spielen sowohl in physiologischen (u.a. Nidation, Embryogenese, Wundheilung) als auch in pathologischen (u.a. Metastasierung, Gewebedestruktion, neuronaler Schaden) Prozessen eine Rolle. Sie sind für die Zytokinmodulation, Zellmigration, Axonwachstum und -regeneration, Remyelinisation und synaptische Plastizität wichtig. Zudem regulieren sie das Zellwachstum und die Apoptose (Clark, Swingler et al. 2008; Ethell and Ethell 2007; Ogier, Bernard et al. 2006; Renaud and Leppert 2007).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die MMPs bei neurodegenerativen Erkrankungen wie beim Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und der

amyotrophen Lateralsklerose verändert sind und damit zu deren Pathogenese beitragen können (Lorenzl, Albers et al. 2003; Lorenzl, Albers et al. 2002).

1.4 Matrixmetalloproteinasen und ALS

Im Mausmodell der ALS konnten Lorenzl et al. eine erhöhte MMP-9 Expression im Rückenmark der Mäuse nachweisen. Ein MMP-Inhibitor reduzierte die Level an Metalloproteinasen und verzögerte den Beginn der Erkrankung (Lorenzl, Narr et al. 2006). In einer weiteren Studie wurde thematisiert, dass MMP-Inhibitoren möglicherweise einen positiven Effekt haben könnten. Hier hat ein Mangel an MMP-9 das Überleben der Mäuse um 31% gesteigert, neuronalen Schaden abgeschwächt und Zytokine im Rückenmark der Mäuse reduziert. Ebenso wurde eine erhöhte MMP-9 Aktivität und Immunoreaktivität im Rückenmark der SOD1-Mäuse gefunden (Kiaei, Kipiani et al. 2007).

Beim Menschen wurden im Serum erhöhte MMP-9 Konzentrationen gefunden, die auch im Verlauf der Erkrankung hoch blieben (Beuche, Yushchenko et al. 2000; Demestre, Parkin-Smith et al. 2005). Auch in klinisch betroffenen Muskeln zeigte sich ein gesteigerter MMP-9 Level beim ALS-Patienten, wohingegen MMP-2 und MMP-7 im Muskel nur leicht erhöht war (Schoser and Blottner 1999).

Eine gesteigerte Immunoreaktivität der MMP-9 wurde in Neuronen des Motorkortex, des Thorakal- und Lumbalmarks und des Frontal- und Okzipitallappens der ALS Patienten gefunden. Die Aktivität der MMP-2 hingegen war im Motorkortex erniedrigt, in den anderen ZNS-Bereichen zeigten sich keine Veränderungen (Lim, Backstrom et al. 1996).

1.5 Ziel und Fragestellungen der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mehr über die Zusammenhänge von Hautveränderungen und ZNS-Veränderungen bei der ALS zu erforschen und die Rolle der MMPs in diesem Kontext zu untersuchen. Es soll erforscht werden, ob die MMPs eine Brücke zwischen den pathologischen Veränderungen an der Haut und der neuronalen Degeneration schlagen können. Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, dass ein weiterer Schritt in der ALS-Pathogenese aufgedeckt werden kann.

Dazu werden im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Konzentrationen der MMPs in der Haut gemessen.

Die unter 1.4. beschriebenen Ergebnisse werden beim Menschen durch weitere Messungen im Serum, im Liquor und in Hautproben ergänzt. Im Tiermodell werden in vier verschiedenen Altersklassen Untersuchungen von Rückenmarks-, Kleinhirn- und Hautproben vorgenommen. So sollen Vergleiche von Veränderungen im Hautgewebe und im Nervengewebe sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell möglich sein.

Aufgrund der Tatsache, dass bei der ALS typische Hautveränderungen auftreten, soll untersucht werden, ob die Haut als mögliche Biomarkerquelle für die amyotrophe Lateralsklerose gesehen werden kann. Ein Biomarker könnte weitere pathologische Aspekte im Krankheitsverlauf aufzeigen, Therapiemöglichkeiten überprüfen und kontrollieren und wäre somit bei der ALS von großem Nutzen. Die Haut als leicht zugängliches Gewebe ist ein guter Kandidat hierfür.

Es werden die Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 untersucht, da das Hauptsubstrat dieser zwei Gelatinasen das Kollagen Typ IV ist. Dieses ist Hauptbestandteil der Basalmembran in der Epidermis und bei der ALS am meisten verändert. Somit sind die Metalloproteinasen 2 und 9 zur Erforschung der Zusammenhänge zwischen Haut- und ZNS-Veränderungen und damit der Pathogenese der ALS von größtem Interesse.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit lauten somit:

1. Wie verhalten sich die Matrixmetalloproteinasen im ZNS und in der Haut?
2. Wie kann man die Prozesse in ZNS und Haut gemeinsam betrachten?
3. Ist die Haut eine mögliche Quelle für einen Biomarker bei der ALS?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

destilliertes Wasser	Aqua B. Braun, Ecotainer®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Apotheke des Universitätsklinikums Ulm, Ulm, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Proteaseinhibitorencocktail	Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, St. Louis, Missouri, USA
TBS	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

2.1.2 Kits

Maus MMP-9	„Quantikine® Mouse MMP-9 (total)“ (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, United Kingdom)
Human MMP-9	„Quantikine® Human MMP-9 (total)“ (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, United Kingdom)
MMP-2	„Quantikine® Human/Mouse/Rat MMP- 2 (total)“ (R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, United Kingdom)

2.1.3 Geräte

Hautstanze (4mm)	Stiefel® Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
Mikro-Dismembrator	Braun Biotech international®, Göttingen, Deutschland
Multistep Pipette	Handy Step®, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Nephelometer	BN ProSpec® System, Behring- Siemens, Erlangen, Deutschland

Orbitalschüttler	Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Photometer	Spectra Rainbow, Tecan® Trading AG, Zürich, Schweiz
Pipetten	Eppendorf Reference 10µl & 100µl & 200µl & 1000µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland E-Man Hybrid™, Rainin Instrument, Oakland, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge®fresco, Hereaus, Kendro® Laboratory Products GmbH, Osterode, Deutschland

2.1.4 Plastikwaren

Eppendorferreaktionsgefäße	Microtube 1.5 ml, SARSTEDT AG&Co., Nürmbrecht, Deutschland
Multistep-Pipettenspitzen	Plastibrand® PD Tips, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Pipettenspitzen	ep T.I.P.S. Standard 0,1 - 10 µl, 2 - 200 µl & 50 - 1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg Bioclean, Precision Pipette Tips, RCL300, Rainin Instrument, Oakland, USA Costar® Stripette®, Corning Incorporated, New York, USA
Reaktionsgefäß für Mikro-Dismembrator	Nalgene®, Nalge Nunc International, Rochester, USA

2.1.5 EDV

PC-Software zur Extinktionsmessung	Easy Fit, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Statistik-Software	Sigma Stat®, Version 3.2, Statcon, Wittenhausen, Deutschland SPSS, Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell und Patienten

2.2.1.1 *Mausmutanten und Kontrollen*

Es wurden vier Gruppen von Mäusen untersucht.

Zum einen die „SOD-Mäuse“ mit einer Mutation der bei der Pathogenese der ALS bedeutenden Superoxiddismutase. Das am besten erforschte Mausmodell für die ALS ist das SOD^{G93A} Modell. Hierbei tragen die Mäuse multiple Genkopien der humanen Cu/Zn-Superoxiddismutase mit der G93A Mutation. Diese Mutation wird autosomal dominant vererbt. Da ihnen das korrespondierende Allel des SOD1^{G93A} Transgens fehlt, werden sie als hemizygot bezeichnet. Diese Tiere entwickeln das klinische und neuropathologische Bild einer selektiven Motoneuronerkrankung, ähnlich der ALS beim Menschen.

Desweiteren wurden „Cra-Mäuse“ untersucht. Diese Mäuse haben eine Cra1-Mutation im dem Genbereich, der die schwere Kette des Motorproteins Dynein kodiert. Durch diese autosomal dominant vererbte Mutation kommt es zu einem Aminosäurenaustausch von Wildtyp Tyrosin (TAC) zu Cra1 Cystein (TGC) an Position 1055 des Gens. Das Dynein ist zuständig für den retrograden axonalen Transport. Bei einem Defekt kommt es zum selektiven Absterben der Motoneurone und damit zu einem ähnlichen klinischen Bild wie bei der ALS mit fortschreitendem Verlust der Muskelkraft und Beweglichkeit.

Zudem wurde eine „SOD-„ und eine „Cra-Maus“ gepaart, um die doppelheterozygote „Cra-SOD-Maus“ zu züchten. Diese tragen sowohl multiple SOD1^{G93A} Genkopien, als auch die Cra1 Mutation auf dem Dynein Gen.

Zuletzt wurden „Wildtyp-Mäuse“ als Kontrollgruppe untersucht. Diese Mäuse mit keiner speziell eingebrachten Mutation, entwickeln einen gesunden Phänotyp.

Die „Cra-„ und die „Cra-SOD“ Mäuse sollten ebenfalls als Kontrolle dienen. Es war das Ziel, speziell Folgen der SOD-Mutation aufzuzeigen und keine Folgen einer anderen Schädigung der Motoneurone, wie bei den „Cra-Mäusen“.

Alle vier Mausgruppen entstanden als F1-Generation aus der Kreuzung einer männlichen Maus mit der SOD^{G93A} Mutation (Jackson Laboratories, Ben Harbor, Maine, USA) mit einer weiblichen heterozygoten „Cra-Maus“ (Ingenium Pharmaceuticals AG, Martinsried, Deutschland) (siehe Abbildung 2).

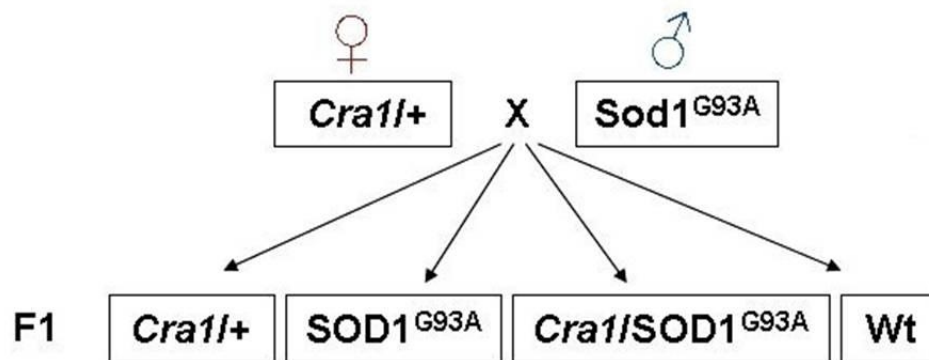


Abbildung 2: Zuchtschema zur Zucht der F1-Generation. Weibliche heterozygote „Cra-Mäuse“ (Cra1/+) wurden mit männlichen hemizygoten „SOD-Mäusen“ (SOD1^{G93A}) verpaart. Die Nachkommen der F1 Generation setzten sich aus vier unterschiedlichen Genotypen (WT, Cra1/+, SOD1^{G93A} und Cra1/ SOD1^{G93A}) zusammen. Wildtypiere (Wt) tragen keinerlei Mutationen und entwickeln einen gesunden Phänotyp. Heterozygote „Cra-Tiere“ (Cra1/+) tragen auf einem Allel des Dynein-Gens die Cra1-Mutation. Hemizygoten SOD1^{G93A} Tiere (SOD1^{G93A}) tragen multiple SOD1^{G93A} Genkopien. Doppel-heterozygote Cra1/ SOD1^{G93A} Tiere (Cra1/ SOD1^{G93A}) tragen auf einem Allel des Dynein-Gens die Cra1-Mutation und zusätzlich multiple SOD1^{G93A} Genkopien.

Die Mäuse wurden in der Tierhaltungsanlage der Universität Ulm artgerecht gehalten und ihr klinischer Zustand täglich überprüft. Ihr genetischer Status und damit das eventuelle Tragen der SOD-Mutation wurden durch Genotypisierung der DNA aus dem Schwanz der Mäuse festgestellt.

Die Mäuse wurden nach 30, 60, 90 oder 120 Tagen getötet, so wurden vier verschiedene Altersklassen untersucht. In jeder Altersklasse waren jeweils zwölf Wildtyp-Mäuse, Cra-Mäuse, Cra-SOD-Mäuse und SOD-Mäuse vertreten. Die Geschlechter waren gleichverteilt.

2.2.1.2 Patienten

Es waren Serum- und Liquorproben von 54 ALS-Patienten verfügbar. Bei 48 Patienten zeigte sich ein spinaler Beginn der Erkrankung, sechs Patienten litten unter der bulbärparalytischen Form.

Das Maß der körperlichen Behinderung der Patienten wurde mit dem „Medical Research Council sumscore (MRCS)“ und dem „Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS)“ erhoben.

Von 39 Patienten waren Folgedaten verfügbar. Es wurde der MRCS zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion und im Median 6 (3-25) Monate danach eruiert. Durch die monatliche Veränderung des MRCS wurde die Progression der Erkrankung festgelegt. Der Median wurde als Grenze genommen. Für die 50% der Patienten, die mit ihrem Wert oberhalb des Medians lagen, wurde eine rasch progressive Form der Erkrankung festgelegt, für die unterhalb des Medians liegenden die langsam progressive Form.

Bei der Kontrollgruppe von 36 Patienten wurden Spannungskopfschmerzen diagnostiziert. Sie zeigten keinerlei Hinweise auf andere neurologische Erkrankungen.

Von 12 ALS Patienten wurden Hautproben entnommen. Die Hautproben von 10 Kontrollen wurden von der dermatologischen Abteilung des Universitätsklinikums Ulm zur Verfügung gestellt.

Die demographischen Daten sind in Tabelle 7 im Anhang dargestellt.

2.2.1.3 Ethikanträge

Für das gesamte Projekt liegen ein positives Ethikvotum mit der Nummer 160/7 sowie die unterschriebenen Einverständniserklärungen der Patienten vor.

2.2.2 Probengewinnung

2.2.2.1 Präparation der Tiere

Es werden von jeder Maus Proben aus dem Rückenmark, aus dem Kleinhirn und aus der Haut benötigt.

Zur Gewinnung dieser Proben wurden die Mäuse zunächst durch zervikale Dislokation getötet und mit Ethanol vollständig besprüht. Mit einem Skalpell wurde der Kopf und Nacken an der Dorsalseite eröffnet und die Rücken- und Halsmuskulatur von den Knochen abgetrennt. Der Schädel konnte mit einer Pinzette aufgebrochen werden und so das Gehirn entnommen werden. Das Kleinhirn wurde vom Endhirn abgetrennt, in ein Eppendorfgefäß gegeben und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Zur Hautpräparation wurde die Maus rasiert und die Haut mit einem Skalpell abgelöst. Von jeder Maus wurden vier etwa ein cm² große Hautstücke präpariert und diese sofort in einem Eppendorfgefäß in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Nun wurde die Wirbelsäule präpariert. Sie wurde in Teile zerlegt, so dass das Rückenmark leicht entnommen werden konnte. Diese Proben wurden ebenfalls in einem Eppendorfgefäß eingefroren.

Sämtliche Proben wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2 Patientenproben

Die Serum- und Liquorproben wurden im Rahmen von Routineuntersuchungen mittels standardmäßiger Venen- und Lumbalpunktion entnommen.

Die Hautproben wurden nach Lokalanästhesie mit einer vier mm Biopsiestanze an der Außenseite des Ober- und Unterschenkels der Patienten entnommen. Eine Einwilligung der Patienten zur Probenentnahme und zur weiteren wissenschaftlichen Verwendung ihrer klinischen Daten und Biomaterialien lag vor. Alle Proben wurden sofort bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Homogenisation der Proben

Zur Messung mussten die Hautproben von Tier und Mensch und die Kleinhirn- und Rückenmarksproben der Tiere homogenisiert werden.

Zur Vorbereitung der Homogenisation wurden alle Reaktionsgefäße mit den Kennnummern der Tiere bzw. Patienten beschriftet.

Das Leergewicht der Röhrchen wurde bestimmt, damit später das exakte Gewicht des sich darin befindenden Gewebes ausgerechnet werden konnte.

Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden auf Trockeneis gegeben. Die Hautgewebeproben wurden in noch gefrorenem Zustand mit einer Schere in zwei Teile geschnitten und pro Maus in je zwei Röhrchen gegeben. Die Kleinhirn- und Rückenmarksproben wurden direkt in die beschrifteten Röhrchen gegeben.

Die Reaktionsgefäße wurden nun mit Gewebe gewogen. Daraufhin wurde durch Subtraktion des Leergewichtes der Gefäße das exakte Gewicht des Gewebes in jedem einzelnen Röhrchen errechnet. Aus diesem Gewicht ließ sich die später zur Auflösung benötigte Puffermenge mittels Dreisatz berechnen. Alle Röhrchen wurden sofort in flüssigen Stickstoff gelegt, um die Gewebe in einen starren tiefgefrorenen Zustand zu bringen.

In jedes Reaktionsgefäß wurde nun eine kleine Metallkugel gegeben und je vier Gefäße in einen Mikro-Dismembrator eingespannt. In diesem Gerät wurde das gefrorene Gewebe durch die hin und her schlagende Metallkugel zu Pulver zermahlen. Das Gerät lief bei den Kleinhirn- und Rückenmarksproben mit einer Frequenz von 2500 für je 40 Sekunden, bei den Hautproben zweimal für je 50 Sekunden.

Zur Herstellung des Extraktionspuffers wurden 9,9 ml TBS, 20 µl 0,5 M EDTA Lösung (Endkonzentration: 1 mM), 100 µl 0,1 M PMSF (Endkonzentration: 1 mM), und 50 µl eines Proteinaseinhibitoren-Gemisches zusammengefügt.

Die vorher ausgerechnete Puffermenge (100 mg Gewebe zu 1 ml Extraktionspuffer) wurde dann in jedes Röhrchen mit dem Gewebepulver hinzu pipettiert und das Röhrchen kurz geschüttelt. Mithilfe eines Magneten wurde die Metallkugel aus dem Röhrchen entfernt und die Mischung zum Extrahieren der zytoplasmatischen Proteine eine Stunde auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Proben in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei 4°C für 30 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und das Pellet für weitere Bearbeitungen eingefroren.

