

Aus der Klinik für Neurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Faßbender

Rolle der Matrix-Metalloproteinase-12 im Mausmodell der ALS

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2012

vorgelegt von: Jennifer Brendel
geb. am: 31.03.1986 in Saarlouis

*„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean“
Isaac Newton*

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary	5
2	Einleitung	8
2.1	Die Amyotrophe Lateralsklerose	8
2.1.1	Klinische Symptome, Diagnostik und Therapie	8
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese der Degeneration motorischer Neurone	10
2.1.3	Histopathologische Merkmale	12
2.2	Die SOD1 und das Mausmodell	12
2.3	Rolle der Mikroglia	13
2.4	Die Matrix-Metalloproteinase-12	14
2.5	Zielsetzung der Arbeit	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Geräte und Programme	18
3.2	Chemikalien	18
3.3	Versuchstiere	20
3.3.1	Kreuzung und Genotypisierung	20
3.3.2	Krankheitsverlauf, klinischer Score und Untersuchung der Lebenszeit	22
3.4	Histologie	24
3.4.1	Herstellung histologischer Präparate für Lichtmikroskopie	24
3.4.2	Färbungen	25
3.5	Histologische Auswertung	28
3.5.1	Methylenblau-Färbung	28
3.5.2	Nissl-Färbung	28
3.5.3	Quantifizierung immunhistochemischer Färbung	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Untersuchung der Lebenszeit	30
4.2	Axonzählung	31
4.3	Quantifizierung der Degeneration motorischer Neurone	32

Inhalt

4.4	Quantifizierung Iba1-positiver Zellen	36
5	Diskussion	39
6	Literaturverzeichnis	45
7	Danksagung	54
8	Lebenslauf	55

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene Folgen der MMP-Aktivität	16
Abbildung 2: Kreuzungsschema	21
Abbildung 3: Weibliches Tier mit Atrophie und Parese beider Hinterläufe	23
Abbildung 4: Männliches Tier mit Parese des rechten Hinterlaufs	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung der ABC-Methode	27
Abbildung 6: Kaplan- Meier Überlebenskurve von G93A SOD1 transgenen Mäusen mit unterschiedlichen MMP-12 Genotypen	30
Abbildung 7: Anzahl Axone $>3,5\mu\text{m}$ bei verschiedenen MMP-12 Genotypen	31
Abbildung 8: Querschnitte der L5 Wurzeln einer MMP-12 knock out sowie einer MMP-12 Wildtyp Maus	32
Abbildung 9: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen der Motorneurone pro Vorderhorn	34
Abbildung 10: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen der Motorneurone pro Vorderhorn nach Geschlecht getrennt	34
Abbildung 11: Vorderhörner aus dem Bereich des lumbalen Rückenmarks bei 10-facher und zugehörige Ausschnitte bei 20-facher Vergrößerung	35
Abbildung 12: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen des relativen Anteils aktivierter Mikroglia an der gesamten Vorderhornfläche in %	36
Abbildung 13: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen des relativen Anteils aktivierter Mikroglia an der gesamten Vorderhornfläche jeweils nach Geschlecht getrennt	37
Abbildung 14: Ausschnitte aus lumbalen Vorderhörnern bei 20-facher Vergrößerung	37
Abbildung 15: Ausschnitte aus lumbalen Vorderhörnern bei 40-facher Vergrößerung	38
Tabelle 1: Gene und Genloci der fALS	11
Tabelle 2: Mittelwerte der überlebenden Motorneurone/Vorderhorn in den verschiedenen Genotypengruppen	33

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex Methode
AD	autosomal-dominant
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Analysis of Variance
AR	autosomal-rezessiv
BDNF	brain derived neurotrophic factor
DAB	Diaminobenzidinetetrahydrochlorid
DDSA	Dodecylbernsteinsäureanhydrid
DNA	Desoxyribonucleic acid
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	extrazelluläre Matrix
fALS	familiäre ALS
FTP	frontotemporale Demenz
FUS	fused in sarcoma
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IGFBP-6	IGF-binding protein 6
IL-4	Interleukin-4
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MNA	Methylnadicanhydrid
MS	Multiple Sklerose
mSOD1	mutierte Superoxid-Dismutase 1
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
sALS	sporadische ALS
SETX	Senataxin
SOD1	Superoxid-Dismutase 1
TDP-43	TDP DNA binding protein 43
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VADP	vesicle associated membrane protein
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

1 Zusammenfassung

Rolle der Matrix-Metalloproteinase-12 im Mausmodell der ALS

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine rasch progrediente, letal verlaufende Erkrankung, deren Symptome durch den Untergang des 1. und 2. Motorneurons bedingt sind. Nach der Alzheimer Demenz und der Parkinson-Krankheit ist sie die dritthäufigste neurodegenerative Erkrankung. Meist tritt die ALS sporadisch auf, bei 5-10% der Patienten liegt eine familiäre Form der Erkrankung vor. Etwa 15-20% dieser familiären ALS-Fälle sind mit Mutationen im Gen der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) assoziiert, welche der Zelle als Radikalfänger dient. Diese Mutationen führen über einen unbekanntem toxischen Mechanismus zur selektiven Motorneurondegeneration. Nach der Identifikation dieser Mutationen konnte 1994 ein Mausmodell entwickelt werden, welches das humane mutierte SOD1-Gen (mSOD1) überexprimiert. Diese Tiere entwickeln eine der menschlichen ALS sehr ähnliche Symptomatik.

Vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Mikroglia, die mSOD1 exprimieren, zum neuronalen Zelltod beiträgt, der genaue Mechanismus ist nicht geklärt. Mikrogliale Aktivierung gleicht einem zweiseitigen Schwert. Einerseits kommt es über Sekretion zytotoxischer inflammatorischer Moleküle zu neuronalem Schaden, andererseits werden Neurone über die Bereitstellung neurotropher Faktoren geschützt.

Erhöhte Konzentrationen einiger Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) fanden sich in Serum, Liquor, Hirn und Rückenmark von ALS-Patienten. In vorausgehenden Untersuchungen wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass die Transkription der Matrix-Metalloproteinase-12 (MMP-12), welche im ZNS hauptsächlich von Mikroglia produziert wird, im Mausmodell bis zu 200-fach erhöht ist. Um die Rolle der MMP-12 zu beleuchten, wurden in dieser Arbeit mSOD1-transgene mit MMP-12 knock out Mäusen gekreuzt, sodass mSOD1-transgene Tiere mit verschiedenen MMP-12 Genotypen miteinander verglichen werden konnten. Hierbei zeigte sich, dass das Fehlen von MMP-12 die Lebenszeit der Tiere signifikant verkürzt. In histologischen Untersuchungen des lumbalen Rückenmarks fand sich bei MMP-12 knock out Tieren eine geringere Zahl an überlebenden Motorneuronen als bei MMP-12 Wildtypen. Immunhistochemische Untersuchungen desselben Gewebes zeigten einen geringfügig höheren Anteil aktivierter Mikroglia bei MMP-12 knock out Tieren als bei Wildtypen.

Zusammenfassend erwies sich die Anwesenheit der MMP-12 als ein entscheidender Faktor für Überlebenszeit und neuronales Überleben im Tiermodell der ALS. Die Frage nach dem Mechanismus, über den die MMP-12 zum neuronalen Schutz beiträgt, bleibt vorläufig unbeantwortet. MMP-12 ist gleichermaßen in der Lage, Inflammation zu verstärken und auch

Zusammenfassung

zu dämpfen. Möglicherweise kommt es durch Mangel an MMP-12 zu verstärkter mikroglialer Aktivierung und darüber zu vermehrter neuronaler Degeneration, wobei auch zu bedenken bleibt, dass aktivierte Mikroglia auch in der Lage sind, umliegende Neurone vor dem Zelltod zu schützen. Um die Rolle der MMP-12 in Zusammenhang mit neuronaler Degeneration und den damit verbundenen inflammatorischen Prozessen endgültig zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Summary

Role of matrix metalloproteinase 12 in a mouse model of ALS

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rapidly progressing, fatal disease characterized by degeneration of upper and lower motor neurons. ALS is the third most common neurodegenerative disorder after Parkinson disease and Alzheimer disease. The majority of ALS cases are sporadic, while a family history is seen in 5-10% of the cases. Approximately 15-20% of these familial ALS cases are linked to mutations in the gene encoding the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1), a free radical scavenger enzyme. These mutations lead to selective degeneration of motor neurons because of unknown acquired toxic properties. The identification of these mutations enabled the creation of transgenic mice overexpressing mutant forms of SOD1 (mSOD1) in 1994. These animals develop symptoms which resemble the symptoms seen in human ALS.

A few years ago, microglia expressing mSOD1 were proven to contribute to neuronal death, the exact mechanisms are still unclear. Microglial activation represents a two-edged sword, which on the one hand damages neurons via secreting cytotoxic inflammatory molecules, but on the other hand protects neurons via providing neurotrophic factors.

The level of several matrix metalloproteinases (MMP`s) is up-regulated in cerebrospinal fluid, serum, brain and spinal cord of ALS patients. In preliminary experiments, we observed that expression of matrix metalloproteinase 12 (MMP-12), which is mainly produced by microglia in the central nervous system, is up to 200 folds up-regulated in the ALS mouse model. To elucidate the role of MMP-12, we cross-bred mSOD1 transgenic and MMP-12 deficient mice so that we could compare mSOD1 transgenic mice with different MMP-12 genotypes. We demonstrated that MMP-12 deficiency significantly reduces the life time of these mice. Histological evaluation of the lumbar spinal cord revealed a decreased number of surviving motor neurons in MMP-12 knock out animals compared to wild-type mice. Immunohistochemical examination of the same tissue showed that the proportion of activated microglia is slightly higher in MMP-12 knock out than in MMP-12 wild-type animals. In summary, MMP-12 was proven to be crucial for life time and neuronal survival in ALS-linked SOD1 transgenic mice. The mechanism of the neuronal protection conducted by MMP-12 is still unclear. MMP-12 serve both pro-inflammatory and anti-inflammatory roles. The lack of MMP-12 might lead to increased neuronal degeneration via heightened microglial activation. However, it has to be considered, that microglia are capable of protecting neighboring cells from cell death. To clarify the role of MMP-12 regarding neuronal degeneration and the associated inflammation, further investigation is required.

2 Einleitung

2.1 Die Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die erstmals in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts durch den Pariser Neurologen Charcot beschrieben wurde, ist eine neurodegenerative Erkrankung. Durch den progredienten Untergang zentraler und peripherer Motoneurone kommt es zu fortschreitender Schwäche der Bulbär-, Rumpf- und Extremitätenmuskulatur und letztlich nach wenigen Jahren zum Tod durch respiratorische Insuffizienz. „Amyotroph“ verweist auf die Atrophie der Muskelfasern, die als Folge der Degeneration ihrer zugehörigen Vorderhornzellen denerviert werden. „Lateralsklerose“ meint das Erhärten des anterioren und lateralen corticospinalen Trakts als Folge einer reaktiven Gliose. Der genaue Mechanismus der Degeneration ist aus heutiger Sicht nur unvollständig aufgeklärt (Boillee S, 2006).

Die ALS ist die häufigste Motoneuronenerkrankung. Die Inzidenz in Europa und Nordamerika liegt bei 1,9/100000/Jahr, die Prävalenz um 5/100000. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis männlich/weiblich circa 1,5:1). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei zwischen 55 und 65 Jahren. In 5% der Fälle beginnt die Krankheit vor dem 30. Lebensjahr. Nach Krankheitsbeginn beträgt die Überlebenszeit ungefähr 2-5 Jahre, wobei Extremwerte von 6 Monaten bis 20 Jahre möglich sind (Worms PM, 2001) (Wijesekera LC, 2009).

2.1.1 Klinische Symptome, Diagnostik und Therapie

Die Klinik der ALS ist durch die kombinierte Degeneration des 1. und 2. Motoneurons gekennzeichnet. Man unterscheidet eine spinale und eine bulbäre Verlaufsform. Ungefähr zwei Drittel aller Patienten leiden an der klassischen spinalen Form der ALS. Initiale Symptome sind hierbei meist Muskelschwäche in Armen oder Beinen. Unwillkürliche Muskelzuckungen, sogenannte Faszikulationen, oder Muskelkrämpfe können der muskulären Schwäche um einige Monate vorausgehen. Schon in der frühen Krankheitsphase findet man fokale Muskelatrophien, die vor allem Hand- und Schultermuskulatur betreffen. Obwohl die Krankheit meist fokal asymmetrisch beginnt, greifen Schwäche und Atrophie früher oder später auf alle Extremitäten über. Meistens werden die kaudalen motorischen Hirnnerven und damit die bulbäre Muskulatur im Verlauf ergriffen. Schrittweise entwickeln sich spastische Lähmungen und Hyperreflexie an den atrophischen Extremitäten. Pathologische Reflexe bleiben oft aus. Bei 2-5% der Betroffenen findet sich eine frontotemporale Demenz.

Einleitung

In einem Drittel der Fälle setzt die ALS mit bulbärer Symptomen wie Sprech- und Schluckstörungen ein. Die Symptome an den Extremitäten können sich fast simultan entwickeln, treten aber meist erst innerhalb von 1 bis 2 Jahren auf. Infolge des erschwerten Schluckens leiden diese Patienten meist an exzessivem Speichelfluss. Wenn zentral bedingte bulbäre Symptome vorliegen, tritt häufig pathologisches Lachen und Weinen auf.

In beiden Fällen kommt es im fortgeschrittenen Stadium zu respiratorischen Komplikationen, bedingt durch die Paralyse der Atemmuskulatur, was die Todesursache der ALS darstellt.

Die Diagnose wird anhand klinischer, elektrophysiologischer und neuropathologischer Nachweise der Motorneuronschädigung mit bulbärer, zervikaler, thorakaler und lumbaler Ausbreitung gestellt. Andere ALS-ähnliche Krankheiten müssen elektrophysiologisch, laborchemisch und radiologisch ausgeschlossen werden (Wijesekera LC, 2009). Als „El Escorial Kriterien“ wurden die Diagnosekriterien der ALS international standardisiert. Die untere Aufzählung zeigt die 1998 von der World Federation of Neurology überarbeiteten, heute gültigen Kriterien.

Revidierte El-Escorial Kriterien:

1. gesicherte ALS:
Schädigungszeichen des 1. und 2. Motorneurons in 3 von 4 Körperregionen (Körperregionen sind: bulbär, zervikal, thorakal, lumbal)
2. wahrscheinliche ALS:
Schädigungszeichen des 1. und 2. Motorneurons in 2 von 4 Körperregionen (einige Schädigungszeichen des 1. Motorneurons oberhalb der Schädigungszeichen des 2. Motorneurons)
3. laborunterstützt wahrscheinliche ALS:
Schädigungszeichen nur des 1. Motorneurons oder des 1. und 2. Motorneurons in 1 von 4 Körperregionen plus Denervierungsaktivität im EMG in mindestens 2 Extremitäten
4. mögliche ALS:
Schädigungszeichen des 1. und 2. Motorneurons in 1 von 4 Körperregionen oder Schädigungszeichen nur des 1. Motorneurons in mindestens 2 Körperregionen
5. ALS- Verdacht:
Schädigungszeichen nur des 2. Motorneurons in mindestens 2 Körperregionen

Eine kurative Therapie der ALS ist nicht möglich. Das einzige zugelassene Medikament Riluzol, ein Glutamatantagonist, verzögert den Krankheitsverlauf um wenige Monate. Allerdings sind unter der Therapie mit Riluzol seltene Fälle von Knochenmarksdepression aufgetreten (Bensimon G, 1994). Daneben werden die Patienten krankengymnastisch,

Einleitung

logopädisch und symptomatisch medikamentös mit Anticholinergika und Antidepressiva behandelt. Zur Minderung von Spastik und Muskelkrämpfen werden Baclofen und Benzodiazepine eingesetzt. Nicht-invasive Heimbeatmung und eine frühzeitige PEG-Sonde sind lebensverlängernd. Die therapeutische Effizienz einer Stammzellbehandlung, die darauf abzielt, verlorene Motorneurone zu ersetzen, wird im Tiermodell untersucht (Lepore AC, 2011).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Degeneration motorischer Neurone

In 90-95% der Fälle tritt die Krankheit sporadisch auf (sALS), die Ätiologie ist ungeklärt. Bei 5-10% der an ALS Erkrankten konnte eine genetische Ursache festgestellt werden (fALS), die meist autosomal-dominant und mit hoher Penetranz vererbt wird. Die fALS beginnt ungefähr zehn Jahre früher. Sonst ist die familiäre von der sporadischen Form klinisch nicht zu unterscheiden. 20% der familiären und auch 4-7% der scheinbar sporadischen ALS-Patienten sind Träger einer Mutation der Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) auf dem langen Arm des Chromosoms 21 (Rosen DR, 1993). Alle bisher bekannten Gene, die mit familiärer ALS in Zusammenhang stehen, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Der zugrunde liegende Mechanismus der Degeneration motorischer Neurone ist nur unvollständig aufgeklärt. Nach heutiger Vorstellung ist es ein Zusammenspiel genetischer Faktoren mit einer Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität (Shaw PJ, 1997), oxidativem Stress (Cookson MR, 1999), Proteinaggregation (Shaw BF, 2007), gestörtem axonalen Transport (Bilsland LG, 2010), mitochondrialer Dysfunktion (Shi P, 2010), Mangel an neurotrophen Faktoren (Duberley RM, 1995) und einer durch Gliazellen vermittelten Inflammation (Weydt P, 2005).

