

Universitätsklinikum Ulm
Abteilung: Klinik für Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Ludolph

Altersabhängige Untersuchung der
inflammatorischen Antwort von primären
Mikrogliazellen des SOD1-Mausmodells der
amyotrophen Lateralsklerose

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

von Heike Tritschler
– geboren in Rheinfelden (Baden) –

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Anke Witting

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Jahrsdörfer

Tag der Promotion: 23.04.2015

Für meine Eltern, die ich über alles liebe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Amyotrophe Lateralsklerose	1
1.1.1 Klinik	1
1.1.2 Ätiologie und Genetik	3
1.1.3 SOD1-Mausmodell der ALS	4
1.1.4 Molekulare Mechanismen und Pathophysiologie	6
1.2 Glia-Zellen	8
1.2.1 Astrozyten	8
1.2.2 Rolle der Astrozyten in der amyotrophen Lateralsklerose	11
1.2.3 Mikroglia	12
1.2.4 Rolle der Mikroglia in der amyotrophen Lateralsklerose	16
1.3 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 L929 Zelllinie aus Mausfibroblasten	31
2.2.3 Stimulation	32
2.2.4 Interleukin 6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
2.2.5 Protein Assay	37
2.2.6 Färbungen von Zellen	38
2.2.7 Färbungen von Schnitten	40
2.2.8 Mikroskopieren der Gewebeschnitte	42
2.2.9 Statistische Auswertung	42

3	Ergebnisse	44
3.1	Fluoreszenzfärbung in SOD1-Mäusen	44
3.2	Kontrollfärbung der Mikroglia	48
3.3	Basale Werte für Interleukin 6 in Mikroglia aus adulten und jungen Mäusen	49
3.4	IL-6 Werte unter LPS Stimulation in Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen	51
3.5	Alternative Aktivierung bei Mikroglia aus jungen und adulten SOD1- Mäusen	54
4	Diskussion	59
4.1	Fluoreszenzfärbung im Rückenmark adulter SOD1-Mäuse	59
4.2	Erhöhte basale IL-6 Werte bei Mikroglia aus adulten Mäusen	62
4.3	Kein Unterschied der basalen IL-6 Werte zwischen Mikroglia aus trans- genen und wildtyp Mäusen	64
4.4	Stärkere Erhöhung der IL-6 Werte bei Mikroglia aus jungen Mäusen un- ter LPS Stimulation im Vergleich zu Mikroglia aus adulten Mäusen . . .	65
4.5	Kein Unterschied der IL-6 Werte zwischen Mikroglia aus transgenen und wildtyp Mäusen nach LPS Stimulation	67
4.6	Keine alternative Aktivierung der Mikroglia nachweisbar	68
5	Zusammenfassung und Ausblick	71
6	Literaturverzeichnis	73
	Anhang	89
	Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ANG	Angiogenin
BSA	Bovines Serumalbumin, Albumin Fraktion V
C9ORF72	Chromosom 9 Open Reading Frame
CD11b	cluster of differentiation molecule 11B
CR3	Komplementrezeptor 3
CT	Computer Tomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonukleinacid)
DNAse	Desoxyribonuclease I
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EAAT2	Excitatory amino-acid transporters 2
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fALS	familiäre amyotrophe Lateralsklerose
FBS	Fetal bovin serum gold
FCS	Fetale calv serum
FUS	fusion in sarcoma
GABA	Gamma Amino-Buttersäure
GFAP	glial fibrillary acedic protein
HBSS	Hanks balanced salt solution
HRP	Horseradish peroxidase
IL-1	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
IL-1β	Interleukin 1 β
IL-4	Interleukin 4

IL-6	Interleukin 6
IFN-γ	Interferron- γ
i.p.	intra peritoneal
JAK	Janus-Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Monozytenkolonien stimulierender Faktor
MG	Mikroglia
MHC Klasse II	Major Histocompatibility Complex Klasse II
MND	Motor Neuron Disease
mRNA	messenger Ribonukleinacid
MRT	Magnetresonanztomographie
mSOD1	mutierte SOD1
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OPTN	Optineurin
PBS	Phosphat buffer salin
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PON	Poly-L-Ornithin Hydrobromid
rcf	relative centrifugal force
RM	Rückenmark
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reaktive oxygen species)
rpm	rounds per minute
sALS	sporadische amyotrophische Lateralsklerose
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
SIP	Stock isotonic percoll
SOD1	Superoxiddismutase 1

TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43
tg	transgen
TH1	T-Helferzellen Typ 1
TH2	T-Helferzellen Typ 2
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tregs	regulatorischen T-Zellen
wt	wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

1.1.1 Klinik

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) wurde erstmals von dem französischen Neurologen Jean-Martin Charcot an dem Pariser Hospital de la Salpêtrière beschrieben. Die Erkrankung ist auch heute noch unter dem Namen „Maladie de Charcot“ bekannt. Weitere Synonyme sind Myatrophische Lateralsklerose und Motor Neuron Disease (MND). Im amerikanischen Sprachraum ist auch der Begriff „Lou Gehring’s Disease“ – geprägt durch den Baseball-Spieler Lou Gehring, der um 1930 an dieser Erkrankung litt – gebräuchlich [43].

Die ALS zählt zu den motorischen Systemdegenerationen. Sie ist charakterisiert durch eine progressive Degeneration sowohl des ersten als auch des zweiten Motoneurons im Bereich der Vorderhornzellen des Rückenmarks und der motorischen Hirnnervenkerne (Nn. V, VII, X, XII) sowie einzelner Abschnitte der Pyramidenbahn und des Gyrus Präcentralis. Die daraus folgende Verschmälerung des Vorder- und Seitenstrangs des Rückenmarks ist namensgebend („Lateralsklerose“) [69].

Bei zwei Drittel der Patienten mit „klassischer ALS“ ist ein spinaler Beginn der Symptome festzustellen („spinal onset“). Initialsymptome sind häufig Faszikulationen sowie fokale auftretende atrophische Lähmungen einer Extremität. Die Symptome sind progredient und breiten sich über die Extremitäten aus, um letztlich auch den bulbären Bereich bzw. die Hirnnerven zu befallen. Die Krankheit schreitet rasch voran und führt im Mittel drei bis fünf Jahre nach Diagnosestellung zum Tod. Eine Verbesserung der Symptome oder ein Stocken der Progredienz ist untypisch und lässt eher an eine Fehldiagnose denken [65].

Patienten mit „bulbärem Symptombeginn“, häufig Frauen in höherem Alter, haben eine schlechtere Prognose [20]. Hier sind vor allem die Hirnnervenkerne IX-XII („bulbaer onset“) und gelegentlich auch die motorischen Teile des V und VII Hirnnervs betroffen [61]. Die Patienten präsentieren sich mit Dysarthrie, Schluckbeschwerden und Sialo-

roeh. Eine atrophische und faszikulierende Zunge ist pathognomisch für eine bulbäre Beteiligung [43].

Bei rund 5 % der Patienten entwickelt sich eine reine Ateminsuffizienz. Hier stehen Schlafstörungen, morgendliche Kopfschmerzen und Müdigkeit zu Beginn der Krankheit im Vordergrund [69].

Abgesehen von der „klassischen ALS“ gibt es viele weitere Varianten der Erkrankung. Bei der seltenen primären Lateralsklerose ist ausschließlich das erste Motoneuron betroffen, bei der progressiven Muskelatrophie hingegen nur das zweite Motoneuron. Hauptsächlich die Armmuskeln sind bei der Diplegia brachialis betroffen. Die moderne molekulargenetische Forschung lockert die klinischen Grenzen zwischen diesen Erkrankungen und zeigt, dass die klinischen Syndrome ätiologisch heterogen sind [61, 65].

In der erwachsenen Bevölkerung Europas tritt die ALS mit einer Inzidenz von 2,7/100.000 Personenjahre auf. Männer sind etwas häufiger betroffen (Inzidenz 3,0/100.000) als Frauen (Inzidenz 2,4/100.000). Die Erkrankung manifestiert sich zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr [63].

Neuere Auswertungen des ALS Registers Rheinland-Pfalz bestätigen, dass diese Zahlen auch für Deutschland zutreffen.

Die Behandlungsstrategie der ALS beinhaltet einen kausal orientierten, pharmakologischen Ansatz und einen supportiven, palliativen Ansatz. Bis heute ist nur Riluzol (6-(Trifluormethoxy)-1,3-benzothiazol-2-amin) als Medikament mit nachweislich lebensverlängernder Wirkung bekannt. Für dieses konnte in doppelblinden, placebokontrollierten Studien eine neuroprotektive Wirkung gezeigt werden [8, 57].

Riluzol erhöht dosisabhängig die Wahrscheinlichkeit das erste Therapiejahr zu überleben um ca. 9 %. Dies entspricht einer medianen Verlängerung des Überlebens von 11,8 auf 14,8 Monate nach Beginn der medikamentösen Therapie [72]. Eine retrospektive Studie konnte zeigen, dass ein früher Beginn der Medikation den Verfall der motorischen Funktionen verlangsamen kann [93]. Die Wirkung von Riluzol wird seiner antiglutamatergen Eigenschaft zugesprochen. Trotz vieler Forschungen ist die genaue Wirkungsweise bis heute nicht bekannt [1].

Die symptomatische Therapie sollte in einem interdisziplinären Team erfolgen. Ziel dieser Therapie ist ein Erhalt der Lebensqualität und Selbstständigkeit im Alltag. Hierzu tragen vor allem Physiotherapie, Ergotherapie und die psychologische Betreuung bei. Der Übergang in die palliative Behandlung ist fließend, daher sollte von Anfang an ein enger Kontakt zu einem erfahrenen Palliativmediziner gehalten werden [13]. In der palliativen Betreuung steht die Leidensfreiheit im Vordergrund. Es stehen viele unterstützende Medikamente zur Verfügung [80].

Es gibt Ansätze ALS-Patienten in speziellen Kliniken zu betreuen. Allerdings gibt es keine Studien, ob dies einen Überlebensvorteil für die Patienten erbringt [104].

1.1.2 Ätiologie und Genetik

Auch über 130 Jahre nach der Erstbeschreibung der Erkrankung durch Charcot ist die Ätiologie der ALS für die meisten Fälle nicht bekannt. Etwa 5–10 % der ALS-Fälle sind familiär bedingt (fALS), der weitaus größere Teil der ALS-Fälle gilt als sporadisch (sALS). Für die familiäre amyotrophe Lateralsklerose (fALS) konnte die Genforschung in den letzten Jahren einige verantwortliche Gene identifizieren. Momentan sind über 13 ALS-auslösende Genmutationen bekannt.

Unter diesen Genmutationen ist die Mutation auf Chromosom 21q21 wohl die bekannteste. Dieses Gen kodiert für eine ubiquitär vorkommende, zytosolische Kupfer/Zink-Superoxiddismutase 1 (SOD1). Eine Mutation der SOD1 ist für etwa 20 % der fALS-Fälle und 5 % der sALS-Fälle verantwortlich.

Die SOD1 ist ein Enzym, das für die Konversion des freien Sauerstoffradikals O_2^- zu H_2O_2 verantwortlich ist. Durch die Glutathionperoxidase wird H_2O_2 weiter zu H_2O transformiert [114, 35].

Viele Studien zeigen, dass die Aktivität oder Inaktivität der gesunden SOD1 nichts mit dem Krankheitsmechanismus zu tun hat. Die Mutation auf dem SOD1-Gen führt zu einer neuen, toxischen Funktion der Dismutase („gain of function“). Der genaue pathophysiologische Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt [94, 69].

Heute sind über 150 ALS auslösende Mutationen auf dem SOD1-Gen bekannt [61]. Bei

ALS Fällen mit einer Mutation auf dem SOD1-Gen spricht man auch von einer „ALS1“.

Eine Mutation, die noch deutlich mehr fALS-Fällen zu Grunde liegt, ist die GGGGCC-Hexanukleotid-Expansion in der nicht kodierenden Region von Chromosom 9 Open Reading Frame (C9ORF72). Diese Mutation wurde 2011 erstmals von DeJesus-Hernandez et al. (2011) beschrieben [28, 92]. Bei 40 % der fALS-Fälle und bei ca. 7 % der sporadische amyotrophische Lateralsklerose (sALS)-Fälle in der europäischen Bevölkerung konnte die C9ORF72 Mutation nachgewiesen werden [67]. Die genaue Pathogenese ist noch ungeklärt, es wird jedoch eine Beeinflussung des mRNA Metabolismus angenommen. Allein aufgrund der Quantität der Mutation ist die C9ORF72 Mutation momentan ein Hauptbestandteil der ALS-Forschung.

Weitere bekannte Gendefekte, die einen klassischen ALS Phänotypen hervorrufen, sind Mutationen im Transactive response DNA binding protein 43 (TDP-43), fusion in sarcoma (FUS), Angiogenin (ANG) und Optineurin (OPTN) [55].

Auch wenn die genauen krankheitsauslösenden Mechanismen der Mutationen nicht bekannt sind, so ermöglicht die Kenntnis der Genmutationen dennoch die Generierung von Tiermodellen. Dies bringt für die Forschung und das Verständnis der Erkrankung enorme Vorteile. Auf das am weitesten verbreitete Mausmodell der ALS, die SOD1-Maus, soll im Abschnitt 1.1.3 näher eingegangen werden.

1.1.3 SOD1-Mausmodell der ALS

Mausmodelle stellen einen wichtigen Grundstein der Grundlagen- und klinischen Forschung dar. Durch ihre kurze Reproduktionszeit und die kürzere Lebensspanne im Vergleich zu Menschen lassen sie einen schnelleren Erkenntnisgewinn über Beginn, Ablauf und Ursache von Krankheiten und deren mögliche Therapie zu. Heute gibt es viele Mausmodelle der ALS mit verschiedenen Vor- und Nachteilen.

Das SOD1-Mausmodell ist das älteste Mausmodell der ALS. Die Versuchstiere weisen sehr ähnliche klinische Symptome wie ALS Patienten auf. Wie oben bereits erwähnt ist die acSOD1-Mutation jedoch nur für einen Teil der ALS Fälle beim Menschen verantwortlich.

Bereits 18 Monate nach der Entdeckung der SOD1-Mutation als ALS-auslösende Genveränderung durch Rosen et al. (1993) stellte Gurney et al. (1994) sein entwickeltes Mausmodell für die ALS vor – die G93A SOD1-Maus. Sie enthält in allen Körperzellen neben der eigenen SOD1 zusätzliche 20–24 transgene humane Kopien der SOD1 [71]. Hierbei ist an Position 93 des SOD1-Gens die Aminosäure Glycin gegen Alanin ausgetauscht [94, 47].

Die Tiere entwickeln nach ca. 3–4 Monaten Muskelschwächen und Paralysen. Der Phänotyp ist dem des Menschen mit ALS sehr ähnlich. Daten aus der Tierforschung sind häufig nicht direkt auf den Menschen zu übertragen, wie sich an einigen Beispielen im Bereich der ALS-Forschung gezeigt hat.

Als ein Beispiel seien die Versuche mit Minocyclin genannt. Minocyclin, welches das Überleben von transgenen SOD1-Tieren signifikant verlängert hat, erhöhte bei ALS Patienten die Mortalität [42].

Ein Grund für die mangelnde Vergleichbarkeit zwischen ALS beim Mensch und den SOD1-Tiermodellen ist die Tatsache, dass in den Tiermodellen die krankheitsauslösende Gensequenz stark überexprimiert wird [71]. Bereits eine Überexpression der gesunden humanen SOD1-Sequenz kann in Mäusen neurodegenerative Symptome auslösen [45]. Auch hängt die Stärke und der Beginn der Symptome im Tiermodell stark von der Anzahl und Art der transgenen SOD1-Expression ab [71]. Bei Menschen ist die mutierte SOD1 nur einfach vorhanden.

Trotz Zweifel an der Übertragbarkeit auf sporadische und andere familiäre Formen ist die G93A-SOD1-Maus immer noch das am weitesten verbreitete Versuchstier für die ALS [107].

Mit Hilfe der Mausmodelle für ALS konnten viele wichtige Erkenntnisse über die Pathogenese der ALS erforscht werden. In etwa die Feststellung, dass eine Überexpression von mutierter SOD1 mSOD1 nur in Neuronen [89] oder Gliazellen [40] allein nicht ausreicht, um einen ALS Phänotypen zu generieren. Hierdurch wurde dem Zusammenspiel von Gliazellen und Neuronen mehr Beachtung geschenkt und es entstand die Theorie der nicht-neuronen-autonomen Ätiologie [12]. In den letzten Jahren rücken

zusätzlich die T-Zellen in den Fokus der Wissenschaft. Sie beeinflussen mit ihren Mediatoren die Art und Weise der Reaktion von Astrozyten und Mikroglia [7].

1.1.4 Molekulare Mechanismen und Pathophysiologie

Pathomechanisch gibt es bis heute keine gesicherte Erklärung über den genauen molekularen Mechanismus, der für die Degeneration der Motoneuronen im Verlauf der ALS verantwortlich ist. Nach allem was man weiß, wird ein komplexes Zusammenspiel zellulärer und pathologischer Mechanismen angenommen, die sowohl von genetischen Faktoren wie auch von Umweltbedingungen beeinflusst werden [61].

Als krankheitsauslösende Ursache wird die Excitotoxizität von Glutamat diskutiert. Glutamat kann bei der ALS nicht mehr schnell genug von Astrozyten aus dem synaptischen Spalt abtransportiert werden [16] und führt somit zu einer toxischen Schädigung der Neurone.

Eine weitere mögliche Ursache fanden Turner und Talbot (2008) heraus. Sie stellten fest, dass in vielen SOD1-Mäusen die mutierte SOD1 (mSOD1) nicht regulär gefaltet werden kann. Dies führt zu einer Akkumulation von missgefalteten Proteinaggregaten in den Zellen und im Extrazellularraum. Die Ansammlung der missgefalteten mSOD1 führt zu Stress des Endoplasmatischen Retikulums [79], inhibiert die Proteasomen, beschädigt die Mitochondrien, stört den ante- und retrograden Transport in Axonen der Motoneuronen und beschädigt die Blut-Hirn-Schranke. Extrazelluläre Ansammlungen von missgefaltetem mSOD1 führen zu oxidativem Stress und aktivieren die Mikroglia. Diese wiederum schädigen durch ihre Reaktion die Motoneurone [52, 95]. Missgefaltete Proteinaggregate sind auch bei der FUS- und TDP-43 Mutation zu finden [11].

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, heben Beers et al. (2008) hervor, dass es sich bei der ALS nicht um eine zellautonome Krankheit handelt, sondern dass eine Vielzahl von Zellen an dem Krankheitsprozess beteiligt sind. Eine alleinige Expression der SOD1-Mutation in Neuronen reichte nicht aus, um im Tierversuch eine ALS auszulösen [121, 22].

Beers et al. (2008) sprechen im Besonderen den Gliazellen eine entscheidende Rolle im

Krankheitsgeschehen zu. Trotz des Absterbens der Motoneurone und einer Atrophie des Rückenmarks ist in der Magnetresonanztomographie (MRT) nur selten eine Volumenminderung des Zentralen Nervensystems ZNS zu sehen, da der Zellverlust eine Gliareaktion hervorruft [86]. Die Neurodegeneration geht bei der ALS immer mit einer Neuroinflammation, einer Aktivierung von Mikroglia, den Makrophagen des ZNS, und Astrozyten sowie einer Einwanderung von peripheren Immunzellen (T-Zellen) einher. Lange Zeit wurde diese Reaktion als eine sekundäre Antwort auf den Untergang von Motoneuronen gesehen mit dem Ziel die Inflammation zu beenden und die Neurone zu regenerieren. Es gibt jedoch wachsende Evidenz für die Annahme, dass die Neuroinflammation die degenerativen Prozesse unter bestimmten Umständen fördert oder sogar auslöst [82]. Sowohl bei Menschen als auch bei Tieren konnte gezeigt werden, dass Mikroglia noch vor Auftreten von klinischen Symptomen aktiviert werden. [56, 49, 2].

In Studien wurden Mäuse gezüchtet, die in einzelnen Zellpopulationen eine niedrigere mSOD1-Rate aufweisen. Bei Mikroglia mit niedrigeren mSOD1-Raten war das Überleben der Tiere nach Symptombeginn signifikant verlängert [12]. Auch die Reduktion der mSOD1 in Astrozyten führte zu einer langsameren Progression der Erkrankung [120] sowie zu einer Verringerung der Mikrogliaaktivierung.

Eine Reduktion der mSOD1 in ca. 70 % der Schwannzellen (durch P0-Cre gesteuerte Exzision) führte bei Ilieva et al. (2009) zu dem unerwarteten Ergebnis, dass diese den Krankheitsverlauf nicht verlangsamt, sondern in der Spätphase sogar beschleunigte. Eine Reduktion der mSOD1 reduziert auch die normale Funktion der Dismutase, den Abbau von Sauerstoffradikalen. Dies ist eine mögliche Erklärungsgrundlage für die Verschlechterung des Krankheitsverlaufs durch Reduktion der mSOD1 in Schwannzellen [62].

Neuere Studien von Kang et al. (2013) wiesen bei SOD1-Mäusen hingegen eine protektive Wirkung durch die Reduktion der mSOD1 in Oligodendrozyten nach.

All diese Ergebnisse lassen auf eine wichtige Beteiligung der nicht-neuronalen Zellen am Krankheitsverlauf und an der Entstehung der ALS schließen.

1.2 Glia-Zellen

Als Neuroglia werden jene Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) bezeichnet, die keine Neurone sind. Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten, Ependymzellen, Plexusgliazellen und einige weitere Zellen werden den Gliazellen des ZNS zugeordnet. Die meisten Gliazellen sind ektodermalen Ursprungs. Allein die Mikroglia bilden mit ihrem mesodermalen Ursprung eine Ausnahme [66]. Erstmals beschrieben wurden die Gliazellen von Rudolf Virchow im Jahre 1858. Er schrieb ihnen Stütz- und Haltefunktionen im Gehirn zu (gr. glia = Leime) [110].

Heute weiß man, dass die Funktion der Gliazellen weit über die reine Gerüstfunktion hinausgeht. Gliazellen sind zehnmal häufiger als Neurone und sind für deren Überleben unerlässlich [66]. Sie regulieren den Wasserhaushalt, sind für die Homöostase verantwortlich, isolieren die Nervenzellen gegeneinander, halten die Blut-Hirn-Schranke aufrecht, sind die Immunzellen des Gehirns und schütten eine Vielzahl an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Botenstoffen aus. Neuroglia-Zellen können daher allgemein als homöostatische Zellen des ZNS bezeichnet werden [83].

Für viele neurologische und psychische Erkrankungen wird den Gliazellen ursächliche oder zumindest modulierende Wirkung zugeschrieben. So spielen Astrozyten und Mikroglia eine Hauptrolle bei Entzündungen und physikalischen Verletzungen des ZNS. Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen sind Gliazellen immer involviert [83]. Die genaue Beteiligung der Gliazellen am Krankheitsprozess neurodegenerativer Erkrankungen wie ALS, Alzheimer und Chorea Huntington ist momentan Gegenstand der Forschung.

Auf zwei Gliazell-Typen wird in den nächsten Abschnitten genauer eingegangen.

1.2.1 Astrozyten

Astrozyten sind die häufigsten Gliazellen im ZNS [66]. Die sternförmigen Astrozyten mit ihren 5–10 Ausläufern werden mikroskopisch in zwei große Untergruppen geteilt. Die protoplasmatischen Astrozyten finden sich hauptsächlich in der grauen Substanz

und haben etwas kürzere, kräftigere und verzweigtere Ausläufer als die fibrillären Astrozyten. Die fibrillären oder auch Faserastrozyten finden sich vornehmlich in der weißen Substanz und an der Oberfläche des Gehirns [90].

Die Faserastrozyten weisen mehr Intermediärfilamente auf, die aus dem sauren Gliafaserprotein (GFAP) bestehen. Die Intermediärfilamente verleihen den Astrozyten ihre Stabilität, auf Grund derer sie im ZNS Stütz- und Gerüstfunktion übernehmen können. GFAP wird seit Langem verwendet, um Astrozyten von andern Gliazellen zu unterscheiden und immunhistochemisch anzufärben. Gesunde Astrozyten exprimieren nicht die gleiche Menge an GFAP wie reaktive Astrozyten. GFAP ist daher kein absoluter Marker für alle Astrozyten. Jedoch können vor allem aktivierte Astrozyten gut damit dargestellt werden [99].

Unter physiologischen Bedingungen nehmen Astrozyten eine Vielzahl an Funktionen im ZNS wahr. Bereits während der Entwicklung des Nervensystems nehmen Astrozyten eine strukturelle Rolle ein. Sie bilden Leitstrukturen für die aussprossenden Axone [88].

Im adulten Gehirn bilden Astrozyten eine Membran, welche die gesamte Oberfläche des Gehirns umgibt. Diese wird als *Membrana limitans glialis superficialis* bezeichnet.

Eine zweite Membran, die *Membrana limitans gliae perivascularis*, wird durch die Ausläufer der Astrozyten gebildet. Diese umschließen die Gefäße im Gehirn mit sogenannten Füßchen und bilden so eine Art zusätzliche Grenzschrift zwischen Blut und ZNS.

Astrozyten treten mit ihren Ausläufern auch an Synapsen heran und spielen durch die Aufnahme und Abgabe von Botenstoffen (Glutamat, GABA, Glycin) eine wichtige Rolle in der neuronalen Informationsübertragung [4, 48].

Des Weiteren senden sie Botenstoffe aus, die an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirnschranke beteiligt sind. Über die Freisetzung von Mediatoren regulieren sie den lokalen Blutfluss im Gehirn [41].

Untereinander sind Astrozyten mit „Gap-Junctions“ verbunden. „Gap-Junctions“ sind direkte Verbindungen zwischen benachbarten Zellen, die das Zytoplasma der Zellen verbinden. Über diese Kanäle können die Astrozyten schnell miteinander kommunizieren und Stoffe innerhalb der Zellen transportieren [18].