Von jeder Probe wurden 20 µl zur späteren Proteinbestimmung abgenommen und der Rest in Eppendorfgefäße aliquotiert. Die homogenisierten Proben wurden bei -80°C wieder eingefroren.

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Um die Matrixmetalloproteinase menge mit der Proteinmenge in der jeweiligen Probe normalisieren zu können, musste die Gesamtproteinkonzentration jeder einzelnen Probe bekannt sein. So konnte errechnet werden, wie viel ng MMP pro mg Gewebeprotein vorhanden ist.

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit einem Nephelometer bestimmt. Die Nephelometrie ist ein optisches Analyseverfahren, das quantitativ die Konzentration kolloidal gelöster Substanzen in Flüssigkeiten misst. Ein Lichtstrahl wird auf die Flüssigkeit gegeben und die Intensität des durch Streuung entstandenen seitlich abgelenkten Lichtes gemessen. Das Gesamtprotein wird hierbei nach der Endpunkt-Methode gemessen. Das bedeutet, nach Abschluss der Reaktion wird über die Lichtintensität des abgestrahlten Lichtes die maximale Trübung des Reaktionsansatzes gemessen. Dieser Wert wird mit einer automatischen Referenzkurve verglichen und so die Gesamtproteinkonzentration ermittelt (Dornblüth 1894).

Die Proben wurden 1:7,5 bis 1:15 verdünnt. Anschließend wurden die Messwerte mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die wahren Endkonzentrationen zu erhalten.

2.2.5 Bestimmung der Matrixmetalloproteinasekonzentrationen

2.2.5.1 Prinzip ELISA

2.2.5.1.1 MMP-9

Zur Bestimmung der Matrixmetalloproteinase 9 beim Tier wurde ein „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) verwendet.

Dieser ELISA basiert auf der Antikörper-Sandwich-Methode und misst quantitativ die aktive, die pro-aktive und die an TIMP-gebundene Form der Maus-MMP-9 in Zellkulturüberständen, Serum und Plasma.

Zur Bestimmung der humanen MMP-9 wurde ebenfalls ein ELISA verwendet, welcher die proaktive und aktive Form der humanen MMP-9 misst.

Die Vertiefungen der 96-well-Mikrotiterplatte waren mit einem für die MMP-9 spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Die Standardlösungen, Kontrollen und Proben wurden nun hineinpipettiert und die vorhandene lösliche MMP-9 konnte an diesen Antikörper binden. Ungebundene Substanzen wurden gewaschen. Ein zweiter für die MMP-9 spezifischer polyklonaler Antikörper wurde hinzugefügt. Dieser war zusätzlich mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Der Enzym-Antikörper-Komplex konnte nun an die schon gebundene MMP-9 binden. Nach weiterem Waschen wurde ein Substrat hinzugegeben. Hierbei handelte es sich um eine Mischung aus gleichen Teilen stabilisierten Hydrogenperoxids und Chromogens (Tetramethylbenzidin). Durch die enzymatische Reaktion mit der gebundenen Meerrettich-Peroxidase zeigte sich ein blauer Farbumschlag, proportional zur Menge der gebundenen MMP-9. Diese Reaktion wurde durch Zufügen einer Stopplösung (verdünnte Salzsäure) gestoppt, woraufhin ein Farbwechsel zu gelb sichtbar wurde. Die Farbintensität wurde über die Extinktionsmessung des Farbgemisches photometrisch bestimmt. Die Menge an MMP-9 in den Standards, Kontrollen und Proben war direkt proportional zu dem gebundenen Enzym-Antikörper-Komplex. Dessen Menge wiederum war direkt proportional zur entstandenen Farbintensität und damit gemessenen

Extinktion. So ließ sich anhand der bekannten MMP-9-Konzentrationen der Standardlösungen und deren Extinktion eine Standardkurve herstellen. Mithilfe dieser Kurve konnten sämtliche Konzentrationen der Proben errechnet werden.

2.2.5.1.2 MMP-2

Das zur Messung der Matrixmetalloproteinase 2 in Human- und Mausproben verwendete Kit basiert ebenfalls auf dem Antikörper-Sandwich-Prinzip.

Es misst quantitativ die aktive und die pro-aktive MMP-2 in humanen Zellkulturüberständen, Serum, Plasma, Speichel, Urin und in Mäuse- und Rattenserum. Das Kit funktioniert nach dem gleichen oben beschriebenen Prinzip, nur die Vertiefungen der 96-well-Mikrotiterplatte waren mit einem MMP-2 spezifischen polyklonalen Antikörper beschichtet. Als sekundärer Antikörper wurde ein MMP-2 spezifischer polyklonaler Antikörper, der an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, benutzt.

2.2.5.2 Standardreihen

2.2.5.2.1 MMP-9

Das Kit zur Messung der Maus-MMP-9 enthielt 25 ng rekombinantes Maus-MMP-9 als Standard. Dieser wurde mit 5 ml Verdünnungspuffer (gepufferte Proteinlösung mit Konservierungsmitteln) gelöst. So entstand eine Stammlösung mit einer Konzentration von 5 ng/ml. Diese Stammlösung ließ man für 15 Minuten inkubieren und erstellte dann daraus die Standardlösungen für die Standardkurve. Dafür wurde in sieben Eppendorfgefäße jeweils 250 µl Verdünnungspuffer vorgelegt. Dann wurden 250 µl aus der Stammlösung in das erste Eppendorfergefäß pipettiert und gründlich gemischt. Aus diesem ersten Eppendorfergefäß wurden wiederum 250 µl entnommen und in das zweite Eppendorfergefäß pipettiert.

So entstand eine Verdünnungsreihe mit folgenden MMP-9 Konzentrationen (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Maus-Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 Konzentrationen der Standardreihe in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter)

<i>Standard</i>	<i>Konzentrationen der MMP-9</i>
1	0,000 ng/ml (nur Verdünnungspuffer)
2	0,078 ng/ml
3	0,156 ng/ml
4	0,312 ng/ml
5	0,625 ng/ml
6	1,250 ng/ml
7	2,500 ng/ml
8	5,000 ng/ml (Stammlösung)

Die 20 ng rekombinante humane pro-MMP-9 wurde mit 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Zur Herstellung der Standardreihe wurde die Stammlösung von 20 ng/ml ebenfalls 1:2 verdünnt und es entstanden folgende MMP-9 Konzentrationen (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Human-Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 Konzentrationen der Standardreihe in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter)

<i>Standard</i>	<i>Konzentrationen der MMP-9</i>
1	0,000 ng/ml (nur Verdünnungspuffer)
2	0,312 ng/ml
3	0,625 ng/ml
4	1,250 ng/ml
5	2,500ng/ml
6	5,000 ng/ml
7	10,000 ng/ml
8	20,000 ng/ml (Stammlösung)

2.2.5.2.2 MMP-2

Die im Kit als Standard enthaltene 100 ng rekombinante humane pro-MMP-2 wurden mit 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Daraus resultierte eine Stammlösung von 100 ng/ml, die wieder 15 Minuten ruhte. Die Verdünnungsreihe wurde genauso wie bei der MMP-9 beschrieben hergestellt.

Es ergaben sich folgende MMP-2 Konzentrationen (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Matrixmetalloproteinase (MMP)-2 Konzentrationen der Standardreihe in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter)

<i>Standard</i>	<i>Konzentrationen der MMP-2</i>
1	0,00 ng/ml (nur Verdünnungspuffer)
2	0,78 ng/ml
3	1,56 ng/ml
4	3,12 ng/ml
5	6,25 ng/ml
6	12,50 ng/ml
7	25,00 ng/ml
8	50,00 ng/ml

2.2.5.3 Verdünnung der Proben

Bei den Kleinhirn- und Rückenmarksproben der Mäuse ist aus Versuchen im Liquorlabor des Universitätsklinikums Ulm im Rahmen anderer Projekte mit denselben Parametern bekannt, welche Verdünnungen erforderlich sind, damit die Messwerte möglichst in den linearen Bereich der Standardkurve fallen. Hier können die Messwerte am zuverlässigsten berechnet werden. Die Serumproben wurden nach Herstellerangaben verdünnt, der Liquor wurde unverdünnt eingesetzt. Um die Verdünnungen der Hautproben, sowohl bei den Versuchstieren

als auch bei den humanen Hautproben, herauszufinden, wurden die unter 2.2.5.7. beschriebenen Wiederfindungs- und Linearitätsexperimente gemacht.

Es ergaben sich folgende Verdünnungen:

Maus-MMP-9:

- Kleinhirn: 1:5 Verdünnung
- Rückenmark: 1:5 Verdünnung
- Haut: 1:6 Verdünnung, 30d: 1:5 Verdünnung

Maus-MMP-2:

- Kleinhirn: 1:3 Verdünnung
- Rückenmark: 1:3 Verdünnung
- Haut: 1:3 Verdünnung

Human-MMP-9:

- Serum: 1:10 Verdünnung
- Liquor: unverdünnt
- Haut: 1:6 Verdünnung

Human-MMP-2:

- Serum: 1:10 Verdünnung
- Liquor: unverdünnt
- Haut: 1:4 Verdünnung

Falls die Probenmenge in Einzelfällen nicht ausreichend war, wurde die nächst höhere Verdünnung genommen.

2.2.5.4 Ablauf des Assays

2.2.5.4.1 MMP-9

Bevor mit den Assays begonnen werden konnte, mussten alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

Vorbereitend wurde, wie oben beschrieben, der Standard gelöst, die Standardreihe hergestellt und sämtliche Proben in neuen Probengefäßen verdünnt. Das Kit enthielt zusätzlich noch eine Kontrolle mit einer bestimmten

Konzentration an rekombinanter Maus-/Human-MMP-9. Die Kontrolle wurde vorbereitend mit 1 ml destilliertem Wasser gelöst.

Von jedem Standard, jeder Kontrolle und Probe wurde eine Doppelbestimmung gemacht.

Der Assay wurde wie folgt durchgeführt:

1. Zuerst wurden in jede Vertiefung 50 μ l (Maus) bzw. 100 μ l (human) Assay Diluent (gepufferte Proteinbase mit Konservierungsmitteln) pipettiert.
2. Dann wurden je 50 μ l (Maus) bzw. 100 μ l (human) der Standardlösungen, der Kontrolle und der Proben hinzupipettiert, die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und der Ansatz für zwei Stunden auf einem Orbitalschüttler inkubiert.
3. Während der Inkubationszeit wurde die Waschlösung hergestellt. Hierfür wurde das 25-fach konzentrierte Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser 1:25 verdünnt.
4. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte viermal mit je 400 μ l Waschlösung pro Vertiefung gewaschen und die Waschlösung sorgfältig und vollständig ausgeklopft.
5. Nun wurden in jede Vertiefung 100 μ l (Maus) bzw. 200 μ l (human) des Meerrettich-Peroxidase-gebundenen Antikörpers gegen die MMP-9 gegeben, die Platte mit einer Klebefolie versehen und zwei Stunden auf dem Orbitalschüttler inkubiert.
6. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die Substratlösung hergestellt. Dazu wurde Farbreagenz A (Hydrogenperoxid) und Farbreagenz B (Chromogen (Tetramethylbenzidin)) im Verhältnis 1:1 gemischt.
7. Anschließend wurde die Platte, wie in Punkt 4 beschrieben, gewaschen.
8. Nun wurden je 100 μ l (Maus) bzw. 200 μ l (human) der Substratlösung in jede Vertiefung gegeben, die Platten vor Licht geschützt und 30 Minuten inkubiert.
9. Zum Anhalten der Reaktion wurden je 100 μ l (Maus) bzw. 50 μ l (human) Stopplösung hinzupipettiert und die Extinktion sofort gemessen.

2.2.5.4.2 MMP-2

Nachdem die Reagenzien und Proben Zimmertemperatur erreicht hatten, wurden der Standard gelöst und die Proben verdünnt.

Nach dem Festlegen der Belegung mit den Doppelbestimmungen konnte der Assay gestartet werden:

1. In jede Vertiefung wurden 100 µl Assay Diluent gegeben.
2. Anschließend wurden je 50 µl der Standardlösungen und der Proben hinzupipettiert. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen und zwei Stunden auf einem Orbitalschüttler inkubiert.
3. In der Wartezeit wurde analog zum Assay der MMP-9 die Waschlösung hergestellt.
4. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Platte wie im Assay der MMP-9 gewaschen und die Waschlösung ausgeklopft.
5. Nun wurden je 200 µl des Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpers gegen die MMP-2 hinzugegeben, die Platte wieder zugeklebt und zwei Stunden auf dem Orbitalschüttler inkubiert.
6. Analog zu dem MMP-9 Assay wurde kurz vor Ende der Inkubationszeit die Substratlösung im Verhältnis 1:1 gemischt (Farbreagenz A (Hydrogenperoxid) und Farbreagenz B (Chromogen (Tetramethylbenzidin))).
7. Nach einem weiteren Waschschrift wurden in jede Vertiefung je 200 µl der Substratlösung gegeben und die Platten lichtgeschützt 30 Minuten inkubiert.
8. Die Reaktion wurde mit je 50 µl Stopplösung gestoppt und die Extinktion gemessen.

2.2.5.5 Messung der Extinktion

Die Extinktionen der Mikrotiterplatten wurden sofort nach dem Stoppen mit einem Photometer gemessen. Die Photometrie ist ein Messverfahren zur Konzentrationsbestimmung fein verteilter oder gelöster Stoffe in Proben. Es wird die Extinktion monochromatischen Lichts beim Durchgang durch eine Probe gemessen, also deren optische Dichte. Hierbei wird die Wellenlänge gewählt, bei der die zu analysierende chemische Verbindung ihr Absorptionsmaximum hat. Für die Bestimmung der Matrixmetalloproteinasen ist eine Wellenlänge von 450 nm nötig. Durch die Analyse der Intensität der Extinktion kann bei bekanntem molarem Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Konzentration errechnet werden (Dornblüth 1894).

Mit einer PC-Software wurde aus den gemessenen optischen Dichtewerten zusammen mit den bekannten Konzentrationen der Standardreihe eine Standardkurve erstellt (siehe Abbildung 3). So konnten die Werte der optischen Dichte der Proben mithilfe dieser Kurve in die jeweiligen Konzentrationen umgerechnet werden. Die Software errechnete zudem automatisch den Mittelwert der beiden Einzelbestimmungen.

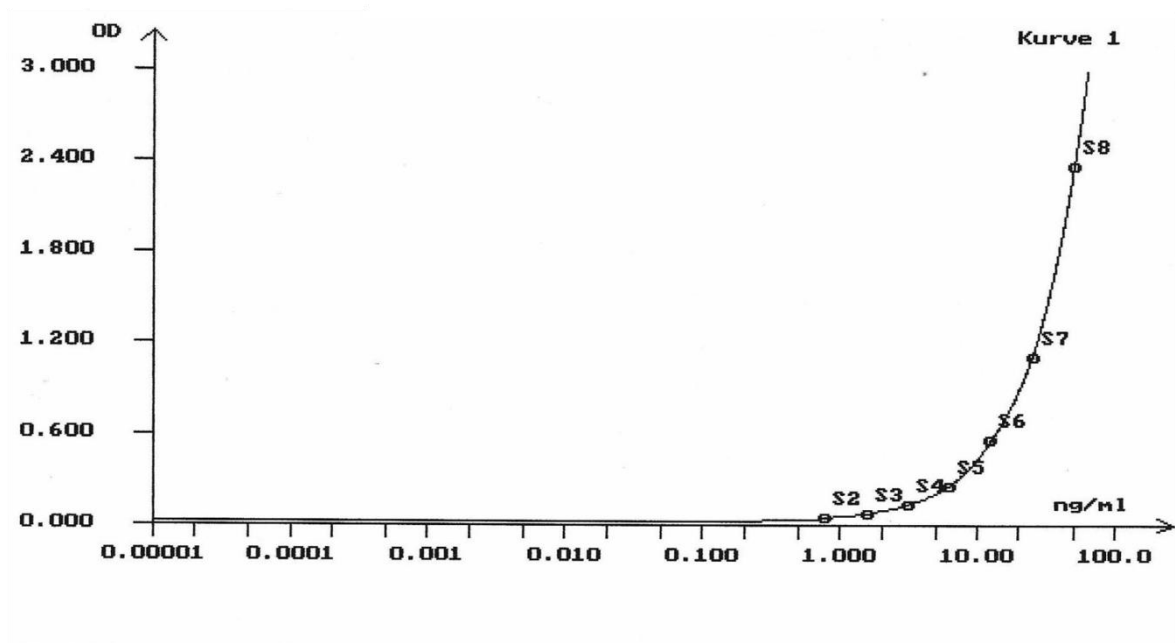


Abbildung 3: Beispielhaft ein Bild einer Standardkurve aus dem Auswertungsprogramm: auf der Abszisse ist die Matrixmetalloproteinase (MMP) 2-Konzentration in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) dargestellt, auf der Ordinate findet sich die Angabe der Extinktion (= OD = Optical Density), welche photometrisch bestimmt wurde. Die auf der Kurve markierten Punkte stellen die verwendeten Standards dar (S=Standard, nach der Größe des Standards durchnummeriert), der Standard 1=S1=0,0mU/ml ist auf der Abbildung softwarebedingt nicht angegeben.

2.2.5.6 Auswertung

Die Konzentrationswerte der Standardreihe und der Kontrolle wurden mit den Herstellerangaben abgeglichen.

Anschließend wurden alle Werte tabellarisch erfasst und nach den jeweiligen Mutationsgruppen, Altersklassen und Gewebearten sortiert. Dann wurde jeder Wert mit dem Faktor seiner Verdünnung multipliziert. Nun wurden diese Werte normalisiert, indem sie durch den jeweiligen Gesamtproteingehalt der Probe geteilt wurden. So entstanden die endgültig verwendeten Werte.

2.2.6 Validierung

Das Kit der MMP-9 enthielt eine Kontrolle. So konnte überprüft werden, ob der gemessene Wert dieser Probe im vorgegebenen Konzentrationsbereich lag und die Richtigkeit somit gewährleistet war.

Zur Testung der Reproduzierbarkeit und Kontrolle wurden die Messungen ein zweites Mal unter unveränderten Bedingungen durchgeführt. Da jeweils Doppelbestimmungen gemacht wurden, ergaben sich somit pro Probe vier Werte, die miteinander verglichen werden konnten.