Einleitung

Genetik der fALS

Akronym	Erbgang	Gen	Locus	Erkrankungs- Beginn	Referenz
ALS1	AD	SOD1	21q22	Adult	(Rosen DR, 1993)
ALS2	AR	ALSIN	2q33	Juvenil	(Yang Y, 2001)
ALS3	AD		18q21	Adult	(Hand CK, 2002)
ALS4	AD	SETX	9q34	Juvenil	(Chance PF, 1998)
ALS5	AR		15q15	Juvenil	(Hentati A, 1998)
ALS6	AD	FUS	16q12	Adult	(Ruddy DM, 2003)
ALS7	AD		20p	Adult	(Sapp PC, 2003)
ALS8	AD	VAPD	20q13	Adult	(Nishimura AL, 2004)
ALS9	AD	Angiogenin	14q11	Adult	(Greenway MJ, 2006)
ALS10	AD	TDP-43	1p36	Adult	(Kabashi E, 2008)
ALS-FTD1	AD		9q21-22	adult mit FTD	(Hosler BA, 2000)
ALS-FTD2	AD		9p21.3	adult mit FTD	(Vance C, 2006)

Tabelle 1: Gene und Genloci der fALS.

AD=autosomal-dominant; AR=autosomal-rezessiv; SOD1=Superoxid-Dismutase1; SETX=Senataxin; VAPD=Vesicle associated membrane protein; TDP 43=TAR DNA binding protein 43; FUS=fused in sarcoma; FTD=frontotemporale Demenz

2.1.3 Histopathologische Merkmale

Die pathologischen Markenzeichen der ALS sind Degeneration und Verlust von Motorneuronen im Beisein von intraneuralen Einschlüssen. Im Bereich des Gyrus praecentralis, besonders im medialen Drittel neben der Mantelkante, kommt es zum Verlust von Betz'schen Zellen. Die Pyramidenbahnen sind vor allem im zervikalen Abschnitt degeneriert. Im Bereich der unteren Motorneurone fand man deren Zahl in Autopsien um bis zu 50% verringert. Die verbliebenen Neurone sind atroph und enthalten verschiedene intraneuronale Einschlüsse, die hauptsächlich aus Ubiquilin 2 und Ubiquitin-positivem TDP-43 bestehen (Neumann M, 2006) (Deng HX, 2011). Dem Zellverlust in Hirnrinde, Hirnstamm und Rückenmark folgt eine reaktive Gliose, sodass sich nur selten eine fokale Volumenminderung findet (Wijesekera LC, 2009).

2.2 Die SOD1 und das Mausmodell

Die SOD1 ist ein ubiquitäres, zytosolisch lokalisiertes Metalloprotein. Es katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionradikalen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid und schützt somit die Zelle vor toxischen Oxidationsvorgängen. Bisher wurden über 140 verschiedene Mutationen der SOD1 bei familiären ALS-Patienten beschrieben (Ticozzi N, 2011). Diese unterscheiden sich phänotypisch in Bezug auf Krankheitsbeginn, Schwere und Verlauf (Orrell RW, 2000).

Die Entdeckung der SOD1 Mutation als unmittelbar krankheitsauslösende Ursache stellt den größten Fortschritt der ALS-Forschung seit der Erstbeschreibung durch Charcot dar. Daraufhin konnten transgene Mausmodelle, die das menschliche punktmutierte SOD1 (mSOD1) Gen heterozygot exprimieren, etabliert werden. Gurney und Mitarbeiter entwickelten 1994 als erste eine Mauslinie des Stammes C57BL6, die etwa 18 zusätzliche Kopien des menschlichen mutierten SOD1 Gens enthält. Mäuse mit einer solchen mutierten SOD1 entwickeln klinisch und neuropathologisch ein der menschlichen Erkrankung nahezu identisches Bild (Gurney ME, 1994).

Die ursprüngliche Annahme, dass die Mutation über einen Funktionsverlust zum neuronalen Zelltod führt, bestätigte sich nicht. Im Gegenteil hat die Mutation den Neuerwerb (gain-of-function) einer bisher noch unbekanntem Funktion der SOD1 zur Folge, jedoch ist es bisher nicht gelungen, den pathologischen Funktionsgewinn der SOD1 genau zu verstehen.

Im Tierversuch führt die gain-of-function Mutation zu vermehrter Produktion von freien Radikalen (Beckmann JS, 2001), mitochondrialer Vakuolenbildung, axonaler Degeneration und progressivem Untergang von Motorneuronen (Jaarsma D, 2000).

Die Mutation reduziert die negative Ladung der SOD1, was die korrekte Faltung des Proteins verhindert und zur Akkumulation führt (Shaw BF, 2007). Die Manifestation der

Einleitung

Krankheitssymptome bei Mäusen geht mit einer Akkumulation dieser unlöslichen, aggregierten Formen der mutierten SOD1 in Mitochondrien einher (Deng HX, 2006), wobei die Neigung zur Bildung der aggregierten Proteine bei verschiedenen Mutationen variiert (Prudencio M, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass wenigstens zwei verschiedene SOD1 Mutationen mit einer Schlüsselkomponente der zellulären Entsorgung fehlgefalteter Proteine interagieren (Nishito H, 2008).

Die Expression von mSOD1 in Motorneuronen ist der bestimmende Faktor in der frühen Krankheitsphase im Mausmodell, wohingegen in der späteren Krankheitsphase die mSOD1 Expression in Mikroglia und Makrophagen die wichtigere Rolle spielt (Boillée S, 2006). Das bedeutet, dass Beginn und Verlauf der Krankheit verschiedene Phasen darstellen, die durch die Expression von mSOD1 in verschiedenen Zelltypen gekennzeichnet ist.

2.3 Rolle der Mikroglia

Mikroglia gehören zur Gruppe der ortsständigen Gewebsmakrophagen. Ursprünglich stammen sie aus dem Knochenmark und besiedeln das ZNS in seiner frühen Entwicklung. Im gesunden ZNS kontrollieren diese Zellen die Extrazelluläre Matrix (EZM) durch kontinuierliche Extraktion und Retraktion ihrer Fortsätze. Als Reaktion auf Störung der Homöostase oder Schädigung des Parenchyms kommt es zu morphologischen und funktionellen Veränderungen und damit zur Aktivierung. Über Phagozytose, Antigenpräsentation und Produktion von Sauerstoffradikalen und Zytokinen sind aktivierte Mikroglia an der inflammatorischen Reaktion beteiligt (Ransohoff RM, 2009). Normalerweise ist diese Aktivierung und die damit verbundene inflammatorische Reaktion ein selbstlimitierender Prozess. Anhaltende Inflammation bedeutet die Persistenz eines inflammatorischen Stimulus, wie beispielsweise aggregierte Proteine, die vom Immunsystem als `fremd` erkannt werden.

Die Neuroinflammation und die damit verbundene Aktivierung von Mikroglia ist ein bedeutendes Merkmal der ALS. Sie konnte in Bereichen mit hohen Verlusten an Motorneuronen, das heißt im motorischen Kortex, im Bereich der Hirnnervenkerne im Hirnstamm und in den Vorderhörnern des Rückenmarks sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten beobachtet werden (Troost D, 1990) (Leichsenring A, 2006) (Moisse K, 2006). Es gelangt sogar, Mikroglia-Aktivierung durch Positronen-Emissions-Tomographie bei Patienten direkt sichtbar zu machen (Turner MR, 2004).

Die Aktivierung der Mikroglia gleicht einem zweiseitigen Schwert. Je nachdem, durch welche Faktoren sie aktiviert werden, wirken sie destruktiv oder protektiv auf ihre Umgebung. Der klassische Aktivierungsweg über Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Lipopolysaccharid (LPS) führt dazu, dass Mikroglia (M1) durch Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und Sauerstoffradikalen destruktiven Einfluss ausüben. Der alternative Aktivierungsweg über

Einleitung

Interleukin-4 (IL-4) führt hingegen zu anti-inflammatorischen und regenerativen Eigenschaften der Mikroglia (M2), beispielsweise durch Bereitstellung von insulin-like growth factor 1 (IGF-1) sowie verminderter Produktion von TNF- α (Butovsky O, 2006) (Ponomarev ED, 2007) (Neumann H, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Mikroglia in der Frühphase der ALS schützenden Einfluss auf Motorneurone, Astrozyten und Oligodendrozyten nimmt und damit den Krankheitsverlauf verlangsamt (Zhao W, 2006). Im späteren Verlauf kommt es zu einer Veränderung des Phänotyps der Mikroglia. Das führt, unter anderem über verstärkte Expression der NADPH-Oxidase (NOX) 2 sowie pro-inflammatorischer Zytokine und der damit verbundenen Motorneuronenschädigung zur schnelleren Progredienz der Krankheit (Henkel JS, 2009) (Beers DR, 2011).

Die Akkumulation von aggregierten Formen der mSOD1 wird mit der Transformation der zunächst neuroprotektiven zu zytotoxisch wirkenden Mikroglia in Verbindung gebracht. In vitro konnte gezeigt werden, dass mSOD1-Expression in Mikroglia die M1-Aktivierung verstärkt und damit auch deren Toxizität (Beers DR, 2006) (Liu Y, 2009). Boillée und Mitarbeiter haben 2006 gezeigt, dass der Krankheitsverlauf in der späten Phase verzögert werden kann, indem man die mSOD1-Expression in Mikroglia selektiv ausschaltet (Boillée S, 2006). Mikroglia, die mSOD1 exprimieren, sind also entscheidend für das Überleben von Nervenzellen. Außerdem werden Motorneurone, die mSOD1 exprimieren, von benachbarten Gliazellen, denen mSOD1 fehlt, vor dem Zelltod geschützt (Clement AM, 2003). 2012 beschrieb die Arbeitsgruppe um Lee, dass nach Ersatz von mSOD1 exprimierenden Mikroglia durch solche, die Wildtyp-SOD1 exprimieren der Krankheitsverlauf verlangsamt und das Überleben von mSOD1-transgenen Mäusen verlängert wird (Lee JC, 2012). Basierend auf diesen Erkenntnissen wird allgemein angenommen, dass der Krankheitsverlauf sowohl von Motorneuronen als auch von Gliazellen bestimmt wird.

2.4 Die Matrix-Metalloproteinase-12

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von Endopeptidasen, die an Abbau und Umbau der EZM beteiligt sind (Ennis BW, 1994). Ihr katalytisches Zentrum beinhaltet Zink und ihre Aktivität ist Calcium abhängig. Neuronen, Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten, Endothelzellen und Leukozyten sind als Hauptproduzenten bekannt (Yong VW, 2001) (Yong VW, 2005). In der Regel werden diese Enzyme in inaktiver Form in den interstitiellen Raum sezerniert und dort vor allem durch Serin-Proteasen und bereits aktive MMPs aktiviert (Shah SV, 1987). Ihre Zielstrukturen beinhalten Kollagen, Gelatine, Fibronectin, Laminin, Elastin und Proteoglykane (Gottschall PE, 1996).

MMPs sind gewissermaßen in alle strukturellen Gewebsveränderungen involviert. Ihre Aktivität ist jedoch nicht auf die EZM beschränkt. Sie sind auch am zellulären Signalweg

Einleitung

beteiligt, indem sie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone aktivieren und inaktivieren (Sternlicht MD, 2001).

Normalerweise sind MMPs im adulten ZNS kaum nachzuweisen. In Zusammenhang mit neurologischen Krankheitsbildern wie ALS, Multiple Sklerose, Myasthenia gravis und Alzheimer kommt es allerdings zu vermehrter Expression (Lim GP, 1996) (Romi F, 2012). Die gesteigerte Expression verschiedener MMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9) konnte in Blut und Liquor sowie durch postmortale Untersuchungen von Hirn, Rückenmark und Muskeln von ALS-Patienten nachgewiesen werden (Lim GP, 1996) (Schoser BG, 1999) (Demestre M, 2005). Darüber hinaus hat der Einsatz von MMP-Inhibitoren im Tiermodell die Überlebenszeit der Tiere signifikant verlängert (Lorenzl S, 2006).

Die frühere, allzu simple Sicht, MMPs hätten grundsätzlich destruktiven Einfluss auf das ZNS, wurde revidiert. In den letzten Jahren zeigte sich, dass MMPs sowohl bei der Reifung und Differenzierung von Oligodendrozyten (Larsen PH, 2004) und der Ausbildung von Myelin (Larsen PH, 2006), als auch bei dendro-axonaler Elongation (Ould-yahoui A, 2009) (Patterson PH, 1985), der Plastizität von Synapsen (Yong VW, 2005) und allgemein in regenerativen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Yong VW, 2001). 2011 konnte gezeigt werden, dass erhöhte MMP-Aktivität und Neurogenese nach ischämischen Schaden im Hippocampus in Verbindung stehen (Wójcik-Stanaszek L, 2011).

Die inflammatorische Funktion der MMPs ist als sehr komplex anzusehen. Neben der erleichterten Migration inflammatorischer Zellen über die Blut-Hirn-Schranke spalten sie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren und haben sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften (McQuibban GA, 2000) (Parks WC, 2004) (Rosenberg GA, 2009).