Astrozyten sind zudem mit zahlreichen Ionenkanälen und Transportmechanismen ausgestattet und regulieren mit deren Hilfe den lokalen pH-Wert, die Ionenkonzentration und den Nährstoffgehalt im Extrazellularraum. Insbesondere an der Regulation der Kalzium- und Kaliumkonzentration sind sie maßgeblich beteiligt [19].

Astrozyten lassen sich durch Verletzungen, Störungen der Homöostase und Pathogene aktivieren. Reaktive Astrozyten verändern ihre Morphologie und bilden deutlich mehr GFAP. Dadurch sind sie besser anfärbbar und erkennbar.

Reaktive Astrozyten können auf mannigfaltige Weisen auf Störungen reagieren. Die reaktive Astroglieose führt zu einer veränderten Produktion von Botenstoffen und Transmittern. Aktivierte Astrozyten proliferieren und können gliale Narben bilden, die das Wachstum von Neuronen behindern können. Diese „Gliale-Narbenbildung“ ist die am längsten bekannte Reaktionsweise der Astrozyten. Heute wird sie als eine sehr extreme Form der Astroglieose angesehen. Häufig hat die Astroglieose jedoch protektive Wirkung für das Gehirn. So können reaktive Astrozyten Stoffe aussenden, welche die Reparatur der Blut-Hirn-Schranke induzieren, Mikroglia aktivieren und durch lokale Narbenbildung eine mechanische Eingrenzung von Infektionen im ZNS erzeugen.

Viele unterschiedliche interzelluläre Signalmoleküle können eine Astroglieose bewirken und auch ihre Stärke modifizieren, zum Beispiel Cytokine (Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin 10 (IL-10), etc.), Neurotransmitter (Glutamat, Noradrenalin) und reaktive Sauerstoffspezies (reaktive oxygen species) (ROS). Auch Hypoxie, Hypoglykämie oder Stoffe, die mit neurodegenerativen Erkrankung assoziiert werden (z.B. Beta-Amyloid), lösen eine Astroglieose aus.

Durch die Interaktion mit anderen Gliazellen, Neuronen, T-Zellen oder Bakterien wird die astrozytäre Reaktion ebenfalls induziert und modifiziert [100].

Für einige Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Astrozyten oder reaktive Astrozyten den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen. Die Alexander Krankheit führt durch eine Mutation im GFAP-Gen zu Makroenzephalopathie mit Narbenbildung, psychomotorischen Störungen und frühzeitigem Tod [14].

Auch in der ALS sind Astrozyten entscheidend am Krankheitsgeschehen beteiligt.

Bei diesen beiden Beispielen wird die schädliche Wirkung auf Neurone und neuronales Gewebe jedoch durch genetisch mutierte und abnorme Astrozyten und weniger durch die reaktive Astrogliose hervorgerufen [100].

1.2.2 Rolle der Astrozyten in der amyotrophen Lateralsklerose

Die ALS geht mit einer heftigen Astrogliose im Rückenmark sowie im Gehirn einher. Die Astrogliose geht sowohl im Mensch als auch beim Tier den klinischen Symptomen weit voraus [16].

Es gibt Evidenz für zwei grundsätzlich verschiedene mögliche Rollen der Astrozyten im Krankheitsprozess der ALS. Zum einen den Verlust von neuroprotektiven Funktionen und zum anderen die Entwicklung von neurotoxischen Effekten.

Astrozyten mit einem Verlust oder einer Dysfunktion des Glutamatransporters (EAAT2) sind charakteristisch für die ALS (SOD1-Modell). Der EAAT2 nimmt Glutamat aus dem synaptischen Spalt auf. Astrozyten mit geringer Expression des EAAT2 in mSOD1-Mäusen werden vor allem im Rückenmark und in bestimmten Regionen des Gehirns gefunden. Dies suggeriert, dass die Excitotoxizität einer erhöhten Glutamatkonzentration im Extrazellularraum für das Absterben der Neurone verantwortlich ist [34, 68, 91, 97].

Gestützt wird diese Theorie von einer Studie, die zeigen konnte, dass bestimmte beta-Laktamantibiotika die Expression von Glutamattransportern auf Astrozyten erhöhen und somit die Glutamataufnahme suffizient steigern können. Im Tiermodell für ALS zeigte sich durch die Gabe dieser Antibiotika ein neuroprotektiver Effekt [96]. Auch die lebensverlängernde Wirkung von Riluzol wird, wie bereits erwähnt, seinen anti-glutamaterge Eigenschaften zugeschrieben [1].

Andere Studien geben Hinweise in die Richtung, dass Astrozyten, die das mSOD1-Gen tragen, lösliche Moleküle produzieren, die selektiv für Motoneurone toxisch und somit für deren Absterben verantwortlich sind [29, 77].

In der ALS nehmen Astrozyten eine entscheidende Rolle ein. Sie sind zwar nicht krankheitsauslösend, jedoch für die Progression der Erkrankung mit verantwortlich und

können andere Gliazellen, wie Mikroglia beeinflussen. Wird die mSOD1 selektiv in Astrozyten ausgeschaltet, so verlängert sich das Überleben von SOD1-Mäusen nach Krankheitsbeginn signifikant und auch die Mikroglia werden nicht so stark aktiviert [120].

1.2.3 Mikroglia

Mikroglia formen die spezifische Makrophagenpopulation des ZNS. Sie exprimieren Makrophagenmarker wie CD11b, sind die immunkompetenten und phagozytosefähigen Wächter des ZNS und weisen ähnliche Reaktionsweisen wie periphere Makrophagen auf [24]. Die Blut-Hirn-Schranke macht das ZNS zu einem immunprivilegierten Organ, da Leukozyten nicht ohne Weiteres von intravasal nach extravasal wandern können und daher das ZNS kaum besiedeln. Mikroglia übernehmen hier die Aufgabe der angeborenen Immunität [50].

Mikroglia sind mesodermalen Ursprungs. Sie wandern in der Embryonalphase als periphere Monozyten in das ZNS ein und bilden dort die ZNS-spezifische Makrophagenpopulation. Organspezifische Makrophagen gibt es in fast allen Geweben. Als ein weiteres Beispiel seien die Kupferzellen der Leber genannt [84, 59].

Unter physiologischen Bedingungen spielen Mikroglia eine Schlüsselrolle bei der Regulierung neuronaler Synapsen, der Neurogenese, dem Entsorgen von apoptotischen Zellen und der Produktion von Wachstumsfaktoren im ZNS [25].

„Ruhende Mikroglia“ sind durch einen kleinen Zellkörper und eine verästelte Morphologie gekennzeichnet (Abbildung 1a). Entgegen ihrer Bezeichnung sind sie immer in Bewegung und scannen ihre Umgebung. Nimmerjahn et al. (2005) zufolge tasten „ruhende Mikroglia“ innerhalb wenigen Stunden den gesamten extrazellulären Raum des ZNS ab. „Ruhende Mikroglia“ machen 5–20 % der neuroglialen Zellen im ZNS aus [59]. Stoßen sie auf pathologische Stimuli, werden „ruhende Mikroglia“ aktiviert und wandeln sich morphologisch und funktionell zu Effektorzellen um (Abbildung 1b). Diese Aktivierung kann durch Infektionen, Verletzungen der Blut-Hirn-Schranke, Protein-Aggregate oder das Auftreten intrazellulärer Bestandteile im Extrazellulärraum ausgelöst werden.

„Aktivierte Mikroglia“ machen eine dramatische morphologische Wandlung zu amöboiden Zellen durch und präsentieren eine Vielzahl an Oberflächenmolekülen. Sie wandern schnell an den Ort des Geschehens und proliferieren [26, 78, 33].

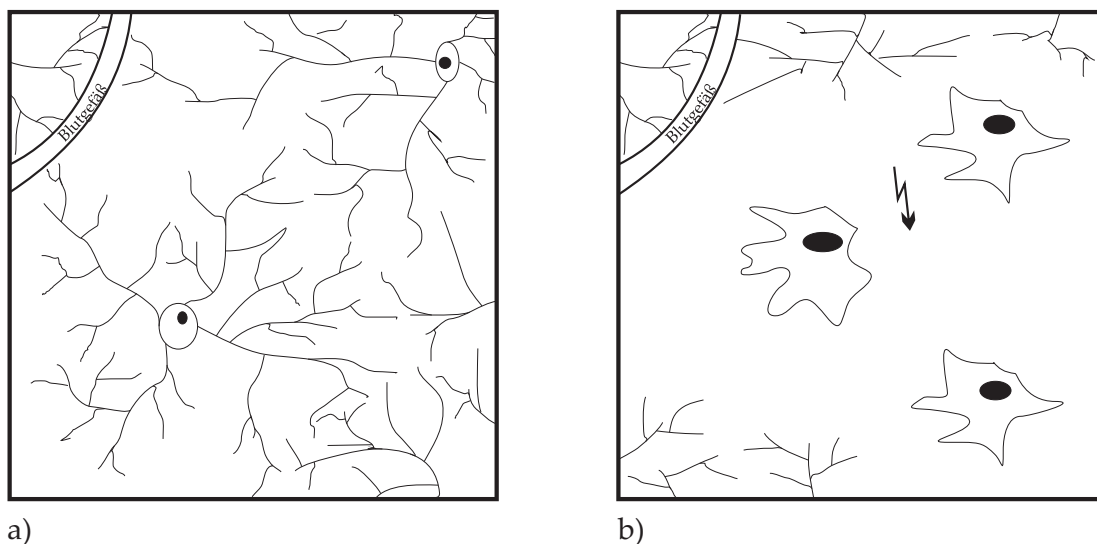


Abbildung 1: Schematische Darstellung der morphologischen Änderung aktivierter Mikroglia

a) ruhende Mikroglia

b) aktivierte Mikroglia, der „Blitz“ symbolisiert einen pathologischen Stimulus

Mikroglia haben verschiedene Möglichkeiten auf Störfaktoren im ZNS zu reagieren. Die Beschreibungen der Aktivierungszustände von Mikroglia lehnen sich stark an die der peripheren Makrophagen an.

„Aktivierte Mikroglia“ können durch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 1 β (IL-1 β) gewebebeschädigende Prozesse in Gang setzen. Die Freisetzung dieser Stoffe führt zur Sekretion weiterer Zytokine, zytotoxischer Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies (reaktive oxygen species) (ROS), Stickstoffmonoxid (NO) [74] und erlaubt die Infiltration peripherer Leukozyten. Hieraus resultiert eine Schädigung von Neuronen, Gliazellen und Strukturen der Extrazellulärmatrix. Diese Reaktionsweise bedingt das Absterben von Zellen in der Umgebung der Mikroglia.

Reize, die diese gewebeschädigende Reaktion hervorrufen, sind vielfältig und reichen von Umweltgiften bis zur Beschädigung oder dem Tod von Neuronen [9, 37].

Diese Reaktionsweise wird als die „pro-inflammatorische Aktivierung“ bezeichnet. Eine weitere pro-inflammatorische Antwort der Mikroglia ist die „klassische Aktivierung“ oder auch M1 Reaktion. Diese ist eng mit den T-Helferzellen Typ 1 (TH1) assoziiert und wird durch Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon- γ (IFN- γ) ausgelöst (siehe Abbildung 2a).

Die Aktivierung der Mikroglia in den „pro-inflammatorischen Aktivitätszustand“ erfolgt in vitro häufig mittels LPS-Stimulation. LPS sind die Endotoxine gramnegativer Bakterien. Die „pro-inflammatorische Aktivierung“ ist seit den 1960ern bekannt [37, 44].

Um größere Gewebeschäden abzuwenden ist es wichtig, dass die gewebeschädigende Reaktion der Mikroglia beendet wird und es nicht zu einer Überreaktion der Mikroglia kommt. Diese Aufgabe übernehmen endogene, protektive Signalstoffe wie Neuropeptide, Canabinoide und anti-inflammatorische Zytokine [9].

Das Konzept der „alternativen Aktivierung“ von Makrophagen/Mikroglia wurde von Stein et al. (1992) erstmals vorgestellt. „Aktivierte Mikroglia“ können durch die Phagozytose von abgestorbenen Zellen die Mobilisation neuronaler Vorläuferzellen, Anregung der Remyelinisierung und Hilfe bei der Regeneration von Axonen gewebe-protective Effekte bewirken. Durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und anti-inflammatorischen Faktoren sind sie essenziell für das Überleben der Neurone verantwortlich [9].

Die „alternative Reaktionsweise“ oder auch M2 Reaktion ist mit Lymphozyten des T-Helferzellen Typ 2 (TH2) und regulatorischen T-Zellen (Tregs) assoziiert [7]. Makrophagen/Mikroglia, die zusätzlich zu inflammatorischen Stimuli mit Interleukin 4 (IL-4) oder Interleukin 13 (IL-13) aus T-Helferzellen stimuliert werden, schütten deutlich weniger pro-inflammatorische Zytokine aus [125] (siehe Abbildung 2b). Makrophagen und Mikroglia tragen zudem Rezeptoren zur Bindung von IL-4/IL-13, die mit einer Janus-Kinase (JAK) verbunden sind. Über diese wird die Expression von Arginase I gefördert. Dieses Enzym metabolisiert Arginine zu Prolin, was wiederum zu

Kollagenproduktion führt. Dadurch stehen weniger Substrate für die NO-Produktion zur Verfügung. Die durch IL-4 und IL-13 ausgelöste „alternative Aktivierung“ fördert somit die Wundheilung und den Rückgang der Inflammation und wird als anti-inflammatorischer Zustand bezeichnet [58].

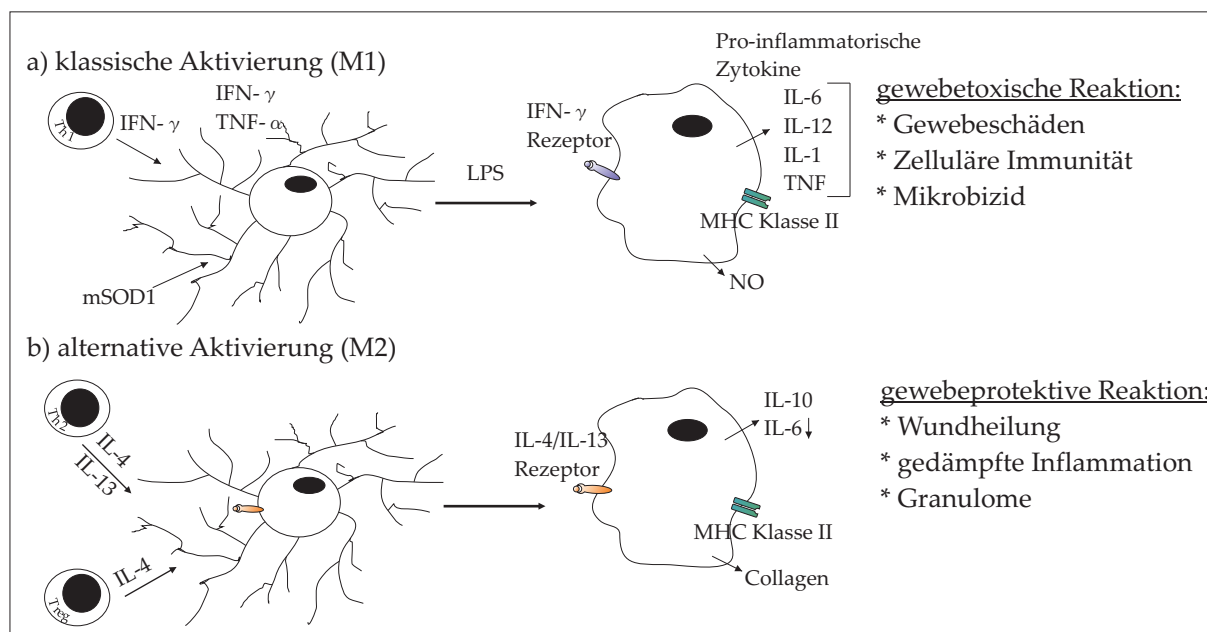


Abbildung 2: Klassische und alternative Aktivierung von Mikroglia

a) Durch T-Helferzellen Typ 1 (TH1), Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Lipopolysaccharid (LPS) so wie weitere Stimulie wie z.B. mutierte SOD1 (mSOD1) wird in Mikroglia die „klassische Aktivierung“ ausgelöst. Dies führt zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Substanzen wie Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 1 (IL-1), TNF- α und Stickstoffmonoxid (NO). Auch eine bestimmte Rezeptorexpression kennzeichnet diese Aktivierung (z.B. der Major Histocompatibility Complex Klasse II (MHC Klasse II)).

b) Durch T-Helferzellen Typ 2 (TH2) und regulatorische T-Zellen (Tregs) die Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) ausschütten wird in den Mikroglia die „alternative Aktivierung“ ausgelöst. Diese führt über die Ausschüttung anti-inflammatorischer Substanzen (z.B. Interleukin 10 (IL-10) und Canabinoide) und die Reduktion der pro-inflammatorischen Substanzen zu einer gewebeprotektiven Wirkung.

Eine Theorie besagt, dass aktivierte Mikroglia neuronalen Zelltod herbeiführen und für die schnelle Progression von neurodegenerativen Erkrankungen verantwortlich sind,

wenn die anti-inflammatorischen Mechanismen versagen oder wenn sie von einer exzessiven inflammatorischen Antwort überwältigt werden [87, 10].

Die Kenntnis der genauen Mechanismen, die der Dysregulation und Überaktivierung von Mikroglia zugrunde liegen, ist von großem wissenschaftlichen Interesse, da dies mögliche Erkenntnisse zur Ätiologie, Pathogenese und Behandlung von vielen neurodegenerativen Erkrankungen bereithalten könnte [9].

1.2.4 Rolle der Mikroglia in der amyotrophen Lateralsklerose

Für viele neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer, Huntington und amyotrophe Lateralsklerose konnte gezeigt werden, dass den Mikroglia eine entscheidende Rolle am Krankheitsprozess zukommt [103, 32].

Ein Kennzeichen der ALS ist die Neuroinflammation. Diese wird charakterisiert durch aktivierte Mikroglia in der Umgebung von geschädigten Neuronen. Eine Neuroinflammation ist bei der ALS sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell bereits vor Beginn der klinischen Symptome nachzuweisen [49, 2, 115, 15].

Mikroglia aus transgenen SOD1-Tieren sind generell stärker aktiviert als aus wildtyp Tieren. Mikroglia aus mSOD1-Tieren produzieren und schütten mehr NO und Superoxide aus als gesunde Mikroglia, was als „pro-inflammatorische Aktivierung“ angesehen werden kann und zu einem verstärkten Untergang der Neuronen führt [3].

Die Mikroglia scheinen jedoch nicht die auslösenden Zellen der ALS zu sein, da eine alleinige Expression der mSOD1 in Mikroglia nicht zu Krankheitssymptomen im Tiermodell führt. Eine Verringerung der mSOD1 in Mikroglia führt hingegen zu einem verlängerten Überleben der Versuchstiere nach Krankheitsbeginn [12].

Boillée et al. (2006) folgern daraus, dass die Mikroglia direkt an der Ätiologie der ALS beteiligt und vor allem für die rasche Progression der Symptome nach Beginn der Krankheit verantwortlich sind [12, 6, 112].

Diese Theorie wird durch Versuche mit Minozyklin gestützt, einem Tetrazyklinderivat, das die „pro-inflammatorische Aktivierung“ der Mikroglia hemmt [123] und zu einem verlängerten Überleben der transgenen Tiere führt [56, 108, 126].

Eine weitere Studie differenziert die Rolle der Mikroglia noch weiter. Sie zeigt, dass die

„alternative Aktivierung“ der Mikroglia den Krankheitsprozess verlangsamen kann, wohingegen die „pro-inflammatorische Aktivierung“ das Voranschreiten fördert [7].

Werden Mikroglia aus gesunden Mäusen extrazellulärem mSOD1-Protein ausgesetzt, so bewirkt dies eine morphologische und funktionelle Aktivierung der Mikroglia, ähnlich wie die Zugabe von LPS, was einer „pro-inflammatorischen Aktivierung“ entspricht [124].

Es ist anzunehmen, dass die mSOD1 die Aktivität der Mikroglia von neuroprotektiv zu neurotoxisch verändert und damit die Progression der Erkrankung bedingt.

Auch der Rückgang an Tregs, die IL-4 ausschütten und damit die „alternative Aktivierung“ von Mikroglia unterstützen, ist ein möglicher Grund für den Übergang zum rasch progredienten Krankheitsstadium [7].

Das komplexe Zusammenspiel der Mikroglia mit anderen Gliazellen, Neuronen und Lymphozyten bildet eine Schlüsselrolle für das Verständnis der ALS-Pathogenese. Mikroglia nehmen in der ALS eine entscheidende, modulierende Rolle im Krankheitsgeschehen ein. Das genaue Wissen über die Aktivitätszustände im jeweiligen Krankheitsstadium, deren Charakterisierung und Beeinflussung sind vielversprechende Ziele für die Therapie der ALS.

1.3 Fragestellung

Der symptomatische Krankheitsbeginn der SOD1 liegt im mittleren Erwachsenenalter. Im SOD1-Mausmodell liegt der Symptombeginn um den 130ten Lebenstag. Die Mutationen in dem SOD1-Gen, das für ca. 10 % der fALS Fälle verantwortlich gemacht wird, ist jedoch von Geburt an in allen Zellen vorhanden. So auch in Mikrogliazellen, die zu einem raschen Fortschreiten der Erkrankung beitragen.

Primäre Mikrogliazellkulturen werden meist aus neugeborenen Mäusen gewonnen und stellen daher nur ein insuffizientes Modell zur Untersuchung von Veränderungen dar, die erst im adulten Tier auftreten. Gerade für die ALS wäre es interessant, Zellen aus adulten Mäusen, die bereits Krankheitssymptome aufweisen, genauer zu untersuchen. Möglicherweise ergeben sich hier Hinweise, welche Veränderungen in den Zellen zum Ausbruch oder dem Übergang in den rasch progredienten Krankheitsverlauf führen. Weydt et al. (2004) verglichen neugeborene und 60 Tage alte Mikroglia aus wildtyp und transgenen SOD1-Tieren miteinander. Sie stellten bei den adulten Tieren einen deutlichen Unterschied in der Reaktionsweise zwischen Mikroglia aus transgenen und denen aus wildtyp Mäusen fest.

Im Rahmen dieser Dissertation soll untersucht werden, ob Mikrogliazellen aus adulten wildtyp Mäusen und adulten transgenen Tieren, die bereits charakteristische Merkmale der Neurodegeneration aufweisen, ein erhöhtes inflammatorisches Potential besitzen als Zellen aus jungen Tieren. Zusätzlich soll geprüft werden, ob dies mit einer verminderten alternativen Aktivierung assoziiert ist. Hierzu sollte zunächst eine Methode zur Kultivierung adulter primärer Mikroglia aus Mäusen im Labor etabliert werden. Dazu stand ein Protokoll der AG Draheim zur Verfügung [75].

Daraufhin sollte anhand dieser Zellkulturen die inflammatorische Reaktionsweise der Mikroglia untersucht werden. Die inflammatorische Antwort soll durch 18-stündige Stimulation mit LPS ausgelöst werden, die „alternative Aktivierung“ durch Vorstimulation mit IL-4. Im Überstand soll das Zytokin IL-6 mittels ELISA quantifiziert werden. Interleukin 6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das als Marker für die „pro-inflammatorische Aktivierung“ der Mikroglia gilt und dessen Inhibition als ein indi-

rekter Indikator der „alternativen Aktivierung“ gesehen wird.

Aus einer besseren Kenntnis der Rolle der Mikroglia im Verlauf der ALS werden sich neue Ansatzpunkte zum Verständnis und für die Therapie der Erkrankung ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Material für die Zellkultur

Material	Firma	Katalog-Nr.
Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi	# B230673
D-MEM+GlutaMAX TM -I 1x – high glucose	Invitrogen	# 61965-059
DMEM/F-12+GlutaMAX	Invitrogen	# 31331-028
DNAase I (Deoxyribonuclease I)	Worthington	# LS-002139
DPBS ⁻ (D-PBS 1x – ohne Calcium, Magnesium)	Invitrogen	# 14190-169
DPBS ⁺ (D-PBS 1x – mit Calcium, Magnesium)	Invitrogen	# 14040-174
FCS hitzeinaktiviert	PAA Laboratories GmbH	# A15-152
GlutaMAX TM I Supplement – 200 mM	Invitrogen	# 35050-038
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)(10x)	Invitrogen	# 14060-040
Kulturplatte (BD Primaria TM Clear 96-well Microtest TM Plate)	BD Falcon	# 35387
L929 steril filtrierter Überstand aus L929 Zelllinie	—	—
Neubauer-Zählkammer	LO Laboroptik	# 1310000
Papain	Sigma	# P4762
Pen/Strep (Penicillin-Streptomycin)	Invitrogen	# 15140-122
Percoll	Sigma	# P4937
Petrischale (CELLSTAR Zellkultur Schale 15 mm)	greiner bio-one	# 628160
PON (Poly-L-Ornithin Hydrobromid)	Sigma	# P3655
steriles Wasser (Ampuwa Spüllösung Plastipur)	Fresenius Kabi	
steriles Werkzeug: Skalpell, Schere, Pinzetten	—	—
Tryptanblau (Trypan Blue Solution)	Sigma	# T8157
Zellsieb (100 µm)	BD Bioscience	# 352360

Zellkulturflasche (Gewebekulturflasche Plug Seal Cap mit Belüftung 75 cm ²)	Sarstedt	# 83.1813.002
Zellkulturflasche (Gewebekulturflasche Plug Seal Cap mit Belüftung 25 cm ²)	Sarstedt	# 83.1810.002
Petrischale 35 mm	greiner	# 628-102

Tabelle 2: Hergestellte Lösungen für die Zellkultur

Lösung	Bestandteile
DNAase I	10 mg/ml in DPBS ⁻
DMEM/F12⁺	DMEM/F12+GlutaMAX TM -I 1x 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 % FCS (hitzeinaktiviert)
DMEM⁺	D-MEM+GlutaMAX TM -I 1x – high glucose 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 % FCS (hitzeinaktiviert)
DMEM⁻	D-MEM (1x) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM GlutaMAX TM I Supplement
Papainsolution	116 mM NaCl 5,4 mM KCl 26 mM NaHCO ₃ 1 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 mM CaCl ₂

	1 mM MgSO ₄
	0,5 mM EDTA
	25 mM Glukose
	1 mM Cystein
	20 units/ml Papain
PON	100 µg/ml in sterilem Wasser
20 % FCS	4 ml FCS
	16 ml HBSS (1x)
20 %SIP Lösung	3,6 ml Percoll
	0,4 ml HBSS (10x)
	16 ml HBSS (1x)

Tabelle 3: Material für die L929 Zelllinie aus Mausfibroblasten

Material	Firma	Katalog-Nr./Lot
DMSO	Sigma	# D2650
Trypsin / EDTA	Biochrom	# L2143
Zellkulturflasche (Gewebekulturflasche Plug Seal Cap mit Belüftung 75 cm ²)	Sarstedt	# 83.1812.002
Nunc Kryoröhrchen	SIGMA	# 363401

Tabelle 4: Hergestellte Lösungen für die L929 Zelllinie

Lösung	Bestandteile
Kulturmedium	DMEM 10 % FCS 1 % Pen/Strep.
Einfriermedium	DMEM 30% FCS 1% Pen/Strep. 5 % DMSO

Auftaumedium	DMEM
	30 % FCS
	1 % Pen/Strep.