Zur weiteren Validierung wurden Versuche zum Nachweis der Wiederfindung und Linearität des ELISA durchgeführt. Da diese Ergebnisse aus vorherigen Projekten im Labor für die Kleinhirn-, Rückenmarks-, Serum- und Liquorproben bekannt sind, wurden diese Untersuchungen nur bei den Hautproben durchgeführt.

Die Wiederfindung der biologischen Probe wurde überprüft, indem ein „Spike“-Experiment gemacht wurde. Dazu wurde eine bekannte Menge des Analyten (= „Spike“) einmal zum Verdünnungspuffer des ELISA (Verdünnungspuffer + Spike = „Kontrollspike“) und einmal zur biologischen Probe (Probe + Verdünnungspuffer + Spike = „Sample Spike“) gegeben. Zudem wurde die Konzentration des Analyten in einer nativen Probe (Probe + Verdünnungspuffer) bestimmt.

Mithilfe folgender Formel konnte über die gemessenen Konzentrationen (K) die Wiederfindung des Analyten (W) in der biologischen Probe in Prozent berechnet werden:

$$W = \frac{K(\text{Sample Spike}) - K(\text{native Probe})}{K(\text{Kontrollspike})} \times 100$$

So wird getestet, ob der gemessene Wert wirklich dem zu untersuchenden Analyt in der Probe entspricht und keine Matrixeffekte vorliegen.

Als valide gilt ein Test mit einer Wiederfindung von 80 bis 120 %.

Dieser Versuch wurde für die MMP-9 in einer 1:5-Verdünnung durchgeführt, als „Spike“ wurde der 1,25 ng/ml-Standard verwendet. Bei der MMP-2 wurde eine 1:6 Verdünnung untersucht. Hier wurden zwei Experimente gemessen, einmal mit

dem 12,5 ng/ml-Standard und einmal mit dem 6,25 ng/ml-Standard des Kits als Spike.

Durch ein „Linearität der Verdünnung“-Experiment kann eine Aussage darüber gemacht werden, ob die Messung und Berechnung der Konzentration in einer Probe, die in einen gewünschten Verdünnungsbereich verdünnt wurde, möglich und valide ist. Man prüft, ob in einer Probe in mehreren Verdünnungen jeweils die gleichen Konzentrationen gemessen werden können. Dazu bestimmt man die Konzentrationen einer Probe in mehreren Verdünnungen und vergleicht die mit dem Verdünnungsfaktor multiplizierten Konzentrationswerte miteinander. Die am niedrigsten verdünnte Probe wird als 100 Prozent angesehen. Als valide gilt ein Test, wenn die Konzentrationswerte in den stärkeren Verdünnungen in einen Bereich von 80 bis 120% um den Wert der niedrigsten Verdünnung fallen.

Für die MMP-9 wurde eine Gewebeprobe in einer 1:5-, 1:10- und 1:20-Verdünnung untersucht. Bei der MMP-2 wurden die Konzentrationen in zwei Gewebeproben gemessen, je in einer 1:3-, 1:6- und 1:12-Verdünnung.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Statistiksoftware Sigma Stat® (humane Proben) sowie SPSS (Mausproben) durchgeführt.

Die Daten wurden durch den Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung untersucht. Da die Daten der humanen Proben nicht alle normalverteilt waren, wurden hier sämtliche Ergebnisse, um sie einheitlich zu behandeln, mit nicht-parametrischen statistischen Tests ausgewertet. Die Daten der Versuchstiere waren normalverteilt und konnten so mit parametrischen Tests ausgewertet werden.

Es wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane, Quartile und Signifikanzen mit dem Wilcoxon Test für unabhängige Stichproben sowie mit dem T-Test berechnet. Die Signifikanzniveaus wurden mithilfe der Bonferroni-Korrektur korrigiert. Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen. Die Korrelationen wurden mit dem Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet. Sämtliche graphischen Darstellungen wurden mit der Statistiksoftware SPSS angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Wiederfindung des MMP-ELISA

Die „Spike-Experimente“ zur Wiederfindung wurden wie unter 2.2.5.7. durchgeführt, anhand der angegebenen Formel wurde die Wiederfindung in Prozent berechnet.

Für den MMP-2 ELISA betrug die Wiederfindung für den Spike mit dem 6,25-Standard 86,58%, für den 12,5-Standard-Spike 92,14%.

Bei dem MMP-9 ELISA wurde eine Wiederfindung von 100,22% gemessen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Wiederfindung des MMP-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): Angegeben sind die jeweiligen Matrixmetalloproteinasen (MMP)-Konzentrationen in ng/ml (Nanogramm/Milliliter) im Sample Spike, der nativen Probe und im Kontrollspike bei den drei unter 2.2.5.7. beschriebenen Versuchsteilen. In der letzten Zeile steht die Wiederfindung des erwarteten Wertes in Prozent (%).

	MMP-2 (6,25 Standard) [ng/ml]	MMP-2 (12,5-Standard) [ng/ml]	MMP-9 [ng/ml]
Sample Spike	9,106	15,212	0,878
Native Probe	3,695	3,695	0,617
Kontrollspike	6,250	12,499	0,260
Wiederfindung	86,58%	92,14%	100,22%

3.2 Linearität des MMP-ELISA

Die Linearität des verwendeten ELISA wurde wie unter 2.2.5.7. beschrieben untersucht.

Beim MMP-9 ELISA zeigten sich in einer Probe in unterschiedlichen Verdünnungen ähnliche Konzentrationswerte, nachdem mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurde. Die niedrigste Verdünnung als 100% angesetzt, ergaben sich Wiederfindungswerte des Analyten in den stärker verdünnten Proben von 103,00 % (1:10) und 102,11% (1:20) (siehe Tabelle 5).

Ebenso zeigten sich beim MMP-2 ELISA bei beiden Gewebeproben keine relevanten Unterschiede der Konzentrationswerte der unterschiedlich verdünnten Proben mit Wiederfindungen von 97,42% (1:6) und 97,16% (1:12) bei Gewebeprobe 1 und 110,35% (1:6) und 116,71% (1:12) bei Probe 2 (siehe Tabelle 6).

Tabelle 5: Linearität des Matrixmetalloproteinase-9 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): Angegeben sind die gemessenen Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 Konzentrationen in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) jeweils in der unterschiedlich verdünnten Probe. Zudem sind die Endkonzentrationen, nachdem mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert wurde, aufgeführt. In der letzten Zeile ist die Wiederfindung im Vergleich zur niedrigsten Verdünnung (1:5) in Prozent angegeben.

	1:5 Verdünnung	1:10 Verdünnung	1:20 Verdünnung
MMP-9 [ng/ml]	0,617	0,318	0,175
x Verdünnungs- faktor	3,085	3,180	3,150
Wiederfindung		103,00%	102,11%

Tabelle 6: Linearität des Matrixmetalloproteinase-2 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): Es sind die gemessenen Matrixmetalloproteinase (MMP)-2 Konzentrationen und die jeweils mit dem Verdünnungsfaktor multiplizierten Endkonzentrationen in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) bei den unterschiedlichen Verdünnungen der beiden Gewebeproben aufgeführt. Zudem ist die Wiederfindung im Vergleich zur niedrigsten Verdünnung (1:3) in Prozent angegeben.

		1:3 Ver- dünnung	1:6 Ver- dünnung	1:12 Ver- dünnung
Gewebe- probe 1	MMP-2 [ng/ml]	6,019	2,932	1,462
	x Verdünnungs- faktor	18,057	17,592	17,544
	Wiederfindung		97,42%	97,16%
Gewebe- probe 2	MMP-2 [ng/ml]	6,697	3,695	1,954
	x Verdünnungs- faktor	20,091	22,170	23,448
	Wiederfindung		110,35%	116,71%

3.3 Verdünnung der Proben

Anhand der Ergebnisse der Wiederfindungs- und Linearitätsexperimente (siehe unter 3.1. und 3.2.) konnte die Verdünnung für die Hautproben eruiert werden. Es wurde eine Verdünnung gewählt, die eine gute Wiederfindung sowohl im „Spike-Experiment“ als auch in der Linearität aufwies. Zudem sollten die Konzentrationswerte bei dieser Verdünnung in den linearen Bereich der Standardkurven fallen. Je nach verfügbarer Materialmenge und Steigung der Standardkurve wurde die gewählte Verdünnung leicht angepasst. Die Hautproben wurden daher für den MMP-2 ELISA 1:3 (Maus) und 1:4 (human) verdünnt, für den MMP-9 ELISA in beiden Fällen 1:6 (als Ausnahme bei den 30 Tage alten Tieren eine 1:5 Verdünnung).

3.4 Ergebnisse beim Menschen

3.4.1 Liquor

3.4.1.1 *Konzentrationen von MMP-2 und MMP-9*

Um zu sehen, ob die Matrixmetalloproteinasen im zentralen Nervensystem von ALS Patienten hochreguliert sind, wurden die Konzentrationen der MMP-2 und MMP-9 im unverdünnten Liquor mittels ELISA bestimmt.

Hier zeigt sich bei den ALS Patienten eine signifikant erhöhte MMP-9 Konzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($p < 0,001$, siehe Abbildung 4). Die MMP-2 Konzentrationen zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ($p = 0,82$, siehe Abbildung 5).

Zudem findet man eine signifikante Korrelation der MMP-2 und MMP-9 zueinander ($p = 0,003$, $R = 0,42$).

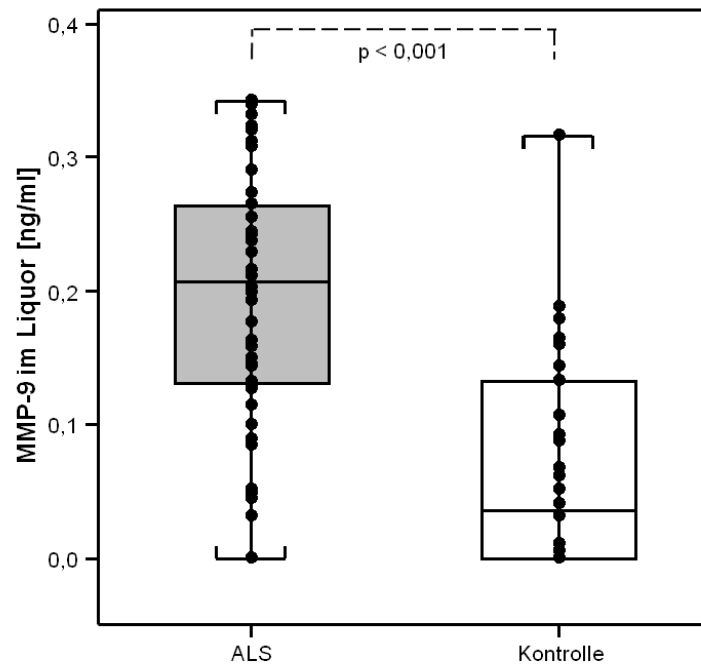


Abbildung 4: Die dargestellten Boxplots zeigen die MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9) Konzentrationen als Mittelwerte von Duplikaten in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) im Liquor bei ALS Patienten (grau) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (weiß). Die Box zeigt unten die 25. Quartile, oben die 75. Quartile an, der Strich in der Mitte stellt den Median dar. Die Antennen zeigen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Die Punkte stellen die einzelnen Werte dar. Extreme Ausreißer sind nicht gezeigt. Es zeigt sich ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar.

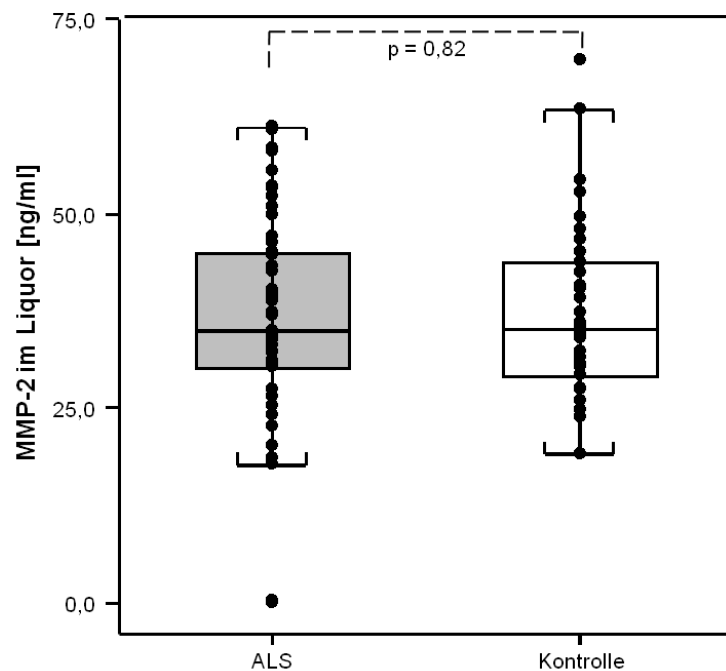


Abbildung 5: Anhand Boxplots sind die MMP-2 (Matrixmetalloproteinase 2) Konzentrationen als Mittelwert von Duplikaten in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) dargestellt. Links sind die Werte im Liquor bei ALS Patienten (grau) aufgezeigt, rechts bei gesunden Kontrollen (weiß). Die Box zeigt unten die 25. Quartile, oben die 75. Quartile an, der Strich in der Mitte stellt den Median dar. Die Antennen zeigen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Die Punkte stellen die einzelnen Werte dar. Extreme Ausreißer sind nicht gezeigt. Es findet sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,82$. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar.

3.4.1.2 Abhängigkeit von weiteren Faktoren

Es wurde untersucht, ob weitere Faktoren, wie zum Beispiel das Geschlecht oder der Krankheitsverlauf, einen Einfluss auf die MMP Konzentrationen haben.

Man analysierte, ob die Dauer der Erkrankung einen Einfluss auf die MMP-Spiegel hat. Während die Konzentration der MMP-2 im Verlauf der Erkrankung abnimmt ($p = 0,04$, $R = -0,31$), ist bei der MMP-9 Konzentration diesbezüglich kein signifikanter Unterschied feststellbar ($p = 0,88$).

Es zeigt sich eine Abhängigkeit der MMP Konzentrationen von der Schnelligkeit der Progression der Erkrankung. Patienten mit einer raschen Verlaufsform der Krankheit zeigen signifikant erhöhte MMP-9 Level ($P = 0.008$) im Liquor im Vergleich zu Patienten mit einer langsameren Progression. Die MMP-2 Konzentrationen steigen ebenfalls tendenziell an, es wird allerdings keine Signifikanz erreicht ($p = 0.09$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

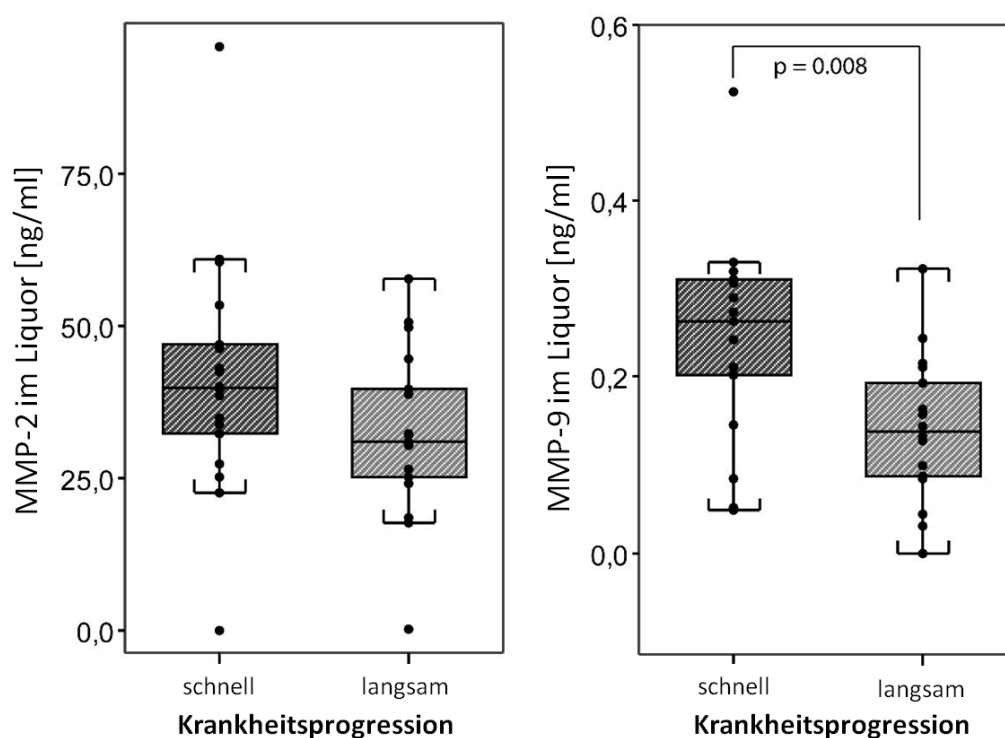


Abbildung 6: Links ist der Unterschied der MMP-2 (Matrixmetalloproteinase 2) Konzentrationen, rechts der der MMP-9 (Matrixmetalloproteinase 9) Konzentrationen im Liquor bei der schnellen und langsamen Verlaufsform der ALS (amyotrophe Lateralsklerose) dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte von Duplikaten in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter). Die Box zeigt unten die 25. Quartile, oben die 75. Quartile an, der Strich in der Mitte stellt den Median dar. Die Antennen zeigen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Die Punkte stellen die einzelnen Werte dar. Extreme Ausreißer sind nicht gezeigt. Bezüglich des MMP-9 zeigt sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,008$. Die Ergebnisse des MMP-2 zeigen keine Signifikanz mit $p = 0,09$. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar.

Allgemein sind sowohl bei den ALS Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen mit steigendem Alter höhere MMP-2 und MMP-9 Level zu beobachten (MMP-2: $p = 0,001$, $R = 0,35$; MMP-9: $p = 0,01$, $R = 0,3$).

Es stellte sich die Frage, ob das Geschlecht den Level der MMPs beeinflusst. Ein Unterschied zwischen Männern und Frauen kann weder für MMP-2 noch für MMP-9 festgehalten werden. Hier zeigen sich Signifikanzniveaus von $p = 0,85$ für MMP-2 und $p = 0,43$ für MMP-9.