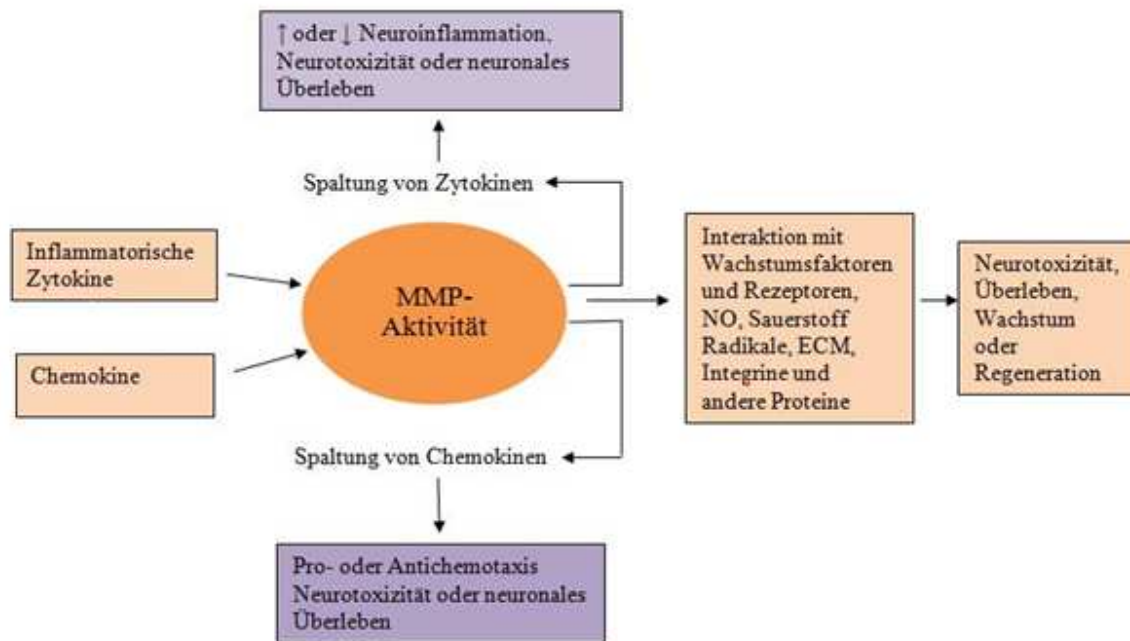


Abbildung 1: Verschiedene Folgen der MMP Aktivität

Die MMP-12, auch bekannt als Makrophagen Metalloelastase, ist eine 54kDa Elastin-spaltende Protease, die im ZNS hauptsächlich von Mikroglia produziert wird (Crocker SJ, 2008). Außerhalb des ZNS steht die MMP-12 in Zusammenhang mit der Entstehung von Aortenaneurysmen, Artherosklerose, Emphysemen und rheumatoider Arthritis. In den letzten Jahren haben mehrere Studien einen immunmodulierenden Effekt der MMP-12 aufgezeigt. Neben der schon erwähnten erleichterten Migration inflammatorischen Zellen ist die MMP-12 in der Lage, TNF- α zu aktivieren (Churg A, 2003), die Produktion von Chemokinen zu induzieren und die Rekrutierung neutrophiler Zellen einzuleiten (Nénan S, 2005) (Le Quément C, 2008). Nach Rückenmarkstrauma und intrazerebraler Hämorrhagie trägt die MMP-12 zu inflammatorisch vermitteltem Schaden bei (Power C, 2003) (Wells JE, 2003) (Wells JE, 2005). Ebenso sind auch anti-inflammatorische Effekte der MMP-12 bekannt. Im Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS) wirkt MMP-12 durch Steigerung der Th-2 Immunantwort protektiv auf Neuronen (Weaver A, 2005). Weiterhin ist die MMP-12 in der Lage, Chemokine zu inaktivieren und damit die Chemotaxis von Leukozyten zu stoppen (Dean RA, 2008). Somit stellt die MMP-12 Aktivität auch einen Mechanismus dar, Entzündungsreaktionen einzudämmen.

Neben der oben beschriebenen Modulation inflammatorischer Vorgänge nimmt MMP-12 auch Einfluss auf regenerative Prozesse im ZNS, denn MMP-12 fördert die Reifung von Oligodendrozyten und die Ausbildung von Myelin durch die Spaltung von IGF-1 bindendem Protein (IGFBP) 6 (Larsen PH, 2004) (Larsen PH, 2006).

Einleitung

Die Auswirkungen, die MMP-12 einerseits auf Schutz und Regeneration von Neuronen und andererseits auf inflammatorische, destruktive Prozesse hat, sind immer noch unklar und es bleibt noch offen, welche Rolle die MMP-12 insgesamt bei der ALS spielt.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit ist Teil eines größeren Projekts, indem der Einfluss der MMP-12 auf die Degeneration von Motorneuronen in einem Mausmodell der ALS untersucht wird. Vorrausgehend wurde die Expression von 23 verschiedenen MMPs in mSOD1-transgenen Mäusen untersucht und mit der in Wildtyp-Tieren verglichen. Hierbei fiel auf, dass nur die Transkription der MMP-12 in mSOD1-transgenen Mäusen in präklinischer und klinischer Phase 80 bis 200-fach erhöht ist.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Rolle der MMP-12 zu beleuchten und deren Zusammenhang mit neuronaler Degeneration zu klären.

Hierzu wurden im ersten Schritt die Lebenszeiten mSOD1-transgener Tiere mit verschiedenen MMP-12 Genotypen miteinander verglichen.

Der zweite Schritt bestand in der Bewertung der überlebenden Motorneurone im lumbalen Rückenmark. Hierzu wurden die noch vorhandenen Motorneurone in den Vorderhörnern sowie die verbliebenen Axone in den L5 Vorderwurzeln quantifiziert.

Aufgrund der Annahme eines immunmodulierenden Effekts wurde weiterhin der Einfluss der MMP-12 auf das inflammatorische Geschehen mit Hilfe immunhistochemischer Färbung mit Anti-Iba1 beurteilt.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Programme

Mikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon, Japan
Vortex Reax top	Heidolph Elektro GmbH, Kelheim,
Digital Camera Dxm 1200	Nikon, Japan
pH- Meter	Knick, Berlin
Mikrotom SM2000R	Leica, Nussloch
Kühlschrank (-25°C)	Liebherr Premiumm no-frost
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Einbettgerät EG1150H	Leica, Nussloch
Fotosoftware NIS-Elements BR3.0	Nikon, Japan
Fotosoftware AnalysisPro	Olympus Europe Holding GmbH, Hamburg

3.2 Chemikalien

Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Entellan Schnelleindeckmittel	Merck KGaA Darmstadt
Mayers Hämalaulösung	Merck KGaA Darmstadt
Kresylviolett	Merck KGaA Darmstadt
3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim
3,3- Diaminobenzidinetetrahydrochlorid	Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim
Biotinylated goat anti- rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Rabbit anti-Iba1 IgG	Wako Pure Chemical Industries, Neuss

Material und Methoden

Citronensäuremonohydrat	Serva,Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg
Ethanol	SAV LP GmbH, Flintsbach
Methanol	VWR International, Frankreich
Rotihistol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Casein	Merck KGaA Darmstadt
Triton-x	Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim
Goat serum	Sigma- Aldrich GmbH, Steinheim
ABC Vectastain kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Isofluran	Baxter,Unterschleißheim
PFA	Merck KGaA Darmstadt
Methylenblau	EMS, München
Epon812	EMS, München
Osmiumtertroxid	EMS, München
Dodecylbernsteinsäureanhydrid (DDSA)	EMS, München
Methylnadicanhydrid (MNA)	EMS, München

3.3 Versuchstiere

Die transgenen Mäuse der Stämme B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1GUR/J und B6SJL-Tg(SOD1)2GUR/J, die die humane SOD1 Mutante G93A und SOD1 Wildtyp exprimieren sowie auch die MMP-12 knock out Mäuse des Stammes B6.129X-MMP12tm1Sds/J bezogen wir von der Firma Jackson Laboratory. Die Unterbringung erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie in Homburg unter spezifisch pathogen freien (SPF) Bedingungen entsprechend den Anforderungen des Tierschutzgesetzes.

3.3.1 Kreuzung und Genotypisierung

Zunächst wurde Mäuse, die die humane SOD1 Mutante exprimieren mit MMP-12 defizienten Tieren verpaart. Nach der zweiten Generationen erhielten wir Tiere mit den Genotypen mSOD1/MMP-12(+/, +/-, -/-). Das genaue Kreuzungsschema zeigt Abbildung 2. Die Genotypisierung aller Tiere erfolgte mittels PCR von Mausohr-DNA.

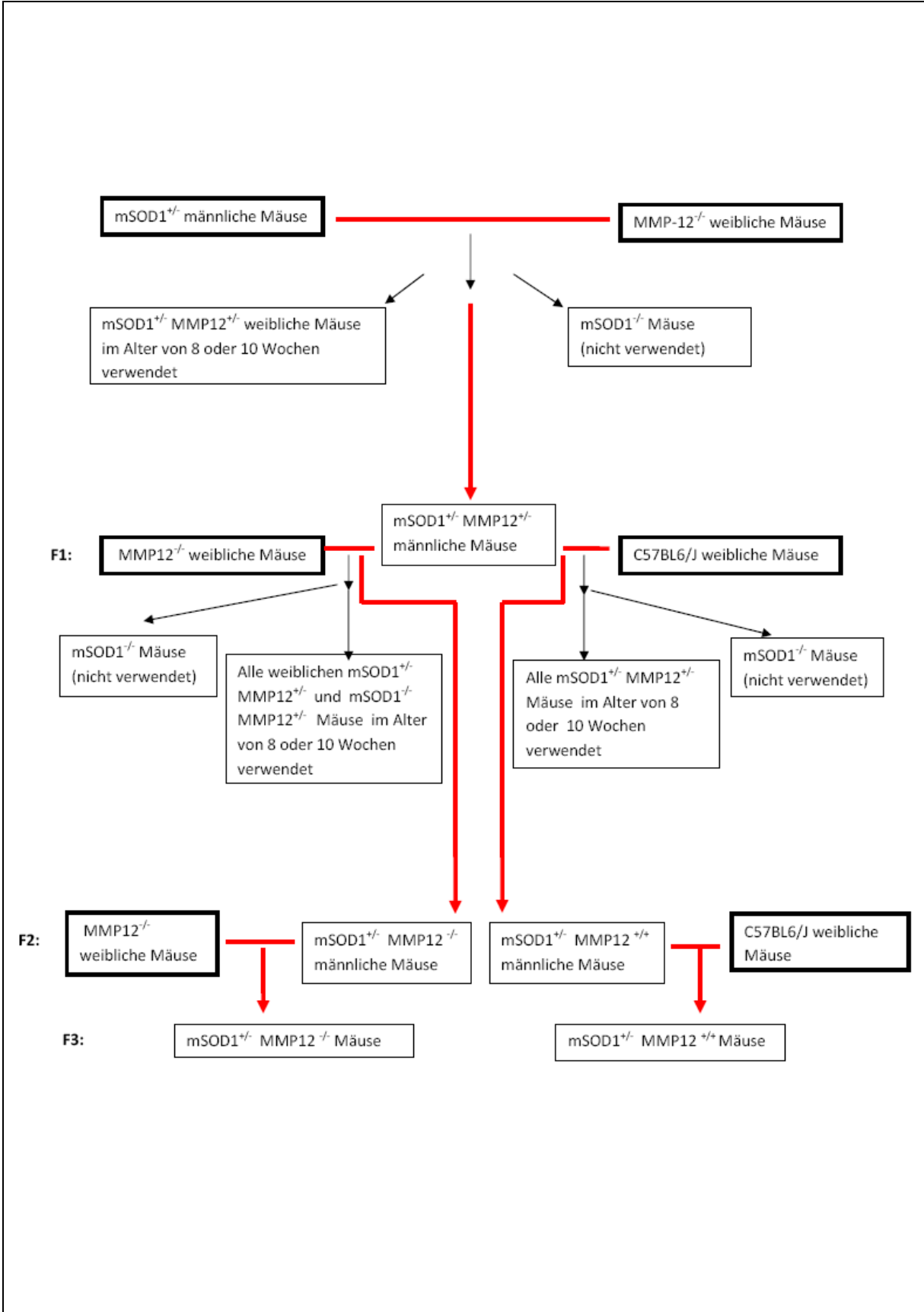


Abbildung 2: Kreuzungsschema von MMP-12 knock out und mSOD1 transgenen Tieren

3.3.2 Krankheitsverlauf, klinischer Score und Untersuchung der Lebenszeit

Tiere, die die G93A Mutation tragen, entwickeln erste Symptome im Sinne einer Schwäche der Hinterläufe ungefähr in der zwölften Woche, die komplette Paralyse der Extremitäten tritt durchschnittlich in der 19. Woche ein. Circa 7-10 Tage nach Eintritt der kompletten Paralyse sterben die Tiere. Weibchen leben im Schnitt fünf Tage länger.

Neuropathologische Veränderungen sind bereits im asymptomatischen Stadium nachweisbar. Die motorischen Vorderhornzellen, deren Zahl im Erkrankungsverlauf abnimmt, enthalten hyaline Einschlüsse aus aggregierten mSOD1.

Alle Tiere wurden regelmäßig gewogen, bezüglich ihrer klinischen Symptomatik untersucht und nach folgendem Score eingeteilt:

0	Keine Zeichen von Schwäche
1	Tremor und Verlust des Spreizreflex
2	Parese eines Hinterlaufs
3	Parese beider Hinterläufe
4	Paralyse eines oder beider Hinterläufe

Der klinische Tod als der Endpunkt des Tierversuchs ist festgelegt als der Zeitpunkt, wenn die Mäuse nicht mehr in der Lage sind, sich nachdem sie auf den Rücken gelegt wurden innerhalb von 10 Sekunden selbst aufzurichten oder wenn sie innerhalb einer Woche 20% ihres Körpergewichts verlieren. Trifft eines dieser beiden Kriterien zu, so werden die Tiere euthanasiert.

Abbildung 3 und Abbildung 4 zeigen Tiere mit deutlicher muskulärer Atrophie und Paresen der Hinterläufe.



Abbildung 3: Weibliches Tier (MMP-12 -/-) mit Atrophie und Paresse beider Hinterläufe

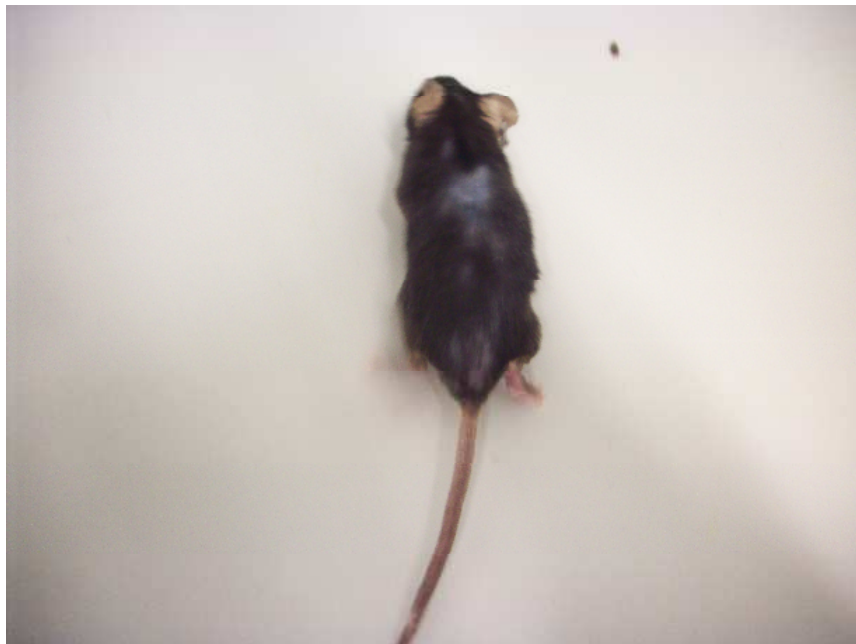


Abbildung 4: Männliches Tier (MMP-12 -/-) mit Paresse des rechten Hinterlaufs

Untersuchungen zur Lebenszeit wurden an 15 Mäusen durchgeführt, für histologische Untersuchungen wurden insgesamt 30 Tiere verwendet. Die Analysen wurden bezüglich des Genotyps blind durchgeführt.

3.4 Histologie

3.4.1 Herstellung histologischer Präparate für Lichtmikroskopie

3.4.1.1 Perfusion und Präparation

Die Mäuse wurden am klinischen Endpunkt über die Inhalation einer Überdosis Isofluran euthanasiert. Danach wurden die Tiere in eine Halteapparatur eingespannt und der Brustkorb eröffnet. Durch den linken Ventrikel wurde transkardial mit PBS perfundiert, um das Blut aus den Gefäßen zu entfernen. Daraufhin folgte die Perfusion mit 4% PFA. Anschließend wurden Rückenmark und die L5 Vorderwurzel präpariert.

3.4.1.2 Fixierung

Zur Nachfixierung wurde das Rückenmark bis zur Einbettung in Paraffin in 4%PFA bei 4°C aufbewahrt. Die L5 Vorderwurzeln wurden für die Epon-Einbettung in einer phosphatgepufferten Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Lösung (1%PFA, 1% Glutaraldehyd in Phosphatpuffer) fixiert. Die Fixierung mit Aldehyden dient der Vernetzung von Proteinen.

3.4.1.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Das lumbale Rückenmark wurde jeweils auf Höhe des thorakolumbalen und des lumbosakralen Übergangs mit einem Skalpell herausgetrennt und in 2 Teile geschnitten. Mittels aufsteigender Alkoholreihe wurde das so erhaltene Material über Nacht entwässert und am nächsten Tag jeweils mit der kranialen Seite nach oben senkrecht stehend in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe des Mikrotoms wurden 5µm dicke Schnitte in Serien zu je 60 Objektträgern pro Maus angefertigt. Der Schnitt wurde schwimmend in destilliertem Wasser auf einem Objektträger positioniert und in einem 50-55°C warmen Wasserbad gestreckt. Die Objektträger wurden zuvor silanisiert. Die mit Schnitten beladenen Objektträger wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 56°C zum Trocknen aufbewahrt.