Tabelle 5: Material für die Stimulationen

Material	Firma	Katalog-Nr./Lot
LPS (Lipopolysaccharides from Escherichia coli)	Sigma	# L4391
IL-4	R&D Systems	# 404/ BC1613061

Tabelle 6: Material für den IL-6 ELISA

Material	Firma	Katalog-Nr./Lot
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl ROTH	# 8076.2
ELISA MAXTM Standard SET Mouse IL-6	BioLegend	# 431302
IL-6-Standard-Stocklösung	BioLegend	# B 110104A
Mikrotiter-Platte (Immuno-Plate Maxisorp F96)	nunc	# 735-0083
Schwefelsäure H ₂ SO ₄	MERCK	# K2664673123
TMB-Substrate Solution	BioLegend	# 421101
TWEEN20	Sigma	# P9416

Tabelle 7: Hergestellte Lösungen für den IL-6 ELISA

Lösung	Bestandteile
Coatin Buffer	100 mM NaHCO ₃
*pH 9,5	33,6 mM Na ₂ CO ₃ in H ₂ O
PBS	137 mM NaCl
*pH 7,2-7,4	2,5 mM KCl
*0,2 µm filtriert	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄

	in H ₂ O
Assay diluent	1 % BSA in PBS (1x)
Wasch Buffer	0,05 % TWEEN20 in PBS (1x)
Stopp Solution	2 M H ₂ SO ₄

Tabelle 8: Material für den Protein-Assay

Material	Firma	Katalog-Nr./Lot
DC Protein Assay Kit	Bio Rad	# 500-0113/ -0114/-0115

Tabelle 9: Hergestellte Lösungen für den Protein-Assay

Lösung	Bestandteile
1 % Triton	1 % Triton X-100 in PBS (1x)
Protein-Standard	BSA in 1 %-Triton in PBS (1x)

Tabelle 10: Material für die Färbungen

Material	Firma	Katalog-Nr./Lot
Fettstift	Science Services	# N71310
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl ROTH	# 8076.2
Thiopental	ROTEXMEDICA GmbH	#4464966
Tissue Tek	Weckert Labor- technik	# 600001
Triton X-100	Sigma	# 9002-93-1
TWEEN20	Sigma	# P9416

Tabelle 11: Hergestellte Lösungen für die Färbungen

Lösung	Bestandteile
PBS	137 mM NaCl
*pH 7,2-7,4	2,5 mM KCl
*0,2 µm filtriert	8,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	in H ₂ O

Tabelle 12: Sonstige Geräte und Materialien

Material	Firma	Katalog-Nr./Lot
24-Well-Platte (Corning® Primaria™)	VWR	734-0078
96-Well-Platte (Mikrotestplatte 96-Well F)	Sarstedt	# 82.1581
Inkubator (CO ₂ -Inkubator)	Thermo Scientific	Heraeus
Magnetrührer	IKA	KMO2basic
Mikroskop	Zeiss	Axiovert25
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axiovert200
Kryotom	Leica	CM 3050S
Okular	LOMO	MBC-10
Pasteurpipetten (Glas)	VWR	# 612-1720
Photometer	BIO-TEK	ELx800uv
Pipetten (Glas)	—	—
Reaktionsgefäße (SafeSeal Gefäß 1,5 ml)	Sarstedt	# 72.706
Waage	Acculab	ALC110.4
Zentrifugenröhrchen 15 ml	greiner bio-one	# 188271
Zentrifugenröhrchen 50 ml	greiner bio-one	# 227261
Zentrifuge mit Kühlung	eppendorf	5810R
Parafilmfolie (PARAFILM® M)	VWR	# 291-1212

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Mikrogliapräparation nach einem modifizierten Protokoll der AG Dranheim

Die Versuche wurden mit primären Mikroglia aus B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/JxC57BI/6J hemizygoten- und C57BI/6J-Mäuse, als Kontrollen, der AG Ludolph, sowie B6.SV129(PrP+/-)*B6.Cg-Tg/SOD1-G93A)1Gur(tg) und B6.SV129(PrP+/-)*B6.Cg-Tg/SOD1-G93A)1Gur(wt), als Kontrollen, der AG Otto im Alter von 130–155 Tagen oder mit neugeborenen Tieren im Alter von 2–5 Tagen durchgeführt. Die Tiere der AG Otto waren jeweils einfach positiv für das Prion Gen. Dies zeigte keine Auswirkungen auf das Verhalten und Überleben der Tiere im Vergleich zu „normalen“ SOD1-G93A-Mäusen [102]. In den Versuchen mit LPS und IL-4 zeigten sich keine Unterschiede der Tiere aus der AG Otto und der AG Ludolph, daher wurden die Versuchstiere zusammengefasst. Die Präparation des murinen Gehirns erfolgte nach den Richtlinien des Tierforschungszentrums der Universität Ulm.

Die Durchführung der Präparation lehnt sich stark an das Protokoll zur Präparation adulter Mikrogliazellen von Moussaud und Draheim (2010) an. Für die Präparation der primären Mikroglia aus adulten Mäusen wurden vor der Präparation Kulturflaschen (Gewebekulturflasche Plug Seal Cap mit Belüftung 75 cm²) mit 7 ml PON Lösung in einer Konzentration von 100 µg/ml beschichtet und für 30 Minuten in den Inkubator bei 37 °C gestellt. Danach wurden die Flaschen zweimal mit steriler Spüllösung (Ampuwa Spüllösung Plastipur) und einmal mit DPBS+/+ (DPBS 1x mit Calcium, Magnesium) gewaschen. In die Kulturflasche wurden 9 ml Medium (50 % F12 + 50 % L929 Überstand) für die Zellen vorgelegt und in den Inkubator gestellt. Das Medium wurde zuvor hergestellt aus 500 ml F12 Medium unter Zugabe von 5 ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und eigenhändig hitzeinaktivierten 50 ml Fetal bovin serum gold (FBS). Der L929 Anteil ist sterilfiltrierter Überstand einer L929 Zellreihe. Der konditionierte Überstand enthält das Zytokin Monozytenkolonien stimulierender Faktor (M-CSF). Dies wirkt wachstumsfördernd auf Mikroglia [51].

Für die Präparation neugeborene Mäuse wurden 25 cm² und eine angepasste Menge

an Medium verwendet. Die folgende Präparation fand an einem desinfizierten Arbeitsplatz unter Zuhilfenahme von Werkzeugen, die zuvor mit Ethanol (70 %) desinfiziert wurden, statt. Für die Vitalität der Zellkultur ist es wichtig, möglichst zügig zu arbeiten und das Gewebe gekühlt zu halten. Für eine gute Vergleichbarkeit sollte die Präparation möglichst immer gleich ablaufen.

Die Tiere wurden mittels cervicaler Dislokation getötet. Die Entnahme des Gehirns erfolgte, indem Haut und Schädelknochen zuvor entfernt wurden. Anschließend wurde das Gehirn in eine Petrischale (CELLSTAR Zellkultur Schale 35 mm) mit 3 ml DPBS⁻ (DPBS 1x ohne Calcium, Magnesium) auf Eis gelagert. Unter dem Okular wurden das Cerebellum und die Bulbi Olfactorii abgetrennt und alle Meningen mit Hilfe von Pinzetten sorgfältig entfernt. Beide Hemisphären wurden daraufhin in eine frische Petrischale mit DPBS⁻ auf Eis gegeben. Die Meningen und das abgetrennte Gewebe wurden verworfen. Die sorgfältige Entfernung der Meningen ist wichtig, um eine möglichst geringe Kontamination der Zellkultur mit Epithelzellen zu erlangen.

Die folgenden Schritte fanden in der Sterilbank statt. Das Gehirngewebe wurde in einer Petrischale unter Zugabe von 3 ml Papainsolution mit dem Skalpell (Braun; BA222) fein zerkleinert und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Papain verdaut und lockert die Proteine im Gewebe und ermöglicht so eine Isolierung der Zellen aus dem Gewebeverband. Danach wurde das Gewebe in ein 50 ml Tube überführt und der Enzymverdau mit 20 ml 20 % FCS in PBS gestoppt. Um das Gewebe von der Flüssigkeit trennen zu können, wurde das Tube bei 200 relative centrifugal force (rcf) und 4 °C sieben Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Nun wurden 100 µl Desoxyribonuclease I (DNase) (gelöst in DPBS⁻; 10 mg/ml) und 900 µl einfache Hanks balanced salt solution (HBSS) zugegeben. DNase vermittelt den Abbau von freier DNA, die aufgrund der mechanischen Schädigung während der Präparation durch vorwiegend nekrotischen Zelltod frei wird. Dies erleichtert das Homogenisieren des Gewebes. Das Pellet wurde ca. sieben Mal mit einer Pasteurpipette homogenisiert und danach durch ein Sieb mit 100 µm Lochweite gesiebt. Damit die Zellen möglichst vollständig das Zellsieb passieren und nicht an diesem haften blieben, wurde mit 20 ml einfachem HBSS gründlich nachgespült. Um die Zellen weiter verarbeiten zu können, wurde er-

neut sieben Minuten bei 200 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgesaugt und das Pellet in 20 ml 20 % SIP Lösung resuspendiert. Zur Ausbildung eines Gradienten wurde die 20 % Stock isotonic percoll (SIP) Lösung mit 20 ml einfachem HBSS überschichtet. Nun folgten 20 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 200 rcf. Damit sich der Gradient nicht auflöst, wurde die Beschleunigung auf Stufe 3 eingestellt und die Bremsen komplett ausgeschaltet. Die Mikroglia sammeln sich als Pellet am Grund des Tubes. Die Interphase und der Überstand werden abgesaugt. Um das Percoll aus den Zellen auszuwaschen, wurde das Pellet in 40 ml einfachem HBSS resuspendiert und weitere sieben Minuten bei 4 °C und 200 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium (50 % F12 + 50 % L929 Überstand) resuspendiert. Die Zellen wurden nun in die vorbereiteten Kulturflaschen gegeben, so dass jede Flasche 10 ml Medium und das Gewebe eines Gehirns enthielt. Die Flaschen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Wenn mit neugeborenen SOD1-Tieren gearbeitet wurde, wurden die Gehirne einzeln verarbeitet und nach der Polymerase Chain Reaction (PCR)-Typisierung der Tiere endgültig beschriftet.

Um den Zellen Zeit zu geben, sich auf dem Flaschenboden anzuheften, ließ man die Kulturen über eine Dauer von drei Tagen ruhen. Danach wurde das Medium abgenommen, der Rasen aus adherenten Zellen wurde mit frischem Medium (50 % F12 + 50 % L929 Überstand) versorgt. Das Absetzen der Zellen wird durch die Beschichtung der Kulturflaschen mit Poly-L-Ornithin Hydrobromid (PON) begünstigt. PON bevorzugt die Adhäsion von Astrozyten am Flaschen-Boden [30], wodurch diese idealerweise eine geschlossene Oberfläche bilden. Mikroglia gehen lockere Interaktionen mit Astrozyten ein und lagern sich daher auf der einzelligen Schicht ab. Astrozyten produzieren des Weiteren M-CSF. Dieses Zytokin wirkt als Wachstumsstimulator für Mikroglia [51]. Dies stellte die Voraussetzung für die Ernte von adulten Mikroglia in Zeitintervallen von ca. 14 Tagen nach einer anfänglichen Proliferationsphase von 14 bis 21 Tagen dar. Um die Zellen immer ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen, wurde das Medium jede Woche zur Hälfte ausgetauscht. Aus jeder Mischkultur konnten bis zu drei Mal Mikroglia entnommen werden. Allerdings war die Ausbeute der adulten Kulturen nicht vergleichbar mit der aus jungen Mikroglia kulturen, sondern deutlich geringer [118].

Die Gewinnung der Mikroglia erfolgt durch kräftiges Beklopfen der Flaschen, wobei sich die Mikroglia vom Astrozytenrasen lösen und im Medium schwimmen. Das Medium wurde mit Hilfe einer Glaspipette abgenommen. Die Kulturflasche wurde sogleich mit 10 ml Medium (50 % F12 + 50 % L929 Überstand) bedeckt und in den Brutschrank zurückgestellt. Das abgenommene Medium mit den Mikroglia wurde in einem 15 ml Tube 10 Minuten bei 500 rcf zentrifugiert. Um die Zellen gleichmäßig für Versuche aufteilen zu können, erfolgte nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes eine Resuspendierung in 1 ml F12 Medium. Mit Hilfe von Trypanblau (Trypan BlueSolution) wurde in der Neubauer-Zählkammer die Zelldichte in der Flüssigkeit ermittelt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt. Je 10 µl dieser Mischung wurden auf die Zählfelder gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Gezählt wurden nicht gefärbte, hell-leuchtend erscheinende Zellen in den Zählfeldern. Die Methode beruht darauf, dass der anionische Farbstoff Trypanblau nur die durchlässige Zytoplasmamembran toter Zellen durchdringen kann und daher ausschließlich tote Zellen anfärbt. Nach Berechnung der Zellzahl in 1000 µl wurde die Zellsuspension durch Zugabe der entsprechenden Menge an F12-Medium auf die jeweils gewünschte Zelldichte gebracht. Nun erfolgte die Weiterbehandlung der Zellen je nach geplantem Experiment.

Mikroglipräparation nach der Labormethode

Die Vorbereitung der Kulturflaschen gleicht der bei der Präparation nach [75]. Das vorgelegte Medium hingegen waren 9 ml DMEM⁺ (serumhaltiges Medium). DMEM⁺ war zuvor aus „DMEM+GlutaMAX™-I 1x - high glucose (500 ml)“ durch Zugabe von 5 ml Pen/Strep und 50 ml eigenhändig hitzeinaktiviertem FBS hergestellt worden. Die Dekaptierung der neugeborenen Mäuse und die anschließende Präparation fanden an einem desinfizierten Arbeitsplatz unter Zuhilfenahme von Werkzeugen, die zuvor mit Ethanol (70 %) desinfiziert wurden, statt. Auch hier sollte die Präparation möglichst zügig ablaufen, um die Qualität der späteren Zellkultur zu sichern. Das Gehirn wurde freigelegt, indem Haut und Schädeldecke entfernt wurden. Nach Entnahme aus dem Schädel wurden alle Gehirne in DPBS⁻ auf Eis gelagert. In einer Petrischale (CELL-

STAR Zellkultur Schale 15 mm) mit DPBS⁻ wurden unter dem Okular Cerebellum und Bulbus olfactorius von den Hemisphären abgetrennt und die Hirnhäute sorgfältig entfernt. Diese lassen sich umso leichter entfernen, je jünger die Tiere sind. Die meningenfreien Hirnhälften wurden zügig in Zentrifugenröhrchen mit DPBS⁻ auf Eis transferiert. Die weitere Präparation fand unter der Sterilbank statt. Zuerst wurde das isolierte Material durch dreimaliges Waschen in DPBS⁻ von unerwünschten Bestandteilen wie Blut, Reste der Hirnhäute oder Bakterien gesäubert [118]. Das Gewebe wurde durch Zugabe von 1,25 ml Trypsin (2,5 %) für 1–2 Minuten angedaut. Trypsin spaltet u.a. Proteine, die Zell-Zell-Kontakte aufrecht erhalten und sorgt damit für die Lockerung eines Gewebeverbands. Es folgte eine Inkubation mit 50 µl DNase (gelöst in DPBS⁻; 10 mg/ml) für 4–5 Minuten.

Nach dreimaligem Waschen wurden erneut 50 µl DNase zugegeben, bevor das Gewebe mit einer Pasteur-Pipette homogenisiert wurde. Die Anwesenheit der DNase verhindert eine gallertartige Ansammlung von freier DNA, die den weiteren Verarbeitungsprozess behindern würde. Um die Enzymreaktionen zu stoppen, wurde das Zellhomogenisat mit 5 ml DMEM⁺ vermischt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 250 rcf und Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde mit DMEM⁺ resuspendiert und dabei auf ein Volumen gebracht, das umgerechnet ca. zwei Gehirne in 1 ml enthält. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml zu dem vorgelegten DMEM⁺ in einer Zellkulturflasche (siehe oben) gegeben. Somit betrug das Gesamtvolumen pro Zellkulturflasche 10 ml mit Präparationsmaterial aus ca. zwei Gehirnen.

Das verwendete Medium DMEM⁺ ermöglicht Überleben und Wachstum von Zellen in Kultur. Erstens stellt erworbenes D-MEM+GlutaMAXTM-I direkt Glucose (4,5 g/l) und indirekt L-Glutamin bereit. Letzteres ist in Form des Dipeptids L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAXTM) enthalten. Es kann von freigesetzten zellulären Peptidasen gespalten und als essentielle Aminosäure in Stoffwechselprozesse der Zellen eingebracht werden [21]. Zweitens fördert der Zusatz von FBS (10 %) das Wachstum der Zellen. Antibakterieller Schutz wird über das zugefügte Pen/Strep gewährleistet. Mikrogliazellen werden zusätzlich von astrozytären Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt. Weitere

Zellen des ZNS (v.a. Neurone und Oligodendrozyten), die im Homogenisat enthalten waren, können aufgrund fehlender essentieller Faktoren im Medium nicht überleben. Trotzdem ist es möglich, dass eine geringe Verunreinigung der Mischkultur aus Mikroglia und Astrozyten durch z.B. Ependymzellen vorlag. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂, wodurch eine Umgebung geschaffen wird, die dem Milieu in vivo sehr nahe kommt. Um den Zellen Zeit zu geben sich auf dem Flaschenboden abzusetzen, wurden die frisch hergestellten Kulturen über eine Dauer von etwa drei Tagen ruhig im Inkubator stehen gelassen. Danach wurde das Medium abgenommen, der Rasen aus adhärennten Zellen mit DPBS⁻ gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Die jungen Mikroglia können in Zeitintervallen von ca. sieben Tagen nach einer anfänglichen Proliferationsphase von 10 bis 14 Tagen geerntet werden. Aus jeder Mischkultur konnten bis zu vier Mal Mikroglia entnommen werden [118].

2.2.2 L929 Zelllinie aus Mausfibroblasten

Da die adulten Mikroglia ohne wachstumsfördernde Substanzen nicht ausreichend proliferierten, wurde eine L929 Zellreihe kultiviert. Der Überstand ist mit Faktoren angereichert (z.B. M-CSF), die sich wachstumsfördernd auf Mikroglia auswirken [81, 17]. Zum Auftauen der Zellen wurde eine Kulturflasche (75 cm²) mit 10 ml Auftaumedium befüllt. Weitere 10 ml Auftaumedium wurden in einem Zentrifugenröhrchen auf Eis gestellt. Ein Kryoröhrchen (1x 10⁶ Zellen L929/ml) wurde im H₂O-Bad angetaut, bis nur noch kleine Eisklumpchen vorhanden waren. Die Zellsuspension wurde vorsichtig gemischt und in das vorgekühlte Auftaumedium überführt. Die Mischung wurde bei 800 rounds per minute (rpm) und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Auftaumedium resuspendiert und in die Gewebekulturflasche überführt. Nach kurzem Schwenken wurde den Zellen mindestens sechs Stunden Zeit gegeben sich bei 37 °C und 5 % CO₂ an den Flaschenboden anzuheften. Darauf erfolgte der erste Medienwechsel. Das alte Medium wurde abgesaugt. Die Kulturflasche wurde zwei Mal mit je 10 ml Kulturmedium gewaschen und danach mit 15 ml Kulturmedium weiter inkubiert. Zur anschließenden Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und dem Abtransport von verbrauchtem Me-

dium erfolgte alle drei Tage ein Medienwechsel, bis der Zellrasen konfluent war.

Bei konfluentem Zellrasen konnten die Zellen passagiert werden. Zum Passagieren der Zellen wurden diese zunächst zwei Mal mit Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) gewaschen und danach mit Trypsin/EDTA bei 37 °C 2–3 Minuten inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit 8 ml Kulturmedium abgestoppt, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Das Medium mit den abtrypsinisierten Zellen wurde aus der Kulturflasche entnommen und in einem Zentrifugierröhrchen bei 4 °C und 800 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Pellet in 23 ml Kulturmedium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden je Kulturflasche (75 cm²) 2,5 ml Zellsuspension in 10 ml vorgelegtem Kulturmedium ausgesät. Bei Kulturflaschen der Größe 175 cm² wurden entsprechend 6 ml Zellsuspension in 25 ml vorgelegtes Kulturmedium ausgesät. Beim nächsten Medienwechsel wurden 25 ml Kulturmedium auf eine 75 cm² Kulturflasche gegeben und dieses Medium eine Woche inkubiert. Bei 175 cm² Kulturflaschen wurden 70 ml für zwei Wochen inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde das Medium in sterilen Röhrchen gesammelt und bei 4 °C und 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in frische Röhrchen überführt und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden maximal bis Passage 30 passagiert und danach verworfen.

Sollten die Zellen eingefroren werden, so wurden die Zellen abtrypsinisiert, um sie vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Die Zellsuspension wurde in einem Röhrchen gesammelt und bei 800 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mit kaltem Einfriermedium auf 1×10⁶ Z/ml eingestellt. Je 1 ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen wurde über Nacht bei 4 °C vorgekühlt und anschließend bei -80 °C im Isotank weitergekühlt. Im Isotank verblieben die Kryoröhrchen für mindestens einen Tag bevor sie zur weiteren Lagerung in den N₂-Tank transferiert wurden.

2.2.3 Stimulation

Um die Aktivierung von Mikroglia zu ermitteln, wurden Stimulationsversuche an adherenten Monokulturen von adulten Mikroglia mit LPS und IL-4 plus LPS durchgeführt. Die Stimulationen erfolgten alle in 96-Well Kulturplatten (BD Primaria™ Clear

96-well Microtest Plate). Hierfür wurden die frisch abgeschüttelten Mikroglia auf eine Zelldichte von 4×10^4 Zellen in 100 μ l verdünnt. In einer 96-Well Kulturplatte wurden je Well 100 μ l der erhaltenen Zellsuspension ausplattiert, sodass die Zellzahl je Well ca. 4×10^4 Zellen betrug. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten, in der sich die Zellen auf dem Boden der Wells absetzen, wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch 120 μ l DMEM⁻ ersetzt. Dadurch wurden Reste von toten Zellen und serumhaltiges Medium entfernt. Die Entfernung des serumhaltigen Mediums ist notwendig, um in den späteren Messungen keine Störeffekte durch das Serum zu messen. Zudem verhindert der Serumentzug eine weitere Proliferation der Zellen. Hierdurch wurde eine Vergleichbarkeit der folgenden Experimente geschaffen. Die in DMEM⁻ enthaltene Glucose (4,5 g/l) und zugegebenes GlutaMAXTM I Supplement (2 mM) ermöglichen das weitere Überleben der Zellen. Alle folgenden Experimente sollten jedoch möglichst zügig durchgeführt werden, da die Kulturbedingungen nicht mehr als optimal anzusehen sind.

Um die klassische Aktivierung der Mikroglia zu messen, wurden die Mikroglia mit 1 μ g/ml LPS stimuliert, nachdem sie 24 Stunden auf der 96-Well Platte geruht hatten (siehe Abbildung 3a).

Für die alternative Aktivierung wurde beim ersten Medienwechsel nach dem Ausplattieren 10 ng/ml IL-4 zum Medium zugefügt und ebenfalls nach 24 Stunden mit 1 μ g/ml LPS stimuliert (siehe Abbildung 3b).

Um Effekte auf die IL-6 Produktion durch IL-4 zu sehen, wurde ein Teil der Zellen für 42 Stunden nur mit 10 ng/ml IL-4 in DMEM⁻ stimuliert. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit DMEM⁻ über 42 Stunden mitgeführt.

Am Ende der Gesamtinkubationszeit von 42 Stunden wurde das Medium zur Bestimmung der Zytokinmenge abpipettiert und auf eine andere 96-Well Platte in die entsprechenden Wells gegeben. Die Platte mit den Zellen wurde zur Bestimmung der Proteinmenge aufbewahrt. Beides wurde bei -80 °C eingefroren.