Außerdem findet sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der klinischen Subtypen. Patienten mit der bulbären Verlaufsform zeigen ähnliche MMP-2 ($p = 0,5$) und MMP-9 ($p = 0,9$) Konzentrationen, wie solche mit der spinalen Form.

Desweiteren gibt es keine Korrelation der MMP-2 und MMP-9 Level mit der Funktion der Blut-Hirn-Schranke, die mit dem Liquor/Serum-Albuminquotienten bestimmt wurde (MMP-2: $p = 0,38$; MMP-9: $p = 0,6$).

Zudem wurde untersucht, ob die Krankheitsschwere mit den MMP Konzentrationen korreliert. Diese wurde mittels zweier klinischer Scores, ALSFRS und MRCS, bestimmt. Hier zeigt sich bei beiden eben genannten Scores weder für MMP-2 noch für MMP-9 eine signifikante Korrelation. Beim ALSFRS konnten Signifikanzniveaus von $p = 0,67$ (MMP-2) und $p = 0,24$ (MMP-9), beim MRCS von $p = 0,78$ (MMP-2) und $p = 0,48$ (MMP-9) festgestellt werden.

Um zu sehen, ob eine vorhergehende Behandlung einen Einfluss auf die MMP Konzentrationen hat, wurden Patienten mit vorheriger Riluzol (Glutamatantagonist) Behandlung betrachtet und solche ohne Therapie. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen (MMP-2: $p = 0,67$; MMP-9: $p = 0,51$).

3.4.2 Serum

Es wurde analysiert, ob die MMP Konzentrationen nicht nur im zentralen Nervensystem sondern auch systemisch erhöht sind. Dazu wurde das Serum der ALS Patienten und Kontrollen auf MMP-2 und MMP-9 untersucht.

Es zeigt sich bei diesen Versuchen keine Erhöhung der MMP-9 Konzentration im Serum ($p = 0,32$, siehe Abbildung 7). Bezüglich der MMP-2 Konzentrationen sind

ebenfalls keine signifikanten Unterschiede feststellbar ($p = 0,59$, siehe Abbildung 8). Eine Korrelation der MMP-2 und MMP-9 zueinander wurde nicht gefunden.

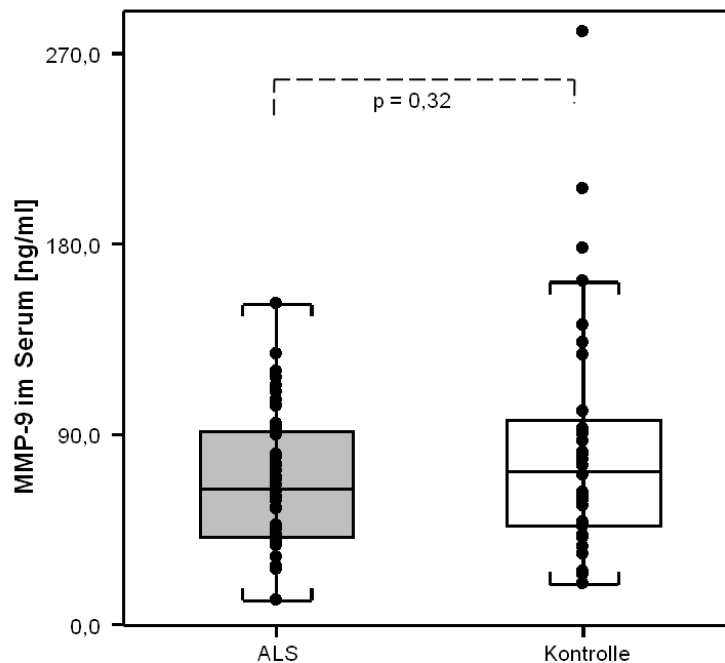


Abbildung 7: Die gezeigten Boxplots stellen die MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9) Konzentrationen als Mittelwerte von Duplikaten in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) im Serum bei ALS Patienten (grau) im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten (weiß) dar. Die Box zeigt unten die 25. Quartile, oben die 75. Quartile an, der Strich in der Mitte stellt den Median dar. Die Antennen zeigen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Die Punkte stellen die einzelnen Werte dar. Extreme Ausreißer sind nicht gezeigt. Es zeigt sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,32$. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar.

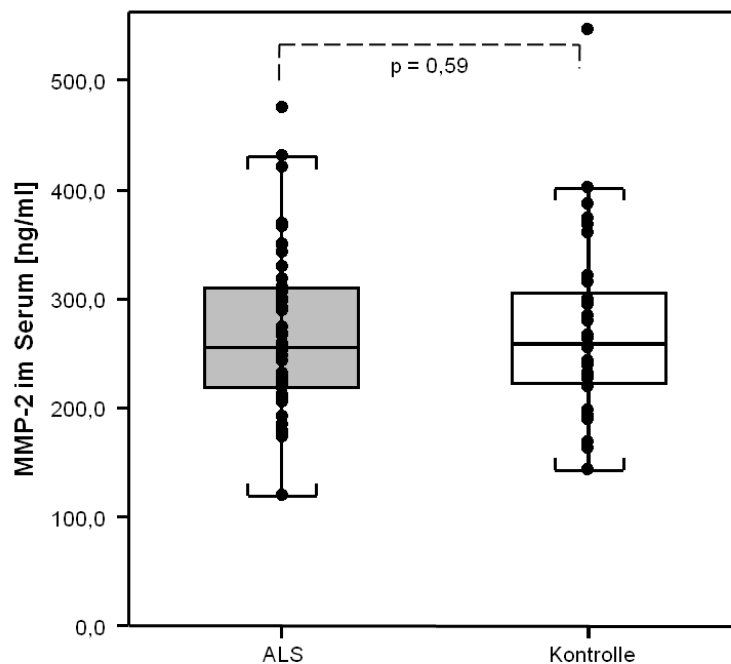


Abbildung 8: Mithilfe der Boxplots sind die MMP-2 (Matrixmetalloproteinase 2) Konzentrationen als Mittelwert von Duplikaten in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) dargestellt. Links sind die Werte im Serum bei ALS Patienten (grau) aufgezeigt, rechts bei gesunden Kontrollen (weiß). Die Box zeigt unten die 25. Quartile, oben die 75. Quartile an, der Strich in der Mitte stellt den Median dar. Die Antennen zeigen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Die Punkte stellen die einzelnen Werte dar. Extreme Ausreißer sind nicht gezeigt. Es findet sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,59$. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar.

Auch hier wurde untersucht, ob andere Faktoren einen Einfluss auf die MMP-Level haben. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen bezüglich des Geschlechts (MMP-2: $p = 0,59$; MMP-9: $p = 0,38$), des klinischen Subtyps (MMP-2: $p = 0,5$; MMP-9: $p = 0,77$) oder der Krankheitsprogression (MMP-2: $p = 0,31$; MMP-9: $p = 0,41$). Zudem ist keine Korrelation zwischen den Konzentrationen der MMP-2 und MMP-9 im Serum und der Dauer (MMP-2: $p = 0,94$; MMP-9: $p = 0,84$) oder Schwere der Erkrankung, gemessen am MRCS (MMP-2: $p = 0,9$; MMP-9: $p = 0,41$), feststellbar.

Desweiteren wurde keine Korrelation zwischen den MMP-Konzentrationen im Liquor und im Serum gefunden. Bei der MMP-2 zeigte sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,79$, bei der MMP-9 von $p = 0,23$.

3.4.3 Haut

Um herauszufinden, ob es eine Verbindung zwischen den pathologischen Hautveränderungen und den neuronalen Schäden bei ALS Patienten gibt, wurde untersucht, ob sich die oben geschilderten Konzentrationserhöhungen im ZNS auch im Hautgewebe wiederfinden lassen.

Dazu wurde Hautgewebe von ALS Patienten und Kontrollen auf MMP-2 und MMP-9 untersucht.

Es zeigt sich, wie im Liquor, eine signifikante Erhöhung der MMP-9 Konzentration im Hautgewebe von ALS Patienten im Vergleich zu Kontrollen ($p = 0,03$, siehe Abbildung 9). Bei der MMP-2 konnte keine signifikante Konzentrationserhöhung festgestellt werden ($p = 0,32$, siehe Abbildung 10).

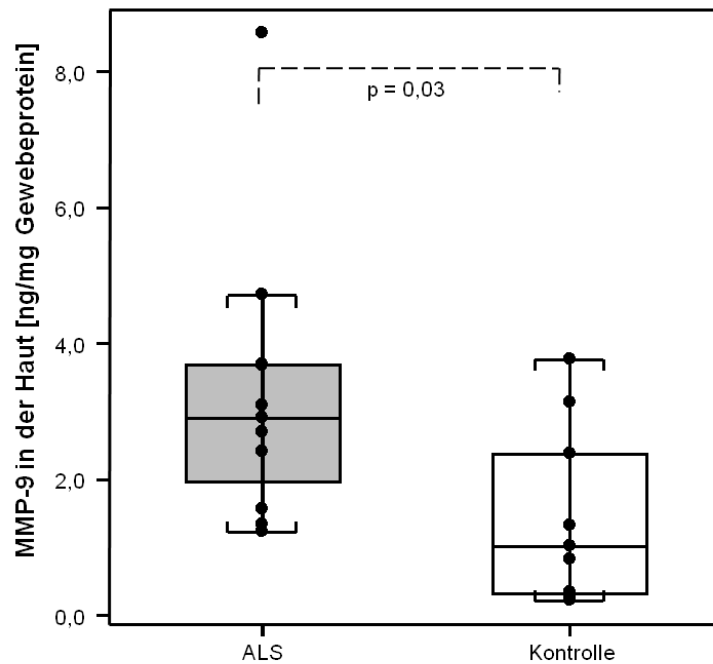


Abbildung 9: Die Boxplots zeigen die MMP-9 (Matrixmetalloproteinase 9) Konzentrationen als Mittelwert von Duplikaten in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) in der Haut bei ALS Patienten (grau) und bei gesunden Kontrollen (weiß). Die Box stellt unten die 25. Quartile, oben die 75. Quartile dar, der Strich in der Mitte entspricht dem Median. Die Antennen zeigen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Die Punkte stellen die einzelnen Werte dar. Extreme Ausreißer sind nicht gezeigt. Es findet sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,03$. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar.

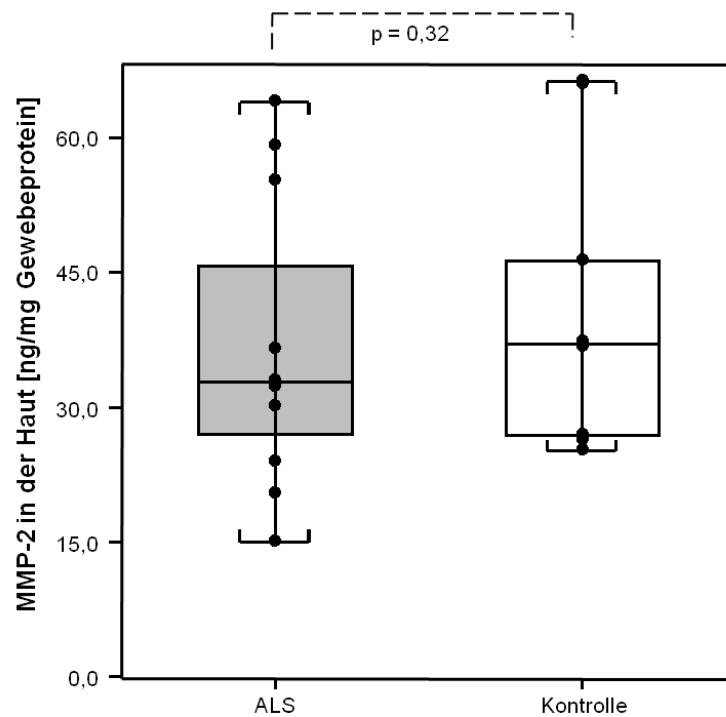


Abbildung 10: Es sind die MMP-2 (Matrixmetalloproteinase-2) Konzentrationen als Mittelwerte von Duplikaten in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) in der Haut bei ALS Patienten (grau) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (weiß) anhand Boxplots dargestellt. Die Box zeigt unten die 25. Quartile, oben die 75. Quartile an, der Strich in der Mitte stellt den Median dar. Die Antennen zeigen die Spannweite der Werte ohne Ausreißer. Die Punkte stellen die einzelnen Werte dar. Extreme Ausreißer sind nicht gezeigt. Es zeigt sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,32$. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar.

3.5 Ergebnisse beim Tiermodell

Im Tiermodell wurden vier verschiedene Genotypen untersucht (siehe 2.2.1.1.). Die „Cra-Mäuse“ und die „Cra-SOD-Mäuse“ sollten hierbei als weitere Kontrollen dienen. Da sich bei diesen beiden Gruppen, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen, werden in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Wildtyp-Mäuse im Vergleich mit der „SOD-Mäusen“ diskutiert.

Zur Beurteilung der MMP-Konzentrationen im ZNS der Tiere wurden Rückenmarks- und Kleinhirnproben entnommen und auf MMP-2 und MMP-9 untersucht. Zusätzlich wurden Hautgewebeproben der Tiere analysiert, um eventuelle Verbindungen zwischen Haut- und neuronalen Schäden herauszufinden.

3.5.1 Rückenmark

Im Rückenmark der SOD-Mäuse zeigt sich eine signifikante Erhöhung der MMP-9 Konzentrationen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Bei den 90 Tage alten Mäusen findet sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,021$. Bei den jüngeren Tieren (30 und 60 Tage alt) und den 120 Tage alten Tieren ist eine Tendenz zu höheren MMP-Werten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen feststellbar, jedoch ohne statistische Signifikanz (30 Tage: $p = 0,18$; 60 Tage: $p = 0,426$; 120 Tage: $p = 0,055$; siehe Abbildung 11).

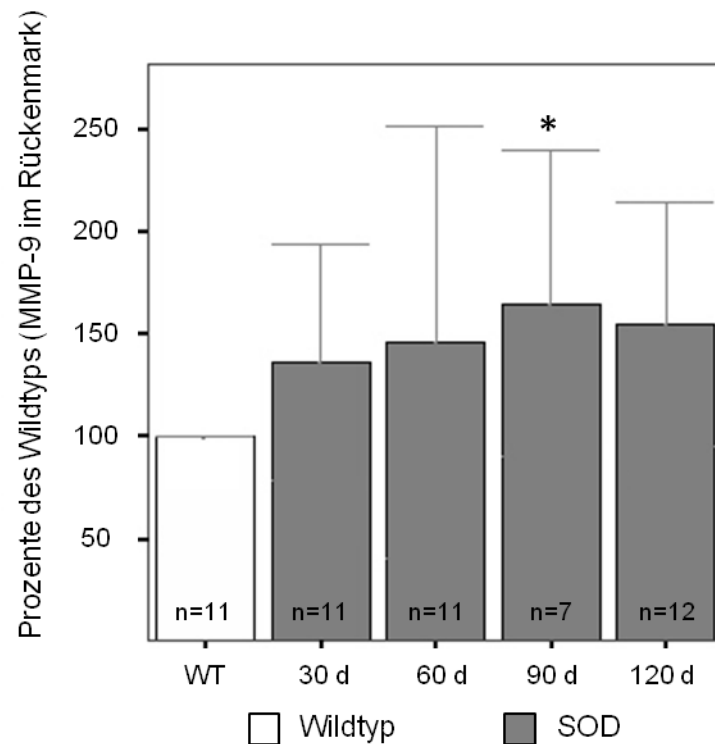


Abbildung 11: Es sind die MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9) Konzentrationen im Rückenmark bei den Wildtypmäusen (WT, weiß) und den Versuchstieren mit der SOD (Superoxiddismutase)-Mutation (grau) gezeigt. Die Konzentrationen bei den SOD-Tieren werden in Prozent der Wildtyp-Konzentrationen (= 100%) dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte innerhalb einer Altersklasse mit den Standardabweichungen gezeigt. Zudem ist die Anzahl (n) der Versuchstiere angegeben. Die SOD-Tiere werden in 4 Altersklassen (30, 60, 90, 120 Tage (d) alte Tiere) unterteilt. Extreme Ausreißer sind nicht dargestellt. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar. * p (Signifikanzniveau) $\leq 0,05$.

MMP-2 ist bei dem 90 Tage alten SOD-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht ($p = 0,014$). Bei den 30 und 60 Tage alten Mäusen zeigen sich tendenziell erhöhte Konzentrationswerte, es wird jedoch keine Signifikanz erreicht (30 Tage: $p = 0,110$; 60 Tage: $p = 0,067$; siehe Abbildung 12). Im Rückenmark zeigt sich keine Korrelation von MMP-2 und MMP-9 zueinander.

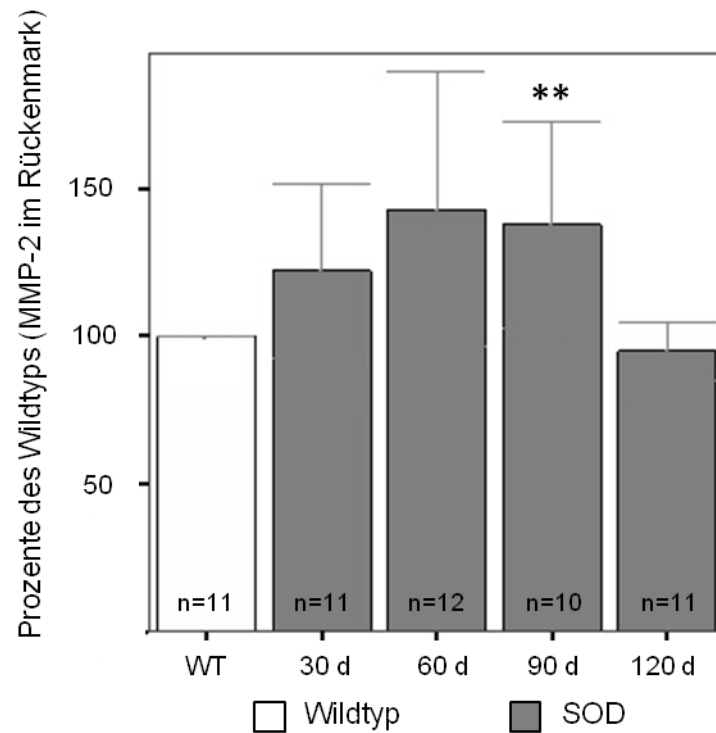


Abbildung 12: Dargestellt sind die MMP-2 (Matrixmetalloproteinase-2) Konzentrationen im Rückenmark bei den Wildtypmäusen (WT, weiß) und den Versuchstieren mit der SOD (Superoxiddismutase)-Mutation (grau) gezeigt. Es werden die Konzentrationen bei den SOD-Tieren in Prozent der Wildtyp-Konzentrationen (= 100%) aufgezeigt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte innerhalb einer Altersklasse mit den Standardabweichungen. Die Anzahl (n) der Versuchstiere ist dargestellt. Die SOD-Tiere werden in 4 Altersklassen (30, 60, 90, 120 Tage (d) alte Tiere) unterteilt. Extreme Ausreißer sind nicht dargestellt. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar. ** p (Signifikanzniveau) $\leq 0,01$.