3.4.1.4 Herstellung der Semidünnschnitte

Zur Herstellung der Semidünnschnitte mussten die ventralen Wurzeln in das Epoxidharz Epon eingebettet werden. Das hierfür notwendige Epongemisch wurde zuvor hergestellt. Dazu wurden zunächst 72,33ml Epon812 und 116ml Dodecylbernsteinsäureanhydrid (DDSA) sowie 100ml Epon812 mit 89ml Methylnadicanhydrid (MNA) jeweils in einem Kolben gemischt. Beide Flüssigkeiten wurden im Verhältnis 1:1 miteinander versetzt und 0,2 ml Benzyl dimethylamin auf 10 ml Fertiglösung zugegeben und gewartet, bis alle Gasbläschen verschwunden waren.

Material und Methoden

Die Präparate wurden vor dem Einbetten mit 2% Osmiumtetroxid zur Vernetzung von Lipiden für 2 Stunden nachfixiert und anschließend viermal 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Da das Kunstharz Epon mit Wasser nicht mischbar ist, das Gewebe aber äußerst wasserhaltig ist, müssen die zellulären Wasseranteile mit folgender Behandlung durch organische Lösungsmittel ersetzt werden:

70% Ethanol (dreimal 5 Minuten), 80% Ethanol (30 Minuten), 90% Ethanol (30 Minuten), 100% Ethanol (30 Minuten), 100% Aceton (dreimal 30 Minuten).

Anschließend wurden die Präparate für je eine Stunde in mit folgenden Epon-Aceton-Gemischen behandelt.

1. 1 Teil Epon, 3 Teile Aceton
2. 1 Teil Epon, 1 Teil Aceton
3. 3 Teile Epon, 1 Teil Aceton

Es folgte die einstündige Inkubation mit purem Epon bei 40°C und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Schließlich wurden die Präparate stehend eingebettet. Die Polymerisation des Epon erfolgte 2 Tage lang bei 60°C im Wärmeschrank. Im Anschluss wurden die fertigen Eponblöckchen bis zu der Tiefe abgetrimmt, in der man erstes Gewebe antraf. Mit dem Ultra-Mikrotom wurden 500nm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Wassertropfen auf den Objektträger aufgebracht und anschließend auf einer Heizplatte getrocknet.

3.4.2 Färbungen

3.4.2.1 Nissl-Färbung

Um Nervengewebe spezifisch anzufärben, gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Zu den gängigsten Färbungen gehört die Nissl-Färbung, bei der der verwendete Farbstoff Kresylviolett basophile Strukturen wie das ribonukleinsäurereiche endoplasmatisches Retikulum (ER) in Neuronen anfärbt. Ansammlungen von rauem ER werden als Nissl-Schollen bezeichnet.

In Vorversuchen wurden optimale Zeiten für Deparaffinierung, die Färbung an sich und die aufsteigenden Alkoholreihe erarbeitet.

Zur Herstellung der Färbelösung, einer 0,5% Kresylviolettlösung wurden 0,5g Kresylviolettacetat mit 100ml destilliertem Wasser auf dem Magnetrührer verrührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und in einer dichten Flasche vor Licht geschützt aufbewahrt.

Von den 60 angefertigten Serienschnitten pro Tier wurde jeder siebte Schnitt gefärbt, insgesamt wurden also 9 Schnitte je Maus für diese Färbung verwendet.

Der erste Schritt der Färbung besteht in der Deparaffinierung der Schnitte in absteigender Alkoholreihe. Dazu wurden die Objektträger zweimal jeweils 5 Minuten in Rothihistol, danach

Material und Methoden

zweimal je 3 Minuten in 100% Ethanol und in 90%, 70% und 50% Ethanol und in destilliertes Wasser jeweils kurz eingetaucht. Anschließend wurden die Objektträger 15 Sekunden mit Kresylviolett gefärbt und direkt danach zuerst in destilliertem Wasser und dann mit Leitungswasser abgewaschen. Daraufhin blieben die Schnitte für eine halbe Stunde in destilliertem Wasser. Die sich anschließende aufsteigende Alkoholreihe zum Dehydrieren des Gewebes bestand aus 50%, 70%, 90% und 100% Ethanol sowie Rothistol, die Schnitte wurden jeweils kurz eingetaucht. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

3.4.2.2 Methylenblau-Färbung nach Richardson

Diese Färbung wurde an Semidünnschnitte der ventralen L5 Wurzeln durchgeführt. Die beiden Stammlösungen (Lösung A:1% (0,5g) Azur 2 in (50ml)Aqua dest., Lösung B:1%(0,5g) Methylenblau in (0,5g)1% Borax in (50ml) Aqua dest.) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, eine Stunde lang gerührt und anschließend filtriert. Die Schnitte wurden 5 Sekunden lang mit einem Tropfen Färbelösung bedeckt und auf einer Wärmeplatte (ca.70°C) 30 Sekunden lang erhitzt, danach mit PBS gründlich gewaschen und anschließend erneut auf der Wärmeplatte getrocknet. Basophile und osmiophile Strukturen stellen sich durch den Farbstoff blau dar.

3.4.2.3 Immunhistochemische Färbung mit Anti-Iba1

Um den Einfluss der MMP-12 auf das inflammatorische Geschehen in diesem Mausmodell zu beurteilen, wurden Mikroglia mit Hilfe immunhistochemischer Färbung dargestellt. Iba1 ist ein Makrophagen/ Mikroglia-spezifisches calciumbindendes Protein, das an der Aktivierung ruhender Mikroglia beteiligt ist.

Wie bereits oben beschrieben wurde auch für diese Färbung jeder siebte Paraffinschnitt verwendet. Hierbei wurden insgesamt 6 Schnitte je Maus gefärbt.

Im ersten Schritt der Färbung wurden die 5µm dünnen Schnitte in absteigender Alkoholreihe deparaffiniert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte fünfmal 3 Minuten in Citratpuffer (10 mM, pH6) in einer Mikrowelle mit 560 Watt erhitzt und anschließend in destilliertem Wasser wieder abgekühlt. Um eine unspezifische Reaktion durch gewebeeigene Peroxidasen zu vermeiden, musste die Aktivität der endogenen Peroxidase blockiert werden. Dazu wurden die Präparate in einer Lösung bestehend aus 10ml H₂O₂, 17ml Methanol und 73ml destilliertem Wasser 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an alle nun folgenden Schritten wurden die Präparate zweimal 5 Minuten in TBS und weitere 5 Minuten in TBS/T gewaschen. Durch Ablagerung des Primärantikörpers an Bindegewebsproteine mit starker elektrostatischer Ladung kann eine unspezifische Hintergrundfärbung entstehen. Daher wurden diese Bindungsstellen vor der Applikation des Primärantikörpers durch Aufbringen eines Serums aus derjenigen Spezies, aus der der

Material und Methoden

Sekundärantikörper stammt, abgesättigt. Um ein Abfließen von Flüssigkeit vom Objektträger zu vermeiden, wurden die Präparate mit einem Fettstift umfahren (Dako Pen). Nach einstündiger Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen in einer Phosphatpuffer-Lösung (0,2% Casein, 0,1% Tween-20, 0,01% Triton-X, 5% Ziegen Serum in PBS) wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer mit dem primären Antikörper rabbit anti-Iba1 inkubiert. Der primäre Antikörper wurde hierbei in einer PBS-Lösung (0,02% Casein, 0,01% Tween-20, 0,01% Triton-X, 1% Ziegen Serum in PBS) 1:500 verdünnt. Der sekundäre Antikörper, Biotin-gekoppelter goat anti-rabbit IgG, wurde am darauffolgenden Tag ebenfalls 1:500 in oben genannter PBS-Lösung verdünnt und für eine Stunde zugesetzt. Als Detektionssystem diente die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex- Methode) (Abbildung 5). Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. An drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ist ein Molekül Biotin gebunden. An der vierten Bindungsstelle bindet der biotinylierte Sekundärantikörper, der somit als Brückenantikörper dient. Außerdem ist eine Peroxidase an den Komplex gekoppelt.

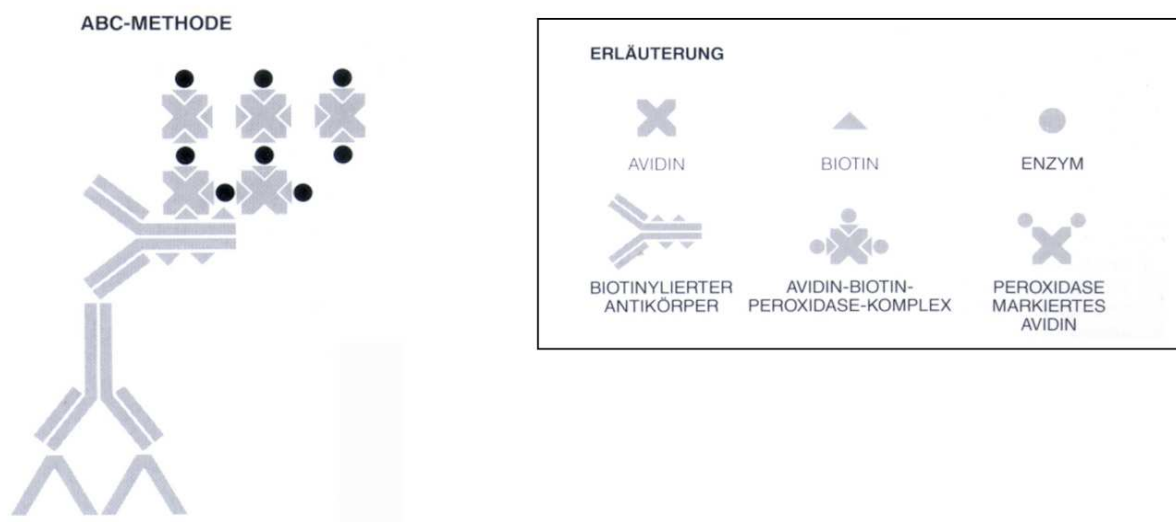


Abbildung 5: Schematische Darstellung der ABC-Methode: Der ABC-Komplex bindet über das Avidin an das Biotin des Sekundärantikörpers (Dako, Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden)

Der ABC-Komplex musste eine halbe Stunde vor Gebrauch laut Herstellerangaben angesetzt und für 30 Minuten mit den Schnitten inkubiert werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Sichtbarmachung des Komplexes, indem H_2O_2 als Reaktionssubstrat und DAB (3,3-Diaminobenzidinetetrahydrochlorid) als Chromogen 30 Sekunden lang zugesetzt wurden (60mg DAB in 60 ml PBS/T, 20 μ l H_2O_2). Anschließend wurden die Schnitte 30 Sekunden mit filtriertem Hämatoxylin gegengefärbt, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 5 Minuten mit Leitungswasser gebläut. Daraufhin folgte

die Dehydrierung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und abschließend die Eindeckung mit Entellan.

Die Spezifität der Färbung wurde überprüft, indem der primäre Antikörper ausgelassen und durch normales Serum ersetzt wurde.

3.5 Histologische Auswertung

3.5.1 Methylenblau-Färbung

Zur quantitativen Analyse der motorischen Axone wurden die semidünnen Querschnitte der Vorderwurzeln an einem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse) bei 60-facher Vergrößerung mit Hilfe des Programmes AnalysisPro fotografiert. Es wurden mehrere Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Die einzelnen Axone und deren Durchmesser wurden manuell erfasst, die Gesamtzahl der Axone vom Programm angegeben. Die Zählung wurde bezüglich des Genotyps blind durchgeführt.

3.5.2 Nissl-Färbung

Die Auswertung aller Paraffinschnitte erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Nikon Eclipse) mit angeschlossener Kamera, wodurch die fotografische Dokumentation möglich war. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der Software NIS-Elements ausgewertet. Die mit Kresylviolett gefärbten Präparate wurden bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Zur Orientierung diente die im Querschnitt des Rückenmarks deutlich sichtbare Fissura mediana anterior sowie die Schmetterlingsform der grauen Substanz. Da nur die Vorderhörner des lumbalen Rückenmarks untersucht werden sollten, wurden als Grenzen zwei senkrecht aufeinander stehende Linien durch den Mittelpunkt des Zentralkanals gezogen, um Vorder- und Hinterhörner sowie links und rechts voneinander zu trennen.

Die Bilder wurden mittels manueller Zähluhr ausgewertet. Gezählt wurden alle Zellen mit einem Durchmesser $>25\mu\text{m}$, die einen eindeutig abgrenzbaren Kern aufwiesen. Die Analysen wurden bezüglich des Genotyps blind durchgeführt.

Aus den gewonnenen Daten wurden mit Hilfe einer in Excel erstellten Tabelle Mittelwerte sowie Standardabweichung errechnet. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde eine einfache Analysis of Variance (one-way Anova) angewendet (PASW).

3.5.3 Quantifizierung immunhistochemischer Färbung

Zur Detektion der angefärbten Mikroglia wurden die Präparate im Lichtmikroskop (Nikon Eclipse) bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Um die beiden Vorder- und Hinterhörner jeweils einzeln betrachten zu können, wurden als Grenzen zwei senkrecht aufeinander

Material und Methoden

stehende Linien durch den Mittelpunkt des Zentralkanals gezogen. Die Analysen wurden bezüglich des Genotyps blind durchgeführt.

In Analysis wurden zunächst die Flächen der einzelnen Hörner gemessen. Mit Hilfe der Funktion Phasenanalyse wurden die im aufgenommenen Bild sichtbare Braunfärbung der Iba1-positiven Zellen in den einzelnen Hörnern farbkodiert. Das Programm berechnet mit Hilfe der Farbeinstellung den prozentualen Anteil von Iba1-positiven Farbsignal an der gesamten Fläche des einzelnen Horns.

Aus den Ergebnissen der einzelnen Hörner wurden in Microsoft Excel Mittelwerte für jedes einzelne Tier sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen für die einzelnen Genotyp-Gruppen bestimmt. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde auch hier eine einfache Analysis of Variance (one-way ANOVA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Lebenszeit

In früheren Experimenten wurde die Expression von 23 verschiedenen MMPs in mSOD1-transgenen Mäusen untersucht und mit der in Wildtyp-Tieren verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Transkription der MMP-12 in mSOD1-transgenen Mäusen in präklinischer (8 Lebenswochen) und klinischer Phase (12 Lebenswochen) 80 bis 200-fach erhöht ist.

Um den Einfluss der MMP-12 auf die Überlebenszeit der Tiere zu untersuchen, wurden G93A SOD1-transgene Mäuse mit MMP-12 knock out Tieren verpaart. Die klinischen Symptome von 15 Mäusen mit unterschiedlichen MMP-12 Genotypen wurden bis zum klinischen Endpunkt überwacht. Heiman-Patterson et al. haben 2005 gezeigt, dass das Geschlecht der Tiere Einfluss auf die Überlebenszeit hat, weiblich Tiere leben 4-7 Tage länger als männliche (Heiman-Patterson TD, 2005), sodass hier ausschließlich weibliche Mäuse betrachtet wurden.

Hierbei zeigte sich, dass ein Defizit an MMP-12 den Krankheitsverlauf beschleunigt und die Lebenszeit der Tiere signifikant verkürzt (Abbildung 6). Statistische Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mantel-Cox Tests berechnet.