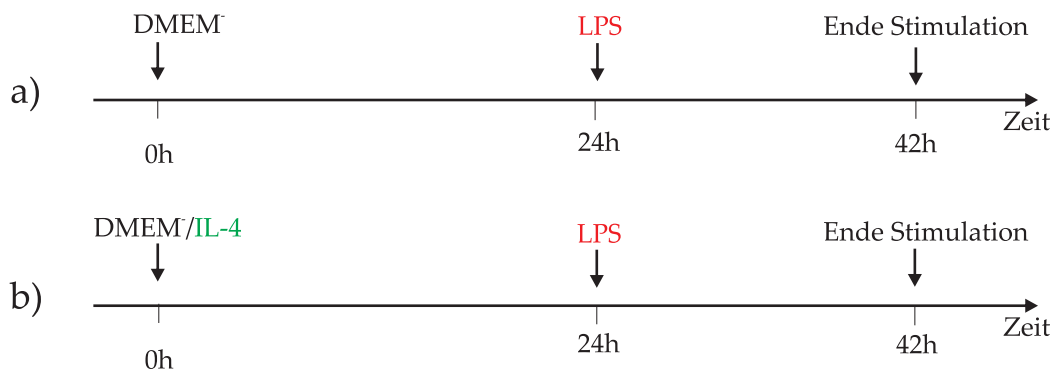


Abbildung 3: Zeitabfolge der Stimulationen mit IL-4 und LPS

a) Stimulation für klassische Aktivierung

b) Stimulation für alternative Aktivierung

LPS = Lipopolysaccharid; IL-4 = Interleukin 4; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium.

2.2.4 Interleukin 6 ELISA

Der Aktivierungsstatus von Mikroglia unter Einfluss der Stimulanzen wurde anhand der Sekretion spezifischer Zytokine bewertet. Für die Quantifikation von freigesetztem IL-6 wurde das ELISA MAXTM Standard SET Mouse IL-6 Kit verwendet, welches nach dem Prinzip des „Sandwich-ELISA“ funktioniert. Bei der Durchführung wurden die Anweisungen und Empfehlungen der Herstellerfirma beachtet. Der Assay wurde auf einer speziellen 96-Well Immuno-Mikrotiter-Platte (Immuno-Plate Maxisorp F96) durchgeführt. Zunächst wurde ein primärer Antikörper („Capture-Antibody“) gegen murines IL-6 auf diese Mikrotiter-Platte aufgebracht. Die Verdünnung der Antikörperflüssigkeit (1:200) erfolgte in einem Beschichtungspuffer („Coating Buffer“). Dieser Puffer (pH 9,5) wurde aus NaHCO₃ (100 mM) und Na₂CO₃ (33,6 mM) hergestellt. Er dient einer erleichterten Immobilisierung des primären Antikörpers auf der Oberfläche der Mikrotiter-Platte. Je Well wurden 100 µl der verdünnten Antikörperlösung aufgetragen und über Nacht bei 4 °C oder für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Laufe

der Inkubation tritt das Immunglobulin über einen Kohlenhydratrest seiner konstanten Region in Wechselwirkung mit den hydrophilen Gruppen der behandelten Polystyren-Oberfläche der Mikrotiter-Platte. Die somit freiliegenden Bindungsstellen der variablen Regionen des gebundenen Antikörpers sind hochspezifisch für eine Proteinstruktur von IL-6.

Nach Ende der Inkubation wurde die Antikörperlösung abgeschüttet, gefolgt von viermaligem Waschen mit einem Waschpuffer („Washing Buffer“: 0,05 % TWEEN20 in 1x-Phosphat buffer salin (PBS)). Dafür wurde jedes Well für etwa eine Minute mit 300 µl Waschpuffer bedeckt, die Flüssigkeit wurde abgeschüttet und die Wells wurden mit frischem Waschpuffer befüllt. Durch die Wirkung als Detergenz löst der Waschpuffer schwache unspezifische Bindungen und spült nicht gebundene Antikörper-Moleküle fort. Nach dem letzten Waschschrift wurden Flüssigkeitsreste besonders gründlich durch Ausklopfen entfernt. Diese Waschprozedur wurde nach jeder folgenden Inkubation identisch wiederholt. Dabei sollte stets beachtet werden, dass es nicht zum Austrocknen der entleerten Wells kommt. Es folgte ein Block-Schritt mit „Assay Diluent“ (1 % BSA in 1x-PBS; 200 µl je Well) über einen Inkubationszeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur. Das „Assay Diluent“ wurde durch Lösen von 1 g pulverförmigem „bovinen Serumalbumin“ BSA in 100 ml 1x-PBS vorbereitet. Die enthaltenen Proteine im BSA sättigen freie Bindungsstellen, z.B. auf der Plastikoberfläche, ab. So werden sowohl unspezifische Bindungen von IL-6 Molekülen an die Plastikoberfläche verhindert und damit das Hintergrundsignal reduziert, als auch eine Stabilisierung der Antikörperbeschichtung erzeugt. Anschließend an den Blockschrift wurden vier Waschschriffe in derselben Art wie zuvor beschrieben durchgeführt. Dann wurden je 50 µl des Probenmaterials aufgetragen, welches aus dem Überstand stimulierter Zellen entnommen worden war. Zusätzlich wurden IL-6-Standard-Proben aufgebracht. Diese wurden, ausgehend von einer Stock-Lösung an rekombinantem IL-6, mit Hilfe einer Verdünnungsreihe in Medium (DMEM⁻) hergestellt. Die Verdünnung des Top-Standards (500 pg/ml) erfolgte Lot-spezifisch unter Beachtung der Angaben des Kits. Von allen Konzentrationen der Standardreihe (0 pg/ml; 7,8 pg/ml; 15,6 pg/ml; 31,25 pg/ml; 62,5 pg/ml; 125 pg/ml; 250 pg/ml; 500 pg/ml) wurden 100 µl je Well ein-

gesetzt.

Um eine erfolgreiche Bindung von IL-6-Molekülen an die „Capture-Antibodies“ zu gewährleisten, wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Auf die Inkubation folgten wiederum vier Waschschriffe. 100 µl einer vorbereiteten Verdünnung (1:200) des sekundären Antikörpers („Detection-Antibody“) in „Assay-Diluent“ wurde auf die gewaschenen Wells gegeben und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Biotin-gekoppelte Sekundär-Antikörper ist wie der primäre Antikörper gegen IL-6 gerichtet. Es handelt sich um einen nicht-kompetitiven ELISA, da die beiden Immunglobuline verschiedene Bindungsmotive am Zielmolekül erkennen. Die Biotinylierung des „Detection-Antibody“ dient dem Nachweis des „Antikörper-IL-6 Antikörper-Sandwich-Komplexes“. Das gekoppelte Biotin-Molekül hat eine hohe Affinität zu Avidin und kann so als Anker für eine Avidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase (HRP) fungieren. Eine Avidin-HRP-Lösung wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in „Assay Diluent“ hergestellt. Nach dem Abwaschen der „Detection-Antibody“-Lösung (identisch zu vorausgegangenen Waschprozeduren) wurden 100 µl dieser Avidin-HRP-Lösung zu jeder Probe gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Einwirkung von Licht sollte während der gesamten weiteren Versuchsdurchführung vermieden werden, um photosensitive Komponenten zu schützen.

Die Platte wurde daher mit Alufolie bedeckt. Der nachfolgende Waschschritt musste fünf Mal wiederholt werden, um ungebundene Avidin-HRP Moleküle möglichst vollständig zu entfernen.

Der letzte Schritt bestand in der Zugabe der „TMB Substrate Solution“. Eine 1:1-Mischung aus der im Kit enthaltenen Reagenz A (H_2O_2) und Reagenz B (TMB-Dihydrochlorid) wurde vorbereitet und mit jeweils 100 µl pro Well eingesetzt. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug etwa 15 Minuten. HRP nutzt zugefügtes 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat für die Reduktion von H_2O_2 , wodurch ein kationisches TMB-Radikal als blau gefärbtes Zwischenprodukt entsteht. Die Bildung des blauen Farbstoffes wurde durch Zugabe von 2N-Schwefelsäure (je 100 µl pro Well) beendet. Dadurch ergab sich ein sofortiger Farbumschlag ins Gelbe. Dieser Vorgang kann

dadurch erklärt werden, dass die Ansäuerung der Lösung die Umsetzung von Schwefelsäure bewirkt und dies in der irreversiblen Inaktivierung des Enzyms endet [73]. Zugleich bildet sich ein gelb gefärbtes Produkt (3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-Diphenochinon-4,4'-Diimmoniumion) aus dem TMB-Radikal [36].

Die Menge an gebildetem Farbstoff wurde über die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb eines Zeitraums von 30 Minuten gemessen. Diese ist direkt proportional zur Konzentration an IL-6 und konnte daher über eine mitgeführte Standardreihe aus den Absorptionswerten berechnet werden.

2.2.5 Protein Assay

Die gemessene Zytokin-Menge sollte in Bezug zur Zellzahl gesetzt werden, um Unterschiede in der Zellzahl zwischen den einzelnen Proben auszugleichen. Zu diesem Zweck wurde die Gesamtprotein-Konzentration in jedem Well bestimmt. Diese wurde mittels eines kalorimetrischen Assays anhand einer Protein-Standardkurve berechnet. Der Protein-Assay wurde mit Hilfe des BioRad DC Protein-Assay Kits nach dessen Anleitung ausgeführt. Die Methode basiert auf dem Lowry-Protokoll für Protein-Messung [64].

Nach vollständiger Abnahme des Überstandes von den adhärennten Zellen in einem Well wurden diese mit 30 µl 1 %-Triton lysiert. Dieses Octylphenol-Derivat ist ein Detergenz, das Proteine löslich macht ohne sie dabei zu denaturieren. Je 5 µl eines Zell-Lysats wurden in das korrespondierende Well einer 96-Well Platte transferiert und mit 25 µl eines Gemisches aus dem mitgelieferten Reagenz A (alkalischer Kupfer-Tartrat-Lösung) und Reagenz S (Tensid) (Verhältnis 50:1) vermischt. Für die Erstellung einer Protein-Standardkurve wurden ebenfalls 5 µl unterschiedlich konzentrierter Proteinlösungen (0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 1,5 mg/ml) eingesetzt. Diese Standard-Proteinlösungen wurden mit Bovines Serumalbumin, Albumin Fraktion V (BSA), gelöst in 1 %-Triton, in entsprechenden Verdünnungen hergestellt. Durch die Zugabe der Reagenz B (Folin-Reagenz) (200 µl) bildete sich ein blauer Farbstoff, dessen Absorption nach ca. 15 Minuten im Photometer bei 750 nm gemessen wurde.

Der Methode liegen zwei Reaktionen zu Grunde: Kupfer(II)-Ionen der alkalischen Tar-

trat-Lösung interagieren mit Peptidbindungen, was zur Bildung von Kupfer-Protein-Komplexen führt. Im Komplex gebundenes Kupfer(II) wird reduziert und sorgt schließlich für die Reduktion des Folin-Reagenzes zu dem Farbstoff Molybdänphosphat. [64] Die gemessene Absorption korreliert mit der Protein-Konzentration, die wiederum ein Maß für die Zellzahl darstellt. Die Protein-Konzentration einer Probe errechnete sich mit Hilfe der Protein-Standardkurve. Die Protein-Konzentration wurde in die Auswertung der Ergebnisse eines ELISAs miteinbezogen. Für jede Probe wurde der Quotient aus Zytokin-Konzentration und Protein-Konzentration gebildet. Dabei musste in die Rechnung miteinbezogen werden, dass die beiden Konzentrationen nicht aus dem gleichen Volumen ermittelt wurden. Um die Zytokin-Konzentration (in 120 µl) auf die Gesamtprotein-Konzentration (in 30 µl) beziehen zu können, wurde letztere geviertelt [5].

$$IL - 6 \text{ Konzentration} \left[\frac{pg}{mg} \right] = \frac{IL - 6 \text{ Konzentration}_{ELISA} \left[\frac{pg}{ml} \right]}{(Proteinkonzentration / 4) \left[\frac{mg}{ml} \right]}$$

2.2.6 Färbungen von Zellen

Nach dem Abschütteln der Mikrogliazellen ist die Verunreinigung durch Astrozyten von Interesse. Um diese zu bestimmen, wurden die Zellen auf Deckgläschen ausplattiert und immunhistochemisch angefärbt. Als Marker für Mikrogliazellen wurde cluster of differentiation molecule 11B (CD11b) verwendet und als Astrozytenmarker glial fibrillary acidic protein (GFAP). Die säuregereinigten und autoklavierten Deckgläschen wurden 30 Minuten lang in einer 32 Well Platte mit PON (1:10) beschichtet. Danach wurden die Deckgläschen zweimal mit destilliertem Wasser und einmal mit DPBS⁻ gewaschen. Pro Well wurden 15x10⁴ Mikroglia in 500 µl DPBS⁻ ausplattiert und für eine Stunde in den Inkubator gestellt. In dieser Zeit heften sich die Zellen an das mit PON beschichtete Deckgläschen an und können so später gefärbt werden. Mit Pinzette und Nadel wurden die Deckgläschen aus den Wells gehoben und auf eine Paraffin-Folie in einer Feuchtkammer umgebettet. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurde jedes Deckgläschen sofort mit 100 µl PBS bedeckt und anschließend noch einmal mit 100 µl gewaschen. Um die Zellen zu fixieren, wurden nun 100 µl 4 % Paraformaldehyd

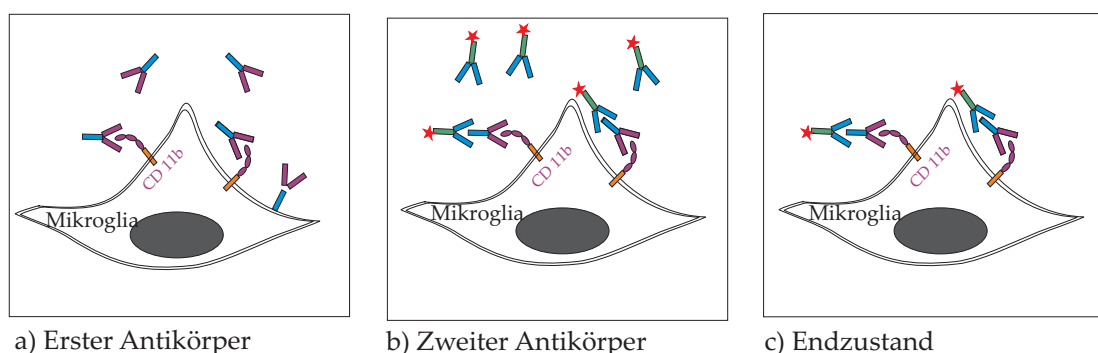
Tabelle 13: Antikörperversdünnungen für die Färbung von Zellen

Ziel	Antikörper	Verdünnung in 0,1 % TWEEN20
CD11b	Rat anti CD11b	1:50
	AlexaFluor 568 goat anti rat	1:200
GFAP	Rabbit anti GFAP	1:100
	AlexaFluor 488 donky anti rabbit	1:200

auf das Deckgläschen gegeben und für 10 Minuten zum Einwirken dort belassen. Es folgte ein Waschschriff, bei dem die Zellen dreimal mit je 100 µl PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen wurden.

Um die Zellmembranen aufzubrechen und somit den Antikörpern den Zugang zu (Trans-)Membranproteinen zu gewähren, wurden die Zellen mit 100 µl 0,1 % Triton für 5 Minuten behandelt. Es erfolgte ein weiterer Waschschriff wie oben beschrieben. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Deckgläschen für 15 Minuten mit 100 µl 1 % BSA in PBS überschichtet. In der Wartezeit wurden die Verdünnungen des Erst-Antikörpers hergestellt (siehe Tabelle 13).

Nach Abnehmen des 1 % BSA in PBS wurden pro Deckgläschen 50 µl des entsprechenden Erst-Antikörpers zugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Auf die Kontrollen wurden je 50 µl 0,1 % TWEEN20 gegeben.

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Fluoreszenzfärbung am Beispiel von CD11b

Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen dreimal für je 5 Minuten mit jeweils 100 µl

0,5 % Tween20 gewaschen. Danach wurden je 50 µl des Zweit-Antikörpers in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 13) auf die Deckgläschen gegeben. Im Dunkeln, damit der Fluoreszenzfarbstoff nicht ausbleicht, ließ man den Antikörper für eine Stunde auf den Zellen. Freie Antikörperreste wurden durch dreimal 5-minütiges Waschen mit je 100 µl 0,5 % TWEEN20 gründlich entfernt. Um die Zellen haltbarer zu machen und sie unter dem Fluoreszenzmikroskop anschauen zu können, wurden die Deckgläschen mit Mowiol eingedeckelt. Dem Mowiol wurde zuvor 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) beigemischt. DAPI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonukleinacid) (DNA) bindet und unter ultraviolettem Licht blau leuchtet. Somit kann man mit Hilfe von DAPI die Zellkerne identifizieren [117].

2.2.7 Färbungen von Schnitten

Für die vergleichende Färbung von Rückenmark und Gehirn bei hemizygoten Tieren B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/JxC57BI/6J und C57BI/6J als Kontrollen, wurden Tiere im Alter von 135 Tagen (entspricht dem Krankheitsonset) und 150 Tagen (entspricht dem Endstadium) verwendet. Um befriedigende Ergebnisse bei der Immunfluoreszenzfärbung zu erhalten, mussten die Mäuse perfundiert werden. Dazu wurden die Tiere zunächst mit 500 mg/kg Thiopental intra peritoneal (i.p.) betäubt und daraufhin mit Natriumchlorid (NaCl) intracardial perfundiert.

Als nächstes erfolgte die Fixierung des Gewebes mit 2 % Paraformaldehyd (PFA), ebenfalls durch Perfusion. Das Gehirn und das Rückenmark in seiner Knochenhülle wurden aus dem Tier präpariert und über Nacht zur weiteren Fixierung in 4 % PFA eingelegt. Da das Wasser in den Zellen diese beim Einfrieren zerstören würde, wird es osmotisch aus den Zellen gezogen. Hierzu verblieb das Gewebe in den nächsten 3–4 Tagen bei 4 °C in einer 30 % Succroslösung. Anschließend wurde das Rückenmarksgewebe aus der Knochenhülle ausgebrochen und in 3 Teile (cervical, thorakal und lumbal) geteilt. Die Rückenmarkabschnitte und das Gehirn wurden einzeln in Tissue Tek eingebettet und bei -80 °C eingefroren. Hier verblieb das Gewebe bis zur Weiterverarbeitung. Am Kryotom wurden die eingefrorenen Gewebe in 16 µm dünne Präparate geschnitten. Auf Objektträger aufgebracht und eingefroren konnten die Schnitte zu einem späteren

Zeitpunkt gefärbt werden.

Zum Färben der Schnitte ließ man die gewünschten Präparate bei Raumtemperatur ca. 25 Minuten auftauen. Mit einem Fettstift wurden die Präparate umkreist. Dieser Schritt dient dazu, Chemikalien und Antikörper zu sparen, da so nicht der gesamte Objektträger bearbeitet werden muss. Die Präparate wurden nun dreimal je fünf Minuten mit einfachem PBS gewaschen. Hierzu wurden in den Bereich des Schnittes je 50 µl PBS mit der Pipette aufgetropft (Bei Gehirnschnitten 100 µl). Nach einer Wartezeit von fünf Minuten konnte das PBS vorsichtig abgeklopft und frisches aufpipetiert werden. Danach wurde der Vorgang noch einmal wiederholt. Dieser Waschschrift dient dem Säubern der Probe, der noch etwaige Gewebereste aus dem Schneidevorgang auswäscht.

Zum Permeabilisieren wurden die Schnitte nun für 45 Minuten mit 0,2 % Triton in PBS in Kontakt gebracht. Auch hier wurden 50 µl für die Rückenmarksschnitte und 100 µl für die Gehirnschnitte verwendet. Triton ist ein nichtionisches Detergenz, das die Zellmembranen aufschließt, jedoch nicht mit den Proteinen agiert [85]. Somit bleiben viele (Trans-)Membranproteine in ihrer Struktur erhalten und können sichtbar gemacht werden. Danach erfolgte wiederum dreimaliges Waschen mit einfachem PBS für je fünf Minuten. Um unspezifische freie Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Präparate für 20 Minuten mit 5 % BSA in Kontakt gebracht. BSA sättigt die vielen unspezifischen Bindungsstellen in den Schnitten und ermöglicht so die spezifische Bindung an die Zielstruktur. Somit wird das Hintergrundleuchten durch BSA deutlich reduziert. Das übrige BSA wurde einmal behutsam abgeklopft. Von dem Erst-Antikörper wurde je 25 µl (50 µl bei Gehirnschnitten) in der entsprechenden Verdünnung in 5 % BSA auf die Schnitte gegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnungen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 0,05 % TWEEN20 in PBS für je fünf Minuten von den Schnitten entfernt. Es folgte ein weiteres Blocken mit 1 % BSA für 30 Minuten.

Daraufhin fand die Detektion mit dem Zweit-Antikörper statt. Hierzu wurde dieser in einer in Tabelle 14 angegebenen Verdünnung auf die Proben gegeben und die Präparate

Tabelle 14: Antikörperversdünnungen für die Färbung von Schnittpräparaten

Ziel	Antikörper	Verdünnung in 5 % BSA / 1 % BSA
CD11b	rat anti CD11b	1:50
	AlexaFluor 568 goat anti rat	1:200
GFAP	rabbit anti GFAP	1:100
	AlexaFluor 488 donkey anti rabbit	1:200

für zwei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Alle folgenden Schritte müssen ebenfalls so gut wie möglich im Dunkeln erfolgen, da sonst der Fluoreszenzfarbstoff am freien Ende des Zweit-Antikörpers ausbleicht. Die ungebundenen Reste des Antikörpers wurden durch dreimaliges Waschen mit 0,05 % TWEEN20 in PBS für je fünf Minuten von den Präparaten entfernt. TWEEN20 sättigt ebenfalls offene, unspezifische Oberflächenbindungsstellen. Um die Präparate haltbarer zu machen, werden sie zum Schluss mit 2–5 µl Mowiol unter einem Deckgläschen eingedeckelt. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftbläschen unter dem Deckgläschen befinden. Dem Mowiol ist DAPI beigefügt, um die Zellkerne anzufärben. Nach zwei Stunden Aushärtezeit bei 4 °C im Dunkeln konnten die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut werden.

2.2.8 Mikroskopieren der Gewebeschnitte

An einem Fluoreszenzmikroskop wurden die zuvor gefärbten Schnitte begutachtet und repräsentative Aufnahmen angefertigt. Dabei wurden die Kontrollen jeweils mit der gleichen Belichtungszeit wie das gefärbte Präparat aufgenommen. Von jedem Präparat wurden Bilder in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.2.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der ELISA-Daten wurde die Software OpenOffice.org Calc 3.4.1 und GraphPad Prism 5 verwendet. Zur Varianzanalyse der Ergebnisse wurde ein one-way ANOVA durchgeführt. Um signifikante Differenzen zwischen einzel-

nen Gruppen von ELISA-Ergebnissen zu ermitteln, wurde anschließend ein Benferroni multiple comparison Test durchgeführt. Bei der Analyse von nur zwei Datensätzen erfolgte die Auswertung über einen abhängigen t-Test. Die gewählten Signifikanzniveaus liegen bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (**).

3 Ergebnisse

In vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe um A. Witting wurde das Verhalten von Mikroglia aus neugeborenen SOD1-Mäusen hinsichtlich ihres inflammatorischen Verhaltens untersucht.

Da die Symptome der Erkrankung bei transgenen SOD1-(G93A)-Tieren ca. am 130. Lebenstag beginnen und die Tiere am 160. Tag das Endstadium erreichen [102], ist das Verhalten der Mikroglia zu diesen Zeitpunkten von Interesse. Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass Mikroglia aus adulten transgenen SOD1-Mäusen auf andere Art auf inflammatorische Stimuli reagieren als die Mikroglia aus gesunden Tieren oder aus neugeborenen Tieren. Ein Verlust der anti-inflammatorischen Aktivierung oder eine verstärkte pro-inflammatorische Aktivierung von transgenen SOD1-Mikroglia könnte die rasche Progression der ALS erklären.

3.1 Fluoreszenzfärbung in SOD1-Mäusen

Um die generelle Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten im SOD1-Tiermodell zu untersuchen, wurden Mikroglia und Astrozyten aus dem Rückenmark von wildtyp und transgenen SOD1-Mäusen um den 130. Tag und den 160. Tag immunhistochemisch angefärbt. Die Präparation der Mäuse und die Herstellung der Schnitte erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Diese Schnitte und ihre Kontrollen aus wildtyp Geschwistertieren wurden, wie im Methodenteil beschrieben, fluoreszenzgefärbt. CD11b wurde dabei als Marker für Mikroglia und GFAP als Astrozytenmarker verwendet. Sowohl CD11b als auch GFAP werden bei einer Aktivierung der Zellen verstärkt exprimiert [111, 100]. Um die Zellkerne darzustellen, wurden diese mit DAPI angefärbt [117].

Die Mikroglia sind in den Schnittpräparaten aus dem Rückenmark von wildtyp Mäusen als filigrane, rot gefärbte Zellen mit langen, verästelten Ausläufern zu sehen (siehe Abbildung 5, erste Spalte). Diese Morphologie haben Mikroglia, wenn sie in ihrer Funktion als Wächter tätig sind [50].

Hingegen erscheinen die Mikroglia in den Rückenmark-Präparaten aus den transge-

nen SOD1-Mäusen abgerundet und verplumpt (siehe Abbildung 5, zweite und dritte Spalte). Die Pfeile markieren exemplarisch aktivierte Mikroglia.

Diese Morphologie entspricht aktivierten Mikroglia. Die morphologische Veränderung der Mikroglia ist ubiquitär im ZNS der transgenen SOD1-Mäuse zu beobachten, wie anhand von Schnittpräparaten aus dem Hirn der Mäuse gesehen werden konnte (Präparate nicht gezeigt).

In Abbildung 6 ist die Astrogliose im Rückenmark der transgenen SOD1-Maus im Vergleich zur wildtyp Maus zu sehen.