3.5.2 Kleinhirn

Zur Beurteilung der MMP-Konzentrationen im ZNS wurden Kleinhirnproben der Versuchstiere auf MMP-2 und MMP-9 untersucht. Es zeigte sich, dass die MMP-9 Konzentrationen im Kleinhirn bei den 90 Tage alten Versuchstieren signifikant ($p = 0,038$) erhöht sind. Bei den übrigen Altersklassen wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der MMP-9 Konzentration festgestellt (siehe Abbildung 13).

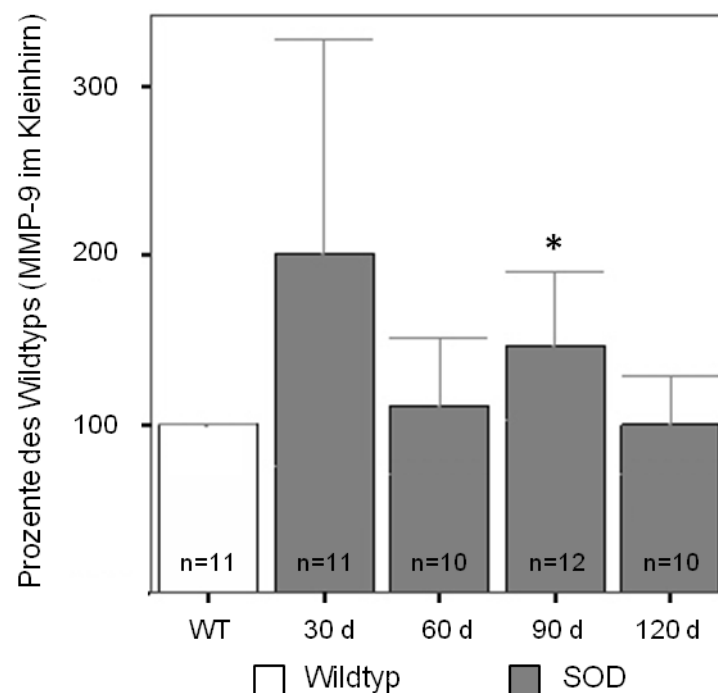


Abbildung 13: Es sind die MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9) Konzentrationen im Kleinhirn bei den Wildtypmäusen (WT, weiß) und den Versuchstieren mit der SOD (Superoxiddismutase)-Mutation (grau) gezeigt. Die Konzentrationen bei den SOD-Tieren werden in Prozent der Wildtyp-Konzentrationen (= 100%) dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte innerhalb einer Altersklasse mit den Standardabweichungen gezeigt. Zudem ist die Anzahl (n) der Versuchstiere angegeben. Die SOD-Tiere werden in 4 Altersklassen (30, 60, 90, 120 Tage (d) alte Tiere) unterteilt. Extreme Ausreißer sind nicht dargestellt. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar. * p (Signifikanzniveau) $\leq 0,05$.

Die MMP-2 Konzentrationen zeigen im Kleinhirn bei den 60 Tage alten Tieren signifikant erhöhte Werte ($p = 0,044$). Bei den 120 Tage alten Versuchstieren wurden signifikant niedrigere MMP-2 Konzentrationen gefunden ($p = 0,019$). Die Ergebnisse in den Gruppen der 30 und 90 Tage alten Versuchstiere erreichen keine Signifikanz (30 Tage: $p = 0,264$; 90 Tage: $p = 0,244$; siehe Abbildung 14).

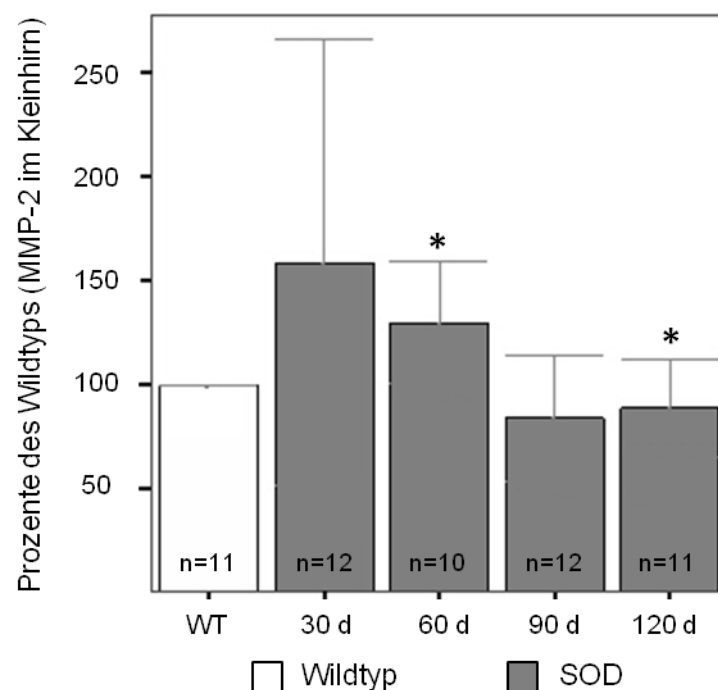


Abbildung 14: Es sind die MMP-2 (Matrixmetalloproteinase-2) Konzentrationen im Kleinhirn bei den Wildtypmäusen (WT, weiß) und den Versuchstieren mit der SOD (Superoxiddismutase)-Mutation (grau) dargestellt. Die Konzentrationen bei den Tieren mit der SOD-Mutation werden in Prozent der Wildtyp-Konzentrationen (= 100%) aufgezeigt. Die Mittelwerte innerhalb einer Altersklasse mit den Standardabweichungen sind angegeben. Zudem ist die Anzahl (n) der Versuchstiere gezeigt. Die SOD-Tiere werden in 4 Altersklassen (30, 60, 90, 120 Tage (d) alte Tiere) unterteilt. Extreme Ausreißer sind nicht dargestellt. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar. * p (Signifikanzniveau) $\leq 0,05$.

3.5.3 Haut

Im Hautgewebe zeigt sich, dass die MMP-9 bei den SOD-Mäusen am Tag 30 signifikant erniedrigt ist im Vergleich zu den Wildtypmäusen ($p = 0,001$). Am Tag 90 ($p < 0,001$) und Tag 120 ($p = 0,015$) hingegen sind die Konzentrationen stark signifikant erhöht. Am Tag 60 findet man eine tendenzielle Konzentrationserhöhung, die jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (siehe Abbildung 15).

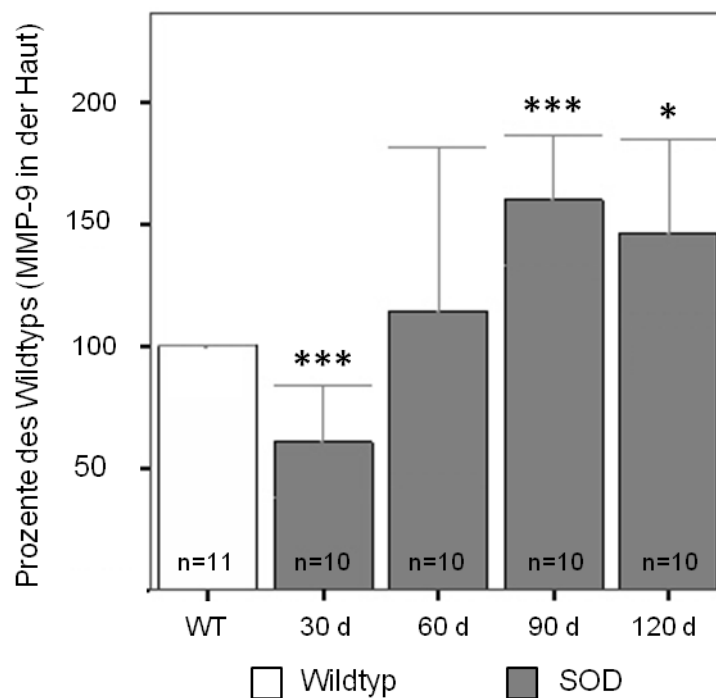


Abbildung 15: Es sind die MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9) Konzentrationen in der Haut bei den Wildtypmäusen (WT, weiß) und den Versuchstieren mit der SOD (Superoxiddismutase)-Mutation (grau) gezeigt. Die Konzentrationen bei den SOD-Tieren werden in Prozent der Wildtyp-Konzentrationen (= 100%) dargestellt. Zudem ist die Anzahl (n) der Versuchstiere angegeben. Die SOD-Tiere werden in 4 Altersklassen (30, 60, 90, 120 Tage (d) alte Tiere) unterteilt. Es sind jeweils die Mittelwerte innerhalb einer Altersklasse mit den Standardabweichungen gezeigt. Extreme Ausreißer sind nicht dargestellt. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar. * p (Signifikanzniveau) $\leq 0,05$. *** $p \leq 0,005$.

Die MMP-2 ist in der Haut bei den 120 Tage alten SOD-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant erhöht ($p = 0,039$). Die anderen Altersklassen zeigen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 16).

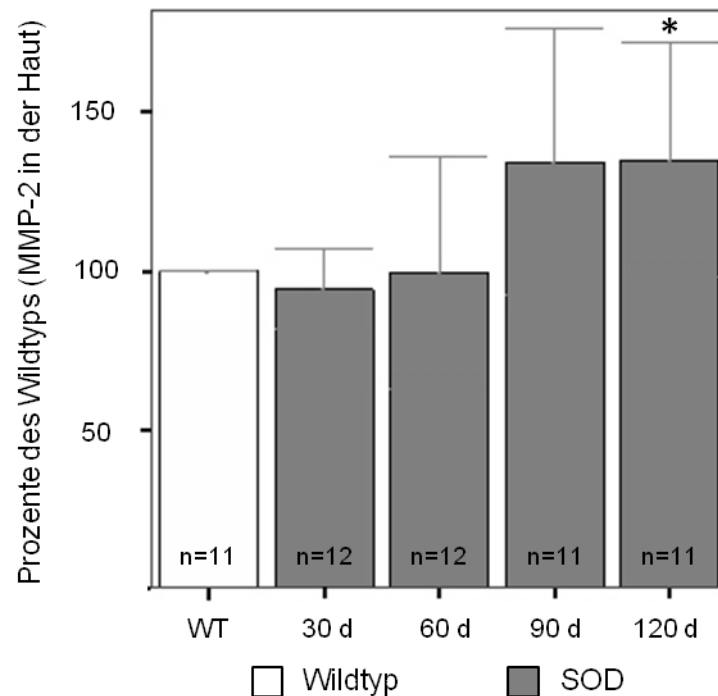


Abbildung 16: Es sind die MMP-2 (Matrixmetalloproteinase-2) Konzentrationen in der Haut bei den Wildtypmäusen (WT, weiß) und den Versuchstieren mit der SOD (Superoxiddismutase)-Mutation (grau) aufgezeigt. Die Konzentrationen bei den Tieren mit der SOD-Mutation werden in Prozent der Wildtyp-Konzentrationen (= 100%) aufgezeigt. Die Mittelwerte innerhalb einer Altersklasse mit den Standardabweichungen sind angegeben. Zudem ist die Anzahl (n) der Versuchstiere gezeigt. Die SOD-Tiere werden in 4 Altersklassen (30, 60, 90, 120 Tage (d) alte Tiere) unterteilt. Extreme Ausreißer sind nicht dargestellt. Die Abbildung stellt die Ergebnisse von zwei Experimenten dar. * p (Signifikanzniveau) $\leq 0,05$.

Ebenso findet sich in der Haut keine Korrelation von MMP-2 und MMP-9 zueinander. Es ist allerdings eine signifikante Korrelation zwischen den MMP-9 Konzentrationen im Rückenmark und den MMP-9 Werten in der Haut feststellbar ($p = 0,04$).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels ELISA signifikant erhöhte MMP-9 Konzentrationen sowohl im ZNS (Liquor) als auch in der Haut bei ALS-Patienten gefunden.

Auch im Tiermodell konnten gesteigerte MMP-9 Konzentrationen im ZNS (Rückenmark) und Haut nachgewiesen werden.

Somit konnte, nach unserem derzeitigen Wissenstand erstmals, bei der ALS eine gemeinsame generelle Hochregulation der MMP-9 in Haut und ZNS, sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell, nachgewiesen werden.

4.1 Generelle Hochregulation der MMP-9

In dieser Arbeit konnten erhöhte MMP-9 Level im Liquor und in der Haut von ALS Patienten gezeigt werden. Im Serum konnte hingegen keine Erhöhung der MMP-9 Konzentrationen nachgewiesen werden.

Ebenso zeigten sich im Tiermodell gesteigerte MMP-9 Konzentrationen in Rückenmark und Haut der SOD-Mäuse.

Diese Ergebnisse lassen auf eine generelle Hochregulation der MMP-9 schließen, was im Einklang mit früheren Studien ist.

Desweiteren zeigt sich im Tiermodell, dass die MMP-Konzentrationen bei den ältesten Tieren (120 Tage alt) wieder abnehmen. Eine Ursache dafür kann der bei der ALS bekannte Motoneuronen- und Astrozytenverlust sein (Arasaki and Tamaki 1998; Gadowski, Chrapusta et al. 2006; Mohajeri, Figlewicz et al. 1998; Rossi, Brambilla et al. 2008). Diese beiden Zelltypen werden als Hauptproduzenten der MMPs gesehen, was die sinkenden MMP-Konzentrationen bei Verlust der Zellen erklären kann (Gottschall and Deb 1996; Lim, Backstrom et al. 1996).

4.1.1 Ergebnisse aus früheren Studien

Es wurde über erhöhte MMP-9 Konzentrationen im Serum (Beuche, Yushchenko et al. 2000; Demestre, Parkin-Smith et al. 2005; Niebroj-Dobosz, Janik et al. 2010; Soon, Crouch et al. 2010) und im Muskel (Schoser and Blottner 1999) von ALS Patienten berichtet. Die Steigerung der MMP-Konzentration im Serum konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz kann durch eine andere Methodik (z. B. Zymographie), Unterschiede in der Patientenauswahl oder anderen laborspezifischen Bedingungen erklärt werden. Immunhistochemisch und zymographisch wurde eine Steigerung der MMP-9 Konzentrationen im Motorkortex und im Thorakal- und Lumbalmark von ALS Patienten nachgewiesen (Lim, Backstrom et al. 1996).

Auch Experimente im transgenen ALS Tiermodell zeigten ähnliche Ergebnisse wie die vorliegende Arbeit. Lorenzl et al. fanden eine erhöhte MMP-9 Expression im Rückenmark der G93A Mäuse (Lorenzl, Narr et al. 2006), Kiaei et al. eine gesteigerte MMP-9 Aktivität (Kiaei, Kipiani et al. 2007).

Bei früheren Studien trat bei der Messung der MMP-Konzentrationen im Liquor bei ALS Patienten und Kontrollen häufig ein Sensitivitätsproblem auf. Die MMP-Level lagen unterhalb der Nachweisgrenze (Beuche, Yushchenko et al. 2000) oder es konnten nur sehr geringe Konzentrationen nachgewiesen werden (Lorenzl, Albers et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der Liquor, im Gegensatz zu älteren Studien, unverdünnt eingesetzt und mit einem sehr sensitiven ELISA analysiert. So konnte dieses Problem umgangen werden.

4.1.2 Regulation und Hochregulation der MMPs

Die basale Expression der MMP-9 und anderer MMPs ist im gesunden Organismus eher niedrig und streng reguliert. Beim Matrixumbau oder bei einigen pathologischen Prozessen wird die Genexpression der MMPs vornehmlich über die Transkription hochreguliert (Vincenti and Brinckerhoff 2007).

Die möglichen Ursachen für eine Hochregulation der MMPs bei der ALS, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, sind noch nicht vollständig geklärt. Die

nachfolgend beschriebenen Punkte werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

4.1.2.1 Gesteigertes Substrat

Ein Grund für die hier gezeigte Hochregulation der MMPs kann ein gesteigertes Substratangebot für die MMPs sein. Die ALS zeichnet sich bekanntermaßen durch eine fortschreitende Motoneurondegeneration aus. Durch den dadurch erhöhten Abbau und Untergang der Nervenzellen kommt es zu einer Zunahme extrazellulärer Matrixproteine. Diese wiederum gelten als Substrate der MMPs, was deren Hochregulation bei ALS-Patienten und SOD1-Mäusen erklären könnte (Lim, Backstrom et al. 1996; Lorenzl, Narr et al. 2006; Ono, Imai et al. 1998).

4.1.2.2 Oxidativer Stress

Man geht davon aus, dass die MMPs durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) im Rahmen von oxidativem Stress hochreguliert werden können. Da angenommen wird, dass oxidativer Stress einen Teil zur Pathogenese der ALS beiträgt (Barber and Shaw 2010; Beckman, Carson et al. 1993), können so ebenfalls die Konzentrationserhöhungen der MMPs bei der ALS erklärt werden.

Oxidativer Stress entsteht, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und der Möglichkeit des Organismus, diese zu bekämpfen bzw. den entstandenen Schaden zu reparieren, kommt.

Bei der ALS kann oxidativer Stress zum einen direkt durch das mutierte SOD-Gen entstehen. Es kommt zu einem toxischen Funktionszuwachs des mutierten Gens und damit zu einer Verstärkung der normalerweise geringeren Peroxidasereaktionen. Zum anderen kann er indirekt über eine gesteigerte Superoxidproduktion der Mikroglia, die bei der ALS bekanntermaßen aktiviert sind, auftreten (Hall, Oostveen et al. 1998; Wu, Re et al. 2006). Desweiteren kann oxidativer Stress als Produkt einer mitochondrialen Dysfunktion hervorgerufen werden. Mitochondrien werden auch im gesunden Organismus als Hauptquelle reaktiver Sauerstoffradikale gesehen. Bei der ALS sind morphologisch veränderte

Mitochondrien feststellbar, sie sind blass und aufgequollen (Menzies, Cookson et al. 2002; Siklos, Engelhardt et al. 1996). Desweiteren findet man im Mausmodell bei Vorhandensein der SOD-Mutation zudem eine gestörte Funktion der Mitochondrien. Es ist eine Störung der Atmungskette im Sinne einer geringeren Aktivität des Elektronentransports feststellbar, was zu einem vermehrten Zelltod der Motoneurone führt. Zudem kann es zu vermehrten Schäden der mitochondrialen DNA oder zu Störungen im axonalen Transport der Mitochondrien kommen (Jung, Higgins et al. 2002; Martin, Liu et al. 2007; Menzies, Cookson et al. 2002; Shi, Gal et al. 2010; Shi, Wei et al. 2010).

Marker des oxidativen Stresses bei der ALS wurden schon in vielen Studien nachgewiesen. Im Rückenmark und im Liquor von ALS-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen vom 3-Nitrotyrosin (3-NT) festgestellt. 3-NT ist ein relativ spezifischer Marker der Peroxynitrit-vermittelten Proteinoxidation und damit des oxidativen Schadens (Abe, Pan et al. 1995; Beal, Ferrante et al. 1997; Tohgi, Abe et al. 1999). Desweiteren waren Marker der Lipidoxidation und der Protein-Glykoxidation im Rückenmark von ALS-Erkrankten erhöht (Shibata, Nagai et al. 2001). Shukla et al. konnten allerdings im Liquor keine signifikante Erhöhung des Lipidoxidationsmarkers Malondialdehyd (MDA) feststellen, lediglich bei Patienten mit einer positiven Familienanamnese zeigten sich signifikante Erhöhungen (Shukla, Rajani et al. 2003). Auch das 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin, ein Marker für oxidativen Schaden auf DNA-Ebene, zeigte sich im Rückenmark von ALS-Patienten erhöht (Ferrante, Browne et al. 1997).

Oxidativer Stress äußert sich bei der ALS in vielfältiger Weise. Er kann beispielsweise zu neuronalen Proteinaggregationen führen, die sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell Akkumulationen von Neurofilamenten (Hauptelement des neuronalen Zytoskeletts) im Rückenmark hervorrufen können (Kim, Jeong et al. 2004). Auch Ubiquitin oder Dörfin kann sich im Motorkortex oder in den spinalen Motoneuronen ablagern (Chung, Joo et al. 2003; Halliwell 2006). Ebenso kann es zu einer glutamatergen Exzitotoxizität kommen. ROS aus geschädigten Motoneuronen kann eine Oxidation induzieren und eine Störung der Glutamataufnahme durch Astrozyten herbeiführen. Diese verminderte astrozytäre Glutamataufnahme führt höchstwahrscheinlich zu einer erhöhten extrazellulären

Glutamatkonzentration. Die Motoneuronen sind sehr verletzlich gegenüber einem durch einen Glutamat-Rezeptor vermittelten Schaden und können darauf mit Zelltod reagieren (Rao, Yin et al. 2003). Desweiteren steht der oxidative Stress bei der ALS mit einer Störung der mRNA Transkription in Verbindung. Dies führt zu einer geringeren Proteinexpression. Vitamin E, das in der Behandlung der ALS diskutiert wird, setzt hier an, indem es die mRNA-Oxidation reduziert und so die Proteinexpression fördert (Chang, Kong et al. 2008). Allgemein ist bekannt, dass die Bildung der ROS mit dem Alter zunimmt. Es kommt dann zu einer gesteigerten Leckage aus der mitochondrialen Atmungskette, was eine Hauptursache der Alterung eines Organismus zu sein scheint (Genova, Pich et al. 2004). Die Krankheit könnte daher letztlich dadurch ausgelöst werden, dass der neuronale Schaden größer als die Kompensationsmechanismen des Körpers ist. All diese Faktoren können zu der bekannten Motoneurondegeneration führen.

ROS beeinflussen viele Gene in ihrer Regulation, so stehen auch die in dieser Arbeit untersuchten MMPs stark unter dem Einfluss des oxidativen Stresses. Die ROS gelten als Schlüsselaktivatoren der MMP-Genexpression und der MMP-Aktivierung (Nelson and Melendez 2004). Die reaktiven Sauerstoffradikale können die MMPs über viele verschiedene Signalwege hochregulieren. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) beispielsweise kann die Genexpression der MMP-2 und MMP-9 über eine indirekte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der MAPK-Familie (z. B. ERK 1/2, JNK, p38 u.a.) beeinflussen. Die Proteinkinase p38 wurde in Neuronen von ALS Patienten als auch SOD-Mäusen vermehrt gefunden und es ist bekannt, dass sie positiv mit der Krankheitsprogression bei SOD-mutierten Mäusen korreliert (Bendotti, Atzori et al. 2004; Tortarolo, Vegliane et al. 2003). Viele weitere Studien zeigen, dass ROS, wie Lipoperoxide und Peroxynitrite, die Genexpression von MMPs modulieren können (Rajagopalan, Meng et al. 1996; Ranganathan, Nelson et al. 2001).

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für die Genregulation ist NF κ B bzw. sein zytosolischer Inhibitor I κ B α . Es kontrolliert viele verschiedene Prozesse in einer Zelle, z. B. das Zellüberleben oder entzündliche Prozesse (Pereira and Oakley 2008). Aktiviertes NF κ B wandert in den Kern einer Zelle, bindet an spezifische DNA-Sequenzen und führt so zur Transkription und Translation neuer Proteine, die

dann die Zellfunktion beeinflussen. Oxidativer Stress kann NFκB aktivieren (Kabe, Ando et al. 2005). NFκB wiederum kann die MMP-9 Genexpression aktivieren, da diese Metalloproteinase eine NFκB-Bindungsstelle im Promoter besitzt (Vincenti and Brinckerhoff 2007; Yan and Boyd 2007).

Unter der Annahme, dass oxidativer Stress die ALS beeinflusst, kann so die in dieser Arbeit gezeigte Hochregulation der MMP-9 bei der ALS erklärt werden.

4.1.2.3 Induzierbarkeit durch weitere Stimuli

Ein weiterer Grund für die Konzentrationserhöhungen kann die leichte Induzierbarkeit und damit Aktivierung der Transkription der MMPs durch die unterschiedlichsten Stimuli sein.

Die MMPs werden durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, mechanische Bewegungen und Phagozytose induziert. Diese Stimuli aktivieren innerhalb weniger Stunden über Signaltransduktionswege die Transkription der MMPs. Potente Transkriptionsaktivatoren sind zum Beispiel die Zytokine IL-1β und TNF-α (Gottschall and Deb 1996; Vincenti and Brinckerhoff 2007; Yan and Boyd 2007). Es ist aus vielen Studien bekannt, dass es bei der ALS zu einer mikroglialen Aktivierung mit daraus resultierendem erhöhtem Level an IL1-β und TNF-α kommt (Babu, Kumar et al. 2008; Cereda, Baiocchi et al. 2008; Frank-Cannon, Alto et al. 2009; Hall, Oostveen et al. 1998; Hensley, Mhatre et al. 2006; Weydt, Yuen et al. 2004). IL1-β und TNF-α aktivieren die Gentranskription der MMPs und so könnten die hier gezeigten gesteigerten MMP-Konzentrationen erklärt werden. Nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit, jedoch in einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe, konnten ebenso erhöhte IL-1β Konzentrationen im Rückenmark und Haut der SOD1-Mäuse gefunden werden. Dies könnte eine Ursache für die Hochregulation des MMP-9 sein, wobei sich allerdings keine Korrelation zu MMP-2 oder MMP-9 zeigte (Fang, Teuchert et al. 2010).

4.2 Geringere Erhöhung der MMP-2 Konzentration

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ist aufgefallen, dass MMP-2 allgemein in geringerem Maße erhöht ist als MMP-9. So finden sich bei den humanen Proben weder im Liquor, noch im Serum oder in der Haut erhöhte MMP-2 Konzentrationswerte. Bei den Tierproben ist MMP-2 in manchen Altersklassen erhöht, jedoch nicht in so einem Ausmaß wie MMP-9.

4.2.1 Abnahme MMP-2 im Krankheitsverlauf

Die Abnahme der MMP-2 im Krankheitsverlauf könnte sich zum einem dadurch erklären lassen, dass, wie in dieser Arbeit gezeigt, die MMP-2 Konzentrationen mit steigender Dauer der Erkrankung abnehmen. Dies ist bei den Liquorproben der ALS-Patienten aufgefallen. Bei den MMP-9 Konzentrationen wurde hingegen keine Abnahme festgestellt. Ebenso zeigen die älteren Versuchstiere (120 Tage), die damit schon länger an der Erkrankung leiden, statistisch signifikant geringere MMP-2 Konzentrationen im Kleinhirn als die Wildtyp- oder die jüngeren SOD-Mäuse. Ebenso sind die MMP-2 Konzentrationen im Rückenmark bei den 120 Tage alten Tieren tendenziell erniedrigt.

Die MMP-2 ist im Gegensatz zur MMP-9 ein konstitutiv exprimiertes Enzym, dessen Transkription ständig auf einem gewissen Level angeschaltet ist (Clark, Swingler et al. 2008; Yan and Boyd 2007). Mit der Dauer einer Erkrankung und somit einer stärkeren Schädigung der Zellen könnte es dazu kommen, dass diese konstitutive Expression durch Funktionsverlust der Zellen nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Die Astrozyten als Hauptproduzent der MMP-2 (Lim, Backstrom et al. 1996) gehen im Laufe der ALS-Erkrankung zugrunde. Dies kann durch die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, die von den Astrozyten gebildet wird, belegt werden (Nicaise, Mitrecic et al. 2009; Zlokovic 2008). Durch den Verlust der Astrozyten sinken daher die MMP-2 Level. Die MMP-9 hingegen ist nicht konstitutiv exprimiert, sondern wird, stärker als MMP-2, durch zahlreiche Stimuli beeinflusst (Clark, Swingler et al. 2008; Yan and Boyd 2007). Diese Faktoren tragen dazu bei, dass die MMP-9 Produktion, auch bei Verlust der

Motoneuronen als Hauptproduzenten der MMP-9 (Lim, Backstrom et al. 1996), weiterhin hochgehalten werden kann. Inflammatorische Zytokine beispielsweise können dies bewirken, indem sie die MMP-9 Genexpression hochregulieren (Yan and Boyd 2007). Da bekannt ist, dass der ALS u. a. eine entzündliche Pathogenese zugrunde liegt, ist diese Tatsache, die zu einer stärkeren Hochregulation der MMP-9 im Vergleich zu MMP-2 führt, durchaus zu beachten (Babu, Kumar et al. 2008; Glass, Saijo et al. 2010; Papadimitriou, Le Verche et al. 2010).

4.2.2 Unterschiedliche Regulation von MMP-2 und MMP-9

Zum anderen kann die geringere Hochregulation der MMP-2 im Vergleich zu MMP-9 auf der unterschiedlichen Genregulation beruhen.

Die Genexpression der MMPs wird hauptsächlich über die Transkription reguliert. Die Mitglieder der MMP-Familie haben mehrere „cis“-Elemente im Promoter, die durch die Interaktion mit „trans“-Aktivatoren die Genregulation beeinflussen. Einige MMPs sind sich im Aufbau der Promoterregion sehr ähnlich oder teilen sich zum Teil „cis“-Elemente. Dies hat zur Folge, dass sie von verschiedenen Stimuli co-exprimiert aber auch co-inhibiert werden können. Andere, auch funktionell sehr eng verwandte MMPs, sind sehr unterschiedlich aufgebaut, so wie MMP-2 und MMP-9. Mehrere Elemente zur Induktion oder Repression sind aber in den Promoterregionen aller MMPs vertreten, wie ETS, Sp1 oder eine zusätzliche AP-1 Bindungsstelle. Wenn Transkriptionsfaktoren nicht an diese „cis“- Bindungsstelle binden können (z.B. aufgrund zu geringer Synthese, Suppressorproteinen an der Bindungsstelle oder inhibierte Phosphorylierung und damit fehlende Aktivierung der aktiven Form), wird die Transkription blockiert. Man kann die MMPs daher abhängig von den „cis“-Elementen in der Promoterregion, grob in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe, zu der die meisten MMPs (u.a. MMP-9) gehören, enthält u.a. eine TATA-Box und eine Bindungsstelle für das Aktivatorprotein-1 (AP-1) im proximalen Bereich des Promoters. Die zweite Gruppe besitzt eine TATA-Box, allerdings keine AP-1 Bindungsstelle und die letzte Gruppe (u.a. MMP-2) weder eine TATA-Box noch eine AP-1 Bindungsstelle. Demnach kann die

Transkription bei dieser letzten Gruppe an mehreren Stellen starten. Aufgrund dieses unterschiedlichen Aufbaus haben die MMPs ein unterschiedliches Antwortverhalten auf diverse Stimuli. Viele Zytokine und Wachstumsfaktoren regulieren die Transkription über Bindung von Transkriptionsfaktoren an das AP-1. AP-1 ist ein Heterodimer, das sich in der Promoterregion aller induzierbarer MMPs findet. Die erste Gruppe mit TATA-Box und AP-1-Region reagiert somit stark auf Signale, einschließlich auf Zytokine wie IL-1 und TNF- α . Ohne TATA-Box und AP-1 Bindungsstelle hingegen wird die Expression vornehmlich über Transkriptionsfaktoren der weit verbreiteten Sp-1-Familie reguliert, die an eine GC-Box im Promoter binden. Diese Gruppe wird eher konstitutiv exprimiert, mit nur geringer Beeinflussbarkeit durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren (Chakraborti, Mandal et al. 2003; Fingleton 2006; Mancini and Di Battista 2006; Vincenti and Brinckerhoff 2007; Yan and Boyd 2007). MMP-9 gehört zu der ersten Gruppe mit TATA-Box und AP-1 Bindungsstelle und deren Regulation wird daher stark von Signalmolekülen beeinflusst. MMP-2 hingegen wird der letzten Gruppe ohne TATA-Box und AP-1 Bindungsstelle zugeordnet, die eher konstitutiv exprimiert ist (Clark, Swingle et al. 2008). So lässt sich die Diskrepanz zwischen der geringeren Hochregulation der MMP-2 und der stärkeren Expression der MMP-9 erklären. Eine ähnlich starke Hochregulation der MMP-2 wie die der MMP-9 wäre aufgrund der unterschiedlichen Genregulation nicht zu erwarten.

4.3 Abhängigkeit der MMPs von weiteren Faktoren

Bei den humanen Proben zeigte sich, dass sich die MMP-Konzentrationen nicht von vielen anderen Größen beeinflussen lassen.

Im Liquor wurden keine Unterschiede der MMP-Konzentrationen bezüglich des Geschlechts, des klinischen Subtyps (bulbäre und spinale Verlaufsform), der Krankheitsschwere oder bezüglich einer vorhergehenden medikamentösen Behandlung festgestellt. Ebenso zeigte sich keine Korrelation der MMP-Level mit der Funktion der Blut-Liquor-Schranke.

Allerdings fiel in dieser Arbeit auf, dass die MMP-9 und MMP-2 Konzentrationen

im Liquor bei ALS Patienten mit höherem Alter stärker erhöht sind als bei jüngeren Patienten. Van Engelen et al. berichteten über eine Konzentrationssteigerung verschiedener Liquorproteine mit dem Alter (van Engelen, Lamers et al. 1992). Ursächlich hierfür kann zum einen die abnehmende Liquorproduktion im Alter sein, zum anderen dilatieren die Ventrikel mit dem Alter mehr und mehr. Diese beiden Faktoren führen zu einem reduzierten Liquorfluss und damit zu einer erhöhten Konzentrierung der einzelnen Proteine im Liquor (May, Kaye et al. 1990).

Desweiteren nehmen die MMP-2 Konzentrationen im Liquor mit steigender Gesamtdauer der ALS-Erkrankung ab. Diese Tatsache ist bei der MMP-9 nicht zu sehen. Dies könnte, wie unter 4.2.1 bereits beschrieben, damit erklärt werden, dass MMP-2 ein konstitutiv exprimiertes Enzym ist, dessen Produktion im Verlauf einer Erkrankung mit erhöhtem Stress der Zellen abnehmen kann. MMP-9 hingegen steht stärker unter dem Einfluss verschiedener Signalmoleküle (Yan and Boyd 2007), die die MMP-9 Bildung auch bei Verlust der produzierenden Motoneurone aufrechterhalten können.

Zudem wurden erhöhte MMP-9 (signifikant) und MMP-2 (tendenziell) Level im Liquor der Patientengruppe gefunden, die unter einer schnellen Progression der Erkrankung leidet. Diese Tatsache kann in Zusammenhang mit der stetigen Frage, ob die MMPs „gut“ oder „schlecht“ für den menschlichen Körper sind, diskutiert werden (Vincenti and Brinckerhoff 2007). Es ist durchaus bekannt, dass die MMPs eine gute Funktion auf den gesunden Körper haben. Sie sind im zentralen Nervensystem wichtig für die synaptische Plastizität, den Myelinumsatz oder für die Physiologie der Axone. Auf der anderen Seite zeigen mehrere Studien auch eine schädliche Wirkung der MMPs im Rahmen neurologischer Erkrankungen. Sie spielen bei Entzündungen und Immunantworten eine Rolle, indem sie verschiedene Zyto- und Chemokine spalten und damit aktivieren (Agrawal, Lau et al. 2008; Ethell and Ethell 2007). Dies trägt teils zur Wundheilung bei, kann aber auch im Rahmen einer Erkrankung vorkommen. Ebenso wurde festgestellt, dass die MMPs die Blut-Hirn-Schranke schädigen können und so ihren Beitrag zu pathologischen Prozessen leisten (McQuibban, Gong et al. 2002; Sellebjerg and Sorensen 2003). Yong et al. konnten zeigen, dass die MMPs Gewebeschäden induzieren können, indem sie die Apoptose von Neuronen vermitteln. Dies führt

dann zur neuronalen Degeneration (Yong, Power et al. 2001). Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Metalloproteinasen einen schädlichen Einfluss haben, geben weitere Studien, die gezeigt haben, dass die Inhibition der MMPs einen positiven Effekt hat. Die Inhibition wirkte sich in Tierstudien zur multiplen Sklerose, zerebralen Ischämie oder auch Parkinson günstig aus (Asahi, Asahi et al. 2000; Clements, Cossins et al. 1997; Lorenzl, Calingasan et al. 2004). Auch bei der ALS konnte ein positiver Einfluss beobachtet werden. Es wurde ein verlängertes Überleben der Versuchsmäuse festgestellt, die in frühen Stadien der Erkrankung mit dem synthetischen MMP-Inhibitor „Ro 26-2853“ behandelt wurden (Lorenzl, Narr et al. 2006). Ebenso wurde gezeigt, dass ein Mangel an MMP-9 das Überleben von SOD-Mäusen um 31% steigert und so Inhibitoren günstig sein könnten (Kiaei, Kipiani et al. 2007). Jedoch wurde in einer weiteren Studie beschrieben, dass die MMP-Inhibition eher eine schädigende Wirkung hat. Die Deletion des MMP-9-Gens in SOD-Mäusen führte dort zu einem signifikant reduziertem Überleben der Versuchstiere (Dewil, Schurmans et al. 2005). Im Einklang mit den Hinweisen auf eine schädigende Wirkung der MMPs sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Bei Patienten mit einer schnelleren Verlaufsform der Erkrankung und einer damit wohl schlechteren Prognose wurden signifikant erhöhte MMP-9 und auch tendenziell erhöhte MMP-2 Konzentrationen im Liquor gemessen. Es ist bekannt, dass es bei der Degeneration der Motoneurone bei der ALS zu einer verringerten Kollagen- und EZM-Proteinmenge kommt (Ono, Imai et al. 1998). Da diese die Hauptsubstrate der MMPs sind, lässt sich schlussfolgern, dass die Hochregulation der MMPs und damit hohe MMP-Konzentrationen ursächlich für diese starke neuro-axonale Degeneration sind. Somit können hohe Konzentrationen auf eine schnellere Progression mit schlechterer Prognose hindeuten, was mit dieser Arbeit bestätigt wurde.

4.4 Signifikante Veränderungen der MMPs im Kleinhirn

Aufgrund der Tatsache, dass die ALS vor allem die Neurone des motorischen Kortex und des Rückenmarks betrifft (Cleveland 1999), wurden in dieser Arbeit die Untersuchungen am Kleinhirn der SOD-Mäuse zunächst als Kontrollgruppe angesehen. Wider Erwarten zeigten sich jedoch auch hier signifikant erhöhte MMP-Konzentrationen. Die MMP-2 Werte waren bei den 60 Tage alten Tieren signifikant erhöht, die MMP-9 bei den 90 Tage alten Versuchstieren.

Dies kann dadurch erklärt werden, dass die ALS als Multisystemerkrankung angesehen wird und daher viele Organsysteme betroffen sein können. So sind pathologische Prozesse neben den Motoneuronen oft auch im nigro-striatalen System, im Neokortex oder eben im Kleinhirn festzustellen (Geser, Brandmeir et al. 2008; Terao, Sobue et al. 1991; van der Graaff, de Jong et al. 2009).

4.5 Hochregulation der MMPs in der Haut

In Hautproben der ALS-Erkrankten fanden sich signifikant erhöhte Konzentrationswerte der MMP-9. Bei der MMP-2 hingegen ließ sich kein Unterschied feststellen. Auch im Tiermodell zeigte sich MMP-9 in der Haut der 90 und 120 Tage alten Tiere signifikant erhöht, bei den 60 Tage alten Tieren fand sich eine Tendenz zu höheren MMP-9 Konzentrationen. Bei den ältesten Tieren (120 d) wurden auch signifikant erhöhte MMP-2 Konzentrationen gemessen.

Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese einer gesteigerten kollagenolytischen Aktivität bei der ALS aufgrund einer Erhöhung der Matrixmetalloproteinasen, die schon vor einigen Jahren von Beach et al. postuliert wurde (Beach, Rao et al. 1986). Das Hauptsubstrat der hier untersuchten Kollagenasen MMP-2 und MMP-9 ist das Kollagen Typ IV. Dieses Kollagen befindet sich vor allem in der Basalmembran der Epidermis. Es ist aus vielen Studien bekannt, dass ALS-Patienten oder SOD-Tiere eine veränderte Hautstruktur im Sinne eines gestörten Kollagenmetabolismus aufzeigen. Ono et al. stellten fest, dass die optische Dichte des Kollagen Typ IV, mittels Immunoreaktivität gemessen, bei den ALS Patienten

erniedrigt ist (Ono, Toyokura et al. 1986). Ebenso zeigen ALS-Erkrankte eine signifikant geringere Kollagen Typ IV Konzentration in Haut, Serum und Urin, was beides für einen erhöhten Kollagenabbau spricht (Ono 2000; Ono, Imai et al. 1999; Ono, Imai et al. 1998). Der Hinweis auf einen vermehrten Kollagenabbau ist daher schon im Rahmen früherer Studien aufgekommen und wird mit dieser vorliegenden Arbeit erneut bestätigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bei ALS-Erkrankten zu einer Hochregulation der MMP-2 und MMP-9 kommt, die ursächlich für eine Veränderung des Kollagenstoffwechsels, im Sinne eines vermehrten Abbaus sein könnte.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

4.6.1 Gemeinsame Betrachtung der Prozesse in ZNS und Haut

In dieser Arbeit wurde eine signifikant positive Korrelation der MMP-9 Konzentrationswerte im Rückenmark der Versuchstiere zu den Konzentrationen in der Haut festgestellt. Wie unter Punkt 4.1 und 4.3 beschrieben, ist eine MMP-9 Hochregulation sowohl im Rückenmark als auch im gleichen Maße in der Haut aufgefallen. Nach unserem Wissen ist damit bei der ALS erstmals eine Verbindung zwischen Prozessen in Haut und ZNS geschaffen worden. MMP-9 scheint durch die konkordante Hochregulation diese beiden für die ALS-Pathologie sehr wichtigen Systeme zu verknüpfen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass MMP-9 bei der ALS sowohl bei der Neurodegeneration als auch bei den Hautveränderungen eine Rolle spielt. Aus dem Grund können die Prozesse in ZNS und Haut durchaus gemeinsam betrachtet werden und damit besteht die Möglichkeit, weitere bisher unbekannte Prozesse zu erforschen. Nicht in dieser Arbeit behandelte Pathologieaspekte könnten von dem einen System in das andere übertragen und damit neue Erkenntnisse gewonnen werden, um die Pathologie der Erkrankung weiter aufdecken zu können.

4.6.2 Haut als mögliche Biomarkerquelle

Aufgrund der unter Punkt 4.5 beschriebenen gemeinsamen Betrachtung von Pathologien in ZNS und Haut liegt der Gedanken nahe, die Haut als Biomarkerquelle nutzen zu können. Damit könnten die pathophysiologischen Prozesse in der Haut auf das ZNS übertragen werden. Die Haut ist als größtes Organ des Menschen das am leichtesten zugängliche Gewebe, aus dem ohne viel Aufwand und Belastung für den Patienten Proben gewonnen werden können. Durch die große Fläche und Regenerationsfähigkeit der Haut sind häufige Biopsien möglich. Daher können im Krankheitsverlauf über einen längeren Zeitraum hinweg mehrere Biopsien entnommen werden, anhand deren Analyse die Progression der Erkrankung dokumentiert werden könnte. Durch die Untersuchung der Biopsate auf verschiedenste Biomarker, wie zum Beispiel MMP-9, könnte der Krankheitsverlauf beobachtet werden, und folglich auch die Erforschung von neuroprotektiven Medikamenten und weiteren Therapieverfahren gefördert werden. Dies ist bei der ALS, als eine Erkrankung mit infauster Prognose, schlechten Behandlungsmöglichkeiten und in den meisten Fällen unbekannter Pathologie, besonders wichtig (Ludolph 2006).

4.6.3 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde erstmals eine Hochregulation der MMPs sowohl im ZNS als auch in der Haut festgestellt. Damit könnte eine gemeinsame Pathologie in den verschiedenen bei der ALS betroffenen Organsystemen aufgedeckt werden, die eventuell die Erforschung von neuen Therapiestrategien erleichtern könnte.

Um diese Gedanken weiter auszubauen, sind jedoch weitere Studien notwendig. All diese Messungen sollten in verschiedenen Organsystemen vorgenommen werden, um eine eventuelle Einheitlichkeit der Pathologie aufzudecken. Sie sollten besonders die Haut und das Nervengewebe erneut parallel untersuchen und weitere Biomarker austesten.

Weitere Faktoren, die zu der in dieser Arbeit gezeigten Hochregulation der MMPs beitragen könnten, sollten getestet werden. So sind sicherlich Untersuchungen an

den spezifischen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 der MMPs sinnvoll. Ebenso sollten weitere Marker des oxidativen Stresses, wie etwa NF κ B oder sein Inhibitor I κ B α , analysiert werden. Es stellt sich zudem die Frage, ob Marker der neuro-axonalen Schädigung (tau, Neurofilament-Schwerketten), die sich bei der ALS erhöht zeigen, eine Korrelation zu den MMPs oder den Markern oxidativen Stresses zeigen.

All diese Ergebnisse, zusammen mit den hier dargestellten Veränderungen der MMPs als Bindeglied zwischen Neurodegeneration und Hautschäden, könnten ein neuer Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen sein. Neue Medikamente mit einem tolerierbaren Nebenwirkungsprofil auf die MMP-Expression, sollten getestet und deren Auswirkungen auf den Organismus und die Erkrankung mithilfe der Beobachtung der MMP-Veränderungen kontrolliert werden. So könnten neue therapeutische Möglichkeiten ausgetestet werden (Ludolph 2006).

Desweiteren sollte bei nächsten Untersuchungen eine größere Kohorte an ALS-Patienten, gesunden Kontrollen und auch Versuchstieren gewählt werden. So kann die Sensitivität und Spezifität der Analysen erhöht und eine höhere Aussagekraft erreicht werden.

Zuletzt ist es sicherlich sinnvoll, sämtliche Untersuchungen zusätzlich an dem TDP-43 Mausmodell für die ALS vorzunehmen, und so schon durchgeführte Studien weiter zu ergänzen (Suzuki, Mikami et al. 2010). Dieses Modell beruht auf einer Mutation im TDP-43 Gen und gilt als weiteres Tiermodell der ALS, das auch die sporadische Form der Erkrankung besser darstellen soll (Ishihara, Yokoseki et al. 2009; Wils, Kleinberger et al. 2010; Zhou, Huang et al. 2010). Im Vergleich mit den Ergebnissen aus dem hier untersuchten SOD-Modell könnte geklärt werden, ob die Hochregulationen der MMPs und ihre Veränderungen in den unterschiedlichen Geweben nur auf die SOD-Mutation zurückzuführen sind.

5 Zusammenfassung

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine Motoneuronerkrankung, die zu einer Degeneration der Motoneurone im Kortex und Rückenmark führt. Die ALS betrifft allerdings auch weitere Organsysteme, wie etwa die Haut. Dort gibt es Hinweise auf einen vermehrten Kollagenabbau mit veränderter Kollagenstruktur. Die Ätiologie dieser rasch progressiven Multisystemerkrankung ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, weitere noch unbekannte Pathologieaspekte der ALS aufzuklären. Es soll untersucht werden, ob es eine Verbindung zwischen den ZNS- und Hautveränderungen gibt und inwieweit die Matrixmetalloproteinasen (MMP) hier eine Rolle spielen. MMPs sind eine Gruppe von Endopeptidasen, deren Hauptaufgabe die Homöostase der Extrazellulärmatrix ist und deren Hauptsubstrat das Kollagen Typ IV in der Haut ist.

Ziel ist es, gemeinsame Pathologieaspekte in Haut und ZNS aufzudecken, die dazu führen können, dass die MMPs in der Haut als Biomarker für diese verheerende Erkrankung gelten können.

Mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wurden die MMP-2 und MMP-9 Konzentrationen in Serum-, Liquor- und Hautproben von ALS-Patienten und Kontrollen, sowie in Rückenmarks-, Kleinhirn- und Hautproben bei Versuchstieren des SOD^{G93A} Modells für die ALS bestimmt.

Es zeigte sich eine generelle Hochregulation des MMP-9, sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell. Beim ALS-Patienten war MMP-9 im Liquor und in der Haut erhöht, MMP-2 zeigte keine Unterschiede. Patienten mit einer rasch progressiven Verlaufsform wiesen höhere MMP-9 Konzentrationen im Liquor auf als solche mit der langsamen Form. Im Tiermodell ist MMP-9 bei den älteren Tieren in allen drei Gewebearten signifikant erhöht. Zudem konnte hier eine signifikante positive Korrelation zwischen MMP-9 in der Haut und im Rückenmark festgestellt werden.

Die Gründe für die Hochregulation der MMPs sind noch nicht vollständig geklärt und sie kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden. Das gesteigerte Substrat, oxidativer Stress oder auch die Induzierbarkeit durch weitere Stimuli im

Rahmen der ALS-Erkrankung können dazu beitragen. Die Ursache für die geringere Hochregulation des MMP-2 ist mit der unterschiedlichen Regulation dieser beiden nah verwandten Enzyme zu erklären. MMP-2 ist konstitutiv exprimiert, wohingegen die MMP-9 Genexpression von zahlreichen Stimuli hochreguliert werden kann. Einen möglicherweise schädigenden Einfluss der MMPs zeigen die höheren MMP-9 Konzentrationen bei der schnell fortschreitenden Verlaufsform. Die MMP-Veränderungen im Kleinhirn belegen die Annahme einer Multisystemerkrankung. Die positive Korrelation der Ergebnisse im Rückenmark und Haut der Versuchstiere deutet darauf hin, dass die Prozesse in ZNS und Haut durchaus verglichen und gemeinsam betrachtet werden können. Die Haut als größtes Organ des menschlichen Körpers und leicht zugängliches Gewebe ist als Biomarkerquelle gut denkbar. Anhand der MMP-Konzentrationen in der Haut könnten neue Medikamente, Therapien oder Verlaufsformen überprüft und kontrolliert werden. Es ist bei dieser verheerenden Erkrankung von großer Wichtigkeit, die Pathologie weiter aufzudecken und eventuelle Therapiemöglichkeiten zu erforschen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abe, K., Pan, L. H., Watanabe, M., Kato, T., Itoyama, Y. (1995). "Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis." *Neurosci Lett* 199: 152-154.
2. Agrawal, S. M., Lau, L., Yong, V. W. (2008). "MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad." *Semin Cell Dev Biol* 19: 42-51.
3. Arasaki, K., Tamaki, M. (1998). "A loss of functional spinal alpha motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology* 51: 603-605.
4. Asahi, M., Asahi, K., Jung, J. C., del Zoppo, G. J., Fini, M. E., Lo, E. H. (2000). "Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94." *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1681-1689.
5. Babu, G. N., Kumar, A., Chandra, R., Puri, S. K., Kalita, J., Misra, U. K. (2008). "Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India." *Neurochem Res* 33: 1145-1149.
6. Barber, S. C., Shaw, P. J. (2010). "Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target." *Free Radic Biol Med* 48: 629-641.
7. Beach, R. L., Rao, J. S., Festoff, B. W., Reyes, E. T., Yanagihara, R., Gajdusek, D. C. (1986). "Collagenase activity in skin fibroblasts of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol Sci* 72: 49-60.
8. Beal, M. F., Ferrante, R. J., Browne, S. E., Matthews, R. T., Kowall, N. W., Brown, R. H., Jr. (1997). "Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 42: 644-654.
9. Beckman, J. S., Carson, M., Smith, C. D., Koppenol, W. H. (1993). "ALS, SOD and peroxynitrite." *Nature* 364: 584.

10. Bendotti, C., Atzori, C., Piva, R., Tortarolo, M., Strong, M. J., DeBiasi, S., Migheli, A. (2004). "Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice." *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 113-119.
11. Beuche, W., Yushchenko, M., Mader, M., Maliszewska, M., Felgenhauer, K., Weber, F. (2000). "Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Neuroreport* 11: 3419-3422.
12. Brooks, B. R. (1994). "El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors." *J Neurol Sci* 124 Suppl: 96-107.
13. Cereda, C., Baiocchi, C., Bongioanni, P., Cova, E., Guareschi, S., Metelli, M. R., Rossi, B., Sbalsi, I., Cuccia, M. C., Ceroni, M. (2008). "TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients." *J Neuroimmunol* 194: 123-131.
14. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., Chakraborti, T. (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." *Mol Cell Biochem* 253: 269-285.
15. Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D. W., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Wong, P. C., Lin, C. L. (2008). "Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS." *PLoS One* 3: 2849.
16. Charcot, J. M. (1869). "Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antero-latéraux de la moelle épinière." *Arch Physiol Neurol Pathol* 2: 744-754.
17. Chung, Y. H., Joo, K. M., Lee, Y. J., Kim, M. J., Cha, C. I. (2003). "Immunohistochemical study on the aggregation of ubiquitin in the central

- nervous system of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation." *Neurol Res* 25: 395-400.
18. Clark, I. M., Swingler, T. E., Sampieri, C. L., Edwards, D. R. (2008). "The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors." *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1362-1378.
19. Clements, J. M., Cossins, J. A., Wells, G. M., Corkill, D. J., Helfrich, K., Wood, L. M., Pigott, R., Stabler, G., Ward, G. A., Gearing, A. J., Miller, K. M. (1997). "Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-alpha inhibitor." *J Neuroimmunol* 74: 85-94.
20. Cleveland, D. W. (1999). "From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS." *Neuron* 24: 515-520.
21. Cuzner, M. L., Gveric, D., Strand, C., Loughlin, A. J., Paemen, L., Opdenakker, G., Newcombe, J. (1996). "The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution." *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1194-1204.
22. Demestre, M., Parkin-Smith, G., Petzold, A., Pullen, A. H. (2005). "The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *J Neuroimmunol* 159: 146-154.
23. Dewil, M., Schurmans, C., Starckx, S., Opdenakker, G., Van Den Bosch, L., Robberecht, W. (2005). "Role of matrix metalloproteinase-9 in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis." *Neuroreport* 16: 321-324.
24. Dornblüth, O. (1894). "Photometrie." In: Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin, 1417.
25. Dornblüth, O. (1894). "Nephelometrie." In: Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter, Berlin, 1247.

26. Ethell, I. M., Ethell, D. W. (2007). "Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets." *J Neurosci Res* 85: 2813-2823.
27. Fang, L., Teuchert, M., Huber-Abel, F., Schattauer, D., Hendrich, C., Dorst, J., Zettlmeissel, H., Wlaschek, M., Scharffetter-Kochanek, K., Kapfer, T., Tumani, H., Ludolph, A. C., Brettschneider, J. (2010). "MMP-2 and MMP-9 are elevated in spinal cord and skin in a mouse model of ALS." *J Neurol Sci* 294: 51-56.
28. Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H., Jr., Beal, M. F. (1997). "Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurochem* 69: 2064-2074.
29. Fingleton, B. (2006). "Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis." *Front Biosci* 11: 479-491.
30. Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E., Tansey, M. G. (2009). "Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?" *Mol Neurodegener* 4: 47.
31. Furukawa, T., Toyokura, Y. (1976). "Letter: Amyotrophic lateral sclerosis and bedsores." *Lancet* 1: 862.
32. Gadomski, R., Chrapusta, S. J., Wojda, R., Grieb, P. (2006). "Morphological changes and selective loss of motoneurons in the lumbar part of the spinal cord in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS)." *Folia Neuropathol* 44: 154-161.
33. Genova, M. L., Pich, M. M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A. I., Formiggini, G., Castelli, G. P., Lenaz, G. (2004). "The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology." *Ann N Y Acad Sci* 1011: 86-100.
34. Geser, F., Brandmeir, N. J., Kwong, L. K., Martinez-Lage, M., Elman, L.,

- McCluskey, L., Xie, S. X., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. (2008). "Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis." *Arch Neurol* 65: 636-641.
35. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F. H. (2010). "Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration." *Cell* 140: 918-934.
36. Gottschall, P. E., Deb, S. (1996). "Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons." *Neuroimmunomodulation* 3: 69-75.
37. Gruzman, A., Wood, W. L., Alpert, E., Prasad, M. D., Miller, R. G., Rothstein, J. D., Bowser, R., Hamilton, R., Wood, T. D., Cleveland, D. W., Lingappa, V. R., Liu, J. (2007). "Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12524-12529.
38. Hall, E. D., Oostveen, J. A., Gurney, M. E. (1998). "Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS." *Glia* 23: 249-256.
39. Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" *J Neurochem* 97: 1634-1658.
40. Hensley, K., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, M., Williamson, K. S. (2006). "On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Antioxid Redox Signal* 8: 2075-2087.
41. Ishihara, T., Yokoseki, A., Nishizawa, M., Takahashi, H., Onodera, O. (2009). "[The implications of TDP-43 mutations in pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis]." *Brain Nerve* 61: 1301-1307.
42. Jung, C., Higgins, C. M., Xu, Z. (2002). "Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral

- sclerosis." *J Neurochem* 83: 535-545.
43. Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., Handa, H. (2005). "Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus." *Antioxid Redox Signal* 7: 395-403.
44. Kiaei, M., Kipiani, K., Calingasan, N. Y., Wille, E., Chen, J., Heissig, B., Rafii, S., Lorenzl, S., Beal, M. F. (2007). "Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Exp Neurol* 205: 74-81.
45. Kim, N. H., Jeong, M. S., Choi, S. Y., Hoon Kang, J. (2004). "Oxidative modification of neurofilament-L by the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system." *Biochimie* 86: 553-559.
46. Kolde, G., Bachus, R., Ludolph, A. C. (1996). "Skin involvement in amyotrophic lateral sclerosis." *Lancet* 347: 1226-1227.
47. Lim, G. P., Backstrom, J. R., Cullen, M. J., Miller, C. A., Atkinson, R. D., Tokes, Z. A. (1996). "Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients." *J Neurochem* 67: 251-259.
48. Lorenzl, S., Albers, D. S., LeWitt, P. A., Chirichigno, J. W., Hilgenberg, S. L., Cudkowicz, M. E., Beal, M. F. (2003). "Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases." *J Neurol Sci* 207: 71-76.
49. Lorenzl, S., Albers, D. S., Narr, S., Chirichigno, J., Beal, M. F. (2002). "Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease." *Exp Neurol* 178: 13-20.
50. Lorenzl, S., Calingasan, N., Yang, L., Albers, D. S., Shugama, S., Gregorio, J., Krell, H. W., Chirichigno, J., Joh, T., Beal, M. F. (2004). "Matrix metalloproteinase-9 is elevated in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

- tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice." *Neuromolecular Med* 5: 119-132.
51. Lorenzl, S., Narr, S., Angele, B., Krell, H. W., Gregorio, J., Kiaei, M., Pfister, H. W., Beal, M. F. (2006). "The matrix metalloproteinases inhibitor Ro 28-2653 [correction of Ro 26-2853] extends survival in transgenic ALS mice." *Exp Neurol* 200: 166-171.
52. Ludolph, A. C. (2006). "Matrix metalloproteinases--a conceptional alternative for disease-modifying strategies in ALS/MND?" *Exp Neurol* 201: 277-280.
53. Mancini, A., Di Battista, J. A. (2006). "Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease." *Front Biosci* 11: 423-446.
54. Martin, L. J., Liu, Z., Chen, K., Price, A. C., Pan, Y., Swaby, J. A., Golden, W. C. (2007). "Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death." *J Comp Neurol* 500: 20-46.
55. May, C., Kaye, J. A., Atack, J. R., Schapiro, M. B., Friedland, R. P., Rapoport, S. I. (1990). "Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging." *Neurology* 40: 500-503.
56. McQuibban, G. A., Gong, J. H., Wong, J. P., Wallace, J. L., Clark-Lewis, I., Overall, C. M. (2002). "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo." *Blood* 100: 1160-1167.
57. Menzies, F. M., Cookson, M. R., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., Dong, L., Figlewicz, D. A., Shaw, P. J. (2002). "Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis." *Brain* 125: 1522-1533.
58. Mohajeri, M. H., Figlewicz, D. A., Bohn, M. C. (1998). "Selective loss of alpha motoneurons innervating the medial gastrocnemius muscle in a mouse

- model of amyotrophic lateral sclerosis." *Exp Neurol* 150: 329-336.
59. Nelson, K. K., Melendez, J. A. (2004). "Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases." *Free Radic Biol Med* 37: 768-784.
60. Nicaise, C., Mitrecic, D., Demetter, P., De Decker, R., Authelet, M., Boom, A., Pochet, R. (2009). "Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat." *Brain Res* 1301: 152-162.
61. Niebroj-Dobosz, I., Janik, P., Sokolowska, B., Kwiecinski, H. (2010). "Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Eur J Neurol* 17: 226-231.
62. Ogier, C., Bernard, A., Chollet, A. M., T. L. E. D., Hanessian, S., Charton, G., Khrestchatisky, M., Rivera, S. (2006). "Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) regulates astrocyte motility in connection with the actin cytoskeleton and integrins." *Glia* 54: 272-284.
63. Ono, S. (2000). "The skin in amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1: 191-199.
64. Ono, S., Imai, T., Matsubara, S., Takahashi, K., Jinnai, K., Yamano, T., Shimizu, N. (1999). "Decreased urinary concentrations of type IV collagen in amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Neurol Scand* 100: 111-116.
65. Ono, S., Imai, T., Munakata, S., Takahashi, K., Kanda, F., Hashimoto, K., Yamano, T., Shimizu, N., Nagao, K., Yamauchi, M. (1998). "Collagen abnormalities in the spinal cord from patients with amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol Sci* 160: 140-147.
66. Ono, S., Imai, T., Takahashi, K., Jinnai, K., Yamano, T., Nagao, K., Shimizu, N., Yamauchi, M. (1998). "Decreased type IV collagen of skin and serum in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology* 51: 114-120.
67. Ono, S., Mannen, T., Toyokura, Y. (1989). "Differential diagnosis between

- amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy by skin involvement." *J Neurol Sci* 91: 301-310.
68. Ono, S., Mechanic, G. L., Yamauchi, M. (1990). "Amyotrophic lateral sclerosis: unusually low content of collagen in skin." *J Neurol Sci* 100: 234-237.
69. Ono, S., Toyokura, Y., Mannen, T., Ishibashi, Y. (1988). "Delayed return phenomenon" in amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Neurol Scand* 77: 102-107.
70. Ono, S., Toyokura, Y., Mannen, T., Ishibashi, Y. (1986). "Amyotrophic lateral sclerosis: histologic, histochemical, and ultrastructural abnormalities of skin." *Neurology* 36: 948-956.
71. Ono, S., Yamauchi, M. (1992). "Collagen cross-linking of skin in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 31: 305-310.
72. Ono, S., Yamauchi, M. (1992). "Amyotrophic lateral sclerosis: increased solubility of skin collagen." *Neurology* 42: 1535-1539.
73. Papadimitriou, D., Le Verche, V., Jacquier, A., Ikiz, B., Przedborski, S., Re, D. B. (2010). "Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil." *Neurobiol Dis* 37: 493-502.
74. Pereira, S. G., Oakley, F. (2008). "Nuclear factor-kappaB1: regulation and function." *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1425-1430.
75. Rajagopalan, S., Meng, X. P., Ramasamy, S., Harrison, D. G., Galis, Z. S. (1996). "Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability." *J Clin Invest* 98: 2572-2579.
76. Ranganathan, A. C., Nelson, K. K., Rodriguez, A. M., Kim, K. H., Tower, G. B., Rutter, J. L., Brinckerhoff, C. E., Huang, T. T., Epstein, C. J., Jeffrey, J. J., Melendez, J. A. (2001). "Manganese superoxide dismutase signals matrix

- metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation." *J Biol Chem* 276: 14264-14270.
77. Rao, S. D., Yin, H. Z., Weiss, J. H. (2003). "Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons." *J Neurosci* 23: 2627-2633.
78. Renaud, S., Leppert, D. (2007). "Matrix metalloproteinases in neuromuscular disease." *Muscle Nerve* 36: 1-13.
79. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., et al. (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." *Nature* 362: 59-62.
80. Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C. F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D. E., Volterra, A. (2008). "Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis." *Cell Death Differ* 15: 1691-1700.
81. Rothstein, J. D. (2009). "Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 65 Suppl 1: 3-9.
82. Schoser, B. G., Blottner, D. (1999). "Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle." *Neuroreport* 10: 2795-2797.
83. Sellebjerg, F., Sorensen, T. L. (2003). "Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system." *Brain Res Bull* 61: 347-355.
84. Shi, P., Gal, J., Kwinter, D. M., Liu, X., Zhu, H. (2010). "Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis." *Biochim Biophys Acta* 1802: 45-51.
85. Shi, P., Wei, Y., Zhang, J., Gal, J., Zhu, H. (2010). "Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis." *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: 311-324.

86. Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., Kobayashi, M. (2001). "Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients." *Brain Res* 917: 97-104.
87. Shukla, R., Rajani, M., Barthwal, M. K., Srivastava, N., Dikshit, M. (2003). "Cerebrospinal fluid nitrite and malondialdehyde levels in patients with motor neuron disease." *Int J Neurosci* 113: 1043-1054.
88. Siddique, N., Siddique, T. (2008). "Genetics of amyotrophic lateral sclerosis." *Phys Med Rehabil Clin N Am* 19: 429-439.
89. Sigma-Aldrich, from <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/matrix-metalloproteinases.html>
12.02.2011
90. Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R. G., Joo, F., Appel, S. H. (1996). "Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 39: 203-216.
91. Soon, C. P., Crouch, P. J., Turner, B. J., McLean, C. A., Laughton, K. M., Atkin, J. D., Masters, C. L., White, A. R., Li, Q. X. (2010). "Serum matrix metalloproteinase-9 activity is dysregulated with disease progression in the mutant SOD1 transgenic mice." *Neuromuscul Disord* 20: 260-266.
92. Strong, M., Rosenfeld, J. (2003). "Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4: 136-143.
93. Suzuki, M., Mikami, H., Watanabe, T., Yamano, T., Yamazaki, T., Nomura, M., Yasui, K., Ishikawa, H., Ono, S. (2010). "Increased expression of TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Neurol Scand* 122: 367-372.
94. Terao, S., Sobue, G., Mukai, E., Murakami, N., Hashizume, Y. (1991). "[A

- clinicopathological study of familial amyotrophic lateral sclerosis with special reference to the mode of motoneuron loss in the spinal ventral horn]." *Rinsho Shinkeigaku* 31: 960-969.
95. Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E., Isobe, C. (1999). "Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 46: 129-131.
96. Tortarolo, M., Veglianesi, P., Calvaresi, N., Botturi, A., Rossi, C., Giorgini, A., Migheli, A., Bendotti, C. (2003). "Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression." *Mol Cell Neurosci* 23: 180-192.
97. van der Graaff, M. M., de Jong, J. M., Baas, F., de Visser, M. (2009). "Upper motor neuron and extra-motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a clinical and brain imaging review." *Neuromuscul Disord* 19: 53-58.
98. van Engelen, B. G., Lamers, K. J., Gabreels, F. J., Wevers, R. A., van Geel, W. J., Borm, G. F. (1992). "Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid." *Clin Chem* 38: 813-816.
99. Vincenti, M. P., Brinckerhoff, C. E. (2007). "Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you?" *J Cell Physiol* 213: 355-364.
100. Watanabe, S., Yamada, K., Ono, S., Ishibashi, Y. (1987). "Skin changes in patients with amyotrophic lateral sclerosis: light and electron microscopic observations." *J Am Acad Dermatol* 17: 1006-1012.
101. Weydt, P., Yuen, E. C., Ransom, B. R., Moller, T. (2004). "Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice." *Glia* 48: 179-182.
102. Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., Smits,

- V., Ceuterick-de Groote, C., Van Broeckhoven, C., Kumar-Singh, S. (2010). "TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3858-3863.
103. Winter, S., Ludolph, A.C. (2004). "Motoneuronerkrankungen " In: Winkler, J. Ludolph, A.C., Neurodegenerative Erkrankungen des Alters, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 213-222.
104. Wu, D. C., Re, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., Przedborski, S. (2006). "The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12132-12137.
105. Yan, C., Boyd, D. D. (2007). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." *J Cell Physiol* 211: 19-26.
106. Yong, V. W., Power, C., Forsyth, P., Edwards, D. R. (2001). "Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system." *Nat Rev Neurosci* 2: 502-511.
107. Zhou, H., Huang, C., Chen, H., Wang, D., Landel, C. P., Xia, P. Y., Bowser, R., Liu, Y. J., Xia, X. G. (2010). "transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene." *PLoS Genet* 6: 1000887.
108. Zlokovic, B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." *Neuron* 57: 178-201.

Anhang

Tabelle 7: Demographische Daten der Patienten und Kontrollen. MRCS = Medical Research Council sumscore, ALSFRS = Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale, n = Anzahl, w = weiblich, m = männlich, ALS = amyotrophe Lateralsklerose.

Liquor, Serum					
	n (w/m)	Alter [Jahren]	Dauer der Erkrankung [Monate]	MRCS	ALSFRS
		Median (Wertebereich)			
ALS Patienten	54 (26/28)	66.5 (45-83)	12 (3-66)	54 (28-60)	34.5 (19-38)
schnelle Progression	20 (10/10)	66 (46-83)	12 (3-48)	54 (28-60)	35 (28-38)
langsame Progression	19 (8/11)	62 (45-77)	9.5 (5-48)	50 (41-59)	36 (29-37)
Kontrollen	36 (21/15)	62 (40-86)			
Haut					
	n (w/m)	Alter [Jahren]	Dauer der Erkrankung [Monate]	MRCS	ALSFRS
		Median (Wertebereich)			
ALS Patienten	12 (6/6)	67 (45-77)	18 (5-24)	50 (28-60)	37 (28-38)
Kontrollen	10 (3/7)	64 (58-71)			

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Albert C. Ludolph möchte ich mich nicht nur für die Bereitstellung des Themas, sondern vor allem für die gute und intensive Betreuung bedanken! Sie haben mich jederzeit unterstützt und gefördert und hatten immer Zeit für meine Fragen, wofür ich Ihnen sehr dankbar bin.

Frau Prof. Gabriele E. Lang aus der Augenheilkunde möchte ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn PD Dr. Johannes Brettschneider und Herrn Prof. Dr. Hayrettin Tumani möchte ich ebenso für die tatkräftige Unterstützung danken. Ihr habt mir bei der Entstehung dieser Arbeit sehr geholfen, sei es durch die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit im Labor, die Vorbereitung auf Kongresse oder letztlich die Korrekturarbeiten, vielen Dank!

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Lubin Fang und Frau Dagmar Schattauer! Ohne euch wäre diese Arbeit nicht entstanden! Die Einführung in die Laborarbeit, Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse, anregende Diskussionen oder auch einfach das tolle Arbeitsklima und die vielen netten Gespräche und aufmunternden Worte, all das hat mir sehr geholfen!

Auch bei Marco Teuchert möchte ich mich herzlich bedanken! Angefangen von deiner Unterstützung in diesem Projekt bis hin zur Korrektur der Arbeit, vielen Dank!

Ebenso möchte ich mich beim gesamten Team des Liquorlabors der Neurologie bedanken! Es war eine sehr schöne Zeit bei euch, und ich möchte mich bei jedem einzelnen von euch für die Unterstützung und vor allem auch den Spaß, den wir zusammen hatten, bedanken! Ich habe mich immer sehr wohl gefühlt bei euch!

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der neurologischen Klinik bedanken, die durch Rekrutierung der Patienten oder Sammeln der Proben zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, sowie bei allen Patienten, die ihre Proben der Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Ein sehr großer Dank geht an meine Eltern, und auch an meine Geschwister und Großeltern! Ihr habt mir das Medizinstudium und letztlich auch diese Arbeit ermöglicht! Meinen herzlichsten Dank für die vielen aufbauenden Worte, die tatkräftige Hilfe und Unterstützung, und vor allem dafür, dass ich mich immer auf euch verlassen kann!

Mein „liebster“ Dank geht an meinen Freund Franz! Du warst immer für mich da und hast mich sehr unterstützt und motiviert. Dafür möchte ich dir von Herzen danken!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.