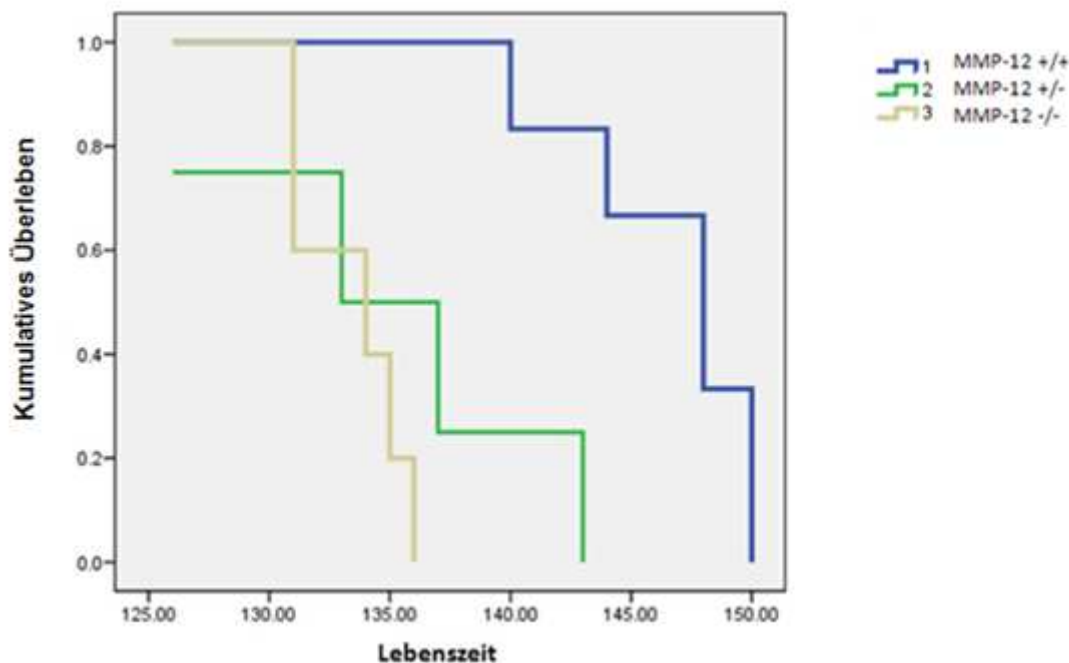


Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve von G93A SOD1-transgenen Mäusen mit unterschiedlichen MMP-12 Genotypen zeigt, dass MMP-12 Defizit die Überlebenszeit verkürzt. Mantel-Cox Analyse, $p < 0,05$; $n = 5$ in jeder Gruppe.

4.2 Axonzählung

Die Axone der L5 Vorderwurzeln wurden lichtmikroskopisch ausgezählt. Die Zählung erfolgte halbautomatisch auf der Basis von AnalysisPro. Erfasst wurden alle Axone mit einem Durchmesser $>3,5\mu\text{m}$. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Axone $>3,5\mu\text{m}$ sind Abbildung 7 graphisch dargestellt. Jeder Balken repräsentiert das Ergebnis eines einzelnen Tieres. Vergleicht man die unterschiedlichen Genotypen miteinander, so zeigt sich, dass die Axonanzahl beim heterozygoten Tier am geringsten ist (210). Das Wildtyp-Tier zeigte die höchste Zahl an Axonen, die allerdings mit 279 nur geringfügig höher ist als bei dem Tier, dem MMP-12 fehlt (263 Axone).

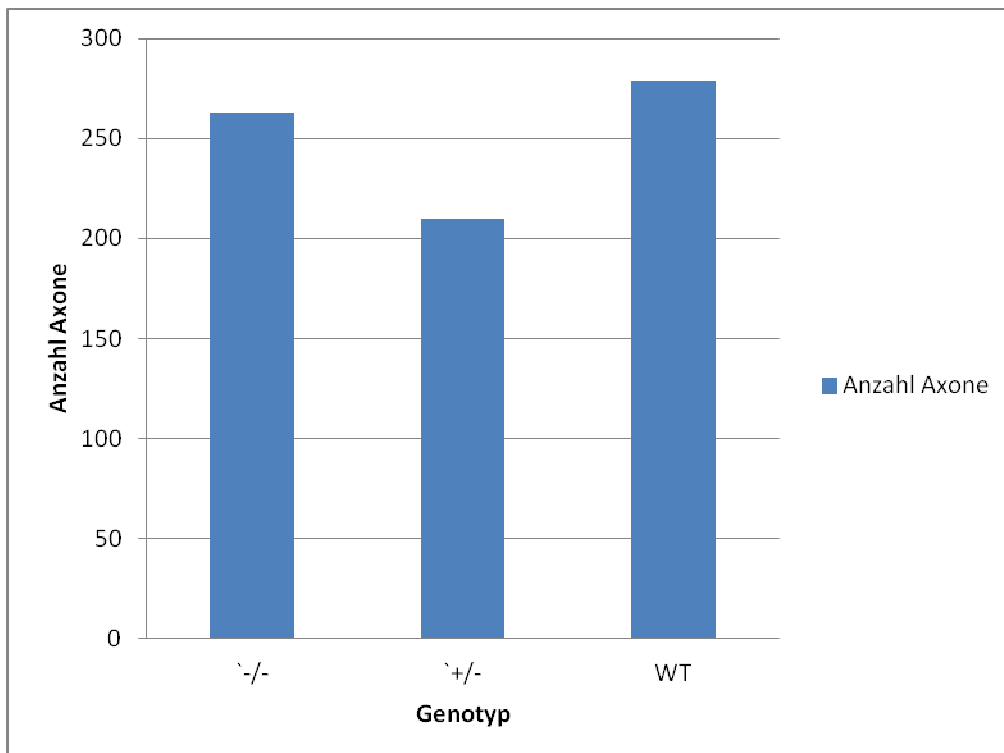


Abbildung 7: Anzahl Axone $>3,5\mu\text{m}$ bei verschiedenen MMP-12 Genotypen

Exemplarische Aufnahmen der Semidünnschnitte in 20- und 60-facher Vergrößerung zeigt Abbildung 8. In den Übersichtsaufnahmen erkennt man von Markscheiden umgebene Nervenzellfortsätze. Die Myelinscheiden werden dadurch gebildet, dass sich die Zellmembranen von Schwann-Zellen, welche zur Gruppe der Gliazellen gehören umwickeln. Sie schützen den Nerv vor mechanischen Belastungen, isolieren und ernähren ihn.

Ergebnisse

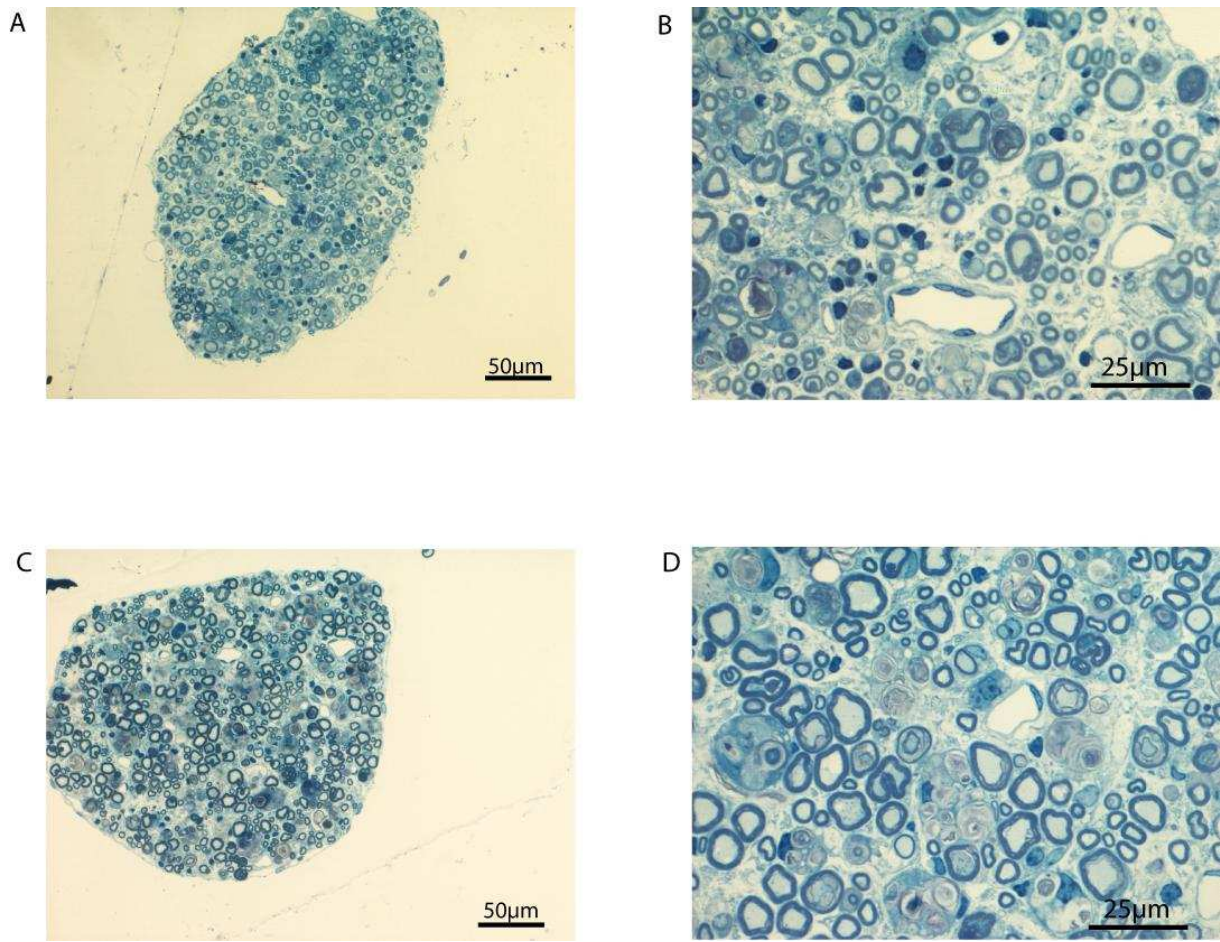


Abbildung 8: Dargestellt sind Querschnitte der L5 Wurzeln einer MMP-12 knock out (A, B) sowie einer MMP-12 Wildtyp Maus (C, D), die mit Methylenblau gefärbt wurden.

4.3 Quantifizierung der Degeneration motorischer Neurone

Bei 10-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop wurden die mit Kresylviolett gefärbten Zellen der Vorderhörner ausgezählt. Pro Maus wurden neun der Serienschritte für die Zählung verwendet, jeweils mit ausreichendem Abstand voneinander (7 Schnitte, d.h. 35 µm), um eine doppelte Erfassung von Neuronen zu vermeiden. Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte der einzelnen Tiere in Gruppen nach Geschlecht und Genotyp geordnet. Hierbei werden starke interindividuelle Unterschiede in den einzelnen Genotypen-Gruppen deutlich. In Abbildung 9 sind Mittelwerte und Standardfehler der Genotypen-Gruppen graphisch dargestellt.

Es zeigt sich hierbei, dass auch die Motorneuronenzahl bei MMP-12 defizienten Tieren geringer ist als bei Wildtypen (MMP-12 $-/-$ 2,474, MMP-12 WT 2,960). Außerdem weisen weibliche Tiere weniger überlebende Motorneurone auf als männliche (Abbildung 10). Zwischen den einzelnen Genotypen besteht allerdings kein signifikanter Unterschied ($p=0,638$).

Ergebnisse

Geschlecht	Genotyp	Mittelwert	Mittelwert
weiblich	+/-	1,625	
weiblich	+/-	2,687	
weiblich	+/-	1,422	
weiblich	+/-	1,678	
weiblich	+/-	1,583	
weiblich	+/-	1,555	
weiblich	+/-	2,3	
weiblich	+/-	3,944	
weiblich	+/-	3,868	2,296
weiblich	WT	1,583	
weiblich	WT	1,902	
weiblich	WT	1,777	
weiblich	WT	2,988	
weiblich	WT	2,464	
weiblich	WT	3,468	2,364
männlich	-/-	2,802	
männlich	-/-	2,666	
männlich	-/-	3,228	
männlich	-/-	1,777	
männlich	-/-	1,896	2,474
männlich	+/-	2,798	
männlich	+/-	2,75	
männlich	+/-	1,531	
männlich	+/-	3,718	
männlich	+/-	4,135	2,986
männlich	WT	3,75	
männlich	WT	5,743	4,7465

Tabelle 2: Mittelwerte der überlebenden Motorneurone/Vorderhorn in den verschiedenen Genotypen-Gruppen WT (Wildtyp) , +/- (heterozygot), -/- (knock out)

Ergebnisse

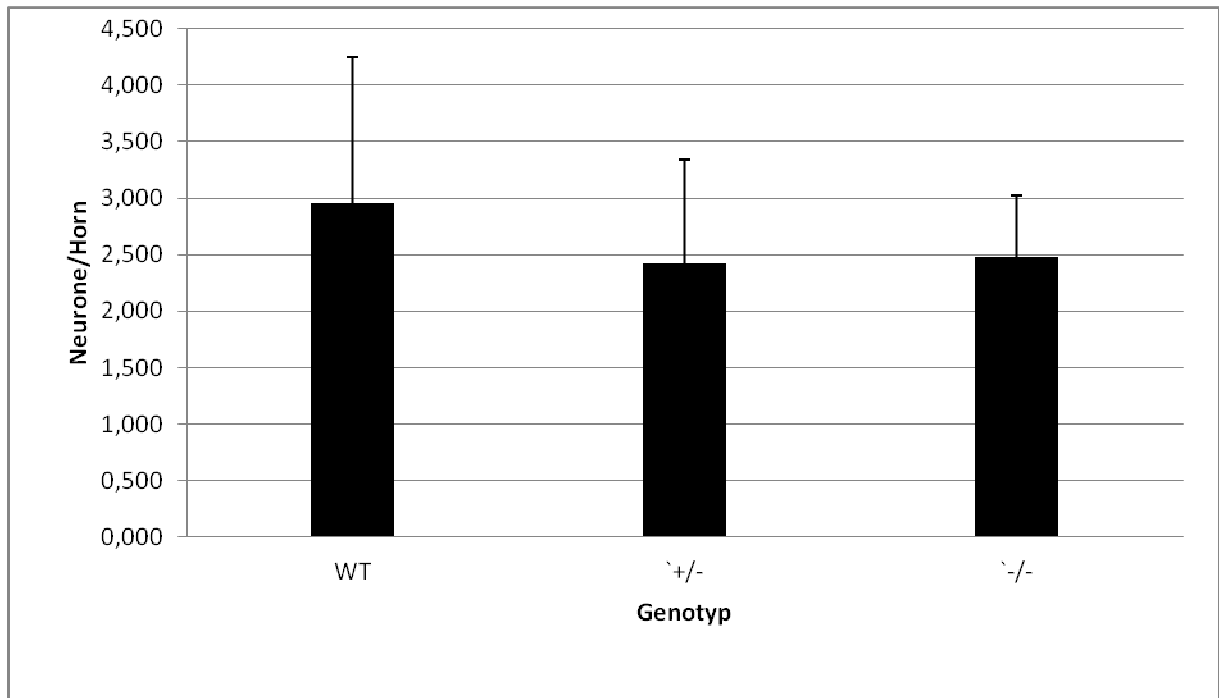


Abbildung 9: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen der mit Kresylviolett angefärbten Motorneurone pro Vorderhorn ($p=0,638$). Die einzelnen Genotypen-Gruppen sind aufgeführt mit WT (Wildtyp), +/- (heterozygot), -/- (knock out)

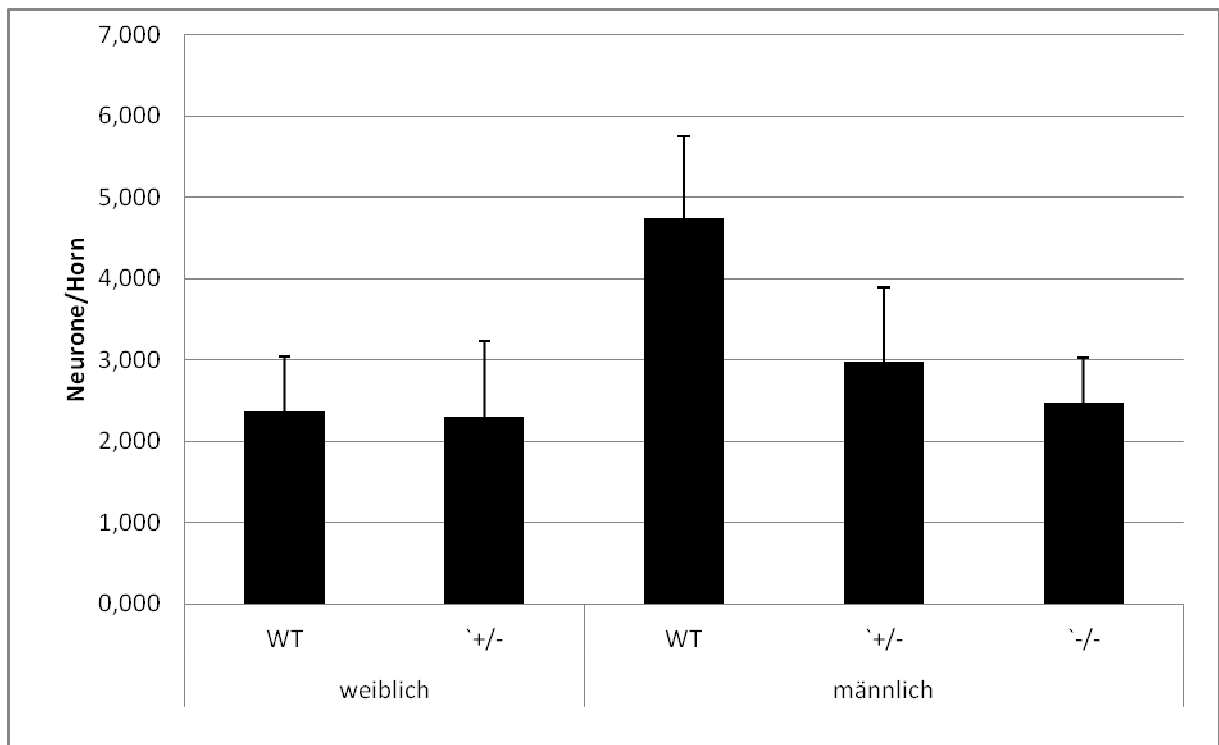


Abbildung 10: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen der mit Kresylviolett angefärbten Motorneurone pro Vorderhorn. Die einzelnen Genotypen-Gruppen sind nach Geschlecht getrennt aufgeführt.