Im Verlauf der Erkrankung (Vergleiche 135 d mit 162 d in Abbildung 6) ist eine Zunahme der Gliose zu erkennen, dies kann anhand der verstärkten Expression von GFAP und der morphologischen Veränderung der Astrozyten deutlich gesehen werden. Astrozyten wie auch Mikroglia verändern bei Aktivierung ihr Erscheinungsbild. Sie runden sich ab und verplumpen. Dies ist auf den Bildern deutlich zu erkennen.

Insgesamt ist in den dargestellten Abbildungen 5 und 6 eine starke Aktivierung sowohl der Mikroglia als auch der Astrozyten in den transgenen Gehirnschnitten im Vergleich zu den Schnitten aus gesunden Tieren zu erkennen.

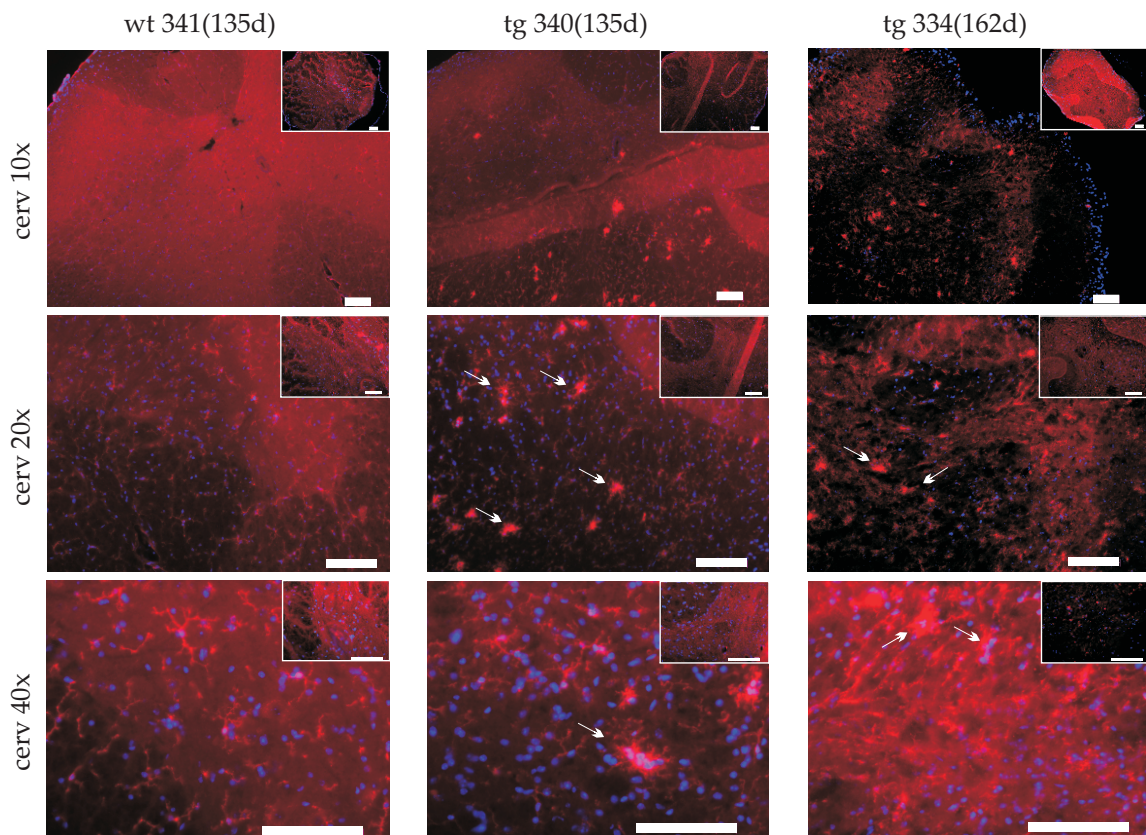


Abbildung 5: CD11b Färbung in Rückenmarksschnitten von SOD1-Tieren

Cervicale 16 µm Schnitte von transgenen Superoxiddismutase 1 (SOD1)-Mäusen an Tag 135 und 162, sowie von einem wildtyp Geschwistertier. Fluoreszenzgefärbt mit einem cluster of differentiation molecule 11B (CD11b) Antikörper (rot) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau) als Marker für die Zellkerne. Die Kontrollfärbungen sind jeweils in der rechten oberen Ecke dargestellt und nur mit dem Zweitantikörper angefärbt. Weiße Balken: 100 µm

Belichtungszeit: CD11b 3,39 s in allen Vergrößerungsstufen; DAPI ca. 200 ms.

Pfeile zeigen beispielhaft auf aktivierte Mikroglia. wt = wildtyp (wt); tg = transgen (tg), cerv = cervikal.

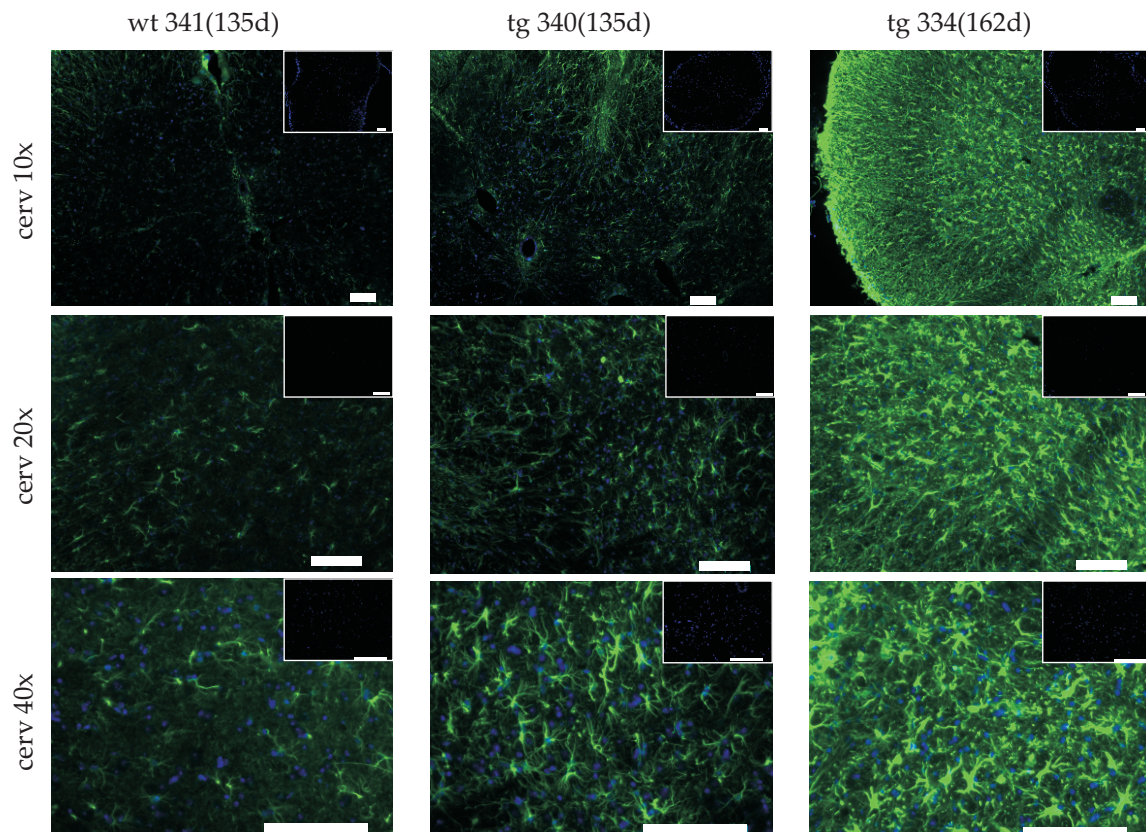


Abbildung 6: GFAP Färbung in Rückenmarksschnitten von SOD1-Tieren

Cervicale 16 μm Schnitte von transgenen Superoxiddismutase 1 (SOD1)-Mäusen an Tag 135 und 162, sowie von einem wildtyp Geschwistertier. Fluoreszenzgefärbt mit einem glial fibrillary acidic protein (GFAP) Antikörper (grün) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau) als Marker für die Zellkerne. Die Kontrollfärbungen sind jeweils in der rechten oberen Ecke dargestellt und nur mit dem Zweitantikörper angefärbt.

Weißer Balken: 100 μm

Belichtungszeiten: GFAP 10 x: 108 ms; 20 x: 231 ms; 40 x: 305 ms; DAPI ca. 200 ms in allen Vergrößerungen. wt = wildtyp; tg = transgen, cerv = cervical.

3.2 Kontrollfärbung der Mikroglia

Da die Mikroglia für die Zytokinbestimmungen und Stimulationen durch Abklopfen aus der Kulturflasche gewonnen werden, besteht immer die Möglichkeit einer Kontamination mit Astrozyten, die sich auch in der Kulturflasche befinden und für das Wachstum der Mikroglia unerlässlich sind. Bei der Messung der Zytokine wären Astrozyten jedoch störend. Daher wurden stichprobenartige Kontrollfärbungen der abgeschüttelten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben mit CD11b und GFAP fluoreszenzgefärbt.

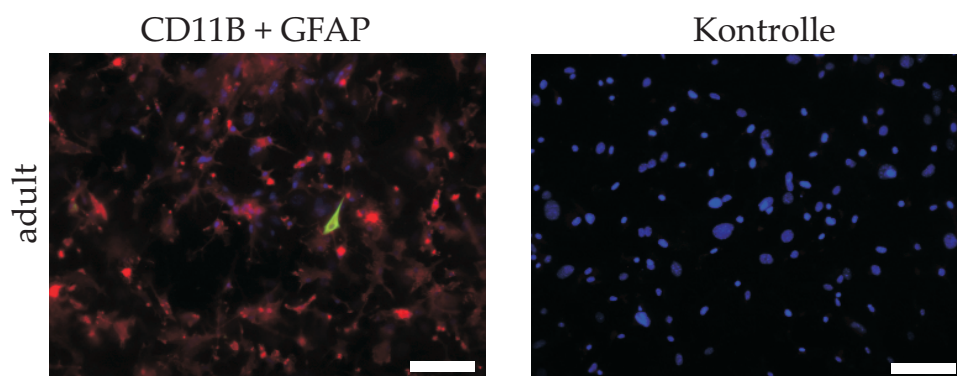


Abbildung 7: Reinheitsfärbung adulter Mikroglia mit CD11b und GFAP

Adulte Zellen nach dem Abschütteln aus der Kulturflasche. Fluoreszenzgefärbt mit einem cluster of differentiation molecule 11B (CD11b) Antikörper (rot) gegen Mikroglia, einem glial fibrillary acidic protein (GFAP) Antikörper (grün) gegen Astrozyten und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau) als Marker für die Zellkerne. Die Kontrollfärbung ist rechts dargestellt und nur mit den Zweitantikörpern und DAPI angefärbt.

Weißer Balken: 100 µm

Belichtungszeiten: CD11b: 2,61 s; GFAP: 1,08 s; DAPI ca. 123,8 ms

Wie in Abbildung 7 exemplarisch zu sehen ist, sind nach dem mechanischen Abschütteln der Kulturflaschen überwiegende rot gefärbte Mikroglia in dem gewonnenen Überstand. Dies ist auf dem linken Bild der Abbildung 7 zu erkennen. Im gesamten Bildausschnitt ist nur ein grün gefärbter Astrozyt zu erkennen. Die blau gefärbten Bereiche

stellen Zellkerne dar. Die abgeschüttelten Mikroglia sind somit nur schwach von Astrozyten kontaminiert.

3.3 Basale Werte für Interleukin 6 in Mikroglia aus adulten und jungen Mäusen

Unsere Hypothese besagt, dass in Mikroglia aus transgenen SOD1-Mäusen die Reaktion auf inflammatorische Stimuli anders als bei Mikroglia aus wildtyp Tieren abläuft. Der morphologische Unterschied der Mikroglia in den Färbungen der Rückenmarksschnitte legt nahe, dass die basale Aktivierung der Zellen aus transgenen SOD1-Mäusen im Vergleich zu der aus wildtyp Tieren verändert ist. Die massive Gliose deutet auf eine stärkere Aktivierung der Mikroglia aus den transgenen Tieren hin.

Untersucht wurden die basalen IL-6 Werte von wildtyp und transgenen Mikroglia. Um einen eventuellen Unterschied bereits in der basalen Aktivierung der Mikroglia zwischen gesunden und kranken Tieren zu zeigen, fand diese Untersuchung jeweils an Mikroglia statt, die aus neugeborenen (0–5 Tage) oder adulten Mäusen (130–160 Tage) präpariert worden waren.

Insgesamt zeigte sich eine signifikante Erhöhung der basalen IL-6 Produktion von adulten Mikroglia im Vergleich zu jungen Mikroglia, unabhängig davon ob diese aus wildtyp oder transgenen Tieren stammten (Abbildung 8). Bei den jungen Mikroglia, sowohl aus transgenen als auch aus wildtyp Tieren, lag die basale IL-6 Konzentration um 1709,5 pg/mg Protein (Standardfehler (Standard Error of the Mean) (SEM) $\pm 556,34$). Bei den adulten Mikroglia lagen die gemessenen IL-6 Werte um die 8859,0 pg/mg Protein (SEM $\pm 1104,55$). Dies entspricht 5-fach höheren basalen IL-6 Werten von adulten Mikroglia im Vergleich zu Mikroglia aus neugeborenen Tieren.

Die Erhöhung der IL-6 Spiegel in adulten Zellen lässt auf eine erhöhte Grundaktivität der Mikroglia in adulten Mäusen schließen.

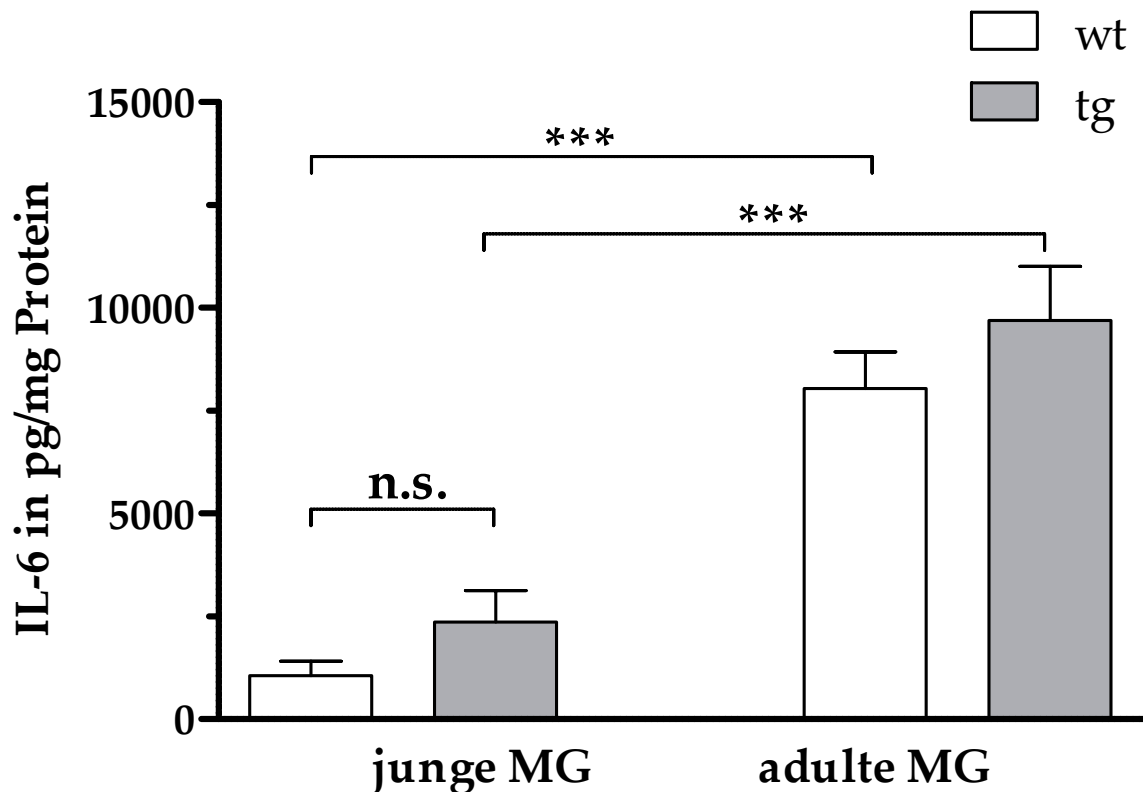


Abbildung 8: Basale IL-6 Werte bei jungen und adulten Mikroglia

Mikroglia (MG) aus jungen und adulten SOD1-Mäusen wurden 42 Stunden in DMEM auf 96-Well Platten inkubiert. Die Konzentration an Interleukin 6 (IL-6) (in pg IL-6 pro mg Protein) wurde wie im Methodenteil beschrieben mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantifiziert und auf die Proteinmenge normiert. Die Werte geben Mittelwerte und Standardfehler (Standard Error of the Mean) (SEM) an. Adulte MG n = 26 – 28 aus 12 – 17 unabhängigen Experimenten; junge MG n = 16 – 26 aus 10 – 12 unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung über one-way-ANOVA, gefolgt von einem Benferroni multiple comparison Test. Signifikanzniveau: ***: $p < 0,001$: Signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen; n.s.: kein signifikanter Unterschied der verglichenen Gruppen. wt = wildtyp; tg = transgen

Bei der Betrachtung der Unterschiede zwischen den basalen IL-6 Werten der transgenen und der wildtyp Zellen zeigten sich leichte Differenzen der Mittelwerte. Der Mittelwert der IL-6 Konzentration bei den jungen wildtyp Mikroglia betrug 1061 pg/mg Protein. Bei den Mikroglia der jungen transgenen Tiere erreichte die IL-6 Konzentration

einen Mittelwert von 2358 pg/mg Protein. Der Unterschied ist jedoch mit $p = 0,86$ nicht signifikant.

Bei den Mikroglia aus adulten Mäusen war der Unterschied zwischen transgenen und gesunden Tieren mit $p = 1,29$ noch geringer. In den Versuchen konnten somit keine signifikanten Unterschiede der basalen IL-6 Sekretion zwischen transgenen und wildtyp Mikroglia gezeigt werden weder bei den Mikroglia aus neugeborenen Mäusen noch bei denen aus adulten Mäusen.

Da es keinen Unterschied der IL-6 Werte zwischen transgenen und wildtyp Zellen der gleichen Altersgruppe gab, wird ein krankheitsbedingter Effekt der erhöhten Sekretion von IL-6 ausgeschlossen.

Der starke altersbedingte Anstieg des basalen IL-6 Spiegels lässt jedoch auf eine generell erhöhte Aktivierung der Mikroglia im Alter schließen.

3.4 IL-6 Werte unter LPS Stimulation in Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen

LPS wird häufig zur Stimulation von Mikroglia verwendet und ist dafür bekannt, bei Makrophagen eine „pro-inflammatorische Aktivierung“ auszulösen. Aktivierte Mikroglia produzieren ein Gemisch an Zytokinen. Zu den proinflammatorischen Zytokinen werden unter anderem TNF- α und Interleukin 6 gerechnet [58]. Die Messung der IL-6 Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA wird in diesen Versuchen als Maß für die „pro-inflammatorische Antwort“ der Mikroglia auf inflammatorische Stimuli (z.B.: LPS) verwendet. Um zu ermitteln, ob die starke Erhöhung der basalen IL-6 Konzentrationen bei adulten Mikroglia noch Reaktionsspielraum auf Stimulation zulässt, wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Hierfür wurden Mikroglia aus adulten und neugeborenen wildtyp und transgenen SOD1-Mäusen für 18 Stunden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Im Kulturüberstand wurde danach die IL-6 Konzentration mittels ELISA bestimmt und ins Verhältnis zur Proteinmenge gesetzt, um eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Messungen herzustellen.

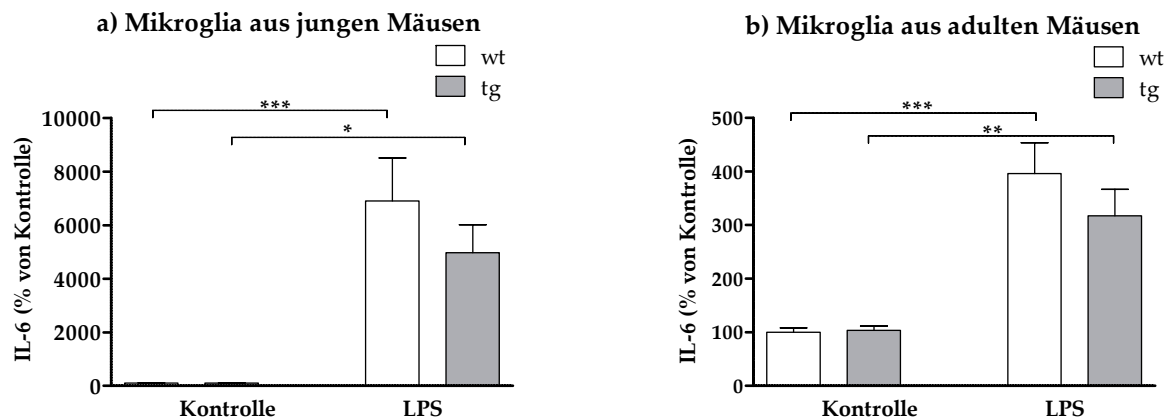


Abbildung 9: IL-6 Antwort auf LPS Stimulation bei Mikroglia aus a) jungen und b) adulten Mäusen im Verhältnis zu den Basalwerten

Stimulation der Mikroglia mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS). Die Messung der Interleukin 6 (IL-6) Werte (in pg/mg) erfolgte 18 Stunden nach der Stimulation mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wie im Methodenteil beschrieben und wurde mit Hilfe der Proteinmenge normiert. Die Ergebnisse wurden ins Verhältnis zu den basalen IL-6 Werten (100 %) gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (Standard Error of the Mean) (SEM). Junge MG n = 16 – 26 aus 10 – 12 unabhängigen Experimenten; Adulte MG n = 26 – 31 aus 12 – 17 unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung über einen one-way-ANOVA gefolgt von einem Benferroni multiple comparison Test.

Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$: Signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen.

wt = wildtyp; tg = transgen

Bei den Mikroglia, die aus neugeborenen Tieren präpariert wurden, steigt die IL-6 Ausschüttung nach LPS Stimulation im Vergleich zum basalen Wert auf das 60-fache. Bei Mikroglia, die aus adulten Mäusen präpariert wurden, lässt sich lediglich eine Steigerung auf das 3-fache feststellen (Abbildung 9). Dies deutet auf eine eingeschränkte Reaktionsmöglichkeit der adulten Mikroglia auf inflammatorische Stimuli hin.

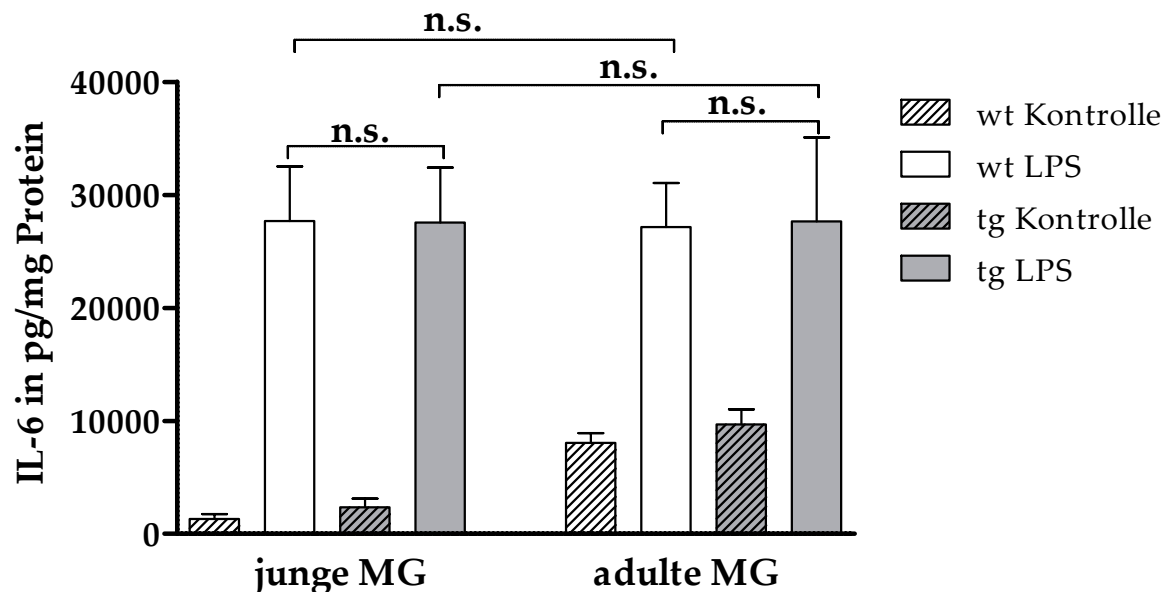


Abbildung 10: Absolute IL-6 Konzentration unter LPS Stimulation bei Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen

Stimulation der Mikroglia (MG) mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS); die Messung der Interleukin 6 (IL-6) Konzentration (in pg/mg) erfolgte 18 Stunden nach der Stimulation mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wie im Methodenteil beschrieben. Die Werte geben Mittelwerte und den Standardfehler (Standard Error of the Mean) (SEM) an. Adulte MG n = 26 – 31 aus 12 – 17 unabhängigen Experimenten; junge MG n = 16 – 27 aus 10 – 12 unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung über einen one-way-ANOVA gefolgt von einem Benferroni multiple comparison Test.

Signifikanzniveau: n.s.: Kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen.

wt = wildtyp; tg = transgen

Werden die absoluten IL-6 Konzentrationen nach 18 Stunden LPS Stimulation genauer betrachtet, so lässt sich kein Unterschied zwischen den Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen erkennen (Abbildung 10). Die IL-6 Konzentrationen nach LPS Stimulation erreichen bei Mikroglia aus jungen Mäusen (Mittelwert jung wt: 27686 pg/mg; Mittelwert jung tg: 27 538 pg/mg) ähnliche Werte wie bei Mikroglia aus adulten Mäusen (Mittelwert adult wt: 27162 pg/mg; Mittelwert adult tg: 27 636 pg/mg).