Ergebnisse

Abbildung 11 zeigt die bei 10- und 20-facher Vergrößerung aufgenommenen lumbalen Querschnitte. Man erkennt die Perikarya der Motorneurone in den Vorderhörnern.

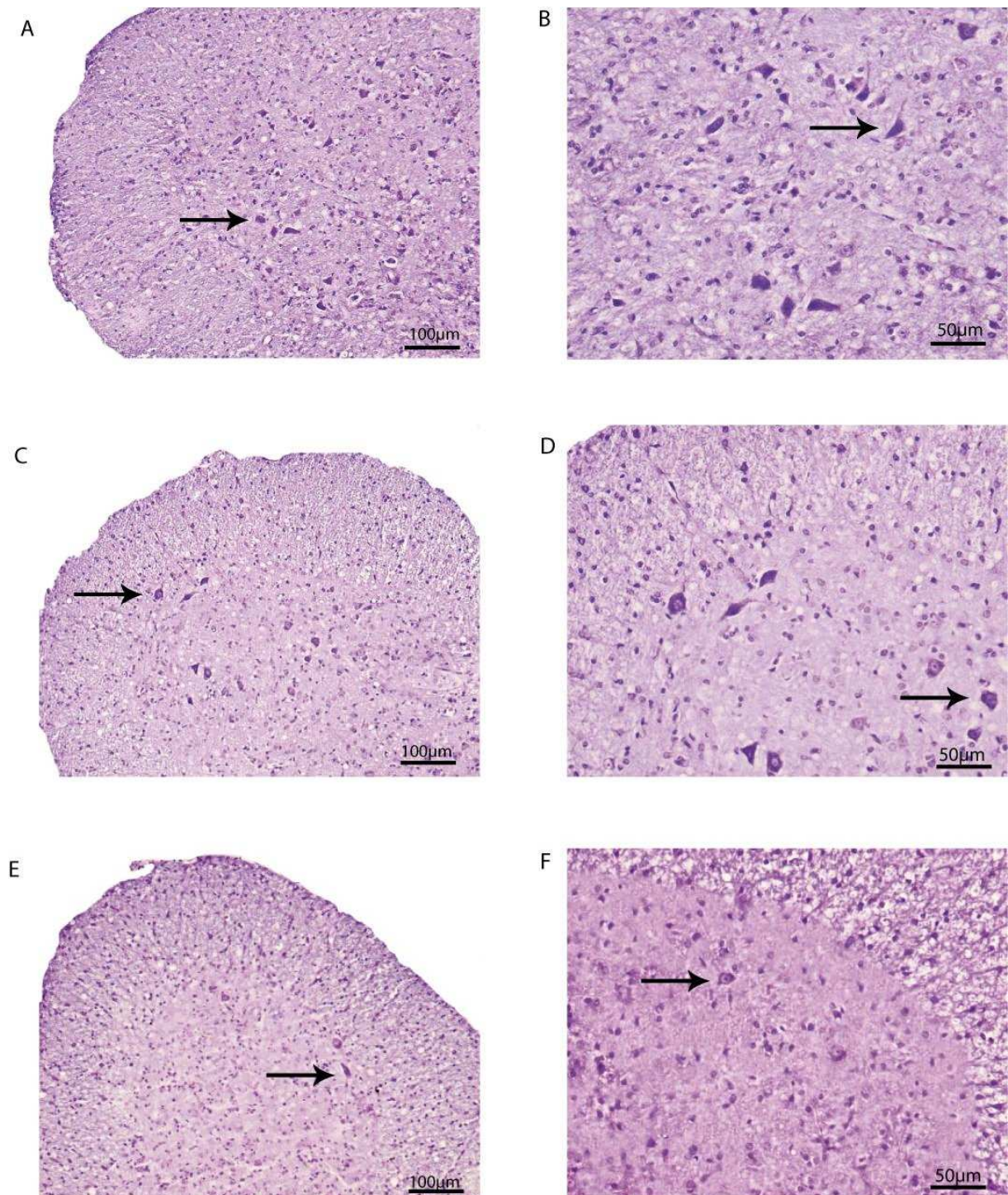


Abbildung 11: Dargestellt sind Vorderhörner aus dem Bereich des lumbalen Rückenmarks bei 10-facher und zugehörige Ausschnitte bei 20-facher Vergrößerung. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Perikarya der Motorneurone, die Kerne erscheinen dunkelviolett, das Zytoplasma in blasserem violett. A und B zeigen Ausschnitte aus einer MMP-12 Wildtyp Maus, C und D aus einem heterozygoten, E und F aus einem MMP-12 knock out Tier, bei Letzterem sind deutlich weniger Motorneurone erkennbar.

4.4 Quantifizierung Iba1-positiver Zellen

Die mit anti-Iba1 Antikörper gefärbten Zellen wurden im Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung betrachtet. In der Auswertung wurde der Anteil an Iba1-positiven Zellen im Vergleich zur gesamten Fläche der einzelnen Vorderhörner erfasst. Es wurden 6 der Serienschnitte jedes Tieres betrachtet, jeweils mit ausreichendem Abstand zueinander, um repräsentativere Stichproben zu erhalten. Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der einzelnen Genotypen-Gruppen, in Abbildung 13 wird zusätzlich nach Geschlecht unterschieden. MMP-12 knock out Tiere zeigen tendenziell den höchsten Anteil an Mikroglia (2,3%), heterozygote Mäuse den geringsten (1,8%). Die einfache ANOVA zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,686$). Auch hier gab es deutliche interindividuelle Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen. Bei männlichen Tieren wurde mehr aktivierte Mikroglia gesehen als bei weiblichen.

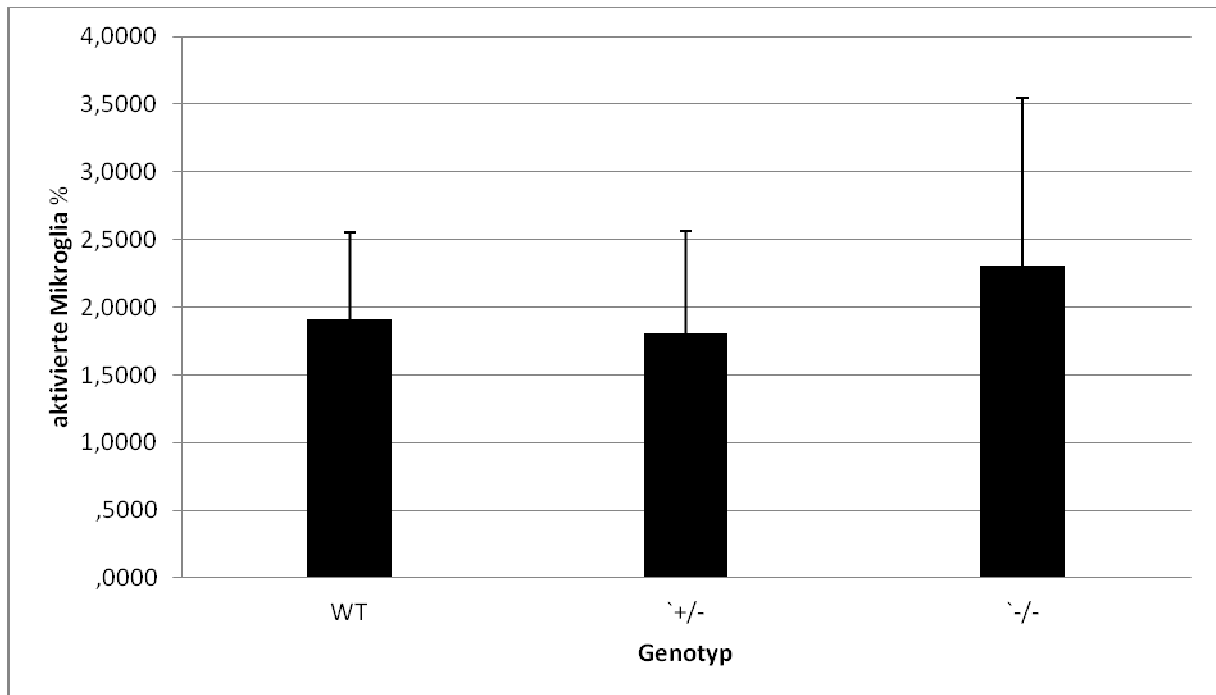


Abbildung 12: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen des relativen Anteils aktivierter Mikroglia an der gesamten Vorderhornfläche in %. Aufgeführt werden die verschiedenen Genotypen WT (Wildtyp), +/- (heterozygot), -/- (knock out).

Ergebnisse

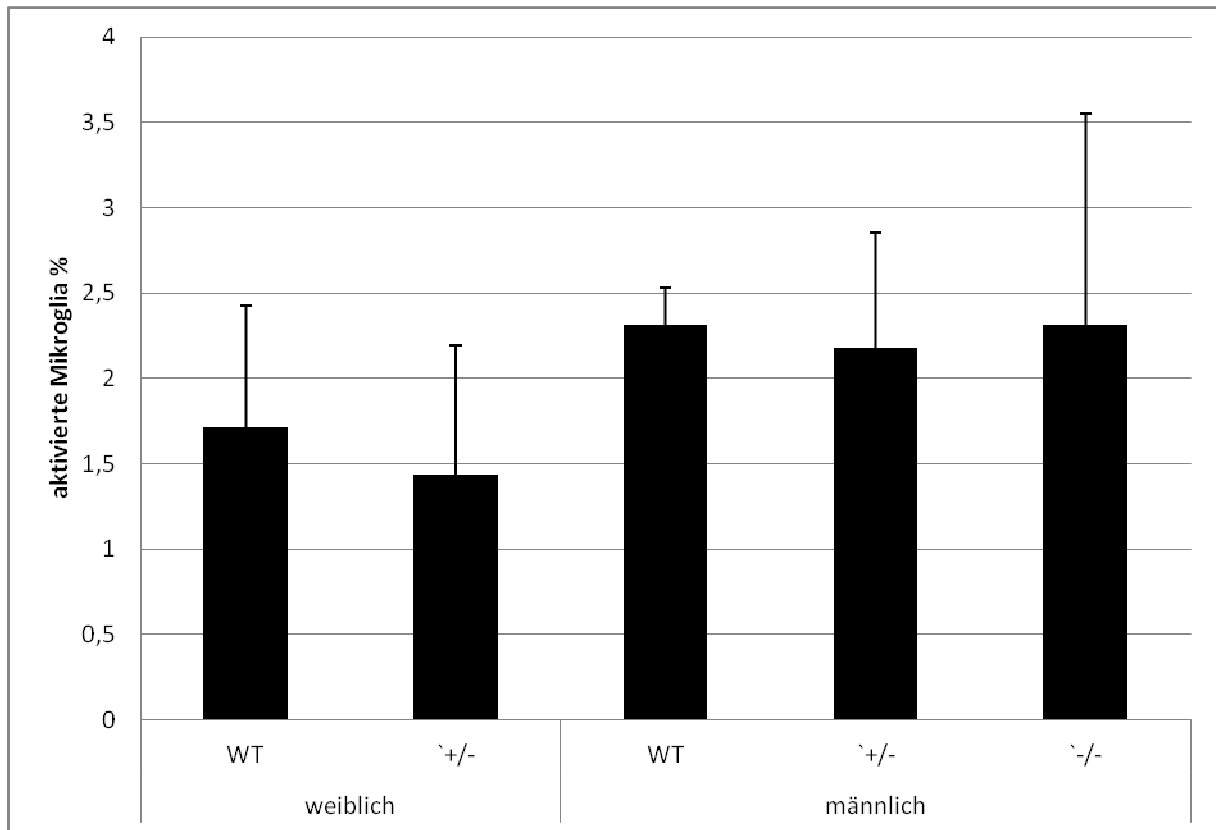


Abbildung 13: Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen des relativen Anteils aktivierter Mikroglia an der gesamten Vorderhornfläche. Aufgeführt werden die verschiedenen Genotypen, jeweils nach Geschlecht getrennt.

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen bei 20- und 40-facher Vergrößerung aufgenommene Ausschnitte aus lumbalen Vorderhörnern. Die mit DAB als Substrat braun angefärbten Mikroglia sind deutlich zu erkennen.

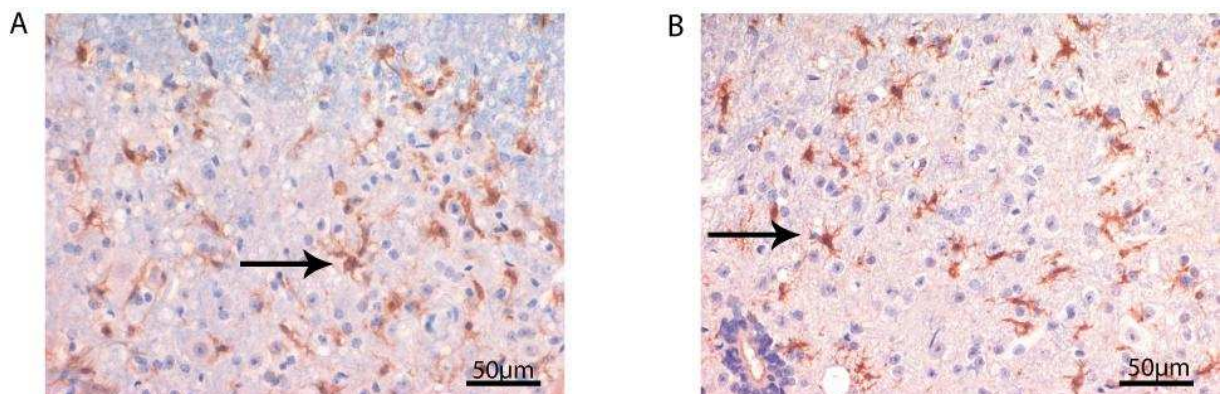


Abbildung 14: Dargestellt sind Ausschnitte aus lumbalen Vorderhörnern bei 20-facher Vergrößerung. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind Iba1-positive aktivierte Mikroglia. A stammt von einer MMP-12 knock out Maus, B ist ein Ausschnitt eines MMP-12 Wildtyp Tieres.