Diese ähnlichen Werte sprechen dafür, dass hier das Maximum der IL-6 Antwort er-

reicht ist.

Die inflammatorische Reaktionsfähigkeit der adulten Mikroglia aus wildtyp Mäusen und transgenen SOD1-Mäusen auf den LPS Stimulus ist noch vorhanden, auch wenn der Unterschied zu der basalen Aktivierung nicht so groß ist wie bei vergleichbaren Zellen aus neugeborenen Tieren. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass sich die adulten Mikroglia bereits im basalen Zustand nahe an ihrem maximalen Stimulationsniveau befinden.

Zwischen transgenen und wildtyp Tieren der gleichen Altersgruppe ist kein Unterschied der IL-6 Reaktion auf die LPS Stimulation auszumachen. Dies spricht gegen einen direkten Einfluss der SOD1-Mutation auf die Reaktionsweise der Mikroglia.

3.5 Alternative Aktivierung bei Mikroglia aus jungen und adulten SOD1-Mäusen

Die „pro-inflammatorische Aktivierung“ ist die gewebezerstörende Art, in der Mikroglia auf Störungen reagieren. Eine weitere Art stellt die „alternative Aktivierung“ dar. Sie gilt als anti-inflammatorisch und gewebeprotectiv. IL-4 ist dafür bekannt, diesen alternativen Aktivitätszustand in Mikroglia zu triggern.

Um zu klären, ob sich adulte Mikroglia aus wildtyp und transgenen SOD1-Mäusen hinsichtlich der Fähigkeit in den „alternativen Aktivitätszustand“ zu gelangen unterscheiden, wurden die Zellen zunächst mit IL-4 (10 ng/ml) und 24 Stunden später mit LPS (1 µg/ml) stimuliert. Nach weiteren 18 Stunden erfolgte die IL-6 Messung im Kulturüberstand mittels ELISA, wie im Methodenteil beschrieben.

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass IL-4 selbst einen Effekt auf die Ausschüttung von IL-6 hat. Die Ergebnisse der alleinigen Stimulation mit IL-4 sind in Tabelle 15 aufgeführt. Es zeigte sich keine relevante Differenz der IL-6 Sekretion unter IL-4 Stimulation im Vergleich zu den basalen Werten. Eine Stimulation der Mikroglia mit IL-4 alleine beeinflusst die IL-6 Ausschüttung der Zellen nicht.

Tabelle 15: IL-6 Konzentration der Kontrolle im Vergleich zu der Stimulation mit IL-4 bei Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen

Die Messung der Interleukin 6 (IL-6) Werte (in pg/mg) erfolgte 42 h nach der Stimulation mit Interleukin 4 (IL-4) wie im Methodenteil beschrieben und wurde mit Hilfe der Proteinmenge normiert. Die Werte geben Mittelwerte und den Standardfehler (Standard Error of the Mean) (SEM) an. Adulte MG n = 20 – 28 aus 12 – 18 unabhängigen Experimenten; junge MG n = 16 – 26 aus 10 – 12 unabhängigen Experimenten.

Statistische Berechnung über einen one-way-ANOVA gefolgt von einem Benferroni multiple comparison Test.

Signifikanzniveau: $p > 0,05$: n.s..

MG = Mikroglia; wt = wildtyp; tg = transgen

	Kontrolle	IL-4	Signifikanz
junge MG wt	1061 ±348,1	2372 ±1011	n.s.
junge MG tg	2358 ±764,5	1883 ±799,5	n.s.
adulte MG wt	8034 ±889,1	9726 ±1193	n.s.
adulte MG tg	9687 ±1320	7072 ±1502	n.s.

Die „alternative Aktivierbarkeit“ wird durch eine kombinierte Stimulation aus IL-4 und LPS getestet. In Abbildung 3b im Methodenteil ist die Stimulation veranschaulicht.

In die Auswertung wurden nur Versuche mit einbezogen, bei denen die LPS Stimulation funktioniert hat. Als Maß für eine erfolgreiche LPS Stimulation wurde bei jungen Mikroglia mindestens eine Verzehnfachung der IL-6 Konzentration unter LPS Stimulation im Vergleich zu den basalen Werten gefordert und bei den adulten Zellen mindestens eine Verdopplung.

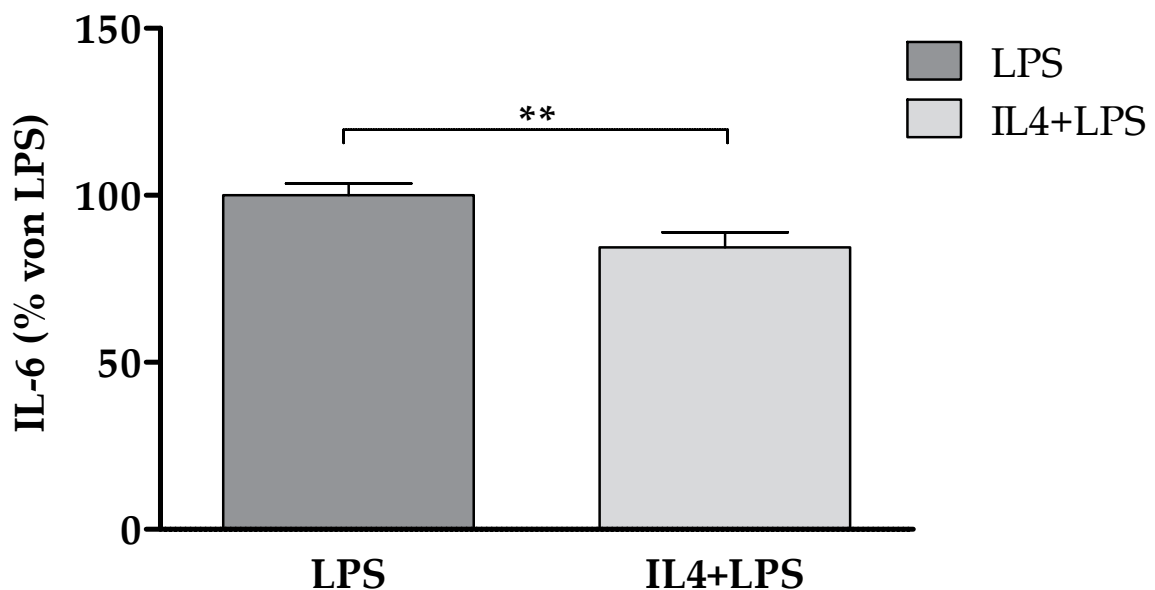


Abbildung 11: Alternative Aktivierung von Mikroglia aus jungen Mäusen

Stimulation der Mikroglia (MG) mit 10 ng/ml Interleukin 4 (IL-4) für 24 Stunden und darauf folgende Stimulation mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), die Messung der Interleukin 6 (IL-6) Werte (in pg/mg) erfolgte 18 Stunden nach der Stimulation mit LPS, wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse wurden ins Verhältnis zu den IL-6 Werten der alleinigen LPS Stimulation gesetzt (100 %). Angegeben sind die Mittelwerte in pg/mg und der Standardfehler (Standard Error of the Mean) . Junge MG n = 10 aus 5 unabhängigen Experimenten.

Statistische Berechnung über einen abhängigen t-Test.

Signifikanzniveau: **: $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen.

Bei Mikroglia aus neugeborenen gesunden Mäusen, die nach der laborüblichen Methode präpariert wurden, ergeben sich die in Abbildung 11 gezeigten Ergebnisse. Es ist eine signifikante Abnahme der IL-6 Konzentration im Kulturüberstand der doppelt stimulierten Mikroglia im Vergleich zu denen mit reiner LPS Stimulation zu sehen. Die Zellen lassen sich durch die Vorstimulation mit IL-4 weniger stark aktivieren. Hier wird von einer „alternativen Aktivierung“ gesprochen.

Der gleiche Versuch zur „alternativen Aktivierung“ wurde mit Mikroglia aus jungen und adulten SOD1-Mäusen (sowohl wildtyp als auch transgen) wiederholt. Diese Zellen wurden nach dem modifizierten Protokoll von Moussaud und Draheim [75] präpariert und mit L929 konditioniertem Medium als Wachstumsstimulanz in Kultur gehalten.

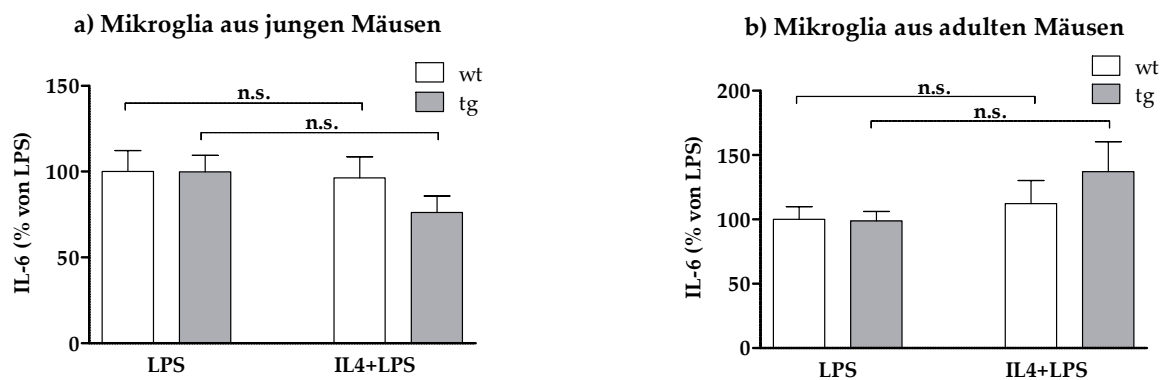


Abbildung 12: IL-6 Antwort auf IL-4+LPS Stimulation in Relation zur LPS Stimulation bei Mikroglia aus a) jungen und b) adulten Mäusen

Stimulation der Mikroglia (MG) mit 10 ng/ml Interleukin 4 (IL-4) für 24 Stunden und darauf folgende Stimulation mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS); die Messung der Interleukin 6 (IL-6) Werte (in pg/mg) erfolgte 18 Stunden nach der Stimulation mit LPS, wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse wurden ins Verhältnis zu den IL-6 Werten der alleinigen LPS Stimulation gesetzt (100 %). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler (Standard Error of the Mean) (SEM). Junge MG n = 13 – 29 aus 6 – 10 unabhängigen Experimenten; Adulte MG n = 22 – 25 aus 8 – 10 unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung über einen one-way-ANOVA gefolgt von einem Benferroni multiple comparison Test.

Signifikanzniveau: n.s.: kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen.

wt = wildtyp; tg = transgen

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, kann in keinem der Versuche eine „alternative Aktivierung“ nachgewiesen werden. Weder bei den Zellen aus wildtyp Tieren noch bei denen aus transgenen Tieren. Bei den Zellen aus jungen Mäusen gibt es eine Tendenz zu einer verringerten IL-6 Ausschüttung unter Vorstimulation mit IL-4 im Vergleich zur

reinen LPS Stimulation (vergleiche Abbildung 12a). Bei den Zellen aus adulten Tieren ist in der Grafik eher eine Erhöhung der IL-6 Konzentration unter Doppelstimulation mit IL-4 und LPS zu sehen, wobei hier die Standardabweichung der einzelnen Werte sehr hoch ist.

4 Diskussion

Die amyotrophe Lateralsklerose ist eine neurodegenerative Erkrankung, die mit einer massiven Neuroinflammation einher geht. Die Neuroinflammation bestätigt sich in den Immunfluoreszenzfärbungen des Rückenmarks der transgenen SOD1-Mäuse, die in Abbildung 5 und 6 zu sehen sind.

Die Rolle der nicht neuronalen Zellen rückte in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung. Interessante Erkenntnisse lieferten die Arbeiten von Boillée et al. (2006) und Beers et al. (2008), in denen gezeigt wurde, dass es sich bei der ALS nicht um eine zellautonome Erkrankung handelt. Vielmehr ist ein Zusammenwirken aus neuronalen und nicht-neuronalen Zellen nötig, um das Vollbild der Erkrankung auszulösen. Besonders die inflammatorische Aktivierung von Mikroglia spielt bei der Pathogenese der ALS eine entscheidende Rolle [15, 32].

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die basale inflammatorische Aktivierung von Mikroglia aus adulten Tieren generell höher ist als die von Mikroglia aus neugeborenen Mäusen (Abbildung 8).

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Reaktion von transgenen und wildtyp Tieren auf die Stimulation mit LPS wie bei Weydt et al. (2004) konnte nicht gezeigt werden. Da sich die transgenen Mikroglia in ihrer Reaktionsweise nicht signifikant von den gesunden gleichen Alters unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass die Alterung der Mikroglia einen stärkeren Einfluss auf die Pathogenese der ALS hat als etwaige Veränderungen in der Reaktionsfähigkeit der Mikroglia durch die SOD1-Mutation selbst.

4.1 Fluoreszenzfärbung im Rückenmark adulter SOD1-Mäuse

Anhand der Fluoreszenzfärbungen mit GFAP und CD11b konnte gezeigt werden, dass im Rückenmark der adulten, transgenen SOD1-Tiere eine massive Gliose stattfindet. Im Krankheitsverlauf ist zwischen Tag 130 und 160 eine Zunahme der Gliose zu beobachten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Berichten vieler weiterer Arbeitsgruppen [49, 2, 115, 15].

Als Marker für die Mikroglia wurde CD11b verwendet. CD11b bildet zusammen mit CD13 den Komplementrezeptor 3 (CR3). CR3 wird bei einer Aktivierung der Mikroglia verstärkt exprimiert und bietet sich dadurch an, aktivierte Mikroglia sichtbar zu machen. Der Rezeptor wird allerdings auch auf „ruhenden Mikroglia“ exprimiert, so dass diese ebenfalls angefärbt werden [111]. Die Morphologie der Zellen und die Intensität der Färbung lässt jedoch Rückschlüsse auf ihren Aktivitätszustand zu. Die Mikroglia sind in den Präparaten der wildtyp Tiere, als feine, ramifizierte, rot leuchtende Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 5, erste Spalte). Die Morphologie in den Präparaten aus wildtyp Tieren entspricht dem „ruhenden Aktivitätszustand“ der Mikroglia.

Bei den Schnittpräparaten transgener SOD1-Mäuse ist eine deutliche morphologische Änderung der CD11b gefärbten Mikroglia im Vergleich zu den Mikroglia aus den Schnitten von wildtyp Mäusen zu erkennen. Die Mikroglia werden rundlich und es sind nur noch kurze Ausläufer zu sehen (siehe Abbildung 5, zweite und dritte Spalte). Die Färbung ist intensiver, was auf eine höhere Expression des CR3 schließen lässt. Die Morphologie der exemplarisch mit Pfeilen markierten Mikroglia entspricht dem „aktivierten Zustand“ [26, 78, 33].

Im Rückenmark aus transgenen SOD1-Tieren finden sich vermehrt „aktivierte Mikroglia“. Dies lässt auf eine starke Neuroinflammation schließen.

Auch bei Hall et al. (1998) zeigte sich ab Beginn der Symptome eine signifikant erhöhte Zahl an aktivierten Mikroglia im ventralen Horn des lumbalen und cervicalen Rückenmarks von transgenen SOD1-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen, gesunden Tieren. Hall et al. (1998) sprechen den Mikroglia eine neurotoxische Wirkung zu, da diese vor allem in der rapid progressiven Phase der Erkrankung aktiv sind.

Auch bei Menschen konnte anhand von Autopsiepräparaten gezeigt werden, dass die Mikrogliaaktivierung mit der Schwere der Krankheit korreliert [15]. Brettschneider et al. (2012) geben zu bedenken, dass diese Aktivierung nicht zwingend auf einen negativen Effekt der Mikroglia hindeuten muss, da diese durchaus auch neuroprotektive Effekte ausüben können [125]. In einer Studie konnte mit Hilfe von Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/Computer Tomographie (CT) gezeigt werden, dass sich die Mikrogliaaktivierung bei ALS Patienten nicht nur auf die motorischen Teile des

ZNS beschränkt, sondern nahezu überall im ZNS anzutreffen ist [106].

Diese generelle Aktivierung der Mikroglia spiegelt sich auch in den Fluoreszenzfärbungen der vorliegenden Arbeit wieder. Gut ist eine Zunahme der, nach morphologischen Gesichtspunkten, „aktivierten Mikroglia“ zu sehen.

All diese Ergebnisse unterstreichen die bedeutende Rolle der Mikroglia im Krankheitsverlauf der ALS.

Eine weitere Gliazelle, der im Rahmen der ALS große Bedeutung beigemessen wird, ist die Astrogliazelle. Diese wurde ebenfalls mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen im ZNS von adulten SOD1-Mäusen dargestellt.

Als Marker für die Astrozyten wurde GFAP verwendet. GFAP ist ein Intermediärfilament, das bei Aktivierung der Astrozyten verstärkt exprimiert wird [100]. Da GFAP ohne Aktivierung nicht auf allen Astrozyten exprimiert wird, bildet es einen guten Marker für die Aktivierung der Astrozyten [99].

In den Präparaten der wildtyp Tiere sind die Astrozyten als feine, längliche Zellen zu erkennen (Abbildung 6, zweite und dritte Spalte). Die Astrozyten gelten in dieser Form als nicht aktiviert. In den Präparaten aus transgenen SOD1-Mäusen sind mehr Astrozyten zu erkennen und die Zellen stellen sich verdickt dar (Abbildung 6, zweite und dritte Spalte). Dies lässt auf massive Aktivierung der Astrozyten schließen. Zwischen dem Beginn der Symptome (ca. 130. Tag) und dem Endstadium (ca. 160. Tag) ist eine Zunahme der Gliose zu sehen (vergleiche zweite und dritte Spalte der Abbildung 6).

Dies deutet auf eine starke Neuroinflammation der transgenen SOD1-Tiere hin, die sich mit fortschreitendem Krankheitsverlauf noch verstärkt.

Auch McGeer und McGeer (1995) beschreiben die Gliose als ein Charakteristikum der ALS. Ähnliche Ergebnisse berichten auch Hall et al. (1998). In ihren Untersuchungen stellten sie eine lebenslang erhöhte Zahl der aktivierten Astrozyten in Rückenmarksschnitten von transgenen SOD1-Tieren im Vergleich zu denen von wildtyp Tieren fest. Der Unterschied zwischen wildtyp und transgenen Tieren war bei Hall et al. (1998) jedoch nur um den hundertsten Lebenstag der Mäuse signifikant erhöht. Danach stieg die Zahl der aktivierten Astrozyten auch in den wildtyp Tieren an. Dies deutet darauf

hin, dass der Astrogliose möglicherweise auch ein Alterungseffekt zugrunde liegt.

Ob die gesehene Aktivierung der Gliazellen von den Mikroglia und Astrozyten selbst ausgeht und diese damit krankheitsverursachend sind oder ob die Gliazellen lediglich auf Faktoren in ihrer Umgebung reagieren, lässt sich anhand der Färbungen nicht beurteilen.

4.2 Erhöhte basale IL-6 Werte bei Mikroglia aus adulten Mäusen

Bei der Untersuchung der basalen Ausschüttung von IL-6 zeigten sich deutlich erhöhte Werte der basalen Zytokinsekretion bei Mikroglia aus adulten Mäusen im Vergleich zu den Mikroglia aus neugeborenen Mäusen. Die adulten Mikroglia erscheinen im Vergleich zu jungen Mikroglia voraktiviert.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Godbout und Johnson (2004) und Sierra et al. (2007), die in Gliazellen aus alternden Gehirnen eine gesteigerte IL-6 Konzentration und eine erhöhte Rate an IL-6 messenger Ribonukleinsäure (mRNA) feststellten.

Auch weitere pro-inflammatorische Zytokine sind in gesunden, älteren Gehirnen erhöht. Dazu zählen TNF- α , IL-1b und IL-12b [98, 23].

Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die gesteigerten basalen IL-6 Konzentrationen der adulten Mikroglia. Eine Möglichkeit ist die Art der Gewinnung der Mikroglia, die diese womöglich aktiviert. Primäre Mikroglia-kulturen wurden lange Zeit nur aus neugeborenen Tieren gewonnen, da die Anzucht adulter Zellen in vitro nicht gelang.

2010 stellte die Arbeitsgruppe um Moussaud und Draheim ein Protokoll zur Isolation und Kultivierung adulter Mikroglia vor [75].

Wie bei Moussaud und Draheim (2010) wurden in den hier beschriebenen Versuchen Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen verglichen.

Da die neugeborenen Mäuse nicht perfundiert werden, wurde dies, anders als bei Moussaud und Draheim (2010), bei den adulten Tieren in dieser Studie nicht vorgenommen.

Da hier junge und adulte Mikroglia gleich behandelt wurden, erscheint diese Überlegung eher unwahrscheinlich.

Die Zellausbeute der Kulturen ohne Wachstumsfaktoren war bei den adulten Zellen so gering, dass der Überstand einer L929 Linie sowohl bei den Kulturen der Mikroglia aus jungen wie auch aus adulten Mäusen zum Einsatz kam. Auch die Zugabe von M-CSF in Form von L929 konditioniertem Medium als Wachstumsfaktor könnte die Zellen in Richtung der „klassischen Aktivierung“ stimulieren. Eine Studie von Vidyadaran et al. (2009) konnte zeigen, dass die Zugabe von M-CSF zu Mikrogliaulturen aus neugeborenen Mäusen keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand der Mikroglia hat. Das L929 konditionierte Medium enthält allerdings nicht ausschließlich M-CSF. L929 konditioniertes Medium wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch den Kulturen der jungen Mikroglia beigefügt. Das konditionierte Medium ist möglicherweise für eine erhöhte IL-6 Ausschüttung verantwortlich, die unterschiedlichen Konzentrationen an IL-6 zwischen jungen und adulten Mikroglia erklärt dies jedoch nicht.

Ein weiteres Problem stellt die lange Zeit dar, die Mikroglia in Kultur gehalten werden. Bei adulten Mikroglia sind dies mindestens vier Wochen bis die Mikroglia eine ausreichende Ernte bieten. Junge Mikroglia brauchen bedeutend kürzere Kultivierungszeiten, können jedoch auch über längere Zeit in Kultur gehalten werden.

Eine Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine mit zunehmendem Alter tritt nicht allein in Zellen aus Kulturen auf, sondern kann auch in der Peripherie gesunder Menschen [113, 31] und Tiere sowie im Gehirn gesunder, nicht stimulierter Mäuse [122] gemessen werden. Diese Daten sprechen gegen einen Effekt, der nur auf der Kultivierung im Labor basiert.

Daynes et al. (1993) vertritt die Auffassung, dass die erhöhten IL-6 Werte zum normalen Altern gehören. Ältere Mikroglia haben schon viele Aktivierungen hinter sich, sei es durch Infektionen, Mikrotraumata oder natürlich absterbende Zellen. Dies in Summe führt zu einem „Priming“ der Zellen und somit zu einer konstant erhöhten basalen Sekretion pro-inflammatorischer Botenstoffe. Die Erhöhung der IL-6 Sekretion und somit der basalen Aktivierung bei Mikroglia aus älteren Mäusen legt eine stärkere „klassische Aktivierung“ der adulten Mikroglia nahe [98, 39].

Mikroglia schütten pro- und anti-inflammatorische Zytokine aus, die sich normalerweise die Waage halten. Dieses System gerät mit zunehmendem Alter leichter aus dem Gleichgewicht. Dies macht alternde Gehirne und den ganzen Organismus anfälliger für Störungen und Krankheiten [76]. Das „Priming“ der Mikroglia und die erhöhten basalen Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen begünstigen den Beginn und das Fortschreiten von neurologischen Erkrankungen [76, 39].

4.3 Kein Unterschied der basalen IL-6 Werte zwischen Mikroglia aus transgenen und wildtyp Mäusen

In der hier vorliegenden Arbeit waren weder die basalen IL-6 Werte der jungen noch der adulten transgenen Mikroglia signifikant höher als die jeweiligen Werte der gesunden Mikroglia. Möglicherweise ist bei der starken Streuung der Ergebnisse die n-Zahl zu niedrig, um eventuelle Unterschiede zu sehen. Auch eine generelle Voraktivierung durch die Kulturbedingungen ist denkbar. Dies könnte kleinere Unterschiede, die in vivo auftreten, maskieren.

Zu gleichen Ergebnissen kam eine Studie von Weydt et al. (2004), in der Mikroglia aus neugeborenen und 60 Tage alten SOD1-Tieren mit wildtyp Zellen verglichen wurden. Die basalen Werte der pro-inflammatorischen Zytokine hatten in wildtyp und transgenen Zellen ähnliche Konzentrationen. Veränderte Zytokinwerte zwischen transgenen (SOD1) und wildtyp Zellen ließen sich bei Weydt et al. (2004) erst nach Stimulation der Mikroglia messen.

Jimenez et al. (2008) hingegen zeigte bei adulten transgenen Alzheimer-Mäusen eine Verlagerung der Mikrogliareaktion hin zur pro-inflammatorischen Antwort. Bei Jimenez sind die Werte jedoch nicht als basal anzusehen. Die Werte stammen nicht aus einer „ruhenden“ Mikrogliakultur, sondern aus Gehirnschnitten oder aus stimulierten Kulturen neugeborener Mäuse. Dabei sind die Mikroglia dem missgefalteten A β -Protein ausgesetzt.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie legen nahe, dass das mutierte SOD1-Gen selbst keinen Einfluss auf die basale IL-6 Ausschüttung hat. Die Mikroglia aus den transgenen Tieren sind basal nicht „aktivierter“ als jene aus gleichaltrigen wildtyp Tieren. Dies stützt die Theorie, dass die Mikrogliaaktivierung auf einen Alterungseffekt zurückzuführen ist, der durch die Anwesenheit von inflammatorischen Reizen gefördert wird. Mögliche Unterschiede in der Reaktionsweise von Mikroglia aus wildtyp und transgenen Tieren könnten sich bei Stimulation der Zellen demaskieren.

4.4 Stärkere Erhöhung der IL-6 Werte bei Mikroglia aus jungen Mäusen unter LPS Stimulation im Vergleich zu Mikroglia aus adulten Mäusen

Um eventuelle Reaktionsunterschiede zwischen Mikroglia aus transgenen und wildtyp Tieren auf inflammatorische Stimuli sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Die Stimulation mit LPS ist eine bewährte Methode, um bei Mikroglia eine „pro-inflammatorische Aktivierung“ auszulösen. Dies äußert sich durch eine vermehrte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-1 β .

Die Stimulation mit LPS rief in den durchgeführten Versuchen sowohl bei jungen als auch bei adulten Mikroglia eine starke Erhöhung der IL-6 Konzentration hervor. Der Anstieg der IL-6 Konzentration nach LPS Stimulation im Verhältnis zu den basalen Werten war bei Zellen aus neugeborenen Mäusen um ein Vielfaches höher als bei Mikroglia aus adulten Mäusen. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, zeigte sich bei jungen Zellen eine Konzentrationserhöhung von IL-6 um ca. das 60-fache zum Basalwert im Vergleich zu einer 3-fachen Erhöhung bei adulten Mikroglia.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Publikationen von Godbout et al. (2005), die eine zunehmende IL-6 mRNA Konzentration unter LPS Stimulation mit dem Alter feststellten. In der Studie von Godbout et al. (2005) werden jedoch erwachsene mit alternden Tieren verglichen. Die erwachsenen Tiere sind im Alter von 3–6 Monaten. Dies entspricht den adulten Tieren in der vorliegenden Studie. Des Weiteren wurden die Zellen nicht kultiviert. Die Messung der IL-6 Spiegel erfolgt direkt aus der Maus nach

einer in vivo Gabe von LPS. Somit ist nicht eindeutig, welche Zellen die erhöhten IL-6 Spiegel verursachen. Die beiden Untersuchungen sind somit nur bedingt vergleichbar. Xie et al. (2003) konnten nur bei kultivierten Mikroglia aus dem Hypocampus von Ratten eine Zunahme der IL-6 Antwort mit dem Alter auf die Stimulation mit LPS feststellen. Bei Mikroglia aus anderen Hirnarealen war keine Zunahme der IL-6 Antwort auf LPS mit dem Alter zu erkennen. Auch bei Xie et al. (2003) galten drei Monate alte Tiere als die junge Population.

Wird nicht das Verhältnis zu den Basalwerten betrachtet, sondern die absolute Konzentration der IL-6 Werte, die nach der LPS Stimulation gemessen werden, zeigen sich zwischen jungen und adulten Mikroglia annähernd gleiche Werte (Abbildung 10). In den vorliegenden Messergebnissen ist keine Veränderung der absoluten IL-6 Konzentration unter LPS Stimulation bei Mikroglia aus adulten Mäusen im Vergleich zu den Zellen aus jungen Mäusen zu erkennen.

Somit passen die Ergebnisse zu der Studie von Xie et al. (2003), die bei den meisten Mikroglia keine Zunahme für die IL-6 Antwort mit dem Alter feststellen konnten.

Die annähernd gleichen IL-6 Werte zwischen Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen sprechen dafür, dass mit der LPS Stimulation das Maximum der IL-6 Antwort von Mikroglia erreicht wird und sich dieser Wert auch mit dem Altern nicht ändert.

Die inflammatorische Reaktionsfähigkeit der adulten Mikroglia aus wildtyp Mäusen und transgenen SOD1-Mäusen auf den LPS Stimulus ist noch vorhanden, auch wenn der Unterschied zu der basalen Aktivierung nicht so groß ist wie bei vergleichbaren Zellen aus neugeborenen Tieren. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass sich die adulten Mikroglia bereits im basalen Zustand nahe an ihrem maximalen Stimulationsniveau befinden.

4.5 Kein Unterschied der IL-6 Werte zwischen Mikroglia aus transgenen und wildtyp Mäusen nach LPS Stimulation

Zwischen den Zellen aus wildtyp und transgenen Tieren ließ sich in der jeweiligen Altersgruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den IL-6 Antworten auf die LPS Stimulation feststellen. Zum Teil stehen diese Ergebnisse im Einklang mit den Untersuchungen von Weydt et al. (2004).

Bei den Zellen aus neugeborenen Mäusen konnten Weydt et al. (2004) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der IL-6 Produktion auf LPS Stimulation zwischen transgenen und wildtyp Zellen feststellen.

Für die Mikroglia aus adulten Mäusen zeigte sich in den Untersuchungen von Weydt et al. (2004) eine erniedrigte IL-6 Ausschüttung durch transgene SOD1-Mikroglia nach LPS Stimulation im Vergleich zu den Zellen aus wildtyp Tieren.

Möglicherweise ist die starke Streuung der Ergebnisse in der vorliegenden Studie dafür verantwortlich, dass in den hier gezeigten Ergebnissen kein deutlicher Effekt zwischen Mikroglia aus adulten wildtyp bzw. transgenen Mäusen gesehen werden kann.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse sind die verschiedenen Zeitpunkte der IL-6 Messung. Weydt et al. (2004) messen an Tag 60, in der hier vorliegenden Studie wurde zwischen 135. und 160. Tag gemessen. In der Zeit zwischen diesen Messpunkten hat möglicherweise eine Veränderung der Mikrogliaaktivierung in den Tieren stattgefunden.

Auch gilt die ALS als eine nicht-zellautonome Erkrankung. Mikroglia werden durch viele andere Zellen beeinflusst, vor allem Neurone, Lymphozyten und Astrozyten [6, 121, 22]. Möglicherweise fehlen diese Zellen mit ihrer stimulierenden oder hemmenden Wirkung in Kultur, um Zytokinveränderungen bei den transgenen SOD1-Mikroglia zu sehen. Des Weiteren sind Mikroglia nicht die einzigen Produzenten von IL-6 im ZNS wie Gruol und Nelson (1997) schreiben. Dies kann Differenzen zwischen Studien erklären, je nachdem wie stark die Kulturen mit Astrozyten oder anderen Zellen des ZNS kontaminiert sind.

Zudem werden Mikroglia in der ALS durch beschädigte Neurone und die Anwesen-

heit von missgefalteten SOD1-Proteinaggregaten aktiviert [52, 95]. Diese Einflüsse sind unter Kulturbedingungen stark reduziert.

Eine gleichzeitige Untersuchung weiterer pro- und anti-inflammatorischer Zytokine zu verschiedenen Kultur- und Lebenstagen wäre hier noch nötig, um genauere Aussagen über die Veränderung der Aktivierungszustände der Mikroglia zu erlangen. Unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit kann keine direkte Beeinflussung der „pro-inflammatorischen Aktivierung“ von Mikroglia durch das mutierte SOD1-Gen beobachtet werden.

4.6 Keine alternative Aktivierung der Mikroglia nachweisbar

Die „alternative Aktivierung“ oder auch M2 Reaktion der Mikroglia hat anti-inflammatorische Effekte und gewebeprotective Eigenschaften. Die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine dient unter anderem dazu, die „pro-inflammatorische Aktivierung“ einzudämmen. Eine Abschwächung der „alternativen Reaktionsweise“ oder gar Aufhebung mit dem Alter oder bei Genmutationen könnte überschießende Entzündungen verursachen und ein Baustein in der Erklärung für das Auftreten bzw. Ausbrechen von neurodegenerativen Erkrankungen sein.

Um die „alternative Aktivierung“ bei Mikroglia auszulösen, werden diese mit dem antiinflammatorischen Zytokin IL-4 vorstimuliert. Auf eine nachfolgende Stimulation mit LPS reagieren Mikroglia im „alternativ aktivierten Zustand“ mit einer deutlich geringeren Ausschüttung an pro-inflammatorischen Zytokinen.

In Vorversuchen an Mikroglia aus gesunden, neugeborenen Mäusen war eine deutliche Inhibition der IL-6 Antwort auf LPS Stimulation nach IL-4 Vorstimulation zu sehen (Abbildung 11). Indirekt konnte durch den Rückgang der IL-6 Antwort gezeigt werden, dass sich die Zellen nach IL-4 Vorstimulation in einem „alternativ aktivierten Zustand“ befanden.

In den Versuchen an Mikroglia aus transgenen und wildtyp SOD1-Tieren war dieser Effekt nicht zu beobachten (Abbildung 12a und 12b).

Bei den Mikroglia aus neugeborenen Mäusen zeigte sich lediglich eine Tendenz zu er-

niedrigsten IL-6 Werten unter IL-4 Vorstimulation auf die LPS Stimulation, allerdings war diese nicht signifikant.

Bei den Zellen aus adulten Mäusen erschienen die IL-6 Werte nach IL-4 Vorbehandlung und anschließender LPS Stimulation sogar höher als unter reiner LPS Stimulation. Allerdings waren auch diese Unterschiede nicht signifikant.

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben der „alternativen Aktivierung“ bei adulten Mikroglia wäre, dass IL-4 selbst einen Einfluss auf die IL-6 Produktion hat. Daher wurde dies an einer Stimulation der Mikroglia nur mit IL-4 getestet (Tabelle 15). Es zeigte sich, dass IL-4 die IL-6 Antwort nicht beeinflusst.

Ein weiterer Grund für das Ausbleiben der „alternativen Aktivierung“ in sämtlichen Versuchsgruppen außer den Vorversuchen ist möglicherweise die Art der Präparation. In den Vorversuchen wurden neugeborene Mikroglia nach der laborüblichen Methode präpariert und ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. In den Hauptversuchen wurden alle Mikroglia nach dem modifizierten Protokoll von Moussaud und Draheim (2010) behandelt. Die Behandlung der Zellen und die vergleichsweise lange Dauer der Zellgewinnung haben die Zellen möglicherweise voraktiviert, so dass eine Stimulation der „alternativen Aktivierung“ nicht mehr möglich war.

Einen weiteren Problemfaktor stellt das L929 konditionierte Medium dar. Dieses wurde über die gesamte Kulturdauer sowohl bei jungen als auch adulten Mikroglia als Wachstumsfaktor verwendet. Konditioniertes Medium durch die L929 Zelllinie wird häufig als Wachstumsfaktor für Makrophagen verwendet, da es den Wachstumsfaktor M-CSF enthält. Vidyadaran et al. (2009) konnten in einer Studie zeigen, dass mit M-CSF behandelte Zellen keine Veränderung in ihrer Reaktionsweise im Vergleich zu Zellen ohne Wachstumsfaktor aufweisen. In der Studie wurde jedoch nur die „proinflammatorische Aktivierung“ mittels LPS getestet. Die „alternative Aktivierung“ der Zellen wurde nicht geprüft.

IL-6 ist nur ein indirekter Marker für die „alternative Aktivierung“, da hier aus einem Rückgang des Zytokins auf den Aktivitätszustand der Zellen geschlossen wird. Es sollte hier noch eine Messung der Arginase Aktivität oder der Zytokine IL-10 und Interleukin 1 β (IL-1 β) als direkte Marker für die „alternative Aktivierung“ folgen. Diese

Botenstoffe werden von Mikroglia ausgeschüttet, welche sich im „alternativen Aktivierungszustand“ befinden [58].

Lee et al. (2013) zeigten kürzlich, dass mit dem Alter von Mikroglia ein Trend zur „klassischen Aktivierung“ besteht. Der „alternative Aktivierungszustand“ war mit steigendem Alter zunehmend schwächer ausgeprägt. Mit fortschreitendem Alter können die Mikroglia die Inflammation, die durch Verletzungen, Fremdkörper oder pro-inflammatorische Zytokine ausgelöst wird, nur noch langsam eindämmen.

Dies ist eine mögliche Erklärung für den Ausbruch von neurodegenerativen Erkrankungen, die schon von Geburt an angelegt sind, wie zum Beispiel die ALS.

Zwischen Mikroglia aus wildtyp und transgenen Mäusen zeigte sich in den Versuchen kein Unterschied der „alternativen Aktivierbarkeit“ durch IL-4 Vorbehandlung. Dies lässt vermuten, dass das mutierte SOD1-Gen unter den Bedingungen dieser Studie keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die „alternative Aktivierbarkeit“ von Mikroglia hat.

Alle Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass für die starke Aktivierung der Mikroglia bei der ALS nicht die Genmutation im SOD1-Gen, sondern das Altern der Zellen und ihre Umgebung verantwortlich ist. In den meisten Mikroglia scheint mit der Zeit die „pro-inflammatorische Aktivierung“ überhand zu nehmen, bedingt durch die Summe der Aktivierungen, die jede Zelle im Laufe ihres Lebens erfährt.

Möglicherweise sind die Auslöser für eine Aktivierung der Mikroglia bei Tieren mit der SOD1-Mutation häufiger als bei gesunden Tieren. Dadurch verlieren die Mikroglia hier eventuell früher ihre Fähigkeit anti-inflammatorisch zu reagieren und tragen somit durch eine pro-inflammatorische Reaktionsweise zur Progression der Krankheit bei.

Weitere Untersuchungen zur Veränderung des Reaktionsprofils von transgenen SOD1-Mikroglia unter Berücksichtigung der Alterung könnten weiteren Aufschluss über die Rolle und das Verhalten der Mikroglia in der ALS geben.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine neurodegenerative Erkrankung mit nicht zellautonem Ursprung. Die auslösenden Genmutationen der ALS sind von Geburt an in alle Zellen vorhanden, die Erkrankung manifestiert sich jedoch erst im mittleren Lebensalter. Mikroglia spielen mit ihrer „pro-inflammatorischen Reaktionsweise“ im Krankheitsgeschehen der ALS eine wichtige Rolle, indem sie durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine den Krankheitsverlauf beschleunigen.

Hintergrund dieser Arbeit war zu klären, ob Mikroglia aus transgenen Superoxiddismutase 1 (SOD1) Mäusen, einem murinen Modell der ALS, anders mit inflammatorischen Reizen umgehen als Mikroglia aus gesunden Tieren. Zudem sollte geklärt werden, ob das Altern der Mäuse, aus denen die Mikroglia stammen, einen Einfluss auf die Reaktionsweise der Mikroglia hat. Hierzu wurden primäre Mikroglia-Kulturen aus neugeborenen und adulten (130–160 Tage alten) SOD1-Mäusen hergestellt. Dabei wurden sowohl transgene als auch wildtyp Mäuse untersucht. Die transgenen, adulten Tiere zeigten bereits physische Symptome der ALS.

Die Zellen wurden mit Hilfe von Lipopolysaccharid (LPS) zu einer „pro-inflammatorischen Aktivierung“ und mit Interleukin 4 (IL-4) Vorstimulation zu einer „anti-inflammatorischen Aktivierung“ angeregt. Durch die Quantifizierung des Zytokins Interleukin 6 (IL-6) im Überstand, mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), wurde die Aktivierung der Mikroglia nach der Stimulation ermittelt.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Mikroglia aus neugeborenen und adulten Mäusen. So waren die basalen IL-6 Konzentrationen bei Mikroglia aus adulten Mäusen bedeutend höher als bei den Mikroglia aus jungen Mäusen. Auf die Stimulation mit LPS reagierten die Mikroglia aus jungen Mäusen mit einem verhältnismäßig stärkeren Anstieg der IL-6 Werte im Vergleich zum Basalwert als die Zellen aus adulten Mäusen. Die Endkonzentrationen blieben jedoch bei jungen und adulten Mikroglia annähernd gleich.

Zwischen Mikroglia aus gesunden und transgenen Mäusen war in keinem der Experimente ein Unterschied in der Reaktionsweise feststellbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten keinen direkten Einfluss der SOD1-Mutation auf die getesteten Reaktionsweisen der Mikroglia in Kultur zeigen. Gezeigt werden konnte eine deutliche Veränderung der Reaktionsweise der Mikroglia in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

Mikroglia schütten sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Substanzen aus. Diese halten sich idealerweise die Waage und sorgen dafür, dass keine der Reaktionen überschießt. Es scheint jedoch, dass mit steigendem Alter und vorangegangenen Inflammationen die „pro-inflammatorische Aktivierung“ zunehmend überhand gewinnt. Für die ALS bedeutet dies, dass die Inflammation, die unter anderem durch die Anwesenheit der missgefalteten SOD1-Proteine und die untergehenden Neurone ausgelöst wird, nicht mehr in Schach gehalten werden kann und die Krankheit ab einem gewissen Zeitpunkt rasch progredient verläuft.

Um die Veränderungen in der Reaktionsweise der Mikroglia weiter zu verstehen, wären Messungen der Reaktionsweise zu verschiedenen Zeitpunkten und von mehr Zytokinen und Oberflächenmolekülen nötig.

Ein tieferes Verständnis über die Veränderungen der Reaktionsweisen der Mikroglia mit dem Alter, könnte neue Wege zu Prophylaxe und Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen eröffnen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Aggarwal, S. und Cudkowicz, M. „ALS drug development: Reflections from the past and a way forward“. *Neurotherapeutics* 5 (2008), 516–527.
- [2] Alexianu, M. E.; Kozovska, M. und Appel, S. H. „Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression“. *Neurology* 57 (2001), 1282–1289.
- [3] Appel, S. H.; Zhao, W.; Beers, D. R. und Henkel, J. S. „The Microglial-Motoneuron dialogue in ALS“. *Acta Myologica* 30 (2011), 4–8.
- [4] Araque, A.; Parpura, V.; Sanzgiri, R. P. und Haydon, P. G. „Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner“. *Trends in Neurosciences* 22 (1999), 208–215.
- [5] Bazle, I. „Effekte der AMP-aktivierten Proteinkinase auf die Mikroglia-Aktivierung“. Bachelor's Thesis (Studienarbeit). Universität Ulm, 2011.
- [6] Beers, D. R.; Henkel, J. S.; Zhao, W.; Wang, J. und Appel, S. H. „CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), 15558–15563.
- [7] Beers, D. R.; Henkel, J. S.; Zhao, W.; Wang, J.; Huang, A.; Wen, S.; Liao, B. und Appel, S. H. „Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis“. *Brain: a journal of neurology* 134 (2011), 1293–1314.
- [8] Bensimon, G.; Lacomblez, L. und Meininger, V. „A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis“. *New England Journal of Medicine* 330 (1994), 585–591.
- [9] Block, M. L.; Zecca, L. und Hong, J.-S. „Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms“. *Nature Reviews Neuroscience* 8 (2007), 57–69.

- [10] Block, M. L.; Li, G.; Qin, L.; Wu, X.; Pei, Z.; Wang, T.; Wilson, B.; Yang, J. und Hong, J. S. „Potent regulation of microglia-derived oxidative stress and dopaminergic neuron survival: substance P vs. dynorphin“. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (2006), 251–258.
- [11] Blokhuis, A. M.; Groen, E. J. N.; Koppers, M.; Berg van den, L. H. und Pasterkamp, R. J. „Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis“. *Acta Neuropathologica* 125 (2013), 777–794.
- [12] Boillée, S.; Yamanaka, K.; Lobsiger, C. S.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Kassiotis, G.; Kollias, G. und Cleveland, D. W. „Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia“. *Science* 312 (2006), 1389–1392.
- [13] Borasio, G. D.; Voltz, R. und Miller, R. G. „Palliative care in amyotrophic lateral sclerosis“. *Neurologic clinics* 19 (2001), 829–847.
- [14] Brenner, M.; Johnson, A. B.; Boespflug-Tanguy, O.; Rodriguez, D.; Goldman, J. E. und Messing, A. „Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease“. *Nature genetics* 27 (2001), 117–120.
- [15] Brettschneider, J.; Toledo, J. B.; Van Deerlin, V. M.; Elman, L.; McCluskey, L.; Lee, V. M.-Y. und Trojanowski, J. Q. „Microglial Activation Correlates with Disease Progression and Upper Motor Neuron Clinical Symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis“. *PLoS ONE* 7 (2012), e39216.
- [16] Bruijn, L. I.; Becher, M. W.; Lee, M. K.; Anderson, K. L.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Sisodia, S. S.; Rothstein, J. D.; Borchelt, D. R.; Price, D. L. und Cleveland, D. W. „ALS-Linked SOD1 Mutant G85R Mediates Damage to Astrocytes and Promotes Rapidly Progressive Disease with SOD1-Containing Inclusions“. *Neuron* 18 (1997), 327–338.
- [17] Burgess, A. W.; Metcalf, D.; Kozka, I. J.; Simpson, R. J.; Vairo, G.; Hamilton, J. A. und Nice, E. C. „Purification of two forms of colony-stimulating factor from

- mouse L-cell-conditioned medium." *Journal of Biological Chemistry* 260 (1985), 16004–16011.
- [18] Bushong, E. A.; Martone, M. E.; Jones, Y. Z. und Ellisman, M. H. „Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains". *The Journal of Neuroscience* 22 (2002), 183–192.
- [19] Charles, A. C.; Merrill, J. E.; Dirksen, E. R. und Sandersont, M. J. „Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate". *Neuron* 6 (1991), 983–992.
- [20] Chio, A.; Logroscino, G.o; Hardiman, O.; Swingler, R.t; Mitchell, D.; Beghi, E. und Traynor, B. G. „Prognostic factors in ALS: A critical review". *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 10 (2009), 310–323.
- [21] Christie, A. und Butler, M. „Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase". *Journal of biotechnology* 37 (1994), 277–290.
- [22] Clement, A. M.; Nguyen, M. D.; Roberts, E. A.; Garcia, M. L.; Boillée, S.; Rule, M.; McMahon, A. P.; Doucette, W.; Siwek, D.; Ferrante, R. J.; Brown, R. H.; Julien, J.-P.; Goldstein, L. S. B. und Cleveland, D. W. „Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice". *Science* 302 (2003), 113–117.
- [23] Colton, C. A. „Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain". *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 4 (2009), 399–418.
- [24] Crain, J. M. und Nikodemova M.and Watters, J. J. „Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice". *Journal of Neuroscience Research* 91 (2013), 1143–1151.
- [25] Cronk, J. C. und Kipnis, J. „Microglia - the brain's busy bees". *F1000Prime Reports* 5 (2013).

- [26] Davalos, D.; Grutzendler, J.; Yang, G.; Kim, J. V.; Zuo, Y.; Jung, S.; Littman, D. R.; Dustin, M. L. und Gan, W.-B. „ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo“. *Nature Neuroscience* 8 (2005), 752–758.
- [27] Daynes, R. A.; Araneo, B. A.; Ershler, W. B.; Maloney, C.; Li, G. Z. und Ryu, S. Y. „Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative“. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 150 (1993), 5219–5230.
- [28] DeJesus-Hernandez, M.; Mackenzie, I. R.; Boeve, B. F.; Boxer, A. L.; Baker, M.; Rutherford, N. J.; Nicholson, A. M.; Finch, N. A.; Gilmer, H. F.; Adamson, J.; Kouri, N.; Wojtas, A.; Sengdy, P.; Hsiung, G.-Y. R.; Karydas, A.; Seeley, W. W.; Josephs, K. A.; Coppola, G.; Geschwind, D. H.; Wszolek, Z. K.; Feldman, H.; Knopman, D.; Petersen, R.; Miller, B. L.; Dickson, D.; Boylan, K.; Graff-Radford, N.I und Rademakers, R. „Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis“. *Neuron* 72 (2011), 245–256.
- [29] Di Giorgio, F. P.; Carrasco, M. A.; Siao, M. C.; Maniatis, T. und Eggan, K. „Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model“. *Nature neuroscience* 10 (2007), 608–614.
- [30] Dobrenis, K. „Microglia in cell culture and in transplantation therapy for central nervous system disease“. *Methods (San Diego, Calif.)* 16 (1998), 320–344.
- [31] Ershler, W. B. und Keller, E. T. „Age-Associated Increased Interleukin-6 Gene Expression, Late-Life Diseases, and Frailty“. *Annual Review of Medicine* 51 (2000), 245–270.
- [32] Ferger, A. I.; Campanelli, L.; Reimer, V.; Muth, K. N.; Merdian, I.; Ludolph, A. C. und Witting, A. „Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia“. *Journal of neuroinflammation* 7 (2010), 45.
- [33] Fetler, L. und Amigorena, S. „Brain Under Surveillance: The Microglia Patrol“. *Science* 309 (2005), 392–393.

- [34] Fray, A. E.; Ince, P. I. G.; Banner, S. J.; Milton, I. D.; Usher, P. A.; Cookson, M. R. und Shaw, P. J. „The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study“. *European Journal of Neuroscience* 10 (1998), 2481–2489.
- [35] Fridovich, I. „Superoxide Radical and Superoxide Dismutases“. *Annual Review of Biochemistry* 64 (1995), 97–112.
- [36] Geyer, Vera Carina. „In vitro VEGF-Sekretion von malignen Schilddrüsenzelllinien: Einfluss von Wachstumsfaktoren und Untersuchung der Postrezeptorsignaltransduktion“. Medizinische Dissertation. Philipps-Universität Marburg, 2008.
- [37] Giri, S.; Nath, N.; Smith, B.; Viollet, B.; Singh, A. K. und Singh, I. „5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1-beta-4-Ribofuranoside Inhibits Proinflammatory Response in Glial Cells: A Possible Role of AMP-Activated Protein Kinase“. *The Journal of Neuroscience* 24 (2004), 479–487.
- [38] Godbout, J. P. und Johnson, R. W. „Interleukin-6 in the aging brain“. *Journal of Neuroimmunology* 147 (2004), 141–144.
- [39] Godbout, J. P.; Chen, J.; Abraham, J.; Richwine, A. F.; Berg, B. M.; Kelley, K. W. und Johnson, R. W. „Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system“. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2005), 1329–1331.
- [40] Gong, Y. H.; Parsadanian, A. S.; Andreeva, A.; Snider, W. D. und Elliott, J. L. „Restricted Expression of G86R Cu/Zn Superoxide Dismutase in Astrocytes Results in Astrocytosis But Does Not Cause Motoneuron Degeneration“. *The Journal of Neuroscience* 20 (2000), 660–665.
- [41] Gordon, Grant R. J.; Mulligan, Sean J. und MacVicar, Brian A. „Astrocyte control of the cerebrovasculature“. *Glia* 55 (2007), 1214–1221.

- [42] Gordon, P. H.; Moore, D. H.; Miller, R. G.; Florence, J. M.; Verheijde, J. L.; Doo-
rish, C.; Hilton, J. F.; Spitalny, G. M.; MacArthur, R. B.; Mitsumoto, H.; Neville,
H. E.; Boylan, K.; Mozaffar, T.; Belsh, J. M.; Ravits, J.; Bedlack, R. S.; Graves, M.
C.; McCluskey, L. F.; Barohn, R. J.; Tandan, R. und Western ALS Study Group.
„Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase
III randomised trial“. *Lancet neurology* 6 (2007), 1045–1053.
- [43] Gordon, P.I H. „Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Fea-
tures, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials“. *Aging and Disease*
4 (2013), 295–310.
- [44] Gordon, S. „Alternative activation of macrophages“. *Nature Reviews Immunology*
3 (2003), 23–35.
- [45] Graffmo, K. S.; Forsberg, K.; Bergh, J.; Birve, A.; Zetterström, P.; Andersen, P.r M.;
Marklund, S. L. und Brännström, T. „Expression of wild-type human superoxi-
de dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis“. *Human Molecular*
Genetics 22 (2013), 51–60.
- [46] Gruol, D. L. und Nelson, T. E. „Physiological and pathological roles of interleukin-
6 in the central nervous system“. *Molecular Neurobiology* 15 (1997), 307–339.
- [47] Gurney, M. E.; Pu, H.; Chiu, A. Y.; Dal Canto, M. C.; Polchow, C. Y.; Alexander,
D. D.; Caliendo, J.; Hentati, A.; Kwon, Y. W. und Deng, H. X. „Motor neuron
degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase muta-
tion“. *Science (New York, N.Y.)* 264 (1994), 1772–1775.
- [48] Halassa, M. M.; Fellin, T. und Haydon, P. G. „The tripartite synapse: roles for
gliotransmission in health and disease“. *Trends in Molecular Medicine* 13 (2007),
54–63.
- [49] Hall, E. D.; Oostveen, J. A. und Gurney, M. E. „Relationship of microglial and
astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of
familial ALS“. *Glia* 23 (1998), 249–256.

- [50] Hanisch, U.-K. und Kettenmann, H. „Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain“. *Nature Neuroscience* 10 (2007), 1387–1394.
- [51] Hao, C.; Guilbert, L. J. und Fedoroff, S. „Production of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) by mouse astroglia in vitro“. *Journal of Neuroscience Research* 27 (1990), 314–323.
- [52] Ilieva, H.; Polymenidou, M. i und Cleveland, D. W. „Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond“. *The Journal of Cell Biology* 187 (2009), 761–772.
- [53] Jimenez, S.; Baglietto-Vargas, D.; Caballero, C.; Moreno-Gonzalez, I.; Torres, M.; Sanchez-Varo, R.; Ruano, D.; Vizuete, M.; Gutierrez, A. und Vitorica, J. „Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer’s Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic“. *The Journal of Neuroscience* 28 (2008), 11650–11661.
- [54] Kang, S. H.; Li, Y.; Fukaya, M.; Lorenzini, I.; Cleveland, D. W.; Ostrow, L. W.; Rothstein, J. D. und Bergles, D. E. „Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis“. *Nature neuroscience* 16 (2013), 571–579.
- [55] Kiernan, M. C.; Vucic, S.; Cheah, B. C.; Turner, M. R.; Eisen, A.; Hardiman, O.; Burrell, J. R. und Zoing, M. C. „Amyotrophic lateral sclerosis“. *Lancet* 377 (2011), 942–955.
- [56] Kriz, J.; Nguyen, M. D. und Julien, J.-P. „Minocycline Slows Disease Progression in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis“. *Neurobiology of Disease* 10 (2002), 268–278.
- [57] Lacomblez, L.; Bensimon, G.; Leigh, P. N.; Guillet, P. und Meininger, V. „Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II“. *Lancet* 347 (1996), 1425–1431.

- [58] Lacy-Hulbert, A. und Moore, K. J. „Designer macrophages: Oxidative metabolism fuels inflammation repair“. *Cell Metabolism* 4 (2006), 7–8.
- [59] Lawson, L. J.; Perry, V. H.; Dri, P. und Gordon, S. „Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain“. *Neuroscience* 39 (1990), 151–170.
- [60] Lee, D.I C.; Ruiz, C. R.; Lebson, L.i; Selenica, M.-L. B.; Rizer, J.; Hunt Jr., J. B.; Rojiani, R.; Reid, P.; Kammath, S.; Nash, K.; Dickey, C. A.; Gordon, M. und Morgan, D. „Aging enhances classical activation but mitigates alternative activation in the central nervous system“. *Neurobiology of Aging* 34 (2013), 1610–1620.
- [61] Leigh, Prof. N. P.; Sreedharan, Dr. J. und Wijesekerna, Dr. L. „Moto Neuron Disease: Amyotrophic Lateral Sclerosis“. In: Donald W. Pfaff (Hrsg.) *Neuroscience in the 21st Century*. 1. Aufl. Bd. 5. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag (2013), S. 2861–2902.
- [62] Lobsiger, C. S.; Boillee, S.; McAlonis-Downes, M.; Khan, A. M.; Feltri, M. L.; Yamanaka, K. und Cleveland, D. W. „Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), 4465–4470.
- [63] Logroscino, G.; Traynor, B. J.; Hardiman, O.; Chio, A.; Mitchell, D.; Swingler, R. J.; Millul, A.; Benn, E. und Beghi, E. „Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Europe“. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81 (2010), 385–390.
- [64] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. und Randall, R. J. „Protein measurement with the Folin phenol reagent“. *The Journal of biological chemistry* 193 (1951), 265–275.
- [65] Ludolph, Prof.Dr.A. C. „Degenerative Erkrankungen - Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronenerkrankungen)“. In: H.-C. Diener, C. Weimar (Hrsg.) *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag (2012), S. 254–263.

- [66] Lüllmann-Rauch, R. „Nervengewebe“. In: Lüllmann-Rauch, R. (Hrsg.) *Taschenlehrbuch Histologie*. 2. Aufl. Thieme Verlag (2006), S. 163–208.
- [67] Majounie, E.; Renton, A. E.; Mok, K.; Dopper, E. {GP}; Waite, A.; Rollinson, S.; Chio, A.; Restagno, G.; Nicolaou, N.; Simon-Sanchez, J.; Swieten, J. C van; Abramzon, Y.; Johnson, J. O.; Sendtner, M.; Pamphlett, R.; Orrell, R. W.; Mead, S.; Sidle, K. C.; Houlden, H.; Rohrer, J. D.; Morrison, K. E.; Pall, H.; Talbot, K.; An-sorge, O.; Hernandez, D. G.; Arepalli, S.; Sabatelli, M.; Mora, G.; Corbo, M.; Giannini, F.; Calvo, A.; Englund, E.; Borghero, G.; Floris, G. L.; Remes, A. M.; Laaksovirta, H.; McCluskey, L.; Trojanowski, J. Q.; Van Deerlin, V. M.; Schellenberg, G. D.; Nalls, M. A.; Drory, V. E.; Lu, C.-S.; Yeh, T.-H.; Ishiura, H.; Takahashi, Y.; Tsuji, S.; Le Ber, I.; Brice, A.; Drepper, C.; Williams, N.; Kirby, J.; Shaw, P.; Hardy, J.; Tienari, P. J.; Heutink, P.; Morris, H. R.; Pickering-Brown, S. und Traynor, B. J. „Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study“. *Lancet Neurology* 11 (2012), 323–330.
- [68] Maragakis, N. J. und Rothstein, J. D. „Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease“. *Nature Clinical Practice Neurology* 2 (2006), 679–689.
- [69] Masuhr, K. F. und Neumann, M. „Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)“. In: Bob, A. und Bob, K. (Hrsg.) *Neurologie*. 6. Aufl. Bd. 1. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme (2007), S. 254–257.
- [70] McGeer, P. L. und McGeer, E. G. „The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases“. *Brain Research Reviews* 21 (1995), 195–218.
- [71] McGoldrick, P.; Joyce, P. I.; Fisher, E. M. C. und Greensmith, L. „Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis“. *Biochimica et biophysica acta* (2013), 1421–1436.
- [72] Miller, R. G.; Mitchell, J. D. und Moore, D. H. „Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)“. *The Cochrane database of systematic reviews* 3 (2012), 191–206.

- [73] Montellano, P. R. Ortiz de; David, S. K.; Ator, M. A. und Tew, D. „Mechanism-based inactivation of horseradish peroxidase by sodium azide. Formation of meso-azidoproteoporphyrin IX“. *Biochemistry* 27 (1988), 5470–5476.
- [74] Moss, D. W. und Bates, T. E. „Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function“. *European Journal of Neuroscience* 13 (2001), 529–538.
- [75] Moussaud, S. und Draheim, H. J. „A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extended period of time“. *Journal of Neuroscience Methods* 187 (2010), 243–253.
- [76] Mrak, R. E. und Griffin, W. S. T. „Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration“. *Neurobiology of Aging* 26 (2005), 349–354.
- [77] Nagai, M.; Re, D. B.; Nagata, T.; Chalazonitis, A.; Jessell, T. M.; Wichterle, H. und Przedborski, S. „Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons“. *Nature neuroscience* 10 (2007), 615–622.
- [78] Nimmerjahn, A.; Kirchhoff, F. und Helmchen, F. „Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo“. *Science* 308 (2005), 1314–1318.
- [79] Nishitoh, H.; Kadowaki, H.; Nagai, A.; Maruyama, T.; Yokota, T.; Fukutomi, H.; Noguchi, T.; Matsuzawa, A.; Takeda, K. und Ichijo, H. „ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1“. *Genes & Development* 22 (2008), 1451–1464.
- [80] Oliver, D. „Opioid medication in the palliative care of motor neurone disease“. *Palliative medicine* 12 (1998), 113–115.
- [81] Pang, Z.-J.; Chen, Y. und Zhou, M. „L929 Cell conditioned medium protects RAW 264.7 cells from oxidative injury through inducing antioxidant enzymes“. *Cytokine* 12 (2000), 944–950.

- [82] Papadimitriou, D.; Le Verche, V.; Jacquier, A.; Ikiz, B.; Przedborski, S. und Re, D. B. „Inflammation in ALS and SMA: Sorting out the good from the evil“. *Neurobiology of Disease* 37 (2010), 493–502.
- [83] Parpura, V.; Heneka, M. T.; Montana, V.; Oliet, S. H. R.; Schousboe, A.; Haydon, P. G.; Stout, R. F.; Spray, D. C.; Reichenbach, A.; Pannicke, T.; Pekny, M.; Pekna, M.; Zorec, R. und Verkhratsky, A. „Glial cells in (patho)physiology“. *Journal of Neurochemistry* 121 (2012), 4–27.
- [84] Perry, V. H. und Gordon, S. „Macrophages and microglia in the nervous system“. *Trends in Neurosciences* 11 (1988), 273–277.
- [85] Pingoud, A. und Urbanke, C. „Solubilisierung“. In: Pingoud, A. und Urbanke, C. (Hrsg.) *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 1. Aufl. Walter de Gruyter (1997), S. 50–52.
- [86] Poeck, K. und Hacke, W. „Amyotripische Lateralsklerose (ALS)“. In: Poeck, K. und Hacke, W. (Hrsg.) *Neurologie*. 12. Aufl. Springer London, Limited (2006), S. 689–694.
- [87] Polazzi, E. und Contestabile, A. „Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology“. *Reviews in the neurosciences* 13 (2002), 221–242.
- [88] Powell, E. M. und Geller, H. M. „Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension“. *Glia* 26 (1999), 73–83.
- [89] Pramatarova, A.; Laganière, J.; Roussel, J.; Brisebois, K. und Rouleau, G. A. „Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment“. *The Journal of Neuroscience* 21 (2001), 3369–3374.
- [90] Ramón, Y. und Cajal, S. „Névroglie“. In: Maloine, A. (Hrsg.) *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Bd. 1. Paris: Maloine, A. (1909), S. 230–252.

- [91] Rattray, M. und Bendotti, C. „Does excitotoxic cell death of motor neurons in ALS arise from glutamate transporter and glutamate receptor abnormalities?“ *Experimental Neurology* 201 (2006), 15–23.
- [92] Renton, A. E.; Majounie, E.; Waite, A.; Simon-Sanchez, J.; Rollinson, S.; Gibbs, J. R.; Schymick, J. C.; Laaksovirta, H.; Swieten, J. C. van; Myllykangas, L.; Kalimo, H.; Paetau, A.; Abramzon, Y.; Remes, A. M.; Kaganovich, A.; Scholz, S. W.; Duckworth, J.; Ding, J.; Harmer, D. W.; Hernandez, D. G.; Johnson, J. O.; Mok, K.; Ryten, M.; Trabzuni, D.; Guerreiro, R. J.; Orrell, R. W.; Neal, J.; Murray, A.; Pearson, J.; Jansen, I. E.; Sondervan, D.; Seelaar, H.; Blake, D.; Young, K.; Halliwell, N.; Callister, J.; Toulson, G.; Richardson, A.; Gerhard, A.; Snowden, J.; Mann, D.; Neary, D.; Nalls, M. I. A.; Peuralinna, T.; Jansson, L.; Isoviiita, V.-M.; Kaivorinne, A.-L.; Holtta-Vuori, M.; Ikonen, E.; Sulkava, R.; Benatar, M.; Wu, J.; Chio, A.; Restagno, G.; Borghero, G.; Sabatelli, M.; Heckerman, D.; Rogaeva, E.; Zinman, L.; Rothstein, J.; Sendtner, M.; Drepper, C.; Eichler, E. E.; Alkan, C.; Abdullaev, Z.; Pack, S. D.; Dutra, A.; Pak, E.; Hardy, J.; Singleton, A.; Williams, N. M.; Heutink, P.; Pickering-Brown, S.; Morris, H. R.; Tienari, P. J. und Traynor, B. J. „A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD“. *Neuron* 72 (2011), 257–268.
- [93] Riviere, M.; Meininger, V.; Zeisser, P. und Munsat, T. „An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole“. *Archives of neurology* 55 (1998), 526–528.
- [94] Rosen, D. R.; Siddique, T.; Patterson, D.; Figlewicz, D. A.; Sapp, P.; Hentati, A.; Donaldson, D.; Goto, J.; O'Regan, J. P. und Deng, H. X. „Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis“. *Nature* 362 (1993), 59–62.
- [95] Rothstein, J. D. „Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis“. *Annals of neurology* 65 Suppl 1 (2009), 3–9.
- [96] Rothstein, J. D.; Patel, S.; Regan, M. R.; Haenggeli, C.; Huang, Y. H.; Bergles, D. E.; Jin, L.; Dykes Hoberg, M.; Vidensky, S.; Chung, D. S.; Toan, S. V.; Bruijn,

- L. I.; Su, Z.-Z.; Gupta, P. und Fisher, P. B. „beta-Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression“. *Nature* 433 (2005), 73–77.
- [97] Rothstein, J. D.; Martin, L. J. und Kuncl, R. W. „Decreased Glutamate Transport by the Brain and Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis“. *New England Journal of Medicine* 326 (1992), 1464–1468.
- [98] Sierra, A.; Gottfried-Blackmore, A. C.; McEwen, B. S. und Bulloch, K. „Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile“. *Glia* 55 (2007), 412–424.
- [99] Sofroniew, M. V. „Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation“. *Trends in neurosciences* 32 (2009), 638–647.
- [100] Sofroniew, M. V. und Vinters, H. V. „Astrocytes: biology and pathology“. *Acta Neuropathologica* 119 (2010), 7–35.
- [101] Stein, M.; Keshav, S.; Harris, N. und Gordon, S. „Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation.“ *The Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 287–292.
- [102] Steinacker, P.; Hawlik, A.; Lehnert, S.; Jahn, O.; Meier, S.; Gorz, E.; Braunstein, K. E.; Krzovska, M.; Schwalenstocker, B.; Jesse, S.; Propper, C.; Bockers, T.; Ludolph, A. und Otto, M. „Neuroprotective Function of Cellular Prion Protein in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis“. *The American Journal of Pathology* 176 (2010), 1409–1420.
- [103] Sugama, S.i; Takenouchi, T.; Cho, B.; Joh, T.; Hashimoto, M. und Kitani, H. „Possible Roles of Microglial Cells for Neurotoxicity in Clinical Neurodegenerative Diseases and Experimental Animal Models“. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 8 (2009), 277–284.

- [104] Traynor, B.; Alexander, M.; Corr, B.; Frost, E. und Hardiman, O. „Effect of a multidisciplinary amyotrophic lateral sclerosis (ALS) clinic on ALS survival: a population based study, 1996-2000“. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 74 (2003), 1258–1261.
- [105] Turner, B. J. und Talbot, K. „Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS“. *Progress in Neurobiology* 85 (2008), 94–134.
- [106] Turner, M. R.; Cagnin, A.; Turkheimer, F. E.; Miller, C. C. J.; Shaw, C. E.; Brooks, D. J.; Leigh, P. N. und Banati, R. B. „Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study“. *Neurobiology of Disease* 15 (2004), 601–609.
- [107] Van Den Bosch, L. „Genetic Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis“. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011 (2011).
- [108] Van Den Bosch, L.; Tilkin, P.; Lemmens, G. und Robberecht, W. „Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. [Miscellaneous Article]“. *Neuroreport June 12, 2002* 13 (2002), 1067–1070.
- [109] Vidyadaran, S.; Ooi, Y. Y.; Subramaiam, H.; Badiei, A.; Abdullah, M.; Ramasamy, R. und Seow, H. F. „Effects of macrophage colony-stimulating factor on microglial responses to lipopolysaccharide and beta amyloid“. *Cellular Immunology* 259 (2009), 105–110.
- [110] Virchow, R. „Rückenmark und Gehirn“. In: Virchow, R. (Hrsg.) *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. 1. Aufl. Bd. 1. Berlin: Hirschwald, A. (1858), S. 238–254.
- [111] Wagner, C.; Hänsch, G. M.; Stegmaier, Sabine; Deneffle, B.; Hug, F. und Schoels, M. „The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function“. *European Journal of Immunology* 31 (2001), 1173–1180.

- [112] Wang, L.; Sharma, K.; Grisotti, G. und Roos, R. P. „The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis“. *Neurobiology of disease* 35 (2009), 234–240.
- [113] Wei, J.; Xu, H.; Davies, J. L. und Hemmings, G. P. „Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects“. *Life sciences* 51 (1992), 1953–1956.
- [114] Weishaupt, J. H.; Lewinski, F. von; Bähr, M. und Keller, B. U. „Motoneuronenerkrankungen und amyotrophe Lateralsklerose (ALS): von der molekularen Analyse der Ursachen zu neuen therapeutischen Ansätzen“. *Neuroforum* (2006), 252–259.
- [115] Weydt, P. und Moller, T. „Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis“. *Neuroreport April 25, 2005* 16 (2005), 527–531.
- [116] Weydt, P.; Yuen, E. C.; Ransom, B. R. und Möller, T. „Increased cytotoxic potential of microglia from ALS-transgenic mice“. *Glia* 48 (2004), 179–182.
- [117] Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Barton, H. J.; Jones, R. L.; Fox, K.; Wydra, R. L. und Streckowski, L. „DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)“. *Biochemistry* 29 (1990), 8452–8461.
- [118] Witting, A. und Möller, T. „Microglia cell culture: a primer for the novice“. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 758 (2011), 49–66.
- [119] Xie, Z.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I. und Finch, C. E. „Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity“. *Experimental Neurology* 182 (2003), 135–141.
- [120] Yamanaka, K.; Chun, S. J.; Boillee, S.; Fujimori-Tonou, N.; Yamashita, H.; Gutmman, D. H.; Takahashi, R.; Misawa, H. und Cleveland, D. W. „Astrocytes as determinants of disease progression in inherited ALS“. *Nature neuroscience* 11 (2008), 251–253.

- [121] Yamanaka, K.; Boillee, S.; Roberts, E. A.; Garcia, M. L.; McAlonis-Downes, M.; Mikse, O. R.; Cleveland, D. W. und Goldstein, L. S. B. „Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), 7594–7599.
- [122] Ye, S.-M. und Johnson, R. W. „Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice“. *Journal of Neuroimmunology* 93 (1999), 139–148.
- [123] Yrjänheikki, J.; Tikka, T.; Keinänen, R.; Goldsteins, G.; Chan, P. H. und Koistinaho, J. „A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1999), 13496–13500.
- [124] Zhao, W.; Beers, D. R.; Henkel, J. S.; Zhang, W.; Urushitani, M.; Julien, J.-P. und Appel, S. H. „Extracellular Mutant SOD1 Induces Microglial-Mediated Motoneuron Injury“. *Glia* 58 (2010), 231–243.
- [125] Zhao, W.; Xie, W.; Xiao, Q.; Beers, D. R. und Appel, S. H. „Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia“. *Journal of Neurochemistry* 99 (2006), 1176–1187.
- [126] Zhu, S.; Stavrovskaya, I. G.; Drozda, M.; Kim, B. Y. S.; Ona, V.; Li, M.; Sarang, S.; Liu, A. S.; Hartley, D. M.; Wu, D. C.; Gullans, S.; Ferrante, R. J.; Przedborski, S.; Kristal, B. S. und Friedlander, R. M. „Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice“. *Nature* 417 (2002), 74–78.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung der morphologischen Änderung aktivierter Mikroglia	13
2	Klassische und alternative Aktivierung von Mikroglia	15
3	Zeitabfolge der Stimulationen mit IL-4 und LPS	34
4	Schematische Darstellung der Fluoreszenzfärbung	39
5	CD11b Färbung in Rückenmarksschnitten von SOD1-Tieren	46
6	GFAP Färbung in Rückenmarksschnitten von SOD1-Tieren	47
7	Reinheitsfärbung adulter Mikroglia mit CD11b und GFAP	48
8	Basale IL-6 Werte bei jungen und adulten Mikroglia	50
9	IL-6 Antwort auf LPS Stimulation bei Mikroglia	52
10	Absolute IL-6 Konzentration unter LPS Stimulation bei Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen	53
11	Alternative Aktivierung von Mikroglia aus jungen Mäusen	56
12	IL-6 Antwort auf IL-4+LPS Stimulation in Relation zur LPS Stimulation bei Mikroglia	57

Tabellenverzeichnis

1	Material für die Zellkultur	20
2	Hergestellte Lösungen für die Zellkultur	21
3	Material für die L929 Zelllinie aus Mausfibroblasten	22
4	Hergestellte Lösungen für die L929 Zelllinie	22
5	Material für die Stimulationen	23
6	Material für den IL-6 ELISA	23
7	Hergestellte Lösungen für den IL-6 ELISA	23
8	Material für den Protein-Assay	24
9	Hergestellte Lösungen für den Protein-Assay	24
10	Material für die Färbungen	24
11	Hergestellte Lösungen für die Färbungen	25
12	Sonstige Geräte und Materialien	25
13	Antikörperverdünnungen für die Färbung von Zellen	39
14	Antikörperverdünnungen für die Färbung von Schnittpräparaten	42
15	IL-6 Konzentration der Kontrolle im Vergleich zu der Stimulation mit IL-4 bei Mikroglia aus jungen und adulten Mäusen	55

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Dr. med. Ludolph danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion in der Abteilung Neurologie der Universität Ulm.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin Frau Dr. Anke Witting für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und das Vertrauen, das sie mir damit entgegenbrachte. Einen herzlichen Dank für die Begleitung der experimentellen Durchführung, die vielen Ergebnisbesprechungen und für die gute und geduldige Betreuung bei der schriftlichen Ausarbeitung. Es war toll, dass sie sich stets Zeit nahm, um Fragen und Probleme zu klären.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Bernd Jahrsdörfer für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Insbesondere danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Frau Dr. Anke Witting und Frau Dr. Katrin Lindenberg, die mir mit Rat und Tat bei der Arbeit im Labor zur Seite standen und für ein fröhliches Arbeitsklima sorgten.

Ein ganz lieber Dank geht an Irma Median für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre unermüdliche Bereitschaft zur Hilfe bei labortechnischen Fragen, der Arbeit mit den Mäusen und den primären Zellkulturen. Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Stephan Meier, der mir bei der Arbeit mit den adulten Mäusen viel geholfen hat.

Frau Mihr aus dem Promotionssekretariat danke ich für die formale Vorabdurchsicht des Manuskripts.

All meinen Freunden, die mich in der Zeit unterstützt haben, gilt mein ganz persönlicher Dank.

Besonderer Dank gebührt Sebastian Schmidt für die L^AT_EX-Vorlage zu dieser Arbeit und für viel persönliche Motivation.

Bei Bertolt Schmidt bedanke ich mich für die geduldige Durchsicht des Manuskripts und die L^AT_EX-Unterstützung.

Claudia Dilger die, trotz Schulstress, die Zeit für eine Korrekturdurchsicht fand, spreche ich ein herzliches Dankeschön aus. Simon Lüke, der mich mehr als einmal davor bewahrt hat, meinen Computer mit der Wand Bekanntschaft schließen zu lassen, sei gedankt.

Bei Isabel Bazle möchte ich mich für viele anregende Diskussionen bedanken.

Harald Lang sei für viele aufmunternde Worte und viel Geduld gedankt.

Meinen Eltern, Antonie und Hans Eugen Tritschler, danke ich von Herzen. Sie ermöglichten mir das Studium und die Promotion. Sie waren stets da wenn ich sie brauchte und haben nie an mir gezweifelt. Für ihre Liebe und ihr Vertrauen schätze ich mich sehr glücklich.