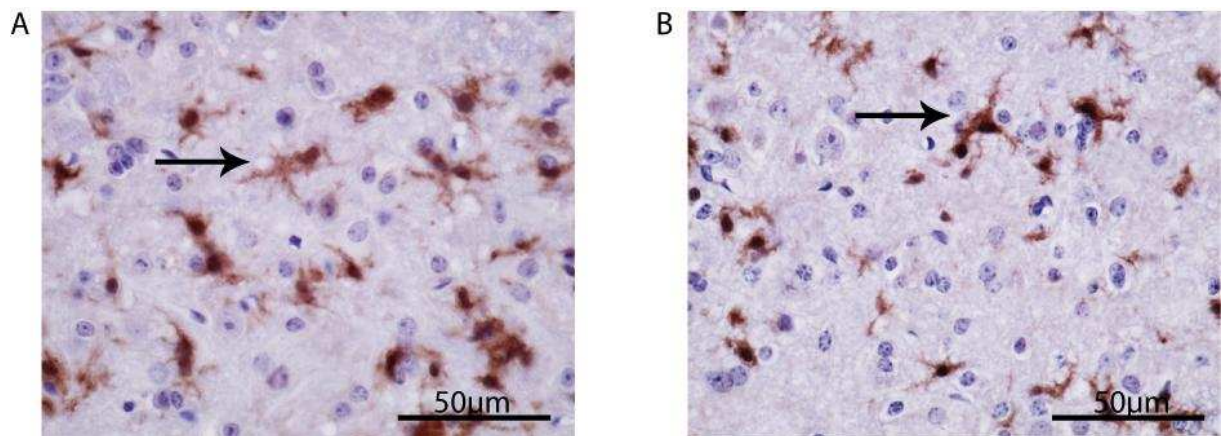


Abbildung 15: Dargestellt sind Ausschnitte aus lumbalen Vorderhörnern bei 40-facher Vergrößerung. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind Iba1-positive aktivierte Mikroglia. A stammt von einer MMP-12 knock out Maus, B ist ein Ausschnitt eines MMP-12 Wildtyp Tieres, hier sind weniger aktivierte Mikroglia erkennbar.

5 Diskussion

ALS ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, bei der sowohl zentrale als auch periphere Motorneurone zugrunde gehen. Für 20% der hereditären ALS-Fälle ist eine Mutation im SOD1-Gen verantwortlich. Der gain-of-function Mechanismus, über den die mutierte SOD1 zur selektiven Neurodegeneration führt, ist nach wie vor unbekannt. Seit 1994 steht ein transgenes Mausmodell zur Verfügung, in dem die Tiere dieses mutierte Gen heterozygot überexprimieren und darüber einen der menschlichen ALS ähnlichen Phänotyp entwickeln (Gurney ME, 1994).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit MMP-12 das Überleben und die neuronale Degeneration im Tiermodell beeinflusst und das inflammatorische Geschehen moduliert. Die gesteigerte Expression verschiedener MMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9) konnte in Blut und Liquor sowie durch postmortale Untersuchungen von Hirn, Rückenmark und Muskeln von ALS-Patienten nachgewiesen werden. In Vorversuchen zu dieser Arbeit wurde die Expression von 23 verschiedenen MMPs in mSOD1-transgenen Mäusen untersucht und mit der in Wildtyp-Tieren verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Transkription der MMP-12 in mSOD1-transgenen Mäusen in präklinischer und klinischer Phase 80 bis 200-fach erhöht ist. Diese Daten bildeten den Ausgangspunkt der Arbeit.

In einem Kreuzungsexperiment wurden mSOD1-transgene Mäuse mit MMP-12 defizienten Tieren verpaart, sodass Mäuse mit den Genotypen mSOD1/MMP-12(+/, +/-, -/-) miteinander verglichen werden konnten. Die Untersuchungen zur Lebenszeit zeigten, dass das Fehlen von MMP-12 den Krankheitsverlauf beschleunigt und die Überlebenszeit der Tiere signifikant verkürzt, ohne jedoch den Krankheitsbeginn zu beeinflussen. Ausgehend von diesem Ergebnis vermuteten wir, dass MMP-12 zum neuronalen Überleben beiträgt.

Die Ergebnisse der Kreuzungsversuche anderer Arbeitsgruppen zwischen mSOD1-transgenen und MMP-9 knock out Mäusen waren jedoch kontrovers. Es ist bekannt, dass die Aktivität der MMP-9, einer weiteren Metalloproteinase, im motorischen Kortex und im Lumbalmark bei ALS-Patienten erhöht ist, ebenso wie die Konzentrationen im Serum. Dewil et al. zeigten 2005 in ähnlichen Untersuchungen zur Lebenszeit, dass die Abwesenheit von MMP-9 den Krankheitsverlauf beschleunigt und die Überlebenszeit signifikant verkürzt, während die Arbeitsgruppe um Kiaei zwei Jahre später publizierte, dass die Abwesenheit von MMP-9 das Leben der transgenen Tiere verlängere (Dewil M, 2005) (Kiaei M, 2007). Lorenzl et al. haben 2006 in einem therapeutischen Experiment mit MMP-Inhibitoren gezeigt, dass diese die Lebenszeit von mSOD1-transgenen Tieren sogar signifikant verlängern (Lorenzl S, 2006).

Diskussion

In der quantitativen Auswertung der Motorneurone im Lumbalmark fanden wir bei MMP-12 defizienten Tieren tendenziell eine geringe Neuronenzahl pro Vorderhorn (Mittelwerte MMP-12 -/- 2,47, MMP-12 WT 2,96), ebenso wie eine verminderte Anzahl an Axonen in der motorischen Wurzel (MMP-12 -/- 263, MMP-12 WT 279). Dies spricht ebenso wie die verkürzte Überlebenszeit der Tiere für den neuroprotektiven Effekt der MMP-12.

Die immunhistochemische Untersuchung des Lumbalmarks auf Infiltration durch Makrophagen bzw. ortständige aktivierte Mikroglia zeigte einen geringfügig höheren Anteil dieser Zellen bei MMP-12 knock out Tieren (2,3%) gegenüber den anderen Genotypen (MMP-12 WT 1,9%, MMP-12 +/- 1,8%). In den Vorderhörnern zeigten sich generell mehr Mikroglia als in den Hinterhörnern, was für den Zusammenhang zwischen der Degeneration der Motorneurone und der Anwesenheit aktivierter mSOD1 exprimierender Mikroglia spricht.

An dieser Stelle gilt es, einige methodische Schwierigkeiten zu diskutieren. In den histologischen Untersuchungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Anzahl betrachteter Tiere insgesamt gering und in den einzelnen Gruppen sehr unterschiedlich war. Die Gruppe MMP-12 -/- umfasste nur 5 Tiere, die MMP-12 WT Gruppe umfasste 8 Tiere (MMP-12 +/- n=14). Dieses Problem ergab sich aufgrund der Tatsache, dass die Zucht sich äußerst schwierig und langwierig gestaltete. Das verwendete G93A Mausmodell, welches eine hohe Kopienzahl des mutierten SOD1-Gens exprimiert, zeigt einen sehr raschen Krankheitsverlauf. Die Tiere entwickeln bereits mit 12 Wochen erste Symptome, der klinische Endpunkt wird spätestens mit 19 Wochen erreicht. Da die weiblichen Tiere frühestens im Alter von 8 Wochen trächtig werden können, war die Zeitspanne zwischen erster möglicher Befruchtung und Krankheitsbeginn sehr kurz. Möglicherweise sind Tiermodelle, die einen späteren Krankheitsbeginn zeigen, geeigneter. 2010 wurde beispielsweise von einer Heidelberger Arbeitsgruppe ein G93A-SOD1(PS) (prolonged survival) Modell mit drastisch reduzierter Kopienzahl des mSOD1-Gens etabliert, bei dem die Tiere erst im Alter von 380 Tagen erste Symptome entwickeln, wobei der Dauer des Krankheitsverlauf nicht verändert ist. Die verzögerte Krankheitsentwicklung in diesem Modell ähnelt eher der menschlichen ALS und eignet sich zur Erforschung pathophysiologischer Vorgänge in der präklinischen Phase sowie der Erprobung neuer medikamentöser Konzepte (Henriques A, 2010).

Bei der Gewinnung der Schnitte ergaben sich ebenfalls Schwierigkeiten. Beim Vorgang des Abtrennens des lumbalen Teils vom Rest des Rückenmarks konnten der thorakolumbale und der lumbosakrale Übergang nicht exakt bestimmt werden, was zu unterschiedlichen Schnitthöhen bei den einzelnen Tieren führte. Zur Herstellung der Schnitte mussten die

Diskussion

Rückenmarksstücke genau senkrecht in das Paraffin eingebettet werden, was nicht immer genau möglich war. Dies wiederum hatte eine schräge Schnittfläche zur Folge. Je mehr die Schnittfläche von der Horizontalen abweicht, desto größer ist die Oberfläche und desto mehr Zellen können sich dort befinden. Außerdem weisen die verschiedenen Segmente des Lumbalmarks von Natur aus schon eine unterschiedliche Anzahl an Motorneuronen auf. Um die doppelte Erfassung von Zellen zu vermeiden, wurde pro Tier jedes siebte Präparat der angefertigten Serienschnitte verwendet. Als Kriterium bei der Auszählung mittels manueller Zähluhr galten Form und Größe der Zellen, einhergehend mit der Sichtbarkeit des Kerns, das heißt, die Zellen wiesen eine bestimmte Minimalgröße auf. So wurden möglicherweise auch Zellen mitgezählt, die Motorneuron-ähnlich aussahen und nur teilweise dargestellte Motorneurone ohne Sichtbarkeit des Kerns nicht erfasst. Die Zählungen wurden verblindet durchgeführt, jedoch nur von einer Person. Durch weiteres Auszählen durch andere Personen wäre es möglich gewesen, die Ergebnisse noch weiter zu objektivieren.

Bei der Quantifizierung Iba-1 positiver Zellen zeigten sich ebenfalls deutliche interindividuelle Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen. Die schon diskutierten Schwierigkeiten in der Herstellung der Schnitte ergaben sich auch bei diesen Versuchen. In der Auswertung wurde deutlich, dass die gefärbten Schnitte nicht alle die gleiche Intensität der Braunfärbung zeigten. Der Grund hierfür könnte sein, dass nicht alle Präparate gleichzeitig gefärbt wurden, sondern pro Färbedurchgang immer 18 Präparate. So ergaben sich offensichtlich von Färbetag zu Färbetag trotz Verwendung des gleichen Protokolls unterschiedliche Farbresultate. Bei der Auswertung mit AnalysisPro wurden durch die Farbkodierung alle braunen Elemente des betrachteten Abschnittes für die Berechnung erfasst, eine Unterscheidung zwischen tatsächlicher Zelle und Färbeartefakt zum Beispiel an der Dura war nicht möglich. Hier wurden sechs Präparate pro Tier ausgewertet, ebenfalls mit ausreichendem Höhenabstand zueinander, um eine doppelte Zellerfassung zu vermeiden. Die unterschiedlichen und zum Teil sehr kleinen Gruppengrößen stellten hierbei ebenfalls ein Problem dar. Insofern ist die Aussagekraft der Ergebnisse statistisch gesehen gering.

Über den genauen Mechanismus, wie die Abwesenheit von MMP-12 zu beschleunigter neuronaler Degeneration führt, kann weiterhin nur spekuliert werden. Ein immunmodulierender Einfluss der MMP-12 wurde jedoch schon in früheren Arbeiten beschrieben. Bekannt sind sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte.

MMPs vermitteln den Übertritt inflammatorischer Zellen aus dem Blut in das ZNS über die Schädigung der Blut-Hirn- und Blut-Nerven-Schranke (Leppert D, 1995) (Rosenberg GA, 2009). MMP-12 überführt TNF- α in seine aktivierte Form (Churg A, 2003) und ist in der Lage, die Sekretion von Chemokinen zu induzieren (Le Quément C, 2008). In einem Mausmodell

Diskussion

der MS fand sich eine erhöhte Expression von MMP-12 in akut inflammatorischen Läsionen. Die Abwesenheit der MMP-12 führte hierbei zu verminderter Demyelinisierung (Hansmann F, 2012).

Ebenfalls im Mausmodell der MS wurde gezeigt, dass MMP-12 über Verstärkung der TH2-Antwort anti-inflammatorische Effekte hat und somit neuroprotektiv wirkt (Weaver A. 2005). Weiterhin wissen wir, dass MMP-12 Chemokine spaltet und inaktiviert und damit die Chemotaxis von Leukozyten stoppt (Dean RA, 2008). Somit stellt die MMP-12 Aktivität auch einen Mechanismus dar, Entzündungsreaktionen einzudämmen. Neben diesen anti-inflammatorischen Effekten ist die MMP-12 auch an regenerativen Vorgängen im ZNS beteiligt. Beispielsweise fördert MMP-12 die Ausbildung von Myelin durch die Spaltung von IGF-1 bindendem Protein (IGFBP) 6 (Larsen PH, 2004) (Larsen PH, 2006), von dem vermutet wird, es wäre ausschlaggebend für des neuronale Überleben bei ALS (Kaspar BK, 2003) (Dodge JC, 2008). Man kann also davon ausgehen, dass mit der Abwesenheit der MMP-12 auch ein anti-inflammatorischer und regenerativer Faktor fehlt und es möglicherweise darüber zur beschleunigten neuronalen Degeneration kommt.

Um die Auswirkung des Fehlens der MMP-12 auf das inflammatorische Geschehen zu beurteilen, wurde das lumbale Rückenmark der verschiedenen Genotypen auf Anwesenheit aktivierter mSOD1 exprimierender Mikroglia untersucht. Die Neuroinflammation und die damit verbundene Aktivierung von Mikroglia ist ein bedeutendes Merkmal der ALS (Troost D, 1990) (Leichsenring A, 2006) (Moisse K, 2006). Proliferation und Aktivierung der Mikroglia wurden im Tiermodell in Bereichen mit hohem Verlust an Motorneuronen, das heißt im motorischen Kortex, im Bereich der Hirnnervenkerne im Hirnstamm und in den Vorderhörnern des Rückenmarks beobachtet. Erhöhte Werte von Chemokinen und Zytokinen, wie zum Beispiel TNF- α und IL-6, wurden in Liquor und Serum von ALS-Patienten gefunden (Sekizawa T, 1998) (Moreau C, 2005). Wie genau die Aktivierung mSOD1 exprimierender Mikroglia den neuronalen Zelltod beeinflusst, ist noch nicht endgültig geklärt. Man hat versucht, therapeutisch Minocyclin einzusetzen, eine Substanz, die Mikroglia Aktivierung inhibiert, mit dem Ergebnis, dass diese sowohl Krankheitsbeginn als auch Krankheitsverlauf im Tierversuch verzögert (Kriz J, 2003) (Kriz J, 2002). Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht in die Therapie der ALS integriert werden, da die Behandlung mit Minocyclin in einer klinischen Studie zur Exazerbation des Krankheitsverlaufs führte (Gordon PH, 2007). Tatsächlich hat die Aktivierung von Mikroglia im Rahmen der Neuroinflammation nicht nur schädlichen Einfluss auf umliegende Neurone, sondern gleicht einem zweiseitigen Schwert. In vitro Experimente haben gezeigt, dass Mikroglia nach Behandlung mit Lipopolysaccharid neurotoxische Einfluss ausüben (M1), wohingegen sie über den Aktivierung über Interleukin-4 neuroprotektive Wirkung haben (M2). Dieser

Diskussion

protektive Effekt steht im Zusammenhang mit der Bereitstellung neurotropher Faktoren wie IGF-1 und BDNF (brain derived neurotrophic factor) und überwiegt zunächst in der frühen Krankheitsphase der ALS, wohingegen im weiteren Krankheitsverlauf der zytotoxische Einfluss im Vordergrund steht (Neumann H, 2008) (Henkel JS, 2009) (Kawamura MF, 2012). All diese Ergebnisse zeigen, dass Mikroglia offensichtlich auch schützende Funktionen auf Neurone ausüben und Inflammation nicht immer nur als schädlicher Prozess angesehen werden darf.

Schon vor Beginn dieser Arbeit wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Transwell-Migration-Assay mit aus Knochenmark stammenden Makrophagen durchgeführt. Hierbei wurde die Migration von Makrophagen MMP-12 defizienter mit der aus Wildtyp-Tieren über die Blut-Hirn-Schranke verglichen. Es zeigte sich, dass die Migrationsrate der Makrophagen aus MMP-12 knock out Knochenmark geringer ist. Somit ist davon auszugehen, dass das Fehlen von MMP-12 nicht zu vermehrter Einwanderung von Makrophagen ins ZNS führt, sondern zu einer verstärkten Aktivierung der dort ansässigen Mikroglia.

Im Tiermodell der MS führte die Abwesenheit der MMP-12, ähnlich wie in unserem Versuch, zu einer Verschlechterung des schubförmigen Verlaufs dieser Krankheit, ohne allerdings den Krankheitsbeginn zu beeinflussen. Hierbei fanden sich bei MMP-12 $-/-$ Tieren während der Remissionsphase weniger eingewanderte Makrophagen als bei MMP-12 Wildtypen und heterozygoten Tieren. Die geringere Zahl an infiltrierenden Makrophagen einhergehend mit der verschlechterten klinischen Remission spricht gegen die Annahme einer schädlichen Rolle der Makrophagen selbst. Weiterhin wurden in dieser Arbeit bei MMP-12 $-/-$ Tieren veränderte Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen während der chronischen Phase nachgewiesen (Goncalves DaSilva A, 2009). Mit ihrer Funktion als Protease steht MMP-12 über die posttranslationale Modifikation dieser inflammatorischen Signalproteine auch bei der ALS mit der Modulation des inflammatorischen Geschehens in Zusammenhang.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Anwesenheit der MMP-12 entscheidend für Überlebenszeit und neuronales Überleben im Tiermodell der ALS ist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Abwesenheit von MMP-12 das Fehlen eines anti-inflammatorischen Faktors bedeutet. Nach dieser These kommt es dadurch zu verstärkter mikroglialer Aktivierung im ZNS und somit zu vermehrter neuronaler Degeneration. Dies konnte in dieser Arbeit allerdings nicht in signifikantem Maße nachgewiesen werden. Allerdings bleibt auch zu bedenken, dass inflammatorische Aktivität im Sinne aktivierter Mikroglia nicht ausschließlich destruktiven Einfluss auf umliegende Neurone ausübt, sondern genauso in der Lage ist, diese zu schützen. Die in dieser Arbeit durchgeführten

Diskussion

histologischen Untersuchungen sollten somit fortgeführt werden, um mit Hilfe einer größeren Anzahl an Tieren repräsentativere Ergebnisse zu erzielen. Den genauen Mechanismus, über den MMP-12 zum neuronalen Überleben beiträgt, gilt es im Rahmen weiterer Studien zu erforschen.

6 Literaturverzeichnis

1. Beckmann JS, Estevez AG, Crow JP. 2001. Superoxid dismutase and the death of motorneurons in ALS. *Trends Neurosci.* 24:15-20
2. Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH. 2006. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:16021-6
3. Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Huang A, Wen S, Liao B, Appel SH. 2011. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134:1293-314
4. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. 1994. ALS/Riluzole Study Group: a controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 330:585-591
5. Bilstrand LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G. 2010. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:20523-8
6. Boillee S, Vande VC, Cleveland DW. 2006. ALS: a disease of motor neurons and their non neuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59
7. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312:1389-92
8. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. 2006. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 31:149-60
9. Chance PF, Rabin BA, Ryan SG, Ding Y, Scavina M, Crain B, Griffin JW, Cornblath DR. 1998. Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet.* 62:633-40
10. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, Wright JL. 2003. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med.* 167:1083-9
11. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-7

12. Cookson MR, Shaw PJ. 1999. Oxidative stress and motor neuron disease. *Brain Pathol.* 9:165-186
13. Crocker SJ, Frausto RF, Whitton JL, Milner R. 2008. A novel method to establish microglia-free astrocyte cultures: comparison of matrix metalloproteinase expression profiles in pure cultures of astrocytes and microglia. *Glia.*56:1187-98
14. Dean RA, Cox JH, Bellac CL, Doucet A, Starr AE, Overall CM. 2008. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112:3455-64
15. Demestre M, Parkin-Smith G, Petzold A, Pullen AH. 2005. The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* 159:146-54
16. Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance MA, Siddique T. 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477:211-5
17. Deng HX, Shi Y, Furukawa Y, Zhai H, Fu R, Liu E, Gorrie GH, Khan MS, Hung WY, Bigio EH, Lukas T, Dal Canto MC, O'Halloran TV, Siddique T. 2006. Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7142-7.
18. Dewil M, Schurmans C, Starckx S, Opdenakker G, Van Den Bosch L, Robberecht W. 2005. Role of matrix metalloproteinase-9 in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 16:321-4
19. Dodge JC, Haidet AM, Yang W, Passini MA, Hester M, Clarke J, Roskelley EM, Treleaven CM, Rizo L, Martin H, Kim SH, Kaspar R, Taksir TV, Griffiths DA, Cheng SH, Shihabuddin LS, Kaspar BK. 2008. Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Mol Ther.* 16:1056-64
20. Duberley RM, Johnson IP, Anand P, Swash M, Martin J, Leigh PN, Zeman S. 1995. Ciliary neurotrophic factor receptor expression in spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 129:109-13
21. Ennis BW, Matrisian LM. 1994. Matrix degrading metalloproteinases. *J Neurooncol.* 18:105-9

22. Goncalves DaSilva A, Yong VW. 2009. Matrix metalloproteinase-12 deficiency worsens relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in association with cytokine and chemokine dysregulation. *Am J Pathol.* 174:898-909
23. Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, Hilton JF, Spitalny GM, MacArthur RB, Mitsumoto H, Neville HE, Boylan K, Mozaffar T, Belsh JM, Ravits J, Bedlack RS, Graves MC, McCluskey LF, Barohn RJ, Tandan R und Grou, Western ALS Study. 2007. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol.* 6:1045-53
24. Gottschall PE, Deb S. 1996. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 3:69-75
25. Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, Patterson V, Swingler R, Kieran D, Prehn J, Morrison KE, Green A, Acharya KR, Brown RH Jr, Hardiman O. 2006. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 38:411-3
26. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-5
27. Hand CK, Khoris J, Salachas F, Gros-Louis F, Lopes AA, Mayeux-Portas V, Brewer CG, Brown RH, Meininger V, Camu W, Rouleau GA. 2002. A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. *Am J Hum Genet.* 70:251-6
28. Hansmann F, Herder V, Kalkuhl A, Haist V, Zhang N, Schaudien D, Deschl U, Baumgärtner W, Ulrich R. 2012. Matrix metalloproteinase-12 deficiency ameliorates the clinical course and demyelination in Theiler's murine encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.*
29. Heiman-Patterson TD, Deitch JS, Blankenhorn EP, Erwin KL, Perreault MJ, Alexander BK, Byers N, Toman I, Alexander GM. 2005. Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)^{1Gur} mouse model of ALS. *J Neurol Sci.* 236:1-7
30. Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. 2009. Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4:389-98
31. Henriques A, Pitzer C, Schneider A. 2010. Characterization of a novel SOD-1(G93A) transgenic mouse line with very decelerated disease development. *PLoS One* 5:e15445
32. Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, Nijhawan D, Ahmad A, Yang Y, Rimmler J, Hung W, Schlotter B, Ahmed A, Ben Hamida M, Hentati F, Siddique T. 1998. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics* 2:55-60

33. Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, Daube JR, Nance M, Fan C, Kaplan J, Hung WY, McKenna-Yasek D, Haines JL, Pericak-Vance MA, Horvitz HR, Brown RH Jr. 2000. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA* 284:1664-9
34. Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC. 2000. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SO. *Neurobiol Dis.* 7:623-43
35. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 40:572-4
36. Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. 2003. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301:839-42
37. Kawamura MF, Yamasaki R, Kawamura N, Tateishi T, Nagara Y, Matsushita T, Ohyagi Y, Kira JI. 2012. Impaired recruitment of neuroprotective microglia and T cells during acute neuronal injury coincides with increased neuronal vulnerability in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp Neurol.*
38. Kiaei M, Kipiani K, Calingasan NY, Wille E, Chen J, Heissig B, Rafii S, Lorenzl S, Beal MF. 2007. Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* 205:74-81
39. Kriz J, Gowing G, Julien JP. 2003. Efficient three-drug cocktail for disease induced by mutant superoxide dismutase. *Ann Neurol.* 53:429-36
40. Kriz J, Nguyen MD, Julien JP. 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 10:268-78
41. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T,. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205-8
42. Larsen PH, DaSilva AG, Conant K, Yong VW. 2006. Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice. *J Neurosci.* 26:2207-14

43. Larsen PH, Yong VW. 2004. The expression of matrix metalloproteinase-12 by oligodendrocytes regulates their maturation and morphological differentiation. *J Neurosci.* 24:7597-603
44. Le Quément C, Guénon I, Gillon JY, Lagente V, Boichot E. 2008. MMP-12 induces IL-8/CXCL8 secretion through EGFR and ERK1/2 activation in epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294:L1076-84
45. Lee JC, Seong J, Kim SH, Lee SJ, Cho YJ, An J, Nam DH, Joo KM, Cha CI. 2012. Replacement of microglial cells using Clodronate liposome and bone marrow transplantation in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice as an in vivo model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 418:359-65
46. Leichsenring A, Linnartz B, Zhu XR, Lübbert H, Stichel CC. 2006. Ascending neuropathology in the CNS of a mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 1096:180-95
47. Lepore AC, Maragakis NJ. 2011. Stem cell transplantation for spinal cord neurodegeneration. *Methods Mol Biol.* 793:479-93
48. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. 1995. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol.* 154:4379-8
49. Lim GP, Backstrom JR, Cullen MJ, Miller CA, Atkinson RD, Tökés ZA. 1996. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurochem.* 67:251-9
50. Liu Y, Hao W, Dawson A, Liu S, Fassbender K. 2009. Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TLR2. *J Biol Chem.* 284:3691-9
51. Lorenzl S, Narr S, Angele B, Krell HW, Gregorio J, Kiaei M, Pfister HW, Beal MF. 2006. The matrix metalloproteinases inhibitor Ro 28-2653 [correction of Ro 26-2853] extends survival in transgenic ALS mice. *Exp Neurol.* 200:166-71
52. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289:1202-6
53. Moisse K, Strong MJ. 2006. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1762:1083-93
54. Moreau C, Devos D, Brunaud-Danel V, Defebvre L, Perez T, Destée A, Tonnel AB, Lassalle P, Just N. 2005. Elevated IL-6 and TNF-alpha levels in patients with ALS: inflammation or hypoxia? *Neurology* 65:1958-60
55. Nénan S, Planquois JM, Berna P, De Mendez I, Hitier S, Shapiro SD, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP. 2005. Analysis of the inflammatory response induced by

- rhMMP-12 catalytic domain instilled in mouse airways. *Int Immunopharmacol.* 5:511-24
56. Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. 2008. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288-95
57. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-3
58. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JR, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M. 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 75:822-31
59. Nishito H, Kadowaki H, Nagai A. 2008. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1 dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes DEV* 22:1451-1464
60. Orrell RW. 2000. Amyotrophic lateral sclerosis: copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene mutations. *Neuromuscul Disord.* 10:63-8
61. Ould-yahoui A, Tremblay E, Sbai O, Ferhat L, Bernard A, Charrat E, Gueye Y, Lim NH, Brew K, Risso JJ, Dive V, Khrestchatisky M, Rivera S. 2009. A new role for TIMP-1 in modulating neurite outgrowth and morphology of cortical neurons. *PLoS One* 4:e8289
62. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 4:617-29
63. Patterson PH. 1985. On the role of proteases, their inhibitors and the extracellular matrix in promoting neurite outgrowth. *J Physiol. (Paris).*80:207-11
64. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. 2007. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci.* 27:10714-21
65. Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J. 2003. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol.* 53:731-42
66. Prudencio M, Hart PJ, Borchelt DR, Andersen PM. 2009. Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: correlation to human disease. *Hum Mol Genet.* 18:3217-26
67. Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol.* 27:119-45

68. Romi F, Helgeland G, Gilhus NE. 2012. Serum Levels of Matrix Metalloproteinases: Implications in Clinical Neurology. *Eur Neurol.* 67:121-128
69. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62
70. Rosenberg GA. 2009. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 8:205-16
71. Ruddy DM, Parton MJ, Al-Chalabi A, Lewis CM, Vance C, Smith BN, Leigh PN, Powell JF, Siddique T, Meyjes EP, Baas F, de Jong V, Shaw CE. 2003. Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16q. *Am J Hum Genet.* 73:390-6
72. Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, Chin W, Gann A, Genise H, Gorenstein J, Huang M, Sailer W, Scheffler M, Valesky M, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T, Horvitz HR, Brown RH Jr. 2003. Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 73:397-403
73. Schoser BG, Blottner D. 1999. Matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-7 and MMP-9 in denervated human muscle. *Neuroreport* 10:2795-7
74. Sekizawa T, Openshaw H, Ohbo K, Sugamura K, Itoyama Y, Niland JC. 1998. Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases. *J Neurol Sci.* 154:194-9
75. Shah SV, Baricos WH, Basci A. 1987. Degradation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils. Activation of a metalloproteinase(s) by reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest.* 79:25-31
76. Shaw BF, Valentine JS. 2007. How do ALS associated mutations in superoxiddismutase 1 promote aggregation of protein? *Trends Biochem Sci.* 32:78-85
77. Shaw PJ, Ince PG. 1997. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 224:3-14
78. Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H. 2010. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1802:45-51
79. Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463-516
80. Ticozzi N, Tiloca C, Morelli C, Colombrita C, Poletti B, Doretti A, Maderna L, Messina S, Ratti A, Silani V. 2011. Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol.* 149:65-82

81. Troost D, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JM. 1990. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 16:401-10
82. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. 2004. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*. 15:601-9
83. Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J, Siddique T, Schelhaas HJ, Kusters B, Troost D, Baas F, de Jong V, Shaw CE. 2006. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain* 129:868-76
84. Weaver A, Goncalves da Silva A, Nuttall RK, Edwards DR, Shapiro SD, Rivest S, Yong VW. 2005. An elevated matrix metalloproteinase (MMP) in an animal model of multiple sclerosis is protective by affecting Th1/Th2 polarization. *FASEB J*. 19:1668-70
85. Wells JE, Biernaskie J, Szymanska A, Larsen PH, Yong VW, Corbett D. 2005. Matrix metalloproteinase (MMP)-12 expression has a negative impact on sensorimotor function following intracerebral haemorrhage in mice. *Eur J Neurosci*. 21:187-96
86. Wells JE, Rice TK, Nuttall RK, Edwards DR, Zekki H, Rivest S, Yong VW. 2003. An adverse role for matrix metalloproteinase 12 after spinal cord injury in mice. *J Neurosci*. 23:10107-15
87. Weydt P, Moller T. 2005. Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 16:527-531
88. Wijesekera LC, Leigh PN. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 4:3
89. Wójcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatisky M, Rivera S, Zalewska T. 2011. The Potential Role of Metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One* 6:e22465
90. Worms PM. 2001. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci*. 191:3-9
91. Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. 2001. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 29:160-5
92. Yong VW. 2005. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. 6:931-44

Literaturverzeichnis

93. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. 2001. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2:502-11
94. Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH. 2006. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J Neurochem.* 99:1176-87

7 Danksagung

Mit der Fertigstellung dieser Dissertationsschrift ist es an der Zeit, denjenigen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Faßbender für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der erforderlichen Geräte und Materialien und seine Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Alex Liu danke ich für die Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit sowie für die Ratschläge bei deren Zusammenstellung. Er hat mir einen Einblick in das wissenschaftliche Denken vermittelt.

Daneben bedanke ich mich bei den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Andrea Schottek und Frau Nadine Commercon für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die ständige Bereitschaft, mir mit Rat und Tat bei der Durchführung der Experimente zur Seite zu stehen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Hendrik Bohnenberger für seine unermüdliche Unterstützung und Hilfestellung, seinen Rückhalt und seine Motivation. Ohne ihn wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nicht denkbar gewesen.

Nicht zuletzt meinen Eltern bin ich für die gleichermaßen moralische wie tatkräftige Unterstützung sowohl während meines Studiums als auch während der Zeit der Fertigstellung dieser Dissertation zu tiefstem Dank verpflichtet.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jennifer Brendel
Geburtsdatum	31.03.1986
Geburtstort	Saarlouis
Familienstand	ledig

Schulischer Werdegang

1992-1996	Grundschule Saarlouis-Steinrausch
1996-2005	Max-Planck-Gymnasium Saarlouis

Studium

2005-2011	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, 2. Ärztliche Prüfung im November 2011
-----------	---

Praktisches Jahr

Chirurgie	Universitätsspital Zürich, Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Unfall-Hand und Wiederherstellungschirurgie
Neurologie	Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Neurologie
Innere Medizin:	Universitätsklinikum des Saarlandes Klinik für Innere Medizin IV-Nieren- und Hochdruckkrankheiten Klinik für Innere Medizin I-Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie