

**iPS-abgeleitete humane Mikroglia als neuroinflammatorisches
in-vitro Modell der
Amyotrophen Lateralsklerose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Johannes Herbert Friese
aus Siegburg
2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Harald Neumann
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Kunz

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.09.2014

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Prof. Dr. med. Oliver Brüstle

Für meine lieben Eltern

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	5
2.	Abkürzungsverzeichnis	8
3.	Einleitung	13
3.1	Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	13
3.1.1	Epidemiologie	13
3.1.2	Symptomatik, Diagnose und Prognose	13
3.1.3	Histopathologie	14
3.1.4	Pathogenese	14
3.2	Mikroglia	15
3.3	iPS-abgeleitete Mikroglia (iPSdM)	16
3.4	Neuroinflammation bei ALS	17
3.5	Mutante Superoxiddismutase 1 (mSOD1)	18
3.5.1	mSOD1 in Mikroglia	19
3.6	Mitochondriale Dysfunktion bei ALS	20
3.7	Mitochondrien in Mikroglia und Neurotoxizität	22
3.8	Ziele der Arbeit	22
4.	Materialien	24
4.1	Laborbedarf	24
4.2	Geräte	24
4.3	Materialien für die Zellkultur	25
4.3.1	Zelllinien	27
4.3.2	Puffer, Nährmedien und Chemikalien	27
4.3.3	Zellkulturmedien	28
4.4	Stimulation/Zytokine	29
4.5	Klonierungen	29
4.6	Sequenz des PGK-Promoters	30
4.7	Primer	30
4.8	Kits	31
4.9	Virusproduktion	31
4.10	Mitochondriale Aktivitätsmessungen	31
4.11	Immunozytochemie	32

4.12	Software.....	33
4.13	Online Ressourcen	34
5.	Methoden.....	35
5.1	Zellbiologische Methoden	35
5.1.1	Passagieren der Zellen	35
5.1.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	35
5.2	Etablierung von transgenen Mikrogliazelllinien	35
5.2.1	Herstellung von Lentiviren	36
5.2.2	Transduktion der iPSdM	37
5.2.3	Durchflusszytometrie	37
5.2.4	Immunzytochemische Färbungen.....	38
5.2.5	Analyse der mitochondrialen Aktivität	39
5.3	Molekularbiologische Methoden	42
5.3.1	Vermehrung von Plasmiden in kompetenten E. coli	42
5.3.2	PCR.....	43
5.3.3	Gelelektrophorese	44
5.3.4	Gelextraktion.....	44
5.3.5	Verdau	44
5.3.6	Ligation pLL3.7 und PGK-Promoter.....	45
5.3.7	Testverdau.....	45
5.3.8	Sequenzierungen.....	46
5.4	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	47
6.	Ergebnisse.....	49
6.1	Molekularbiologische Arbeiten	49
6.1.1	Maxipräparation N1-Vektor	49
6.1.2	Klonierung des PGK-Promoters in den pLL3.7-Vektor	50
6.1.3	Klonierung der SOD1-Mutanten in den pLL3.7-Vektor	50
6.2	Transduktion der iPSdM mit Lentiviren	53
6.3	Durchflusszytometrische Sortierung der transduzierten Zellen.....	54
6.4	Immunozytochemische Färbungen, confocales Mikroskop.....	61
6.4.1	Colokalisation von Iba1 und EGFP-SOD1	65
6.5	Messung der mitochondrialen Aktivität	65
6.6	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	70

7.	Diskussion	72
7.1	Transduktion und Durchflusszytometrie.....	72
7.2	Stimulation mit GM-CSF	73
7.3	Immunocytochemie.....	74
7.4	Mitochondriale Messungen	75
7.5	Messung von Superoxid	77
7.6	Seneszenz von iPSdM.....	78
8.	Zusammenfassung	78
9.	Ausblick	79
10.	Abbildungsverzeichnis	81
11.	Literaturverzeichnis.....	83
12.	Danksagung.....	93

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	acetyliertes Coenzym A
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure)
Bcl2	B-Zell Lymphom 2, Apoptose regulierendes Protein (B-cell-lymphoma 2)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCR7	C-C-Chemokin Rezeptor Typ 7
CD14	Mustererkennungszepetor (Cluster of differentiation 14)
CD80	Protein, das von aktivierten B-Zellen, Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird . (Cluster of differentiation 80)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
C-Myc	zelluläres Myc (cellular Myc)
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CoA-SH	Reduziertes Coenzym A
CoQ1	Coenzym Q1 (Ubichinon 1)
Cu	Kupfer
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTNB	Dithio-bis-2-Nitrobenzoe Säure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>

EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
ESdM	aus embryonalen Stammzellen abgeleitete Mikroglia (embryonic stemcell derived microglia)
FACS cell	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated sorting)
fALS	familiäre ALS
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrogenchlorid
HEK293FT	Zelllinie von humanen, embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney cells 293FT)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradishperoxidase)
Iba1	ionisiertes Calcium bindendes Adaptermolekül 1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1)
ICDH	Isocitratdehydrogenase
IGF1	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (insulin like growth factor 1)
IL	Interleukin
IL1 β	Interleukin 1 β
INF γ	Interferon γ
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
iPSdM	iPS abgeleitete Mikroglia (induced pluripotent stemcell derived microglia)
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumcyanid
LB	Bakterienkulturmedium (lysogeny broth)

LPS	Lipopolysaccharid
MCP1	Makrophagen chemotaktisches Protein 1 (macrophage chemoattractant protein-1)
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (macrophage colony stimulating factor)
MEF-Medium	murines embryonales Fibroblasten Medium (mouse embryonic fibroblast-medium)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mmol	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MRT	Magnetresonanztomographie
mSOD1	mutierte Formen der Superoxiddismutase 1
NADH	reduzierte Form von Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NANOG	Transkriptionsfaktor, der in der Ausbildung von Pluripotenz wirkt.
NFκB	Kappa-Leichtketten fördernder nukleärer Faktor in aktivierten B-Zellen (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
ng	Nanogramm
NGS	normales Ziegen Serum (normal goat serum)
nl	Nanoliter
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NOX2	NADPH-Oxidase 2 (Phagozyten NADPH-Oxidase)
Oct4	Octamer bindender Transkriptionsfaktor 4 (octamer binding transcription factor 4)
P/S	Penicillin/Streptomycin

PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PBST	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (phosphate buffered saline + Tween-20)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PGK-Promoter	Phosphoglycerat Kinase Promoter
PLL	Poly-L-Lysin
pLL3.7	pLentiLox3.7, lentiviraler Vektor
PLP 1-3	Packplasmide 1-3 für lentivirale Vektoren
PRR	Mustererkennungsrezeptor (pattern recognition receptor)
rhGM-CSF	rekombinanter, humaner Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor (recombinant human granulocyte-monocyte colony stimulating factor)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	Sauerstoffradikale (radical oxygen species)
RPM	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sALS	sporadische ALS
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SOD1	Superoxiddismutase 1
Sox2	sex determining region Y (SRY)- box 2 (Gen auf Chromosom Y)
T4-Ligase	Ligase aus T4-Bakteriophagen
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TDP-43	Transaktiv wirkendes DNA-Bindeprotein (transactive response DNA binding proteine 43)
TEMED	N,N,N+,N+-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor β (transforming growth factor β)
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor (toll like receptor)

TNB	Thionitrobezoessäure
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRA	Triethanolamin
TREM2	von myeolischen Zellen exprimierter Trigger Rezeptor 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells-2)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polysorbat-20
VS-Virus	vesikuläres Stomatitis Virus
wtSOD1	Wildtypform der Superoxiddismutase 1
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem

3. Einleitung

3.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

3.1.1 Epidemiologie

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist die häufigste Motorneuronenerkrankung des Erwachsenen. Sie ist durch eine progressive Degeneration der ersten und zweiten Motorneurone charakterisiert. Es gibt sporadische Formen (sALS), die einer neuen Metaanalyse nach 95% der Erkrankungen ausmachen (Byrne et al., 2011). Außerdem gibt es familiäre Formen (fALS), denen eine Reihe von Mutationen zu Grunde liegen, wobei Mutationen im Superoxiddismutase 1 (SOD1) -Gen am häufigsten vorkommen. Die Inzidenz der ALS beträgt 0,4-2,6/ 100.000 (Beghi et al., 2006), das Lebenszeitrisiko beträgt 1/400 bis 1/700 (bzw. 1:800 Dunckley et al., 2007). Männer sind im Verhältnis von 1,5 zu 1 häufiger betroffen als Frauen. (Bento-Abreu et al., 2010). Die Inzidenz bei Frauen hat sich über einen längeren Zeitraum der der Männer angeglichen, wogegen die Inzidenz bei Männern stabil blieb. Dies wird auf sich verändernde Umweltfaktoren, denen Frauen ausgesetzt sind, zurückgeführt, z. B. Expositionen auf bisher unbekannte berufsbedingte Noxen (Beghi et al., 2006).

Das mittlere Alter bei Beginn der Erkrankung ist 66 Jahre (Ahmeti et al., 2013). Risikofaktoren der sporadischen ALS sind Lebensalter, männliches Geschlecht und Rauchen; Profi-Fußballer haben eventuell ein höheres Risiko (Beghi et al., 2006). Zudem gibt es in der Westpazifischen Region eine endemische Form der ALS, häufig kombiniert mit einer Parkinson-plus Demenz Erkrankung (Hermosura und Garruto, 2007).

3.1.2 Symptomatik, Diagnose und Prognose

Klinisch wird die Erkrankung zunächst durch Faszikulationen und Muskelschwäche auffällig und führt in zumeist schneller Progression zur schlaffen und spastischen Parese der quergestreiften Muskulatur. Die Erkrankung manifestiert sich in der Mehrzahl der Fälle zuerst in den Motorneuronen, welche die Extremitäten innervieren, seltener in den bulbären motorischen Kernen (Bento-Abreu et al., 2010). Die Diagnose der Erkrankung erfolgt primär klinisch anhand der revidierten El-Escorial Kriterien und durch Ausschluss der Differentialdiagnosen.

Die ALS verläuft stets letal, meist infolge respiratorischer Insuffizienz durch Lähmung der Atemmuskulatur oder Pneumonien vor dem Hintergrund einer Langzeitbeatmung. Es gibt bislang keine wirksame Therapie- lediglich supportive Maßnahmen sind möglich- daher beträgt die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung nur 3-5 Jahre. Das einzige zugelassene spezifische ALS-Medikament ist Riluzol, ein Glutamat Antagonist, der eine mittlere Überlebensverlängerung um 2 - 3 Monate bringt (Borrascas et al., 1998), (Miller et al., 2012).

Bemerkenswerterweise sind die motorischen Kerne der inneren und äußeren Augenmuskeln in den allermeisten Fällen von der Degeneration ausgespart (Takeda et al., 2012). In seltenen Fällen wurden auch kognitive Einschränkungen, verursacht durch Degeneration im Frontallappen berichtet.

3.1.3 Histopathologie

Hier besteht eine Verbindung zur Frontotemporalen Demenz, der - wie bei einer Form der fALS (non SOD1 fALS) - in einigen Fällen eine Mutation im Gen für TDP-43 zu Grunde liegt (Wang et al., 2008). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass sich TDP-43 fast immer in zytoplasmatischen Einschlüssen von Patienten mit sporadischer ALS findet, auch wenn keine Mutation dieses Proteins vorliegt. (Polymenidou und Cleveland, 2011), (Arai et al., 2006). Diese Einschlüsse liegen in der Regel ubiquitiniert vor (Manuela Neumann, 2011) und stellen als solche ein schon früh erkanntes histopathologisches Kennzeichen der ALS dar (Al-Chalabi et al., 2012). TDP-43 Aggregate finden sich jedoch nicht bei den durch mSOD1 verursachten Formen der fALS. Daher wurde auch eine histopathologische Einteilung der ALS in Formen mit und ohne TDP-43 Aggregate vorgeschlagen (Kanouchi et al., 2012). Weitere histopathologische Anzeichen sind eine Degeneration der distalen Axone der α -Motorneurone (Fischer et al., 2004).

3.1.4 Pathogenese

Die genaue Pathogenese der sporadischen ALS ist noch unklar. Die in den angesprochenen charakteristischen intrazellulären Einschlüssen auch bei sALS gefundenen Proteine SOD1 und TDP-43 sind z. T. fehlgefaltet und bilden unphysiologische Oligomere (Chattopadhyay und Valentine, 2009). Weitere bei ALS bekannte pathogenetische Phänomene seien hier im Folgenden genannt:

Dazu zählt eine durch den Neurotransmitter Glutamat vermittelte Exzitotoxizität, welche eine Calciumüberladung der Motorneurone zur Folge hat. Die Exzitotoxizität wird wahrscheinlich durch eine verringerte astrozytäre Glutamataufnahme verstärkt (Rothstein et al., 1995). Auch werden Störungen im Gleichgewicht von Wachstumsfaktoren und des axonalen Transportes vermutet (Bento-Abreu et al., 2010). Schließlich findet man im Gewebe von ALS Patienten einen vermehrten Anfall von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, die auch als Ursache für die motorneuronale Degeneration in Frage kommen (Ferrante et al., 1997). Ob die genannten Beobachtungen nun Folge der Proteinfehlfaltung von SOD1 bzw. TDP-43 sind, oder deren Ursache, ist nicht klar. Es ist sicher, dass zumindest in einigen Fällen auch Umweltfaktoren wie z.B. Schwermetallbelastung eine Rolle spielen (Vinceti et al., 2010). Mit spezifischen Überlegungen zur Pathogenese im mSOD1 Modell beschäftigen sich die Kapitel 1.4-1.7.

3.2 Mikroglia

Mikroglia sind für die angeborene Immunabwehr im zentralen Nervensystem (ZNS) verantwortlich und gehören zum Monozyten-Makrophagen-System. Während der Embryogenese wandern hämatopoetische Zellen aus dem Dottersack in das ZNS ein. Dort übernehmen sie ihre Aufgabe als residente Immunzellen im ZNS (Napoli et al., 2009). Unter physiologischen Bedingungen erneuert sich die Mikroglia-Population autark (Ajami et al., 2007). In experimentellen Situationen wie Knochenmarksablationen mittels Bestrahlung und anschließender Transplantation mit Stammzellen konnte eine Einwanderung von hämatopoetischen Stammzellen in das ZNS und deren Differenzierung in Mikroglia nachgewiesen werden. (Hess et al., 2004). Jedoch scheint dies mit der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke durch die Bestrahlung sowie dem artifiziellen Auswaschen von Stammzellen aus dem Knochenmark zusammenzuhängen (Ajami et al., 2007).

Unter pathologischen Bedingungen wie Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Ischämien, Tumoren oder neurodegenerativen Prozessen wandern Mikroglia in die geschädigte Region, wo sie eine Reihe löslicher Faktoren wie Zytotoxine und Immunmodulatoren sezernieren (Napoli und Neumann, 2009), (Neumann et al., 2008). Zu den von Mikroglia im aktivierten Zustand sezernierten Faktoren zählen: TNF- α , IL 1 β , IL-12, IL-6, Chemokine, Proteasen, Glutamat und Redox Proteine (Mosley und

Gendelman, 2010). Mikroglia sezernieren im aktivierten Zustand auch die Radikale Superoxid und NO, die durch die Enzyme NADPH Oxidase 2 (NOX2) respektive NO-Synthetase (vor allem induzierbare NO-Synthetase, iNOS) gebildet werden. Zusammen reagieren Superoxid und NO zu Peroxynitrit. Diese Radikale sind Teil der antimikrobiellen Abwehr, beide spielen zudem eine Rolle als Second Messenger (Forman und Torres, 2001). Im Anschluss an die proinflammatorische Phase tragen Mikroglia durch Sekretion von Neurotrophinen und Phagozytose von Zelltrümmern zur Ausheilung des Entzündungsgeschehens bei (Neumann et al., 2008).

Mikroglia lassen sich *in-vitro* und *in-vivo* (Hu et al., 2012) ähnlich den Blut-Monozyten in einen M1 und einen M2 Phänotyp polarisieren. Im M1 Phänotyp agieren sie eher neuroinflammatorisch, fungieren als antigenpräsentierende Zellen und sezernieren größere Mengen an TNF α und IL-12p40. Im M2 Phänotyp überwiegen die neuroregenerativen Eigenschaften mit Sekretion von TGF β und IGF1 sowie der Phagozytose von Zelltrümmern (Durafourt et al., 2012), (Neumann et al., 2008). Die Aktivierung von Mikroglia wird u.a. über pattern recognition receptors (PRRs) wie z.B. toll like receptors (TLRs) vermittelt, welche nach Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) oder Doppelstrang-RNA aktiviert werden. Die nachgeschalteten Signalwege führen u. a. zur vermehrten Sekretion der genannten pro-inflammatorischen Moleküle. Zusätzlich locken Mikroglia über Chemokine Blut-Makrophagen, T-Zellen und dendritische Zellen an, welche die durch die Entzündungsvorgänge durchlässigere Blut-Hirnschranke (Blamire et al., 2000) passieren können.

3.3 iPS-abgeleitete Mikroglia (iPSdM)

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) gehen aus der Reprogrammierung von adulten somatischen Zellen hervor. Diese wird erreicht entweder durch Transduktion mittels viraler Vektoren, welche Gene für Oct4, Sox2, c-Myc und NANOG enthalten (Takahashi und Yamanaka, 2006) oder durch Einschleusung der rekombinanten Proteine in die Zellen (Zhou et al., 2009). Bis heute wurden verschiedene murine und humane somatische Zellen erfolgreich in iPS-Zellen reprogrammiert (Hanley et al., 2010). iPS-abgeleitete Mikroglia wurden nach einem Protokoll differenziert, das aus dem Protokoll für die Differenzierung von Mikroglia aus embryonalen Stammzellen (ESdM) hervorging (Beutner et al., 2010), (Napoli et al., 2009). ESdM entsprechen in ihren Oberflächenrezeptoren, der Hochregulierung

proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation und dem Migrationspotential auf einen chemotaktischen Reiz hin primären Mikroglia (Napoli et al., 2009). IPS-abgeleitete Mikroglia entsprechen in den genannten Eigenschaften weitgehend den ES-abgeleiteten Mikroglia (unveröffentlichte Beobachtung).

3.4 Neuroinflammation bei ALS

In letzter Zeit wurden die Bedeutung des Immunsystems und damit auch der Mikroglia bei der Pathogenese der ALS immer deutlicher. In histologischen post-mortem Schnitten fand man eine Anhäufung von Mikroglia und dendritischen Zellen zusammen mit einer Hochregulierung des Chemokins MCP-1 im Vorderhorn des Rückenmarks von Patienten (Henkel et al., 2004) und Mäusen (Henkel et al., 2006). Zudem wurde bei ALS-Patienten mit Hilfe kombinierter PET und MRT-Aufnahmen eine starke Aktivierung der Mikroglia fast im gesamten ZNS nachgewiesen (Turner et al., 2004). Weitere Studien zeigten eine Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen im Serum und Liquor von ALS-Patienten (Rentzos et al., 2010), sowie eine Aktivierung des Komplementsystems in histopathologischen ZNS-Präparaten (Sta et al., 2011). Auch Zhang et al., 2005 beschrieben einer systemische Aktivierung des Immunsystems bei ALS-Patienten. Es wurden oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA bei Gewebeproben von Patienten mit sporadischer wie mit familiärer ALS beobachtet (Ferrante et al., 1997). Im SOD1 Mausmodell führt eine selektive Reduzierung der SOD1 Expression in Motoneuronen zu einem späteren Krankheitsbeginn und einer verlangsamten frühen Erkrankungsphase, während die selektive Reduzierung in Mikroglia zu einer langsameren Progression im späteren Krankheitsverlauf führt (Boillée et al., 2006). Dazu passt die Beobachtung, dass mSOD1 transgene Mäuse, die nach Bestrahlung mit GFP markierten Knochenmarkstammzellen von wt Mäusen transplantiert wurden einen langsameren Krankheitsverlauf hatten; man fand bei diesen Mäusen GFP und Iba1 (mikroglialer Marker) doppelt positive Zellen im Rückenmark (Ohnishi et al., 2009).

Eine ausschließliche Expression von mSOD1 G85R, G93A (Lino et al., 2002) bzw. G37R (Pramatarova et al., 2001) nur in Motoneuronen führt im Mausmodell dagegen weder zu einem ALS-Phänotyp noch zu den prototypischen histopathologischen Veränderungen. Eine neuere Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer Kontrolle der

Neuroinflammation als therapeutisches Prinzip im ALS Tiermodell (Shin et al., 2012). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der ALS Phänotyp im Mausmodell nicht ohne die inflammatorische Komponente entstehen kann und die artifizielle Modulation der Immunantwort den Krankheitsverlauf beeinflusst.

3.5 Mutante Superoxiddismutase 1 (mSOD1)

Der SOD1 kommt eine führende Funktion bei der zellulären Abwehr von oxidativem Stress durch die Umsetzung des Radikals Superoxid in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu (Fridovich, 1975). Letzteres wird von dem Enzym Katalase in O_2 und H_2O umgewandelt. Superoxid entsteht als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette sowie als Hauptprodukt des Enzyms NADPH-Oxidase. Mutationen des SOD1-Gens sind mit 20 % die häufigste Ursache für die familiäre ALS. Es wurden allerdings auch in Gewebeproben von Patienten mit sporadischer ALS Proteinaggregate von SOD1 nachgewiesen (Shibata et al., 1996), (Shibata et al., 1994). Mäuse (und seltener Ratten: Howland et al., 2002) mit verschiedenen Mutationen des SOD1-Gens entwickeln eine Motorneuron-Degeneration, die der Erkrankung beim Menschen klinisch und pathologisch gleicht. Der Beginn der Symptomatik ist dabei abhängig von der Art der Mutation, dem Expressionslevel von mSOD1 und dem genetischen Hintergrund der Mäuse. (Gurney et al., 1994), (Dal Canto und Gurney, 1995). Diese transgenen Mäuse sind der allgemein verwendete Modellorganismus zur Erforschung der ALS.

Die Toxizität des mutanten SOD1 Proteins wird durch einen gain-of-function Mechanismus vermittelt, da auch enzymatisch vollaktive SOD1 Mutanten wie z.B. die Mutanten G37A und G93A krankheitsverursachend sind und auch eine gleichzeitige Überexpression von wtSOD1 und dem enzymatisch inaktiven mSOD1 G85R in Mäusen keine Änderung des Krankheitsverlaufes mit sich bringt (Bruijn et al., 1998). Es ist unklar, ob eine bestimmte kritische Menge an mSOD1 notwendig ist, um den Krankheitsprozess auszulösen. Im Mausmodell scheint dies der Fall zu sein (Dal Canto und Gurney, 1995), (Deng et al., 2006), während beim Menschen schon geringe Mengen an mSOD1 für die Krankheitsentstehung ausreichen (Jonsson et al., 2004).

Dass die SOD1 auch bei der sporadischen ALS eine Schlüsselrolle spielen könnte, wird durch eine Untersuchung belegt, welche zeigte, dass durch Oxidation verändertes wtSOD1 ähnliche Epitope wie mSOD1 aufweist und dass Antikörper, die diese

Epitope spezifisch erkennen, auch in Gewebeschnitten des Rückenmarks von sALS Patienten binden (Bosco et al., 2010). Die Oxidation von wtSOD1 trägt über eine forcierte Disulfid-Brückenbindung, die auch bei mSOD1 besteht, zur Aggregation bei (Deng et al., 2006). Oxidativer Stress in Form von H_2O_2 in der Zellkultur führt dazu, dass wtSOD1 wie mSOD1 poly-ubiquitiniert vorliegt und zum Zelltod von Motorneuronen führt. (Ezzi et al., 2007). Gleichwohl die prinzipielle Fähigkeit von mSOD1 zur Aggregation mit der Toxizität korreliert, wird angenommen, dass im Zytosol nur die löslichen Formen und hier vor allem die Oligomere des mutierten Proteins für die Toxizität verantwortlich sind (Witan et al., 2008). Im mitochondrialen Intermembranraum können SOD1 Aggregate durch Bindung des anti-apoptotischen Faktors Bcl2 zur Toxizität beitragen (Pasinelli et al., 2004).

Einen andere Arbeit belegt eine weitere physiologische Rolle für SOD1, nämlich die eines Sensors für Sauerstoffradikale: WtSOD1 bindet an die Untereinheit Rac1 der NAPDH-Oxidase 2 (NOX2) und schützt darin enthaltendes GTP vor Hydrolyse. Steigende Wasserstoffperoxid-Konzentrationen führen zur Dissoziation von SOD1 aus dem Komplex, wodurch GTP leichter hydrolysiert wird, was zur Inaktivierung des Komplexes führt. Mutantes SOD1 kann nicht mehr aus dem Komplex dissoziieren, was zu einer vermehrten Produktion von Sauerstoffradikalen führt (Harraz et al., 2008). NOX2 wird im ZNS v. A. von Mikroglia exprimiert. Vor diesem Hintergrund konnte von derselben Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Deletion von NOX2 bei transgenen SOD1 G93A Mäusen zu einer deutlich signifikanten Überlebensverlängerung führt, zusammen mit einem Rückgang an aktivierter Mikroglia in den lumbalen Vorderhörnern (Marden et al., 2007).

3.5.1 mSOD1 in Mikroglia

Die Expression von mSOD1 in Mikroglia ist für die Progression der Erkrankung in Mäusen verantwortlich (Boillée et al., 2006), die alleinige Expression in Mikroglia führt aber nicht zur Erkrankung (Beers et al., 2006).

In Mikroglia erhöht die Expression von mSOD1 die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL1 β (Meissner et al., 2010). Nach TLR2-abhängiger Stimulation sezernieren mSOD1 exprimierende Mikroglia erhöhte Mengen an TNF α . Dies geschieht infolge vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch die NAPDH-Oxidase (Liu et al., 2009). Eine Überexprimierung von wtSOD1 führte

dagegen zu einer verringerten Produktion von NO (Chang et al., 2001) und ROS in Mikroglia und reduzierte auch die Zytokinproduktion nach Stimulation sowie die Neurotoxizität in der Co-Kultur (Dimayuga et al., 2007). Oxidiertes wtSOD1 erhöht dagegen wie mSOD1 in Mikroglia die Expression von TNF α und iNOS *in-vitro* (Ezzi et al., 2007). Selbst die alleinige Zugabe von mSOD1 in das Kulturmedium führt dazu, dass nicht mSOD1 transgene Mikroglia neurotoxisch werden und benachbarte Neurone in der Co-Kultur abtöten (Zhao et al., 2010). Mikroglia, die kein mutantes SOD1 exprimieren, erhöhen die Überlebenschancen von mSOD1 exprimierenden Motorneuronen in der Nachbarschaft im Mausmodell (Clement et al., 2003).

Möglicherweise tragen Mikroglia auch zur Glutamat vermittelten Exzitotoxizität bei, da sie nach autokriner TNF α Stimulation Glutamat sezernieren (Takeuchi et al., 2006). Im Sinne einer positiven Rückkopplung kann das Glutamat bei den Mikroglia wiederum die TNF α Sekretion induzieren (Taylor et al., 2005). Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass bei ALS die astrozytären Glutamatttransporter, die das Glutamat aus dem Extrazellulärraum aufnehmen, vermindert sind (Rothstein et al., 1995). Diese Tatsachen könnten den schnell progressiven Charakter der Erkrankung mit erklären.

3.6 Mitochondriale Dysfunktion bei ALS

Mitochondrien sind die Hauptquelle von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies, da sie 98% des Sauerstoffs einer Zelle umsetzen (Menzies et al., 2002a). Dabei entsteht durch Reduktion von O₂ das Superoxidanion O₂⁻. 1-2 % des im Organismus aufgenommenen molekularen Sauerstoffs werden so zu Superoxid umgewandelt (Orrenius et al., 2007). Dieses kann durch Reaktion mit NO zu Peroxynitrit reagieren. Superoxid und Peroxynitrit können Proteine, Lipide und DNA schädigen. Dabei ist die mitochondriale DNA besonders empfindlich für derartige Einflüsse, da sie nicht wie die nukleäre DNA über schützende Histone sowie über weniger effektive Reparaturmechanismen verfügt (Menzies et al., 2002a). Bereits kurz nachdem die mSOD1 Mausmodelle zur Verfügung standen, wurden ultrastrukturelle Auffälligkeiten in den Mitochondrien des Rückenmarks dieser Tiere beobachtet (Dal Canto und Gurney, 1995), (Wong et al., 1995).

Durch eine Überexpression von mSOD1 G37R und G93A in einem Zellkulturmodell von Neuronen zeigten sich strukturelle Auffälligkeiten sowie geringere Aktivitäten der Komplexe II und IV (Menzies, 2002b), im SOD1 G93A Mausmodell wurde eine geringere Aktivität des mitochondrialen Komplex IV beobachtet. (Kirkinezos et al., 2005). Li und Kollegen zeigten, dass mSOD1 in einem Rattenmodell den mitochondrialen Proteinimport verändert, was mit einer reduzierten Aktivität von Komplex I einherging (Li et al., 2010), eine reduzierte Komplex I Aktivität fand sich auch bei Son (Son et al., 2007). Im mSOD1 Modell, sowohl an verschiedenen Mäusen als auch an Ratten wurde eine vermehrte Anreicherung von mutantern SOD1 im Intermembranraum von Mitochondrien des Rückenmarks beobachtet. Darüberhinaus fanden die Autoren mSOD1 in den Mitochondrien des Rückenmarks auch bei einem mSOD1 ALS Patienten (Liu et al., 2004).

Eine Arbeit zeigte eine erhöhte ROS Produktion bei Anwesenheit von wtSOD1 im mitochondrialen Intermembranraum und gleichzeitiger Komplex III Blockade, sowie eine noch höhere ROS Produktion bei isolierten Mitochondrien von mSOD1 G93A Mäusen (Goldsteins et al., 2008). Während Bosco et al., 2010 zeigen konnten, dass im Rückenmark von sALS Patienten oxidiertes SOD1 vorliegt, welches ein gemeinsames Epitop mit mSOD1 aufweist, wurde in der Arbeit von Deng et al., 2006 gezeigt, dass wtSOD1 Überexpression in einem mSOD1 Mausmodell die Krankheitsprogression beschleunigt, indem es die Aggregatbildung in Mitochondrien fördert. Pasinelli et al. 2004 konnten zeigen, dass mutantes SOD1 mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl2 physikalisch interagiert und beide Proteine zusammen in Detergenz-unlöslichen Aggregaten in den Mitochondrien vorkommen. Mattiazzi und Kollegen fanden auch wtSOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien (Mattiazzi et al., 2002). Die Zytokinstimulation von Motorneuronen, führt zu einem höheren Anteil sowohl von wtSOD1 als auch mSOD1 in den Mitochondrien, nur in den mSOD1 exprimierenden Zellen jedoch führt die Zytokinstimulation auch zu mitochondrialen Schäden (Ferri et al., 2008).

Auch in Skelettmuskeln von ALS Patienten (Vielhaber et al., 1999), (Vielhaber et al., 2000) und mSOD1 transgenen Mäusen (Zhou et al., 2010) fanden sich mitochondriale Alterationen.

3.7 Mitochondrien in Mikroglia und Neurotoxizität

Eine Hemmung des Komplex I in Mikroglia resultiert *in-vitro* in einer Inhibierung des alternativen Aktivierungsweges, bei dem Mikroglia eher neuroprotektive Eigenschaften annehmen (Ferber et al., 2010). Die spezifische Inhibierung von Komplex II führt *in-vitro* und *in-vivo* zur Aktivierung von Mikroglia, erhöhter ROS Produktion und Apoptose (Ryu et al., 2003). Bei ALS ist der extrazelluläre Glutamatgehalt erhöht, eine Stimulation von mikroglialen Glutamatrezeptoren führt zur Depolarisation der Mitochondrien von Mikroglia, d. h. dem Verlust des elektrochemischen Gradienten und der Beendigung der ATP Produktion (Taylor et al., 2002). Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, die Rolle der mitochondrialen Funktion in mSOD1 transgenen Mikroglia zu untersuchen.

3.8 Ziele der Arbeit

Da Mikroglia nur im zentralen Nervensystem vorkommen, waren Biopsien oder *post-mortem* Proben lange die einzige Möglichkeit humane Mikroglia zu erhalten. Die sich daraus ergebenden technischen und ethischen Probleme machten eine Untersuchung humaner Mikroglia schwierig. Daneben existieren seit einiger Zeit auch immortalisierte mikrogliale Zelllinien (Blasi et al., 1990), (Bocchini et al., 1992). Durch die Möglichkeit, Mikroglia aus Stammzellen zu differenzieren, eröffnen sich neue Wege die Rolle dieser Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen zu studieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden iPS-abgeleitete humane Mikroglia mit verschiedenen mutanten SOD1 Genen transduziert, um ein *in vitro*-Modell zur Untersuchung der inflammatorischen Komponente der ALS zu erstellen. Die Zellen wurden mit einem SOD1-EGFP-Fusionsgen transduziert und anhand des EGFP Signals mittels Durchflusszytometrie sortiert. Die EGFP-positiven Zellen wurden immunzytochemisch auf Iba1 und SOD1 angefärbt und mit confocaler Mikroskopie die Co-Expression des mikroglialen Markers Iba1 mit SOD1 indirekt über das EGFP-Signal nachgewiesen. Via Westernblotanalyse wurde endogenes SOD1 sowie SOD1-EGFP nachgewiesen; diese Untersuchung wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Albrecht Clement am Institut für Pathobiochemie, Universitätsklinikum Mainz durchgeführt. Die Funktion der mitochondrialen Atmungskette wurde von der Arbeitsgruppe von Professor Wolfgang Kunz an der Klinik für Epileptologie des Universitätsklini-

kums Bonn untersucht. Es wurde bei den transduzierten Mikroglia die Produktion von Superoxidanionen gemessen, diese Untersuchung wurde von Estelle Perrier aus der Arbeitsgruppe von Prof. Harald Neumann, Institut für rekonstruktive Neurobiologie der Universitätsklinik Bonn durchgeführt.

4. Materialien

4.1 Laborbedarf

Alufolie	Roth
Pipet Boy Molekularbiologie	Accu-jet pro, Brand
Pipett Boy Zellkultur	MatrixCell Mate II, Thermo Scientific
Pasteurpipetten	Ratiolab
Mikroliterpipetten Molekularbiologie	
0,5-10 μ l	Proline Pipettor, Biohit
10-100 μ l	Proline Pipettor, Biohit
100-1000 μ l	Biozym
Mikroliter-Pipetten Zellkultur	
1-10 μ l	Finn Pipette, Thermo Scientific
10-100 μ l	Thermo Scientific
30- 300 μ l	Thermo Scientific
100-1000 μ l	Thermo Scientific
Pipetten für Pipett Boy 5 ml, 25 ml	Cellstar, Greiner Bio-one
Pipetten für Pipett Boy 10 ml	Falcon
Absaugung Zellkultur	Vacuu Hand Control, Vacuu Brand
Glasflaschen mit Schraubverschluss	Schott Duran, Roth
Skalpell	Dahle

4.2 Geräte

Arbeitsbänke Zellkultur	Hera Safe, Heraeus
Brutschrank E.coli	Heraeus
Brutschrank Zellkultur	Hera Cell 150, Heraeus
Confocales Mikroskop	Olympus IX 81, Fluoview FV 1000. Laser: Melles Griot, 633nm und 543 nm Wellenlänge.
Durchflusszytometrie	FACS DiVa Cell Sorter, Becton Dickinson

Elektrophoresekammern	Agagel-mini, Biomed Analytic
Gefrierschrank -20°	Liebherr
Gefrierschrank -80°	Hera Freeze, Heraeus
Gelbetrachtungsgerät mit CCD Kamera	Bio RAD
Gelbetrachtungsgerät zum Ausschneiden	Dark Reader Transilluminator, Clare Chemical Research
Heizblock-Schüttler	Thermomixer Compact, Eppendorf
Kühlschrank 4° Ethidiumbromidraum	Amica
Kühlschrank 4° Molekularbiologie	Liebherr Premium
Lichtmikroskop	Zeiss Axioskop 2, AxioCam HRm
Lichtmikroskop Zellkultur	Zeiss Axiovert 40 CFL
Schüttler-Inkubator groß	Innova 4300
Schüttler-Inkubator klein	Edmund Bühler TH15
Stickstofftank	K-Series, Cryostorage System
Stickstofftank	MVE 611, German Cryo
Thermocycler	T300, Biometra
Tischzentrifuge Molekularbiologie	Bio-Fuge pico, Heraeus
Tischzentrifuge S1 Labor	Biofuge Fresco, Heraeus
Tischzentrifuge S2 Labor	Mini Centrifuge MCF2360, Tanaka
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery 90 SE, Hitachi
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R, Heraeus

4.3 Materialien für die Zellkultur

4-Kammer –Objektträger	Nalge Nunc Lab-Tek
6-well Platte, 12-well Platte	one cellstar
Dichtungsfolie	Parafilm "M", Laboratory Film, Benis
Einmalhandschuhe Latex	Hygrip Micro Touch, Ansell
Einmalhandschuhe Nitril	Micro Touch, Ansell
Filter mit Spritzenaufsatz	0,2 µm Filtropur S 0,2, Sarstedt
Filter mit Spritzenaufsatz	0,45 µm Corning
Filteraufsatz für Flaschen	Steritop, Millipore

Kompressen	Hartmann
PCR-Reaktionsgefäß	PCR Single Cap 0,2 ml, Biozym Scientific
Petrischalen	B.D. Falcon
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	Tip one, Starlab
Pipettenspitzen 1-200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 101-1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Microcentrifuge Tube, Sarstedt
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Microcentrifuge Tube, Sarstedt
Reaktionsgefäß 15 ml	Cellstar Tube, Greiner Bio-one
Reaktionsgefäß 2 ml	Microcentrifuge Tube, Eppendorf
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß Durchflusszytometrie	B.D. Falcon
Serologische Pipetten 3ml	Copan
Spritzen 10 ml	Lure Lok Tip, B.D.
Spritzen 10ml	Omnifix Luerlock, Braun
Spritzen 20 ml, 50 ml	Omnifix, Braun
Spritzen 50ml	Braun
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann
Zellkultur-Objekträger	Lab-Tek Chamber Slide, Nunc,
Zellkulturschale 10 cm	Sarstedt
Zellkulturschale 15 cm	TPP 150
Zellkulturschale 6 cm	Sarstedt
Zellkulturschale 6 well	Cell Star, Greiner Bio-one
Zellkulturschalen 3 cm, 5cm, 10 cm, 15 cm	Sarstedt
Zellsieb	Cell Strainer, B.D. Falcon
Zellzählkammer	Neubauerzählkammer, Marienfeld

4.3.1 Zelllinien

Kompetente E. coli	Top Ten, Invitrogen
HEK293FT Zellen	Invitrogen
iPSdM	Kristin Roy, AG Neumann

4.3.2 Puffer, Nährmedien und Chemikalien

Agarose	Biozym
Dihydroethidium (DHE) 30 mM in DMSO	Invitrogen
Ethanol >99,8%, DAB, reinst	Roth
Ethanol vergaellt >99,8% mit ca. 1% MEK	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Gelstar	Lonza
PBS	Gibco
Trypsin	Invitrogen
PLL	Sigma
PFA	Sigma
Mowiol	Roth

TBE Puffer

Reagenz	Konzentration/Volumen	
Tris	108 g	Roth
Borsäure	55 g	Roth
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	0,5 M 40 ml	Roth
Ad Aqua bidest.	1000 ml	

Krebs-HEPES Puffer, pH 7,4

Reagenz	Konz. [mmol/l]	Konz. [g/l]	
HEPES	8.3	1.98	Roth
NaCl	130.0	7.60	Roth
KCl	5.6	0.42	Roth
CaCl ₂	2.0	0.29	Sigma
MgCl ₂	0.24	0.049	Sigma
Glukose	11.0	1.98	Roth

LB- Medium

40g LB Medium Pulver ad 2 l Aqua bidest.	Fluka, Sigma-Aldrich
--	----------------------

Agarosegel

TBE-Puffer	50 ml	s. O.
Agarose	0,5 g	Biozym
Ethidiumbromid	3 µl	Roth

Das Agarosepulver wurde im TBE-Puffer aufgelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung wurde das Ethidiumbromid zugefügt.

4.3.3 Zellkulturmedien**N2-Medium**

5 ml N2 Supplement	Invitrogen
1,7 ml D-Glucose 45 % 5,3 g/Mol	Sigma
1,2 ml L-Glutamin 0,49mM	Gibco, Invitrogen
5ml P/S 100g/ml	Gibco, Invitrogen
Ad 500 ml DMEM/ F12	Gibco, Invitrogen

MEF-Medium

5 ml nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Invitrogen
5 ml Na-Pyruvat	Gibco, Invitrogen
5 ml L-Glutamin	Gibco, Invitrogen
50 ml (10%) FCS	Invitrogen
ad 500 ml DMEM high glucose	Gibco, Invitrogen

Opti-MEM	Invitrogen
----------	------------

Einfrier-Medium

50% FCS	Gibco, Invitrogen
40% N2-Medium	s.O.
10% DMSO	Sigma

Sortier-Medium

N2 Medium mit 2% P/S und 5% FCS

4.4 Stimulation/Zytokine

LPS	Sigma
INF γ	R&D Systems
Rekombinanter humaner TNF α	R&D Systems
Rekombinanter Humaner GM-CSF	Gibco

DNA-Größenmarker

100 bp Größenmarker	Roche
1000 bp Größenmarker	Generuler, Fermentas

DNA-Präparationen

Miniprep DNA-Isolation Kit	Quiagen
Maxiprep DNA-Isolation Kit	Quiagen

4.5 Klonierungen**Restriktionsenzyme:**

NheI	Roche
XbaI	Roche
Buffer A	Roche

Ligation

Hexanukleotid Mix 10x konzentriert	Roche
Ligase-Puffer 10x konzentriert	Roche
PCR-Reaktions-Puffer 10x konzentriert	Roche
T4 DNA-Ligase	Roche
T4 DNA-Ligase	Roche

4.6 Sequenz des PGK-Promoters

GCGCT**CTAGAA**ATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGG
 AGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTG
 GCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGT
 GGCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGC
 CCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTA
 GTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGG
 GGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGG
 AAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGG
 GCGCGAAGGTCTCCCGAGGCCCGGCATTCTCGCACGCTTCAAAGCGCACGT
 CTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTT**CGAGCTAGCATGC**

4.7 Primer

Primer für die Sequenzierung des SOD1-EGFP Konstruktes im N1 Vektor und pLL3.7-Vektor

Die folgenden Primer wurden erstellt von Dr. Yiner Wang, AG Neumann:

SeqCitriRev 5´-TGC AGA TGA ACT TCA GGG TCA G-3´

Dieser Primer ist komplementär zu einer Sequenz innerhalb des EGFP-Gens.

SeqforPlentCMV: 5´-AAA ATG TCG TAA CAA CTC CG- 3´

Dieser Primer ist komplementär zu einer Sequenz stromaufwärts des SOD1 Gens.

Primer für die PCR des PGK-Promoters

Die folgenden Primer wurden synthetisiert von Eurofins MWG Operon, Ebersberg

For-PGK-Xbal: GCT**CTAGAA**ATTCTACCGGGTAGGGGAG

Rev-PGK-NheI: GCT**AGCTAGCT**CGAAAGGCCCGGAGATGAGGAA

Die Sequenzierungen wurden durchgeführt von Seqlab, Göttingen

4.8 Kits

Quia Quick Gel Extraction Kit	Quiagen
MiniElute Gel Extraction Kit	Quiagen
Maxipräparation	Endo Free Plasmid Maxi Kit, Quiagen
Minipräparation	Qiaprep Spin Miniprep Kit, Quiagen

4.9 Virusproduktion

Lipofectamine 2000	Invitrogen
Pack-Vektoren: PLP1, PLP2, PLP3	Virapower Lentiviral System, Invi- trogen

4.10 Mitochondriale Aktivitätsmessungen

Geräte

Spektrophotometer	Aminco DW 2000, SLM Instru- ments
Ultraschall Homogenisator	GEX-600, Sonics & Materials

Chemikalien

Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich
CoQ1	Sigma-Aldrich
Cytochrom C	Sigma-Aldrich
Dodecyl-Maltosid	Sigma-Aldrich
DTNB	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich
KCl	Sigma-Aldrich
KCN	Sigma-Aldrich
NADH	Sigma-Aldrich

NaHCO ₃	Sigma-Aldrich
Oxalacetat	Sigma-Aldrich
Rotenon	Sigma-Aldrich
TRA	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Isocitratdehydrogenase	Boehringer

Puffer und Lösungen

TRA/EDTA Puffer

0,5 M Triethanolamin (ohne Cl⁻ Ionen), 5 mM EDTA, pH 7.4 mit NaOH eingestellt.

KCl-Tris Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA

10 mM CoQ₁ Lösung

10 mM CoQ₁ in 96% Ethanol.

1 mM DTNB Lösung

1 mM 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoe Säure gelöst in 1 M Tris-HCl, pH 8.1

50 mM Oxalacetat

50 mM Oxalacetat in TRA/EDTA buffer.

2 mM Rotenon

2 mM Rotenon in 96% Ethanol.

15 mM NADH Lösung

15 mM NADH in 1% NaHCO₃

4.11 Immunozytochemie

Blockierlösung

10% bovines Serumalbumin (BSA) Sigma

5% normal goat serum (NGS) Sigma
 0,1% Triton X 100 Sigma
 in PBS

Primäre Antikörper

Kaninchen-anti- Iba1 polyklonaler Antikörper Wako, eingesetzt 1:2000
 Kaninchen-anti-SOD1 monoklonaler Antikörper Epitomics, eingesetzt 1:250

Sekundärer Antikörper

Cy3-konjugierter Ziege-anti- Kaninchen Dianova, eingesetzt 1:500
 polyklonaler Antikörper

Kernfärbung

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
 Sigma-Aldrich, eingesetzt 1:5000

4.12 Software

Gelbetrachtung Geldoc, Quantity One

Klonierung APE (A Plasmid Editor), M. Wayne Davis

Gene Runner, Hastings Software

Bildbearbeitung Image J, National Institutes of Health, USA
 PhotoImpac, Ulead

Statistik Graphpad Prism, Graphpad Software

Textverarbeitung Word 2007, Microsoft

Literaturverwaltung

Citavi Pro 3, Swiss Academic Software GmbH

4.13 Online Ressourcen

Restriktionsschnittstellensuche

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

Klärung von Abkürzungen

www.wikipedia.com

Literaturrecherche

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

5. Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Passagieren der Zellen

Die iPScM wurden bei Konfluenz gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen mit auf Raumtemperatur vorgewärmtem Trypsin (0,25 %) für 3-5 min bei 37° C, 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einer Pipette von der Platte gelöst und in ein 15 ml Tube überführt und für 3 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in N2-Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturplatten vereinzelt mit einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20, je nach gewünschter Anwendung.

5.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die im Stickstofftank eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37° C für 1 min aufgetaut, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 5 ml vorgewärmtes N2-Medium vorgelegt wurde und in dem Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen bei 300 g für 3 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in N2-Medium resuspendiert und die Zellen in einer Zellkulturschale bei 37 C, 5% CO₂ kultiviert. Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in Einfrier-Medium resuspendiert und zügig bei -80° C eingefroren. Nach 1-5 Tagen wurden die Zellen in den Stickstofftank (-170° C) überführt.

5.2 Etablierung von transgenen Mikrogliazelllinien

Eine Methode, um eine langhaltende Expression von Transgenen in sich teilenden sowie nicht teilenden Säugetierzellen zu erreichen, ist die Transduktion mit Lentiviren. Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren und ihr bekanntester Vertreter ist das humane Immundefizienz-Virus (HIV). Lentivirale Vektoren basieren auf dem Genom des HI-Virus. Der hier verwendete Vektor pLL3.7 ist als lentiviraler Vektor der dritten Generation replikationsinkompetent, dies wird erreicht durch die Aufteilung des ursprünglichen Genoms auf 4 Vektoren, einen Expressionsvektor pLL3.7 und 3 Hilfsvektoren, PLP1, PLP2 und PLP3. Die Bio-Sicherheit des Vektors wurde weiter

erhöht durch die Deletion von Genen wie „tat“ sowie dem Austausch des HIV-Hüllproteins „env“ durch das Hüllprotein VSV-G des VS-Virus; letztere Modifikation führt außerdem zu einem größeren Tropismus des Virus und damit zu dessen breiterer Einsatzfähigkeit in experimentellen Studien. (Mendoza, 2007)

5.2.1 Herstellung von Lentiviren

Zur Herstellung von Lentiviren wurden HEK293FT Zellen, das Transfektions-Reagenz Lipofectamine 2000 sowie die Pack-Plasmide PLP1, PLP2 und PLP3 verwendet. Die HEK293FT Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf mit PLL beschichtete Zellkulturschalen ausgesät und in MEF-Medium gehalten. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden sie mit den drei Packplasmiden (je 3 µg) sowie je einem der folgenden Plasmide (5 µg) transfiziert:

pLL3.7-PGK-EGFP; pLL3.7-PGK-SOD1 wt-EGFP; pLL3.7-PGK-SOD1 G37R-EGFP
pLL3.7-PGK-SOD1 G85R-EGFP; pLL3.7-PGK-SOD1 G93A-EGFP

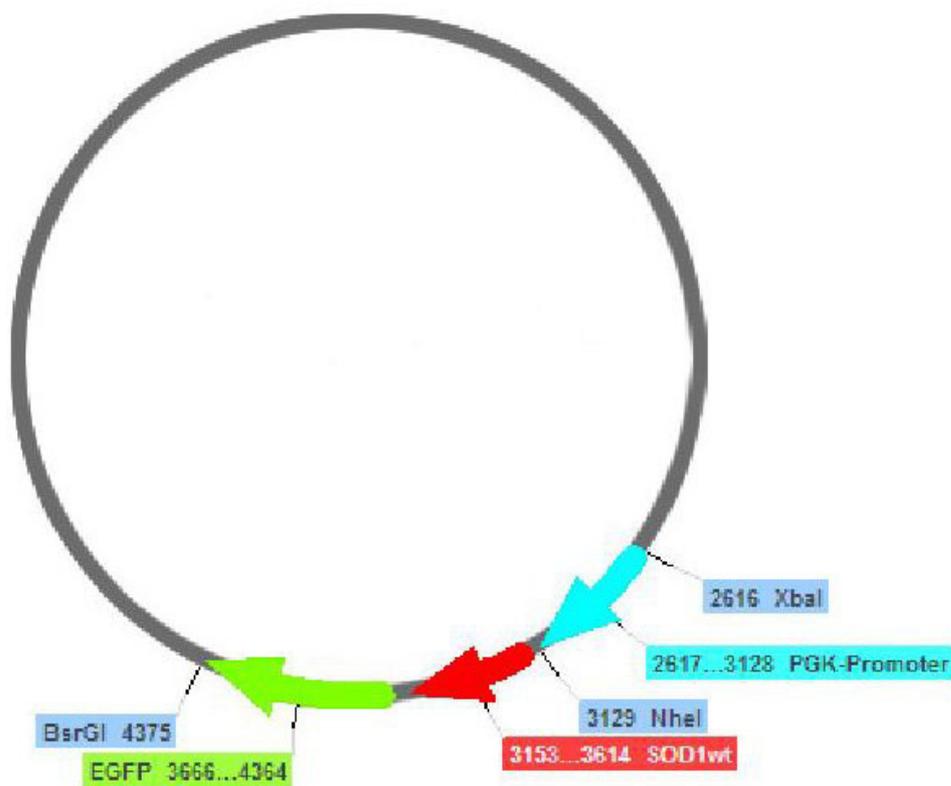


Abb. 1 Lentiviraler Vektor pLL3.7 mit dem PGK-Promoter vor dem SOD1-EGFP-Fusionsgen und den verwendeten Restriktionsschnittstellen XbaI, NheI und BsrGI.

Für die Transfektion wurde das Protokoll des Herstellers verwendet. Hiernach wurden die transfizierten HEK293FT-Zellen für 4-6 Stunden in Opti-MEM Medium + 10 % FCS kultiviert, dann wurde auf MEF-Medium (8 ml) gewechselt. Nach 24 Stunden wurde das Virus-haltige MEF-Medium durch 0,45 µm Filter filtriert, um im Medium schwimmende Zellen zurückzuhalten. Das Virus-haltige Medium der jeweils ersten Virenernte wurde sofort zur Transduktion der iPScM verwendet. Um eine zweite Virenernte zu erhalten, wurden die HEK293FT Zellen erneut für 24h in 8 ml MEF Medium kultiviert, das Virus-haltige Medium wie beschrieben filtriert und bei -80° C eingefroren.

5.2.2 Transduktion der iPScM

Die iPScM, zu Beginn bei Passage 13, wurden bei 50-60% Konfluenz mit den Lentiviren pLL3.7-PGK-EGFP, pLL3.7-PGK-SOD1 wt-EGFP, sowie pLL3.7-PGK-SOD1 G37R-EGFP, -SOD1 G85R-EGFP und -SOD1 G93A-EGFP transduziert. Dazu wurde das N2 Medium gewechselt und der gesamte Virus-haltige Überstand in einem Verhältnis von 1:1 zum N2-Medium hinzugegeben. Im Abstand von 5-7 Tagen erfolgte die 2. bis 4. Transduktion in gleicher Weise. Bei Konfluenz wurden die transduzierten Zellen gesplittet.

5.2.3 Durchflusszytometrie

Die transduzierten Zellen wurden anhand des EGFP-Signals mittels Durchflusszytometrie am Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie (IMMEI) des Universitätsklinikums Bonn sortiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsiniert, in Sortier-Medium resuspendiert und auf Eis transportiert. Kurz vor der Prozedur wurden die Zellen mittels Zellsieb filtriert und in ein FACS-Gefäß gegeben, anschließend mit der Pipette nochmals durchmischt, um Zellklumpen aufzulösen, die das Kapillarsystem des Geräts verstopfen können. Die EGFP-positiven sortierten Zellen wurden in 2 ml Sortier-Medium aufgefangen, direkt zentrifugiert, nochmals in ein frisches 15 ml Gefäß überführt und auf Eis zurück in die Zellkultur gebracht. Nachdem sich die Zellen in der Kulturschale gesetzt hatten, wurde das Medium entfernt und frisches Sortier-Medium (ohne FCS) hinzugegeben. Dieses Vorgehen diente dem Verringern von etwaigen Kontaminationen, die während des Sortier-Prozesses auftreten können. Nach 2 Tagen wurde auf N2-Medium gewech-

selt. Einen Tag nach der Sortierung wurden die sortierten Zellen in 25 ng/ml rhGM-CSF kultiviert. Im Abstand von 2 Tagen wurde auf neues N2-Medium mit 25 ng/ml rhGM-CSF gewechselt. Von Tag 10 an ab Sortierung wurden die Zellen ohne rhGM-CSF in N2-Medium kultiviert.

5.2.4 Immunzytochemische Färbungen

Dazu wurden jeweils 40.000 Zellen in eine Kammer eines 4-Kammer-Objektträgers ausgesät. Nach einem Tag in Kultur wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 60 min in Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper Kaninchen-anti-Iba1 wurde in einem Verhältnis von 1:2000, der Primärantikörper Kaninchen-anti-SOD1 in einem Verhältnis von 1:250 eingesetzt und die Zellen über Nacht bei 4° C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurde der Sekundärantikörper (Cy3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper) in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen.

Zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI in einer Konzentration von 0,1 µg/ml für 30 s inkubiert, anschließend nochmals dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden mit Mowiol und einem Objektglas eingedeckelt und mindestens eine Nacht bei 4° C gelagert. Die Aufnahmen wurden mit einem confocalen Mikroskop angefertigt.

Es wurden Objektive mit 10x, 20x, 40x und 60x Vergrößerung verwendet. Die Exzitation des EGFP erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, die des Cy3 bei 543 nm. Die Mehrschicht- Aufnahmen wurden mit 9 bis 13 Schichten bei einer Schichtdicke von 0,41 µm durchgeführt und einer Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten. Wenn während der Aufnahmen die Zellen in der Z-Achse verrutschten, wurde die Aufnahme abgebrochen, neu fokussiert und die Aufnahme erneut gestartet.

5.2.5 Analyse der mitochondrialen Aktivität

Stimulation der Zellen

Um die mitochondriale Funktion der Mikroglia in verschiedenen Aktivierungszuständen zu messen, wurden 1.000.000 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht in den Inkubator gestellt. Nach Wechseln des Mediums wurden die Zellen mit LPS (1 µg/ml), INF γ (1000U/ml), LPS und INF γ oder TNF α (100ng/ml) für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets an der Luft getrocknet und danach im Stickstofftank eingefroren. Es wurden bei diesen Experimenten Zellen der Passagen 15-20 verwendet. (untransduzierte iPScM waren bei P. 15-16, transduzierte iPScM waren bei P. 17-20)

Die Messung der mitochondrialen Komplexe I (Ubichinon–Oxidoreduktase) und IV (Cytochrom-C-Oxidase), sowie des mitochondrialen Enzyms Citrat-Synthase und der gesamten zellulären Proteinmenge erfolgte in der Abteilung für Neurochemie, Prof. Kunz an der Klinik für Epileptologie des Universitätsklinikums Bonn. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

Präparation der Zell Homogenate

Die Zellen wurden mittels Ultraschall in 0,1 M Kaliumphosphat Puffer (pH 7.4) für 15 s homogenisiert. Alle Aktivitätsmessungen wurden bei 30° C durchgeführt. Es wurde ein zwei-Wellenlängen Spektrophotometer verwendet.

Bestimmung der Aktivität des mitochondrialen Komplex I (Ubichinon-Oxidoreduktase)

Die Aktivität von Komplex I wurde ermittelt durch Messung der Rotenon-sensitiven NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Aktivität. Rotenon ist ein spezifischer Inhibitor der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase. Die Oxidation von NADH wurde durch Absorptionsänderungen bei Wellenlängen von 340-380 nm ($\epsilon_{\text{red-ox}} = 5,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen. Die Reaktions-Mixtur enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM CoQ1, 4 mM KCN, 0,15 mM NADH sowie das Zell Homogenat.

In einem zweiten Schritt wurden 0,02 mM Rotenon hinzugefügt. (460 µl KCl-Tris Puffer + 5 µl 10mM CoQ1 Lösung + 5 µl 0,4 M KCN + 5 µl 15 mM NADH Lösung + 20 µl Zell Homogenat + 5 µl 2 mM Rotenon. Es wurde der lineare Abfall der Absorption vor Rotenongabe minus des linearen Abfalls der Absorption nach Rotenongabe berechnet.

Bestimmung der Aktivität des mitochondrialen Komplex IV (Cytochrom C Oxidase)

Zur Aktivitätsbestimmung von Komplex IV wurde die Oxidation von Cytochrom C durch eine Änderung der Absorption bei 550 nm ($\epsilon_{\text{red-ox}} = 18,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen. Der Reaktionsmix enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Dodecyl-Maltosid, 30 µM reduziertes Cytochrom C sowie das Zell Homogenat. (480 µl KCl-Tris Puffer + 5 µl 10 % Dodecyl-Maltosid + 5 µl 3 mM reduziertes Cytochrom C + 10 µl Zell Homogenat (gelöst in 0,1 M Kalium Phosphat, pH 7.4).

Bestimmung der Aktivität der Citrat Synthase

Für die Aktivitätsbestimmung der Citrat-Synthase wurde die physiologische Reaktion des Enzyms ($\text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Citrat} + \text{CoA-SH}$) mit der Reaktion $\text{CoA-SH} + \text{DTNB} \rightarrow \text{TNB} + \text{CoA-S-S-TNB}$ gekoppelt. Das Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes TNB kann bei 412 nm ($\epsilon_{\text{red-ox}} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen werden. Der Reaktionsmix enthielt 0,1 mM DTNB, 0,36 mM Acetyl Coenzym A, 2,5 mM Oxalacetat sowie das Zell Homogenat. (800 µl H₂O + 100 µl 1 mM DTNB Lösung + 30 µl 12 mM Acetyl Coenzyme A + 50 µl 50 mM Oxalacetat + 10 µl Zell Homogenat)

Berechnung der Aktivität

$V \text{ (Aktivität)} = (dE/\epsilon_{\text{red-ox}}) * (TV/HV) * (1/\text{Protein Konzentration im Zell-Homogenat [mg/ml]}) = \text{Einheiten/mg Protein.}$

dE = ein linearer Anstieg oder Abfall der Absorption über 1 min.

$\epsilon_{\text{red-ox}}$ = Differenz des Exstinktionskoeffizienten ϵ vor und nach Oxidation

TV = Totales Volumen in der Cuvette

HV = Volumen der hinzugefügten Probe.

Der Proteingehalt in den Zell-Homogenaten wurde mit Hilfe des Total Protein Kit (Micro Lowry, Peterson's Modification, SIGMA) bestimmt. Es wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

Da die Stimulationsexperimente (n=3) von 2 verschiedenen Experimentatoren durchgeführt wurden (Estelle Perrier (1 Wiederholung) und Johannes Friese (2 Wiederholungen)) wurden die Werte anschließend normiert auf den Wert SOD1 wt unstimuliert = 1. Daher entspricht der Multiplikationsfaktor = $1 / \text{Wert SOD1 wt unstimuliert}$ (jeweils separat für jeden Experimentator). Die normierten Werte wurden anschließend zusammen statistisch ausgewertet.

Statistische Auswertung der mitochondrialen Aktivitätsmessungen und der Messung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Daten wurden mit dem Programm Graphpad Prism ausgewertet. Es wurde der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes bestimmt. Außerdem wurde eine zwei-faktorielle ANOVA mit dem Posttest nach Tukey durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzwerte entsprechen:

Keine Angabe = nicht signifikant $P > 0,05$

* $P \leq 0,05$

** $P \leq 0,01$

*** $P \leq 0,001$,

**** $P \leq 0,0001$.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Vermehrung von Plasmiden in kompetenten *E. coli*

Transfektion mittels der Hitzeschock Methode

Bei -80°C gelagerte kompetente *E. coli* wurden für 20 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden $40\ \mu\text{l}$ der kompetenten *E. coli* zusammen mit $1\ \mu\text{l}$ des zu vermehrenden Plasmids in ein $1,5\ \text{ml}$ Gefäß pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gefäß für genau 45 s in einen auf 42°C vorgeheizten Heizblock gestellt und hiernach für 3 min auf Eis abgekühlt. Jetzt wurden $500\ \mu\text{l}$ LB Medium ohne Antibiotikazusatz hinzugefügt und das Gefäß für 1 h bei 250 RPM bei 37°C geschüttelt. Danach wurde die Suspension für 2 min bei 7000 RPM zentrifugiert, dann $450\ \mu\text{l}$ des Überstandes abpipettiert und das Zellpellet im restlichen Medium resuspendiert. Anschließend wurden $10\ \mu\text{l}$ der Suspension auf eine LB-Agarplatte mit einer Pipettenspitze ausgestrichen. Die Agarplatte enthielt im Falle des pEGFP-N1 Vektors das Antibiotikum Kanamycin, für den pLL3.7 Vektor dagegen Ampicillin. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Bakterienkulturflaschen mit je $10\ \text{ml}$ LB Medium plus $10\ \mu\text{l}$ Kanamycin (pEGFP-N1) bzw. $10\ \mu\text{l}$ Ampicillin (pLL3.7) befüllt und mit je einer Kolonie von den Kulturplatten beimpft. Die Deckel der Kulturflaschen wurden so aufgelegt, dass noch Luft in die Fla-

schen gelangen konnte. Die Flaschen wurden in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37° C und 200 RPM inkubiert. Am nächsten Tag wurde anhand der Trübung des Mediums geprüft, ob ein Bakterienwachstum stattfand. Zur Aufreinigung der in *E. coli* vermehrten Plasmide wurden das Miniprep DNA Isolation Kit sowie das Maxiprep DNA Isolation Kit von Quiagen verwendet. Hierzu wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

5.3.2 PCR

Zur Vermehrung des PGK-Promoters wurde eine PCR mit den Primern For-PGK-XbaI und Rev-PGK-NheI durchgeführt, welche die Schnittstellen der Restriktionsenzyme XbaI und NheI enthalten. Zusammensetzung der PCR-Reagenzien:

Reagenz	Volumen
10x PCR Buffer	5 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
50 mM MgSO ₄	5 µl
Primer Mix (100 pmol/µl je Primer)	2 µl
Polymerase (Hifi-Polymerase)	0,2 µl
Aqua dest.	36 µl
cDNA	0,5µl

Tab. 1 Ansatz der PCR des PGK-Promoters.

Der PGK-Promoter wurde zunächst mittels einer PCR mit benötigten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und NheI versehen, deren Sequenzen in den Primern enthalten sind.

Es wurde folgendes PCR-Programm benutzt:

Temperatur [°C]	Zeit [s]	
94	180	
94	30	} 40x
62	50	
72	120	
72	600	

Tab. 2 Temperaturkurvenverlauf der PCR des PGK-Promoters

Die PCR-Produkte wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

5.3.3 Gelelektrophorese

Es wurde ein 1 % Agarosegel mit 3 µl Ethidiumbromid verwendet. Die Gelelektrophorese lief mit 120 V, 80 mA für 30 min. Die Auswertung erfolgte mit einer CDC Kamera (Biorad) und der Software Quantity One.

5.3.4 Gelextraktion

Mittels Restriktionsenzymen verdautes Material wurde auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennte DNA wurde unter der Fluoreszenzlampe mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem MiniElute Gel Extraction Kit (Quiagen) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Die SOD1-EGFP-Fusionskonstrukte wurden von Dr. Albrecht Clement von der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Die SOD1 Sequenzen wurden über BglIII und EcorRI in den N1 -Vektor vor die EGFP-Sequenz kloniert.

5.3.5 Verdau

Das PCR-Produkt des PGK-Promoters wurde nach Gelextraktion mithilfe der Restriktionsenzyme XbaI und NheI verdaut, ebenso der pLL3.7 Vektor.

5.3.6 Ligation pLL3.7 und PGK-Promoter

Für die Ligation wurden folgende Mengen eingesetzt:

Reagenz	Menge/Volumen
pLL3.7	116,2 ng
PGK-Promoter	280 ng
T4-Ligase	3 μ l
Puffer	2 μ l
Aqua dest.	ad 20 μ l

Tab. 3 Eingesetzte Mengen für die Ligation von pLL3.7 Vektor und PGK-Promoter. Beide Gensequenzen enthalten nach der Restriktion überlappende komplementäre Enden, die im Schritt der Ligation von dem Enzym T4-Ligase verbunden werden.

Im Anschluss an die Ligation wurden kompetente *E. coli* mit dem Ligationsprodukt transfiziert und eine Minipräparation durchgeführt. Hiernach wurde die Konzentration des Ligationsproduktes mittels Photometer bestimmt.

5.3.7 Testverdau

Das Ligationsprodukt wurde einem Testverdau zugeführt, mit folgendem Ansatz:

Reagenz	Volumen/Menge
DNA	7 μ l (= 371 ng bei 53 ng/ μ l Konzentration aus Miniprep)
Buffer A	2 μ l
NheI	0,5 μ l
XbaI	0,5 μ l
Nuklease-freies Aqua dest	ad 20 μ l

Tab. 4 Ansatz des Testverdaus des Ligationsproduktes zwischen pLL3.7 Vektor und PGK-Promoter. Ein Teil der zuvor ligierten DNA wurde zur Überprüfung der korrekten Ligation einem Testverdau zugeführt.

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37° C inkubiert. Das gesamte Volumen des Ansatzes wurde für die Gelelektrophorese eingesetzt. Ligation pLL3.7-PGK und SOD1-EGFP-Fusionskonstrukt

Im Anschluss wurde die Ligation zwischen dem pLL3.7-PGK Vektor und den aus dem N1 Vektor ausgeschnittenen SOD1-EGFP-Konstrukten durchgeführt. Der Ansatz ist in Tabelle 5 aufgeführt.

DNA	Konzentration [ng/μl]	eingesetztes Volumen [μl]	eingesetzte Menge [ng]	DNA
pLL3.7-PGK	122,3	1	122,3	
+ jeweils 1 SOD1-Variante				
SOD1-wt	16,6	9	149,4	
SOD1 G37R	17,7	9	159,3	
SOD1 G85R	26,1	9	234,9	
SOD1 G93A	19,7	9	177,3	
T4-Ligase		3		
Puffer 10x		2		
RNAse freies Wasser		5		

Tab. 5 Ligationsansatz des pLL3.7-PGK-Konstruktes und der verschiedenen SOD1-EGFP-Varianten. Nachdem zunächst der PKG-Promoter in den pLL3.7-Vektor kloniert wurde, wurden nun die zuvor aus den N1-Vektoren ausgeschnittenen verschiedenen SOD1-EGFP Fusionsgene hinter den PGK-Promoter in den pLL3.7-Vektor kloniert.

5.3.8 Sequenzierungen

Zum Nachweis der korrekten Basensequenzen und dem Ausschluss von Mutationen wurden alle Ligationsprodukte sequenziert. Die Sequenzierungen wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

5.4 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgte mithilfe des Farbstoffs Dihydroethidium (DHE). DHE reagiert sehr spezifisch mit Superoxid Anionen ($O_2^{\cdot-}$) zu 2-Hydroxyethidium (Bindokas et al., 1996), (Zhao et al., 2005). Die Intensität der Fluoreszenz korreliert mit der Menge von extrazellulärem $O_2^{\cdot-}$, welches von der membranständigen NADPH Oxidase gebildet wird. Im Fall von Phagozyten wie Mikroglia handelt es sich hierbei vor allem um die NADPH-Oxidase 2 (NOX2). Die DHE-Experimente wurden von Estelle Pierre, AG Neumann am Institut für rekonstruktive Neurobiologie durchgeführt. Zunächst wurden 30 000 Zellen/Kammer auf einen 4-Kammerobjektträger ausgesät und über Nacht bei 37° C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde für 24 h entweder mit 1000 ng/ml LPS, 1000 U/ml rhINF γ oder für 20 min mit 500 ng/ml TNF α stimuliert. Dann wurden die Mikroglia dreimal mit Krebs-HEPES Puffer gewaschen. Nun wurden 30 μ M DHE in Krebs-HEPES Puffer verdünnt. Die Zellen wurden für 15 min in der DHE-Puffer Lösung bei 37° C 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit Krebs-HEPES Puffer gewaschen, um die Absorption von extrazellulärem Oxyethidium, entstanden durch Autooxydation von DHE zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 0,25 % Glutaraldehyd in 4 % PFA fixiert. Nach dreimaliger Waschung mit PBS wurden die Zellkerne für 30 s mit DAPI in einer Konzentration von 1:5000 angefärbt. Zum Schluss wurde nochmals dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und die Zellen mit Mowiol und Objektträgern eingedeckelt.

Einstellungen des Confocalen Mikroskops:

- Vergrößerung: 40 \times
- VBF: channel 1 (EGFP) = 494 nm [37 nm] 531 nm; channel 2 Cy3.5 (DHE) = 548 nm [100 nm] 648 nm
- EGFP: HV = 503, Gain = 2 \times , Offset = 9 %, Laser 488 = 4 %
- Cy3.5 (für DHE): HV = 570, Gain = 2 \times , Offset = 9 %, Laser 543 = 5 %
- 1024 x 1024 Bildpunkte
- Kalman 3 line, Sequential line

Übersicht über Kollaborationen

Die untransduzierten iPSdM wurden von Kristin Roy aus der gemeinsamen Arbeitsgruppe für neurale Regeneration zur Verfügung gestellt.

Die Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies wurden von Estelle Perrier aus der gemeinsamen Arbeitsgruppe für neurale Regeneration durchgeführt.

Die verwendeten SOD1-EGFP-Konstrukte wurden von Dr. Albrecht Clement aus dem Institut für Pathobiochemie des Universitätsklinikums Mainz zur Verfügung gestellt.

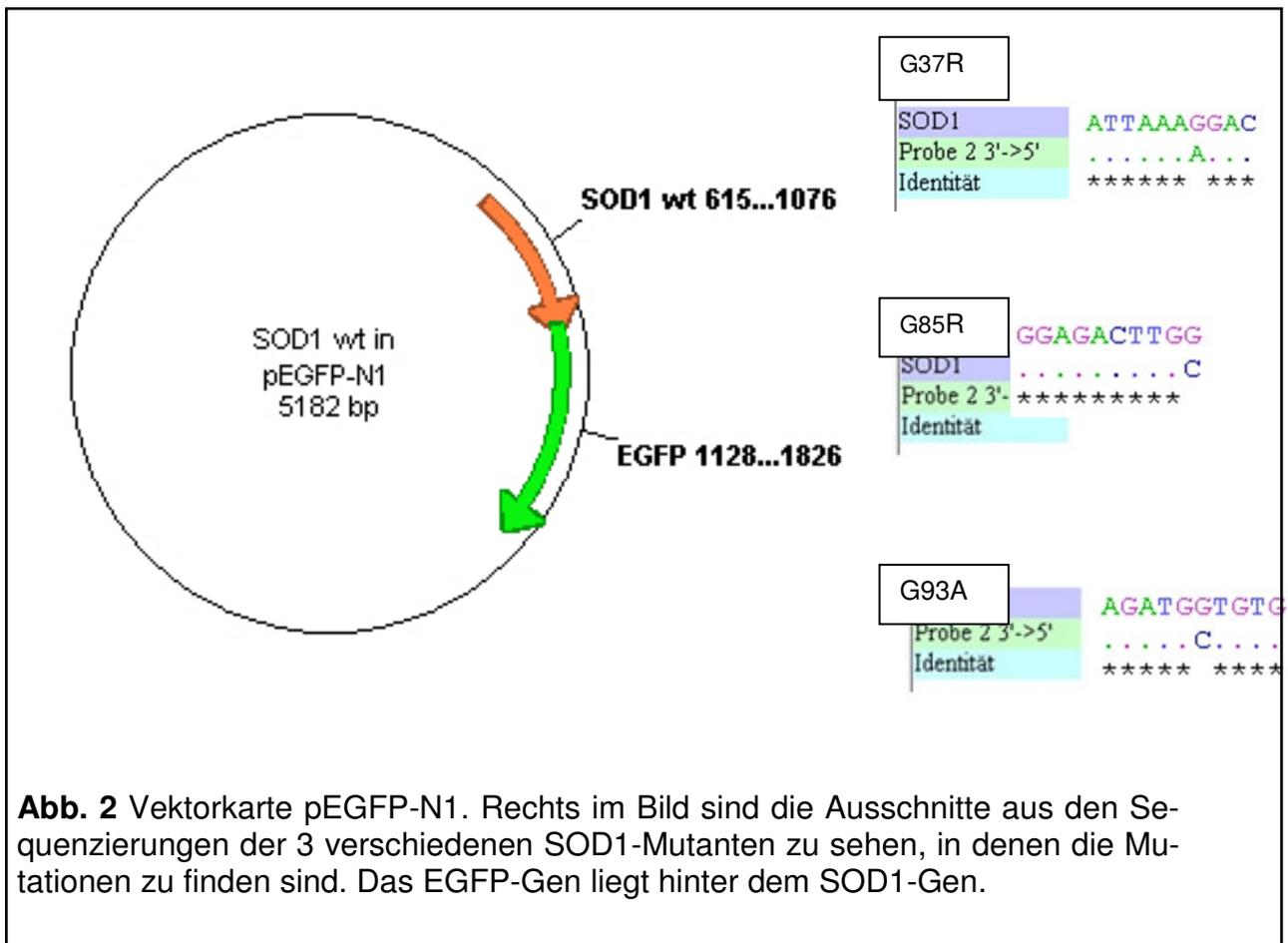
Die Messungen der mitochondrialen Aktivität wurden von Dr. Alexey Kudin aus der Abteilung für Neurochemie von Prof. Wolfram Kunz des Universitätsklinikum Bonn durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1 Molekularbiologische Arbeiten

6.1.1 Maxipräparation N1-Vektor

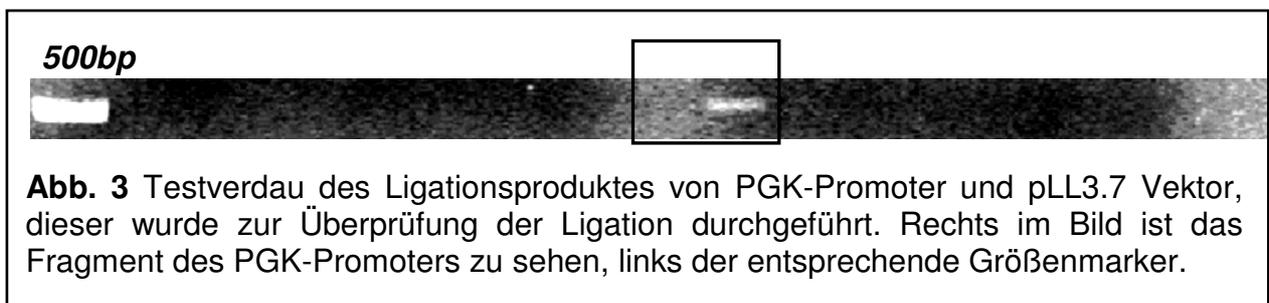
Die pEGFP-N1 Vektoren mit den verschiedenen SOD1-Varianten wurden mittels einer Maxipräparation vermehrt. Um auszuschließen, dass während der Maxipräparation Mutationen auftraten, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Der Abgleich erfolgte gegen die Sequenz des N1 SOD1 wt Vektors. Die in Abb. 2 dargestellten Diskrepanzen, angezeigt durch die jeweils abweichende Base, entsprechen den jeweiligen Mutationen innerhalb des SOD1-Gens. Bei der Mutation G37R ist das Codon GGA durch AGA ausgetauscht, was zum Austausch von Glycin durch Arginin führt. Bei der Mutation G85R steht statt GGC das Codon CGC, was ebenfalls den Austausch von Glycin durch Arginin bedingt. Bei der Mutation G93A wird GGT durch GCT ausgetauscht, was den Einbau von Alanin anstatt Glycin zur Folge hat.



6.1.2 Klonierung des PGK-Promoters in den pLL3.7-Vektor

Zur Expression der SOD1-EGFP Konstrukte in den Mikroglia wurde der PGK Promoter in den pLL3.7 Vektor kloniert. Dazu wurden dem PGK-Promoter mittels einer PCR die benötigten Restriktionsschnittstellen angefügt. Dies geschah unter Verwendung der Primer „For-PGK-XbaI“ und „Rev-PGK-NheI“. Die Konzentration des PGK-Promoters nach PCR, Verdau und Gelextraktion betrug 28 ng/μl. Anschließend wurde der PGK-Promoter unter Verwendung der eingefügten Restriktions-Schnittstellen in den Vektor pLL3.7 kloniert.

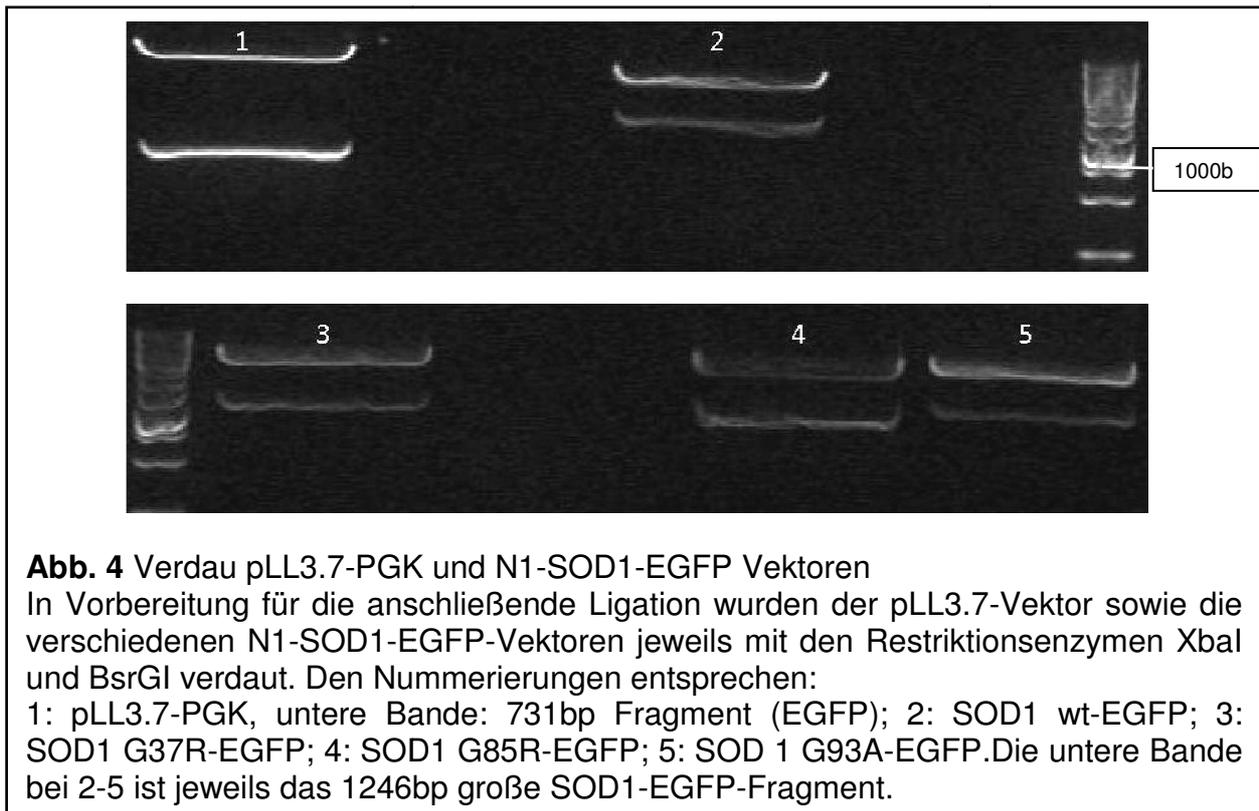
Die DNA-Konzentration des Ligationproduktes (pLL3.7-PGK) nach Minipräparation in kompetenten *E. Coli* betrug 53 ng/μl. Anschließend wurde ein Testverdau mit denselben Restriktionsenzymen durchgeführt, um das Insert (den PGK-Promoter) nachzuweisen.



In der Abb. 3 ist auf Höhe der 500 bp-Marker DNA eine schwache Bande zu erkennen, die dem PKG-Promoter entspricht. Anschließend wurde das Ligationprodukt sequenziert, um Mutationen auszuschließen. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte korrekte Basensequenzen für den pLL3.7 Vektor mit PGK-Promoter inklusive der Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI (TCTAGA).

6.1.3 Klonierung der SOD1-Mutanten in den pLL3.7-Vektor

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen SOD1-EGFP Konstrukte in den pLL3.7-Vektor kloniert. Dazu wurden die Restriktionsenzyme XbaI und BsrGI verwendet.



Der pLL3.7 Vektor enthielt bereits ein EGFP-Gen, welches bei diesem Klonierungsschritt mit ausgeschnitten wurde. Die Fragmente in Abb. 4 bei ca. 1200 bp (im Bild die unteren Fragmente der Banden 2-5) wurden unter der UV-Lampe ausgeschnitten und mit dem MiniElute Gel Extraction Kit aufgereinigt. Nach der Ligation zwischen den SOD1-EGFP Genen und dem pLL3.7-PGK Konstrukt wurden mit dem Nanodrop Photometer folgende DNA-Konzentrationen der Ligationsprodukte gemessen:

Konstrukt	Konzentration [ng/μl]
SOD1 wt-EGFP 1	233,4
SOD1 wt- EGFP 2	90,1
SOD1 G37R- EGFP 1	176,9
SOD1 G37R- EGFP 2	341,5
SOD1 G37R- EGFP 3	152,6
SOD1 G37R- EGFP 4	265,8
SOD1 G85R- EGFP 1	277,3
SOD1 G85R- EGFP 2	357,9
SOD1 G85R- EGFP 3	326,5
SOD1 G93A- EGFP 1	221,9
SOD1 G93A- EGFP 2	94,6

Tab. 6 DNA Konzentrationen der Ligationsprodukte, gemessen mit dem Nanodrop-Photometer.

Zum Testverdau wurden je 1 μg DNA eingesetzt.

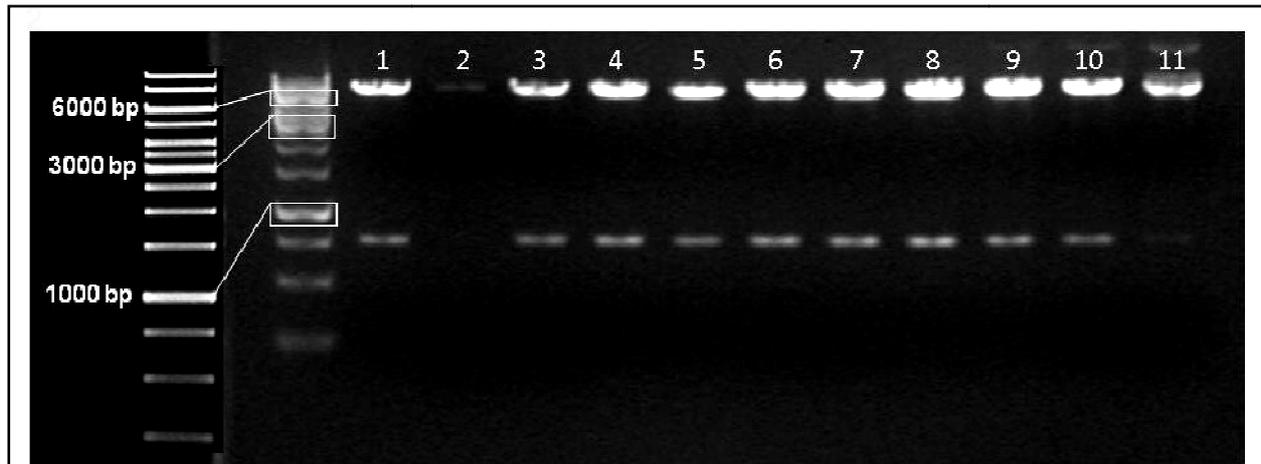


Abb. 5 Testverdau der pLL3.7 PGK-SOD1-EGFP Vektoren.

1,2: SOD1 wt; **3,4,5,6:** SOD1 G37R; **7,8,9:** SOD1 G85R; **10, 11:** SOD1 G93A

Für den Testverdau wurde das Restriktionsenzym EcoRI verwendet, das an 2 Schnittstellen innerhalb des SOD1-EGFP Gens schneidet, so dass bei erfolgreicher Ligation ein 770 bp großes Fragment ausgeschnitten werden sollte, dass in allen Probe bis auf Nummer 2 zu erkennen ist.

Zu dem in Abb. 5 dargestelltem Testverdau wurde das Restriktionsenzym EcoRI verwendet, welches an 2 Schnittstellen innerhalb des SOD1-EGFP Konstrukts schneidet. In allen Proben bis auf Nummer 2 lässt sich eine Bande unterhalb des 1000bp Markers erkennen, welche den ausgeschnittenen 770 bp großen Fragmenten entspricht. Die korrekte Basenfolge der Ligationsprodukte wurde in einer Sequenzierung bestätigt. Nach der Sequenzierung wurde eine Maxipräparation zur Vermehrung der DNA angesetzt, die gemessenen DNA-Konzentrationen betragen:

Konstrukt	DNA-Konzentration [ng/ μl]
pLL3.7-PGK-SOD1 wt	4326,5
pLL3.7-PGK-SOD1 G37R	2524
pLL3.7-PGK-SOD1 G85R	3403,7
pLL3.7-PGK-SOD1 G93A	3806,4

Tab. 7 DNA Konzentrationen nach Maxipräparation

Die korrekte Basenfolge der Maxipräparationsprodukte wurde ebenfalls per Sequenzierung bestätigt.

6.2 Transduktion der iPSdM mit Lentiviren

Um eine langanhaltende Expression der SOD1-EGFP Konstrukte in den iPSdM zu gewährleisten wurde die Expression mittels lentiviraler Vektoren gewählt. Die iPSdM der Passage 13 wurden bei einer Konfluenz von 50-60 % mit frischem virushaltigen Überstand von HEK293FT Zellen transduziert. Um ausreichend hohe Transduktionsraten zu erreichen, wurden die Mikroglia insgesamt 4x transduziert- nach einer einmaligen Transduktion war das Exprimierung des Fusionsproteins nicht stark genug für eine durchflusszytometrische Sortierung. Zwischen den einzelnen Transduktionen wurden jeweils 5-7 Tage Abstand eingehalten, da die Zellen für diesen Zeitraum nicht erneut für die Viren empfänglich sind. Der Transduktionserfolg konnte anhand des EGFP-Signals kontrolliert werden. Es wurden Aufnahmen im Phasenkontrastmikroskop unter Verwendung einer UV-Lampe durchgeführt (Abb. 6 und 7). Abgebildet sind iPSdM nach der ersten Transduktion.

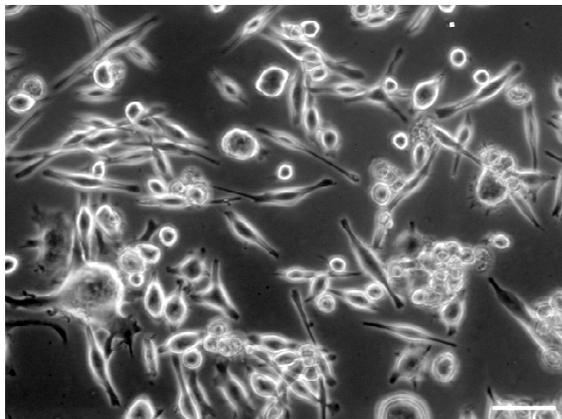


Abb. 6 iPSdM SOD1 wt, Durchlicht. Zu erkennen sind Mikroglia verschiedener Größe und Morphologie

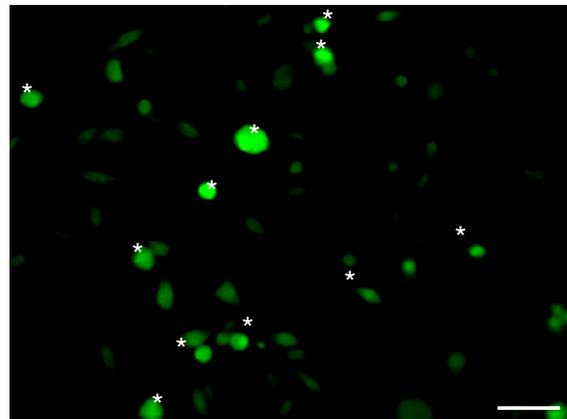


Abb. 7 iPSdM SOD1 wt, das gleiche Bild im EGFP-Kanal aufgenommen. Es handelt sich hier um einfach transduzierte Zellen, die noch nicht durchflusszytometrisch sortiert wurden. Die mit „*“ gekennzeichneten Zellen sind als EGFP-positiv anzunehmen.

Maßstab = 50µm

Da die iPScM eine hohe Autofluoreszenz im grünen Spektrum aufweisen, sind bei diesen noch nicht sortierten Zellen wahrscheinlich nur die mit „*“ markierten Zellen als transduziert anzunehmen. Diese Zellen weisen zudem die für eine Aktivierung typische Abrundung auf, was als Reaktion auf die vorher stattgehabte Transduktion mit Lentiviren gewertet werden kann.

6.3 Durchflusszytometrische Sortierung der transduzierten Zellen

Um eine reine Zellpopulation zu erhalten wurden die Mikroglia durchflusszytometrisch anhand des EGFP-Signals sortiert. Da bei dieser Prozedur ein hoher Zellverlust auftritt, wurden je Zellreihe 5 x 15 cm große Zellkulturschalen, die zu über 90% konfluent waren verwendet.

Als Negativkontrolle wurden untransduzierte iPScM verwendet, als Positivkontrolle dienten iPScM, die mit einem pLL3.7-PGK-EGFP-Vektor transduziert worden sind. Angesichts der erwähnten Autofluoreszenz, wurde das Gate relativ streng gewählt. Die Population „P5“ wurde dabei als EGFP-positiv definiert (Abb. 11-16).

Zunächst wurden die Zellen lediglich zweimal mit den Lentiviren transduziert, danach ergaben sich nur sehr geringe Raten an EGFP positiven Zellen. Bei dem ersten Versuch wurde auch keine Positivkontrolle verwendet (Abb. 8).

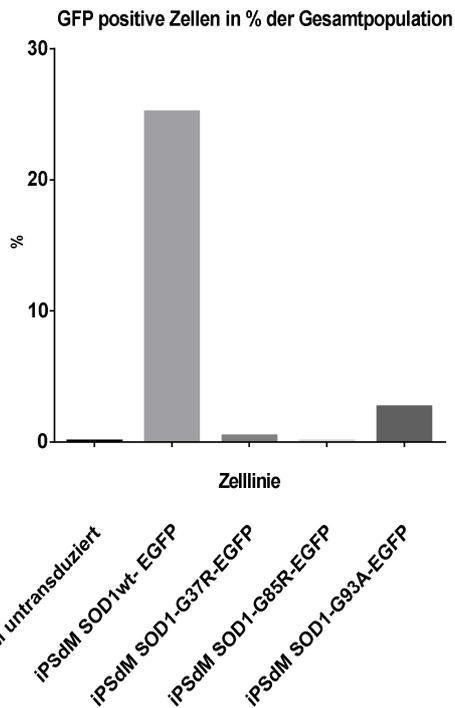


Abb. 8 Sortierung nach 2x Transduktion (21./22.06.10) Nur bei Zellen der Linien SOD1 wt-EGFP sowie SOD1-G93A-EGFP lässt sich ein nennenswerter Transduktionserfolg verzeichnen. Die untransduzierten iPScDM dienen als Negativkontrolle.

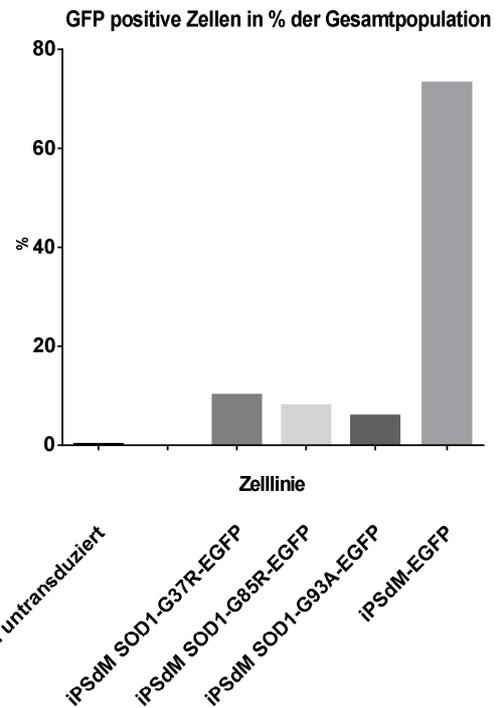


Abb. 9 Sortierung nach 3x Transduktion (16./18.07.10). Hier wurden die Zellen der SOD1 wt Linie nicht mit sortiert, die übrigen Linien zeigen einen größeren Transduktionserfolg als bei nur einfacher Transduktion.

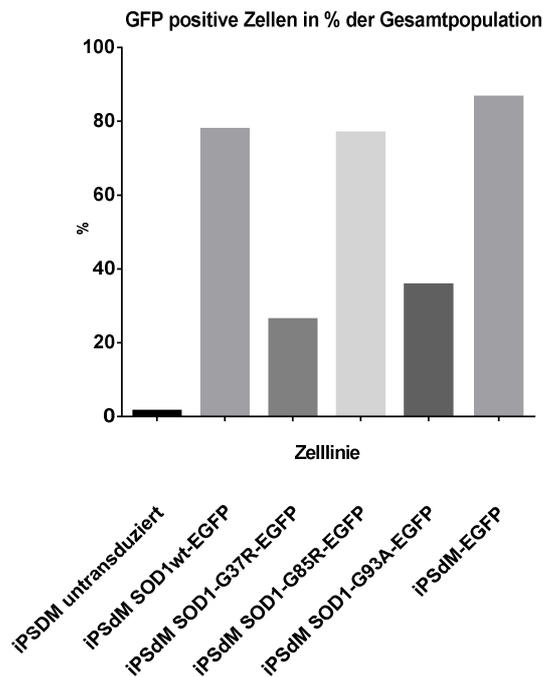


Abb. 10 Sortierung nach 4x Transduktion (13.09.10). Es zeigte sich bei allen Linien eine ausreichend hohe Menge an EGFP-positiven Zellen.

Es zeigte sich, dass nur die Transduktion mit den SOD1 wt-EGFP Vektoren erfolgreich war- einen minimalen Transduktionserfolg sieht man noch bei der Linie SOD1-G93A-EGFP (Abb. 8).

Aufgrund dessen wurden die iPSdM vor der nächsten Sortierung dreimal transduziert, in der Absicht, höhere Raten an EGFP positiven Zellen zu erhalten; die Zellen der Linie SOD1 wt- EGFP wurden hier nicht sortiert. Als Positivkontrolle wurden iPSdM, die nur mit dem pLL3.7 EGFP Vektor transduziert wurden, verwendet. In dieser Linie waren, obwohl nur einmal transduziert, sehr viele Zellen EGFP positiv in der Sortierung (Abb. 9). Um noch höhere Transduktionsraten zu erzielen wurde ein weiterer Versuch unternommen und die iPSdM insgesamt viermal transduziert (Abb. 10). Diesmal wurden auch wieder Zellen der Linie SOD1 wt-EGFP sortiert, sodass für die anschließenden funktionellen Analysen Zellen mit einer vergleichbaren Last an

transgenen SOD1-EGFP-Fusionsproteinen zur Verfügung standen. Die Zellen lagen nach der Sortierung in folgenden Zelldichten vor:

SOD1-wt-EGFP: 1,3 Millionen auf eine 10 cm Schale (16.560 Zellen/ cm²)

SOD1-G37R-EGFP I: 148.000 auf eine 3,5 cm Schale (16.444 Zellen/ cm²)

SOD1-G37R-EGFP II: 150.000 auf eine 3,5 cm Schale (16.666 Zellen/ cm²)

SOD1-G85R-EGFP: 500.000 auf eine 10 cm Schale (6369 Zellen/ cm²)

SOD1-G93A-EGFP I: 420.000 auf eine 10 cm Schale (5350 Zellen/ cm²)

SOD1-G93A-EGFP II: 189.000 auf eine 6 cm Schale (6687 Zellen/ cm²)

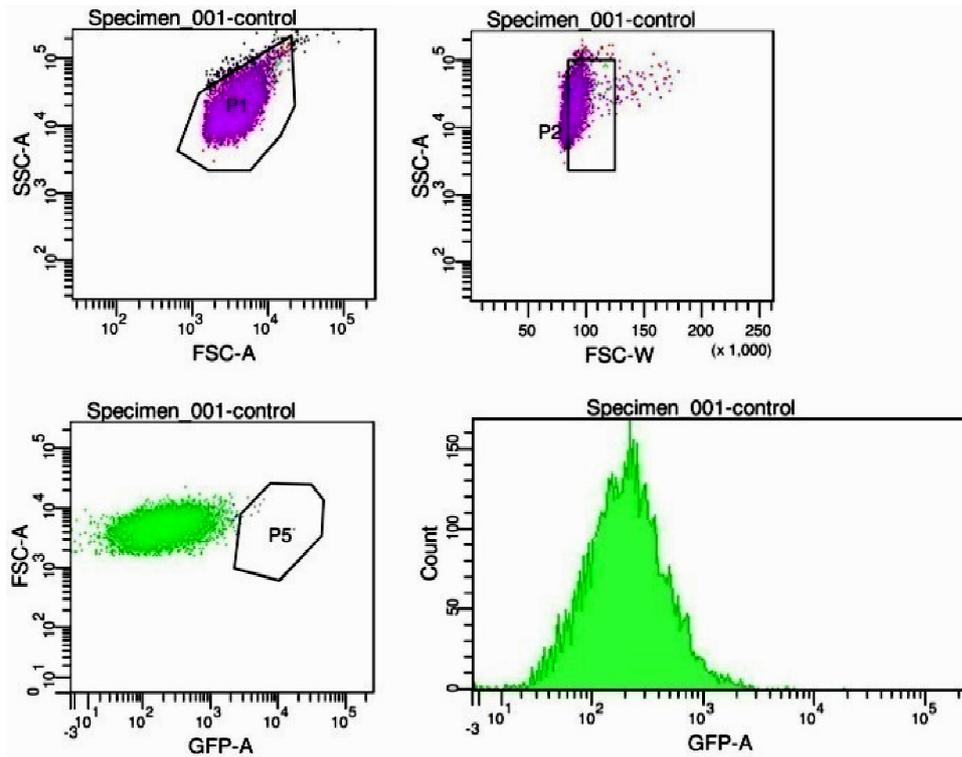


Abb. 11 iPSdM untransduziert als Negativkontrolle, keine EGFP-positiven Zellen

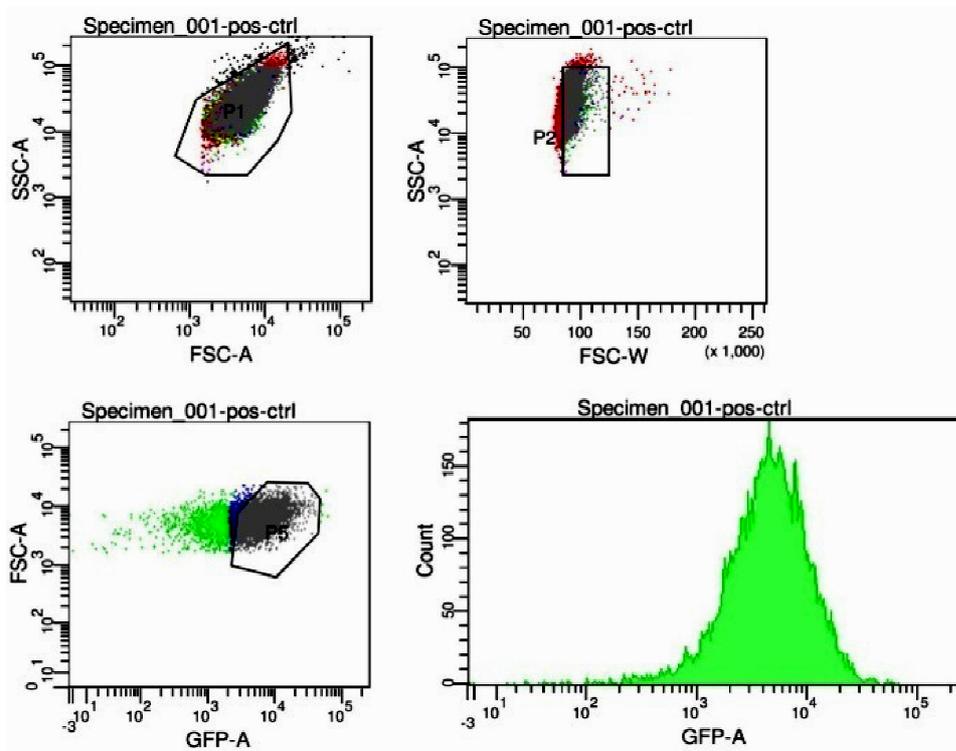


Abb. 12 iPSdM pLL3.7-EGFP vierfach transduziert, Positivkontrolle, die Population „P5“ wird als EGFP-positiv definiert

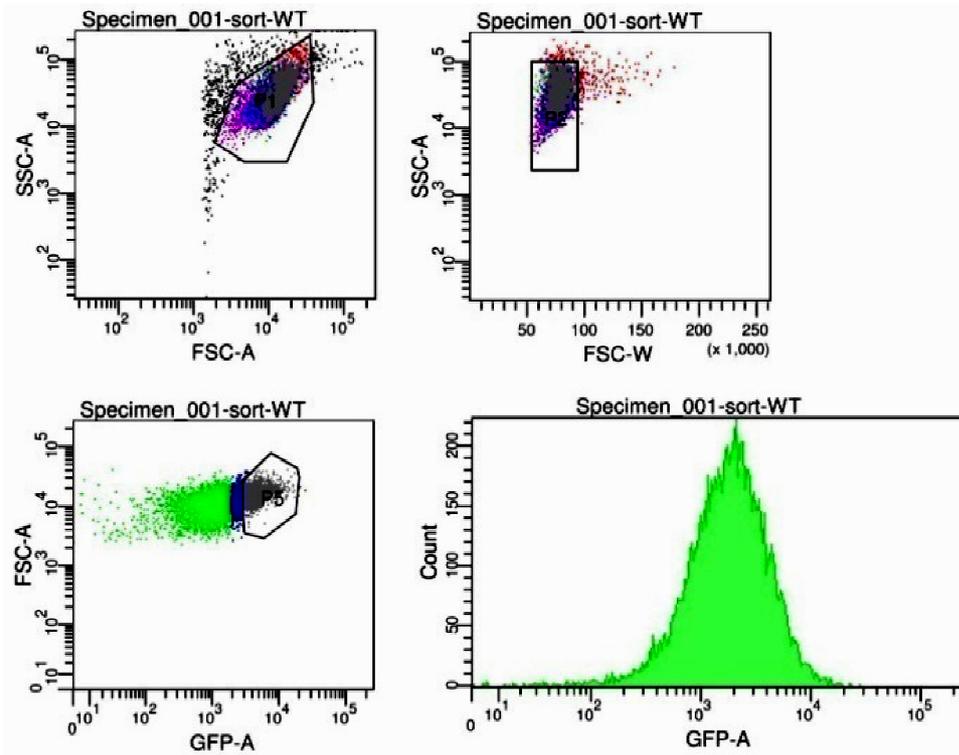


Abb. 13 iPSdM SOD1-wt-EGFP vierfach transduziert

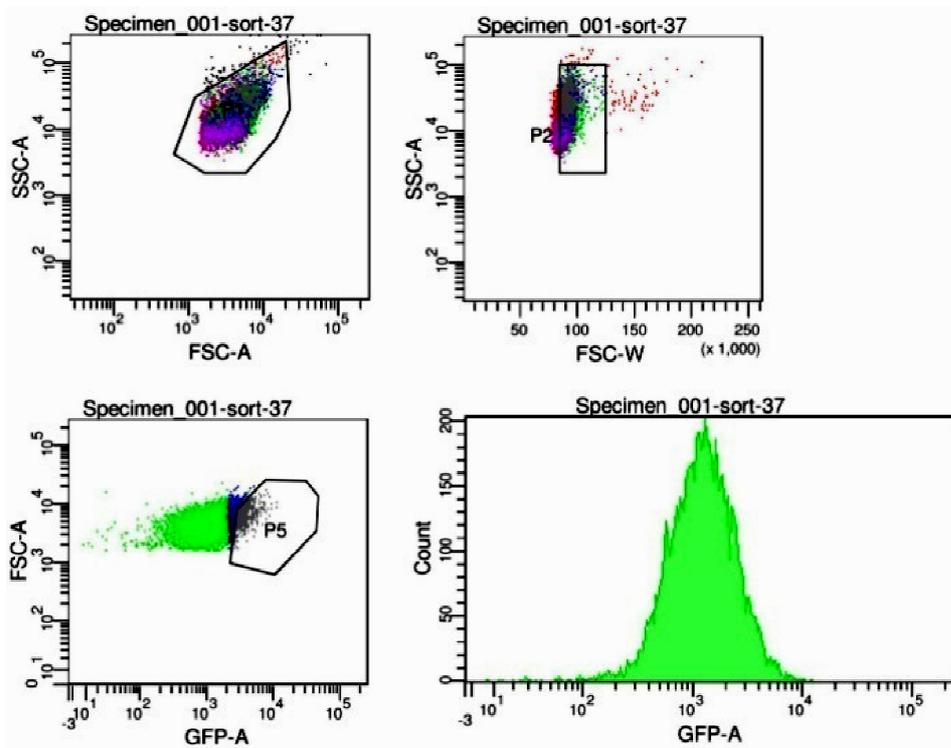


Abb. 14 iPSdM SOD1-G37R-EGFP vierfach transduziert

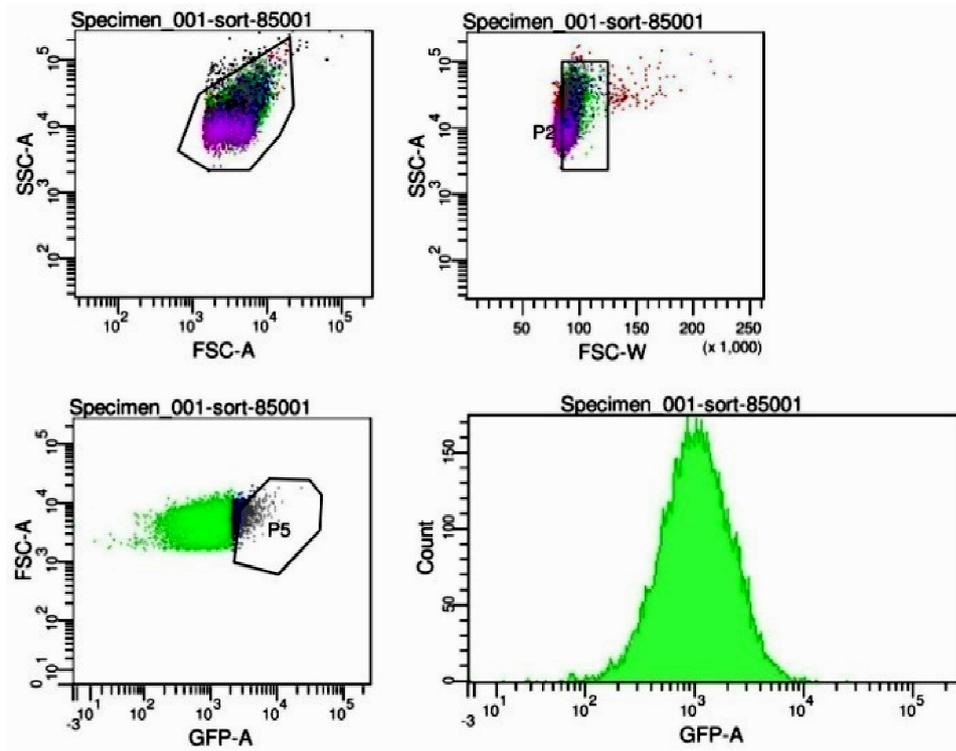


Abb. 15 iPSdM SOD1-G85R-EGFP vierfach transduziert

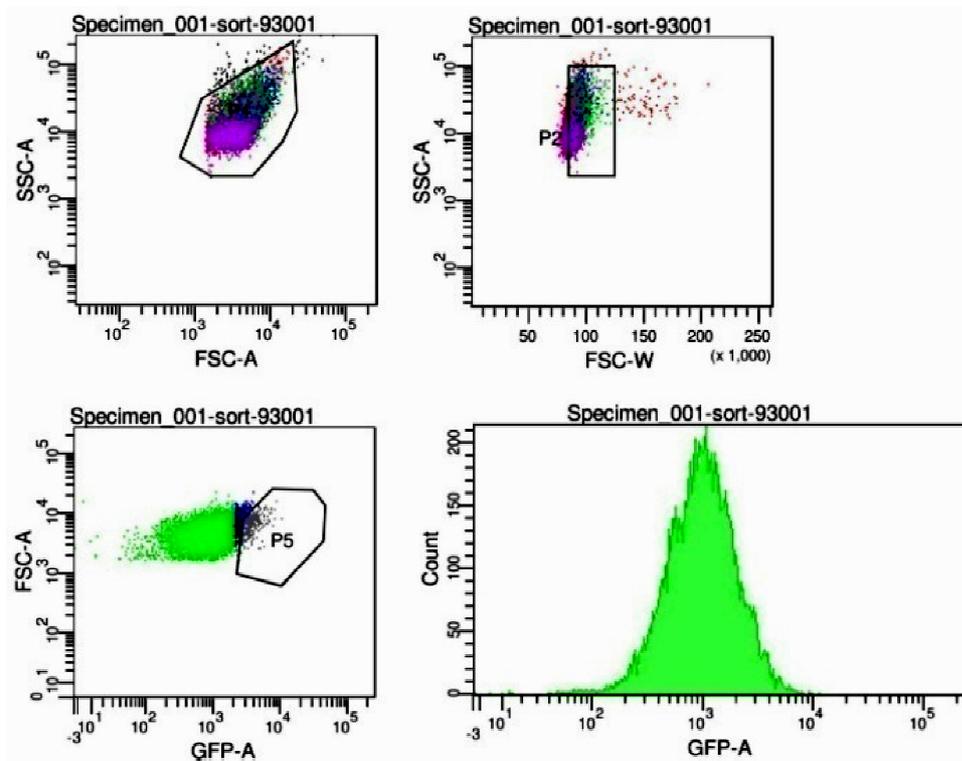


Abb. 16 iPSdM SOD1-G93A-EGFP vierfach transduziert

Die Abbildungen 11-16 zeigen die Graphen der Sortierung der vierfach transduzierten Zellen.

Im Anschluss an die Sortierung wurden die Zellen weiterkultiviert und eingefroren. Da der Sortierungsprozess Stress für die Zellen bedeutet und sie währenddessen einem erhöhtem Kontaminationsrisiko ausgesetzt waren, wurden die Mikroglia für einige Tage mit Zusatz von GM-CSF sowie einer erhöhten Antibiotika-Konzentration (Penicillin-Streptomycin) kultiviert.

6.4 Immunozytochemische Färbungen, confocales Mikroskop

Zum Nachweis von SOD1 wurden die iPScM mit einem Antikörper angefärbt, der sowohl humanes SOD1 wt, als auch die verwendeten SOD1 Mutanten erkennt.

Die iPScM wurden mit einem SOD1-EGFP Fusionsgen transduziert, das zur Expression eines entsprechenden Fusionsproteins führt. Das SOD1-EGFP-Fusionsprotein ist genau wie das native SOD1 in der Lage zu dimerisieren und auch katalytisch aktiv (Zhang und Zhu 2006), (Witan et al. 2008). Zum Nachweis von intrazellulärem SOD1 wurde das EGFP-Signal aufgenommen.

Der Antikörper färbt sowohl natives SOD1 (Abb.17, untransduzierte Zellen), als auch das SOD1 im Fusionsprotein an (Abb. 19 und 28). Als Gegenfärbung diente ein Antikörper gegen das Protein Iba1 (Abb. 18, 22 und 25). Iba1 ist ein spezifischer Makrophagenmarker, im ZNS ist dieses Protein spezifisch für Mikroglia. In den "merge" Bildern ist erkennbar, dass sich die Signale für SOD1 und EGFP decken (Abb. 21 und 30), während die Signale von Iba1 und EGFP nicht deckungsgleich sind (Abb. 24 und 27). Zu erkennen ist, dass im Bereich der Zellkerne schwächere Signale in allen Färbungen zu sehen sind. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt, dies lässt sich im confocalen Mikroskop betrachten, jedoch nicht auf den Fotos mit abspeichern.

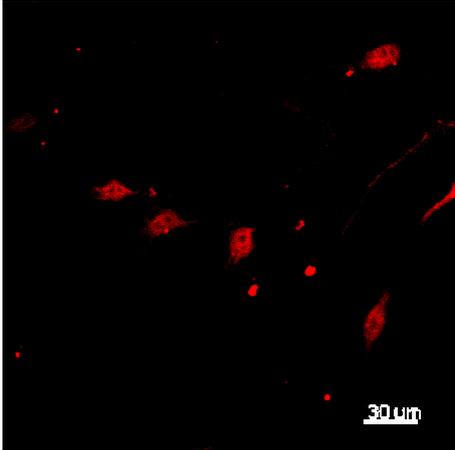


Abb. 17 iPScM untransduziert, anti-SOD1, dargestellt ist natives SOD1, welches ubiquitär exprimiert wird.

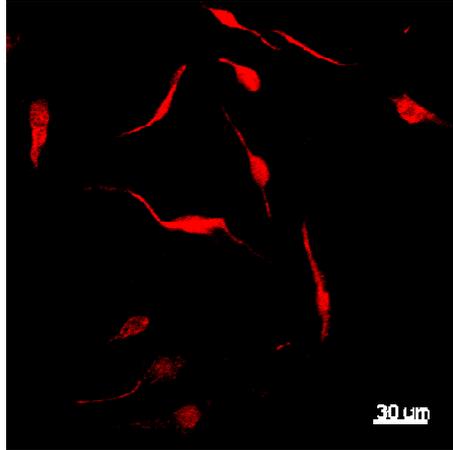


Abb. 18 iPScM untransduziert, anti-Iba1, verwendet als Makrophagenspezifischer Marker.

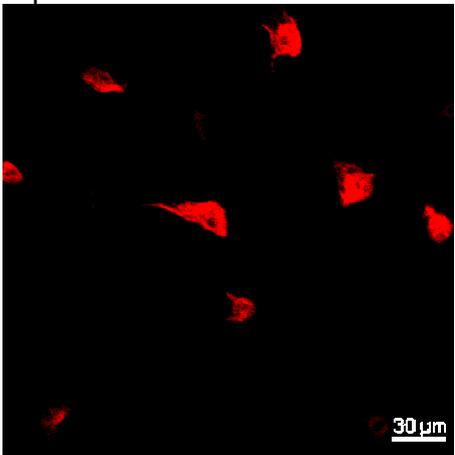


Abb. 19 iPScM SOD1 G85R, anti SOD1, natives und transgenes mSOD1 sind dargestellt.

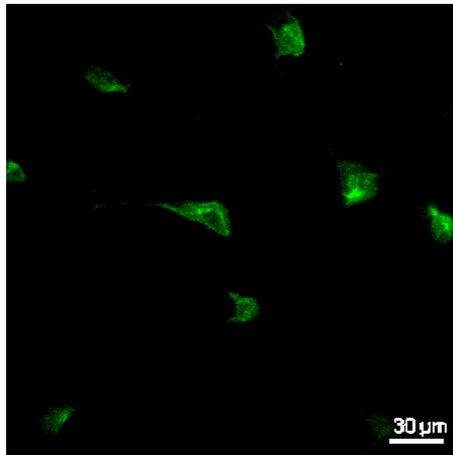


Abb. 20 iPScM SOD1 G85R, EGFP-Signal, alle sortierten Zellen zeigen eine gleichmäßige EGFP Expression.

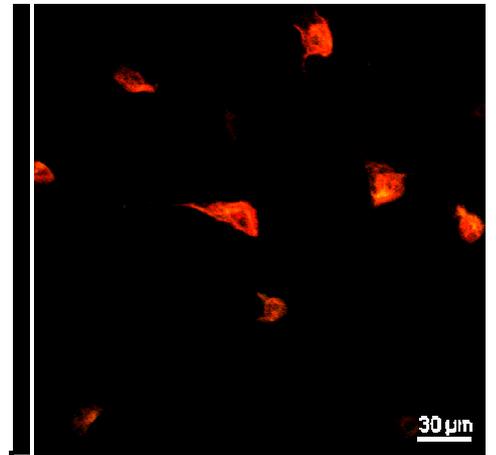


Abb. 21 iPScM SOD1 G85R, anti SOD1 EGFP merge. Aufgrund der Kopplung beider Proteine sind beide Signale räumlich deckungsgleich.

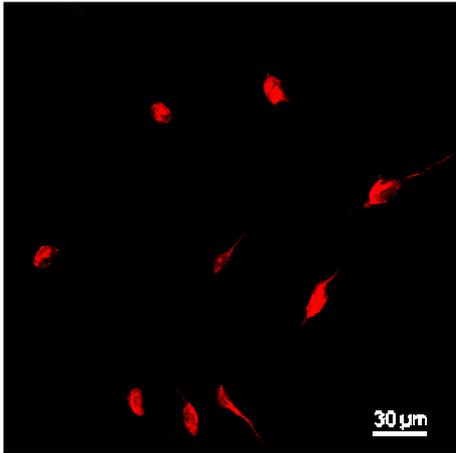


Abb. 22 iPSdM SOD1 G85R, in rot angefärbt ist der mikrogliale Marker anti Iba1.

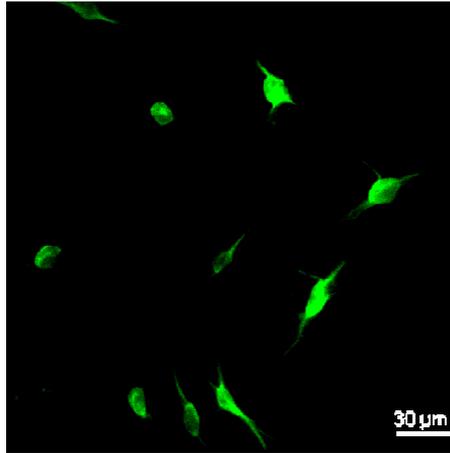


Abb. 23 iPSdM SOD1 G85R, EGFP-Signal.

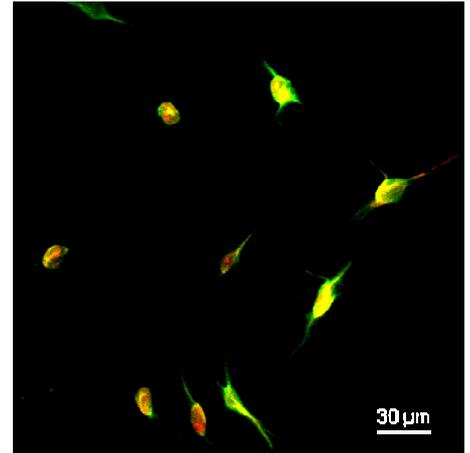


Abb. 24 iPSdM SOD1 G85R, anti Iba1 (rot), EGFP (grün) merge. Aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Verteilung in der Zelle sind die Signale von Iba1 und EGFP nicht deckungsgleich.

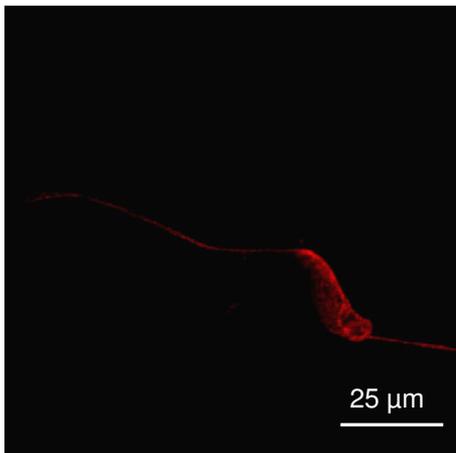


Abb. 25 iPSdM wt, anti Iba1

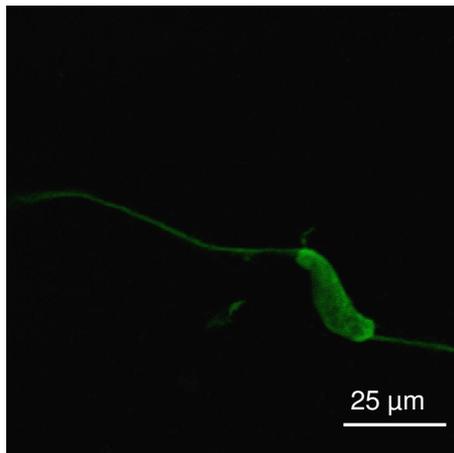


Abb. 26 iPSdM wt EGFP- Signal

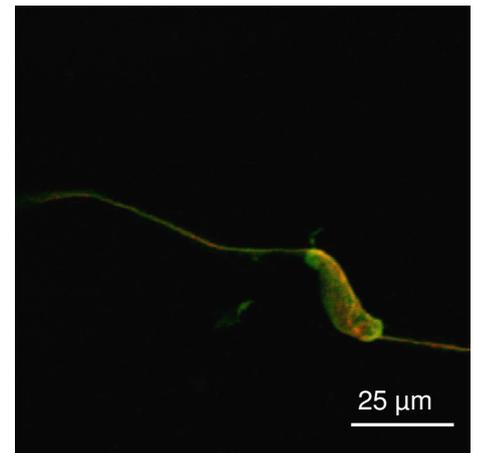


Abb. 27 iPSdM wt, Iba1 (rot), EGFP (grün) merge. In der höheren Vergrößerung sieht man, dass Iba1 und EGFP auch in den Zellausläufern vorkommen, wieder ist eine inhomogene Verteilung zu erkennen.

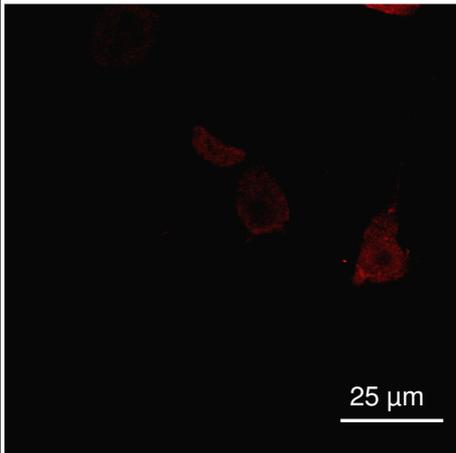


Abb. 28 iPSdM wt, anti SOD1

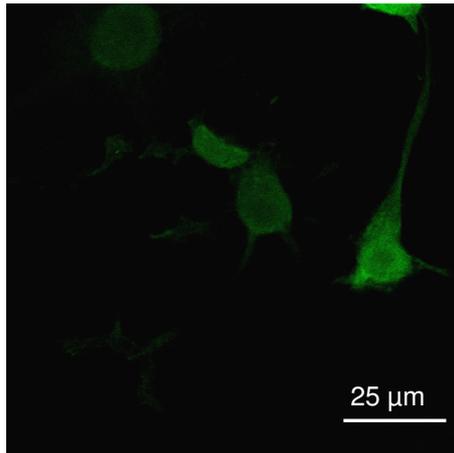


Abb. 29 iPSdM wt, EGFP Signal

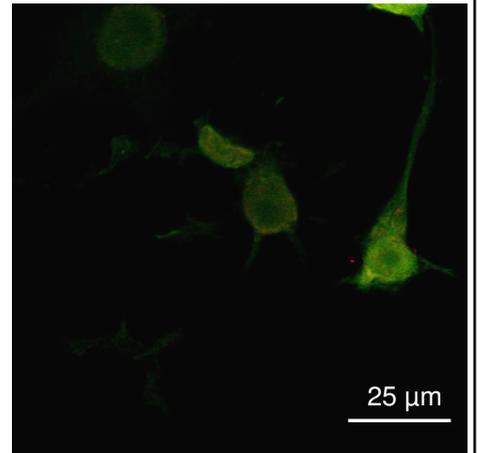


Abb. 30 iPSdM wt, SOD1 (rot), EGFP (grün) merge.

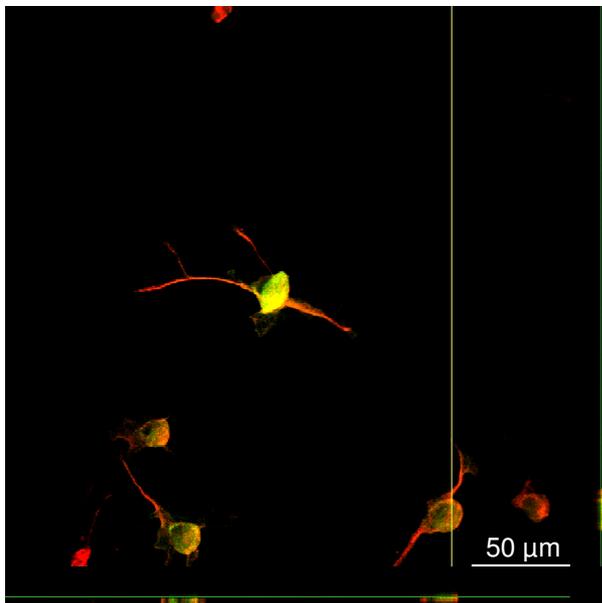


Abb. 31 iPSdM SOD1 wt. Iba1 (rot), EGFP (grün) merge. Die jeweils am rechten und unteren Bildrand gelegenen Ausschnitte zeigen eine Aufsicht auf die Zellen entlang der zugehörigen, gelb dargestellten Achse durch die Zelle.

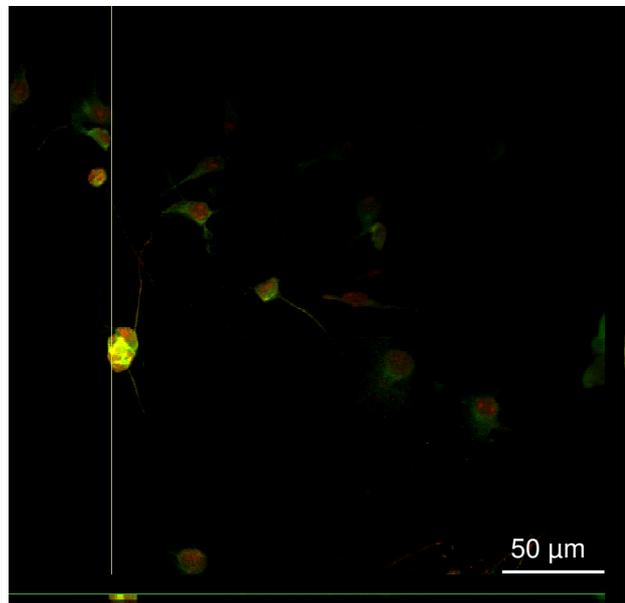


Abb. 32 iPSdM SOD1 G85R Iba1 (rot), EGFP (grün) merge

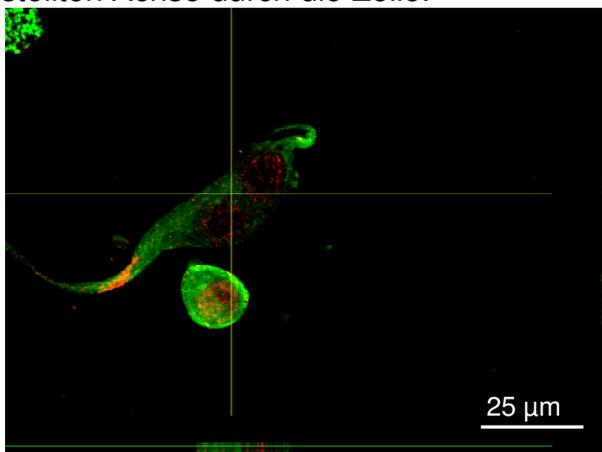


Abb. 33 iPSdM SOD1 G93A. Iba1 (rot), EGFP (grün) merge

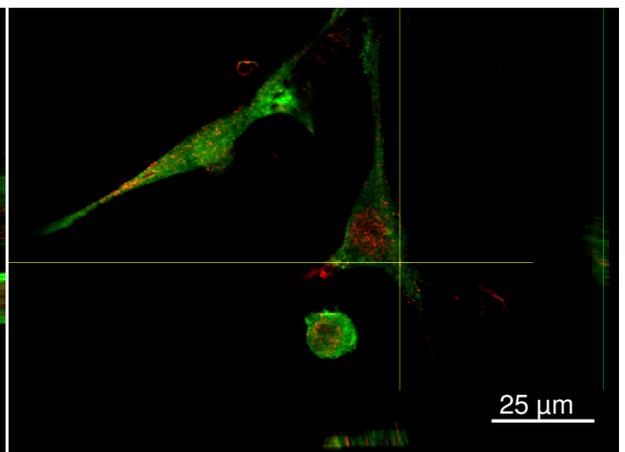


Abb. 34 iPSdM SOD1 G37R. Iba1 (rot), EGFP (grün) merge

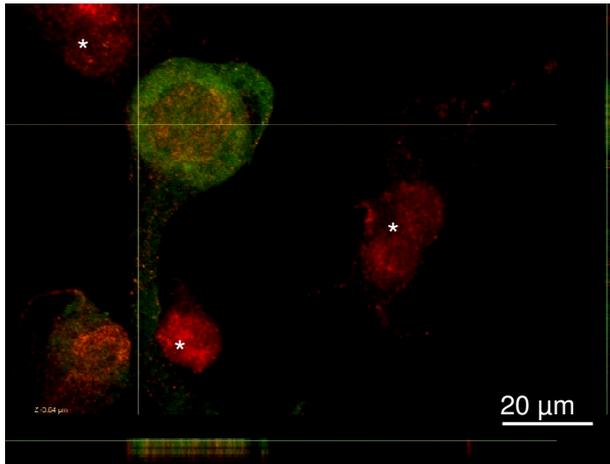


Abb. 35 iPSdM EGFP-Kontrolle. Iba1 (rot), EGFP (grün) merge. Die mit "*" gekennzeichneten Zellen exprimieren kein EGFP.

6.4.1 Colokalisation von Iba1 und EGFP-SOD1

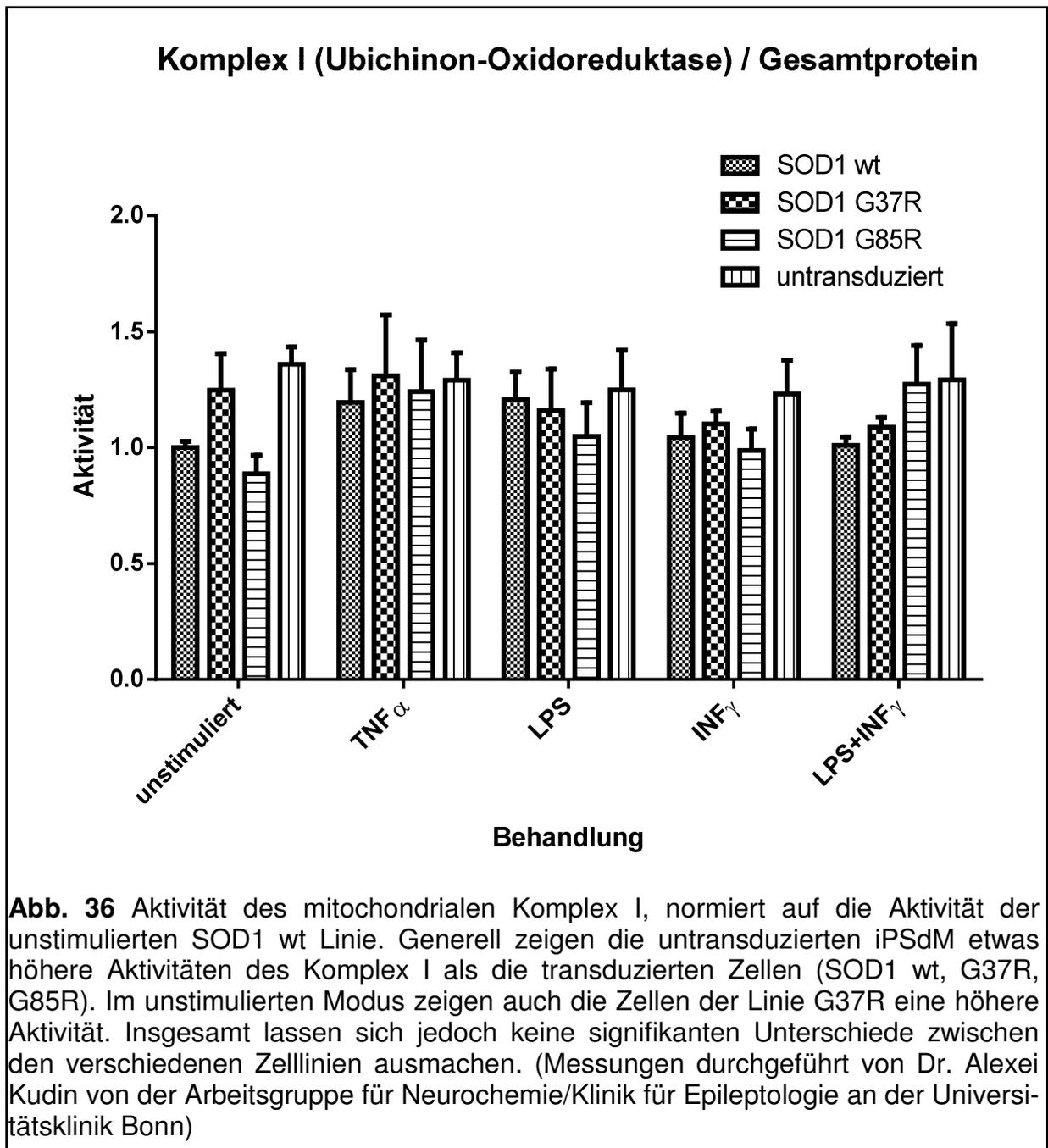
Um das SOD1-EGFP Fusionsprotein intrazellulär zu lokalisieren wurden Mehrschicht-Aufnahmen mit dem confocalen Mikroskop angefertigt. Die Gegenfärbung der Zellen erfolgte mit Iba1 (rot). Die gezeigten Abbildungen (31-35) sind Aufnahmen entlang der Z-Achse, die übereinander gelegt wurden. Auf Abb. 35 sind unsortierte iPSdM zu sehen, die als Kontrolle nur mit dem pLL3.7-PGK-EGFP Vektor transduziert wurden. Da die nicht-sortierten Zellen keine reine Population darstellen, zeigen 3 Zellen (*) auf der Abb. 35 kein EGFP-Signal.

6.5 Messung der mitochondrialen Aktivität

Die Messung der mitochondrialen Aktivität wurde an unstimulierten und an mit verschiedenen Substanzen stimulierten iPSdM gemessen. TNF α stimuliert in Mikroglia die NADPH-Oxidase, die das Sauerstoffradikal NO \cdot produziert. Mikroglia sind die Hauptquelle des Zytokins TNF α im ZNS und zugleich einer seiner Wirkorte. LPS, aus der Zellwand gram-negativer Bakterien bindet in Mikroglia an TLR4 und CD14, was via NF κ B zur Exkretion von TNF α und IL1 β führt. INF γ ist ein von TH1 Zellen (Subpopulation der CD4 $^{+}$ T-Zellen) gebildetes Glykoprotein und fördert in Makrophagen

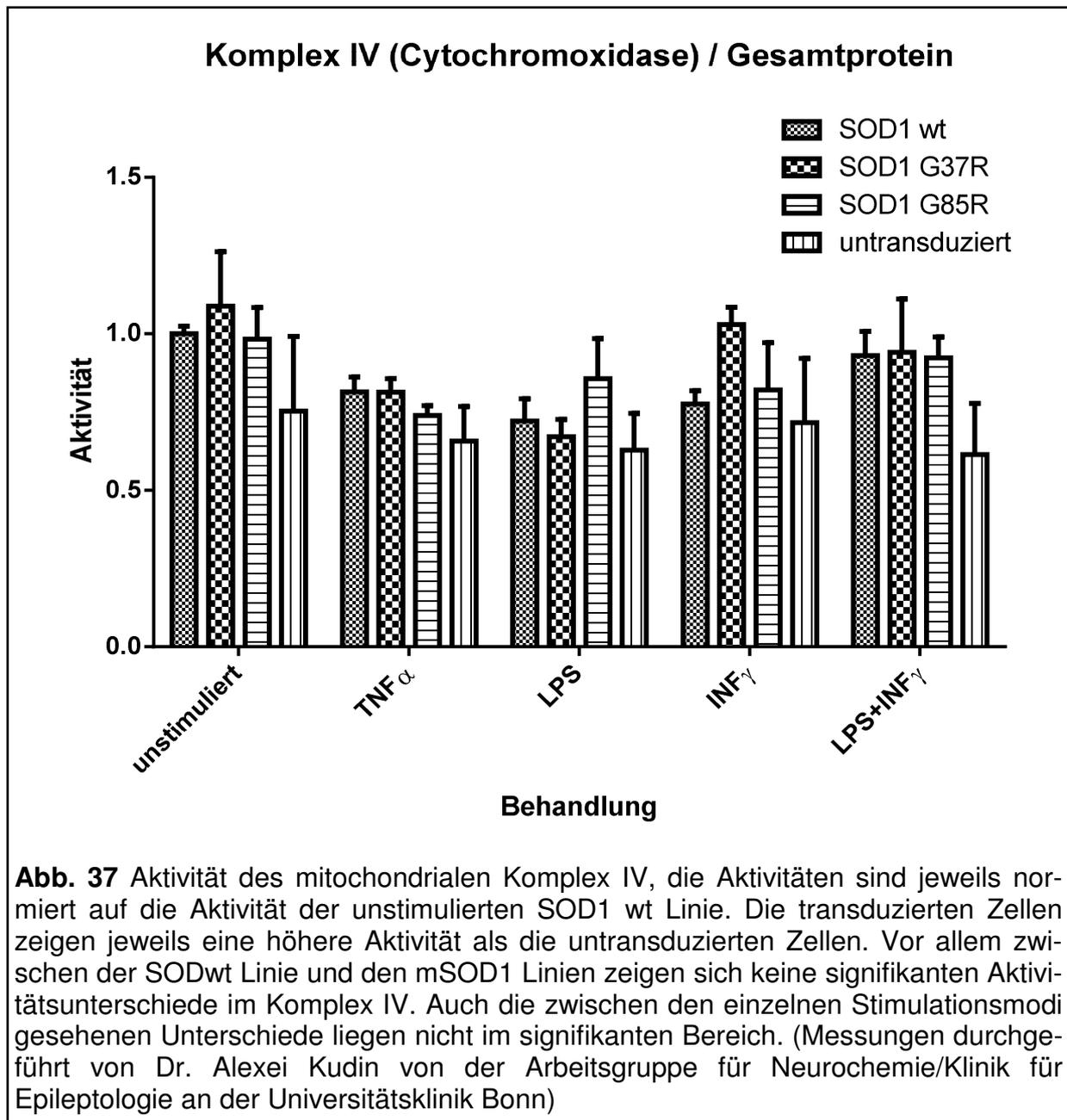
wie Mikroglia die Verschmelzung von Phagosomen mit Lysosomen und steigert die NO Produktion.

Die enzymatische Aktivitätsmessung der mitochondrialen Atmungskette wurde von Dr. Alexey Kudin von der Arbeitsgruppe von Professor Kunz an der Klinik für Epileptologie, Universität Bonn durchgeführt. Es wurden die Aktivität der Komplexe I und IV aus der mitochondrialen Atmungskette gemessen sowie die Aktivität der Citratsynthase, einem mitochondrialen Enzym, das nicht zur Atmungskette gehört. Vor der Stimulation der Zellen wurde jeweils eine definierte Menge der Zellen ausgesät. Um die gemessenen Aktivitäten zu normieren wurde zusätzlich der Gesamtproteingehalt der Zellpellets bestimmt und die Aktivitäten auf die Gesamtproteinmenge bezogen berechnet. Die Aktivitäten/ Gesamtprotein wurden jeweils normiert auf den Wert SOD1 wt unstimuliert.



Der mitochondriale Komplex I stellt den ersten Schritt im Elektronentransport der Atmungskette dar. Er katalysiert die Reduktion von Ubichinon zu Ubihydrochinon, wobei das Coenzym NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. In Abb. 36 erkennt man, dass die untransduzierten iPSdM in drei der Ansätze (unstimuliert, INF γ stimuliert, LPS + INF γ stimuliert) eine höhere Komplex I Aktivität aufweisen als die mit SOD1 wt transduzierten Zellen. Dies gilt jedoch auch für die SOD1 G37R überexprimierenden Zellen im unstimulierten Ansatz sowie für die Linie SOD1 G85R im Ansatz LPS+INF γ . Die genannten Unterschiede sind allerdings nicht signifikant. Insgesamt lassen

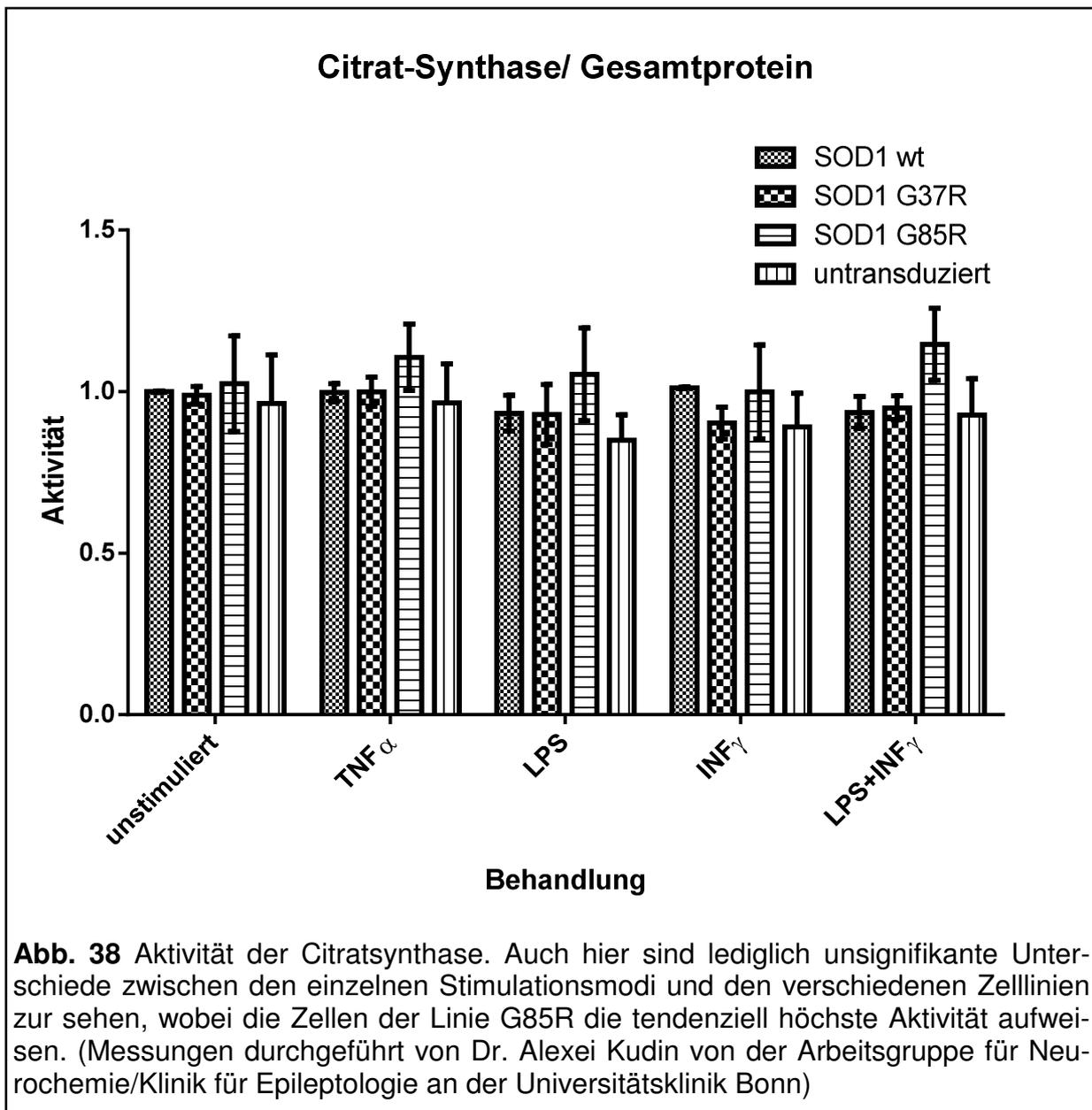
sich keine klaren Unterschiede zum einen zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen und zum anderen zwischen untransduzierten, mit SOD1 wt transduzierten und mit den SOD1 Mutanten transduzierten Zellen erkennen.



Der mitochondriale Komplex IV katalysiert den letzten Schritt der Atmungskette, mit dessen Hilfe ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut wird. Hier weisen die Zellen nach TNF α Behandlung im Schnitt die niedrigste Aktivität auf, die höchsten Aktivitäten sind bei den unstimulierten Zellen zu verzeich-

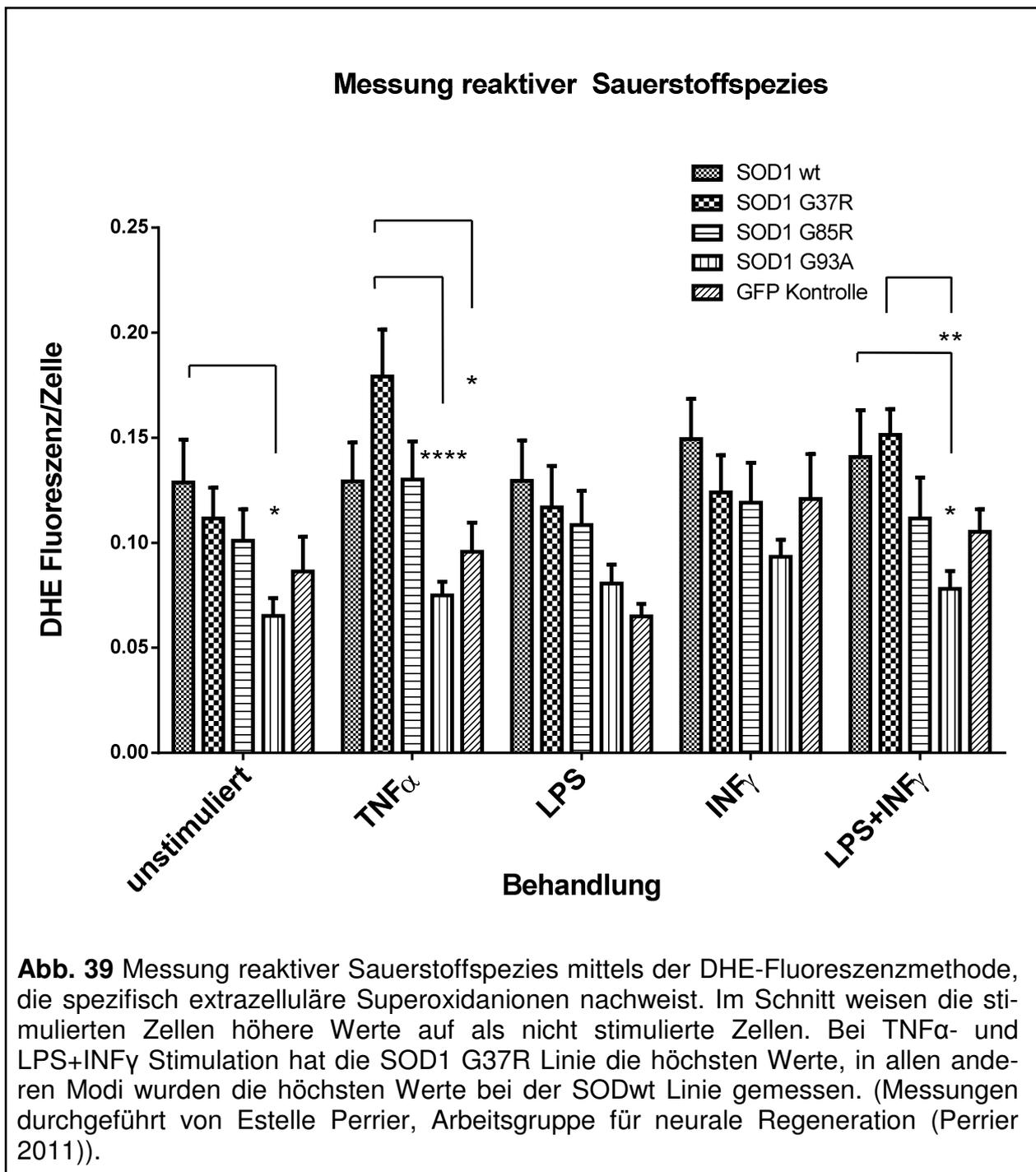
nen. Die transduzierten Zellen zeigen insgesamt eine höhere Aktivität des Komplex IV als die untransduzierten Zellen.

Den deutlichsten Unterschied sieht man in der Situation bei $\text{INF}\gamma$ Stimulation zwischen SOD1 G37R und den Zellen der anderen Linien- die SOD1 G37R Linie zeigt hier eine höhere Komplex IV Aktivität (Abb. 37). Die in Abb. 37 dargestellten Unterschiede in der Komplex IV Aktivität liegen jedoch nicht in einem statistisch signifikanten Bereich.



Die Citrat-Synthase katalysiert den ersten Schritt des Citratzyklus- die Umsetzung von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat, der in den Mitochondrien stattfindet. Hinsichtlich der Aktivität der Citrat-Synthase ergibt sich ein homogenes Bild bei den verschiedenen Zelllinien auch im Hinblick auf die unterschiedlichen Stimulationsmodi. Eine nicht signifikant höhere Aktivität sieht man bei der Linie SOD1 G85R bei Stimulation mit TNF α und LPS sowie bei LPS/ INF γ Costimulation (Abb. 38).

6.6 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies



Die Messungen von reaktiven Sauerstoffspezies mit der DHE-Fluoreszenz-Methode wurden von Estelle Perrier aus der gemeinsamen Arbeitsgruppe für neurale Regeneration von Prof. Neumann durchgeführt. In Abb. 39 ist die relative DHE Fluoreszenz pro Zelle dargestellt. In den Untersuchungen ergaben sich signifikant niedrigere Werte für Zellen der Linie SOD1 G93A im Vergleich zu Zellen der Linie SOD1 wt. Dies fiel sowohl bei den unstimulierten Mikroglia als auch bei den mit LPS und $\text{INF}\gamma$ stimulierten Zellen auf. Noch deutlichere Unterschiede zeigten sich zwischen der Linie SOD1 G93A und der Linie SOD1 G37R wobei letztere höhere Fluoreszenzsignale zeigten, was einer höheren ROS Produktion entspricht. Die insgesamt größte ROS Produktion fiel bei der Linie SOD1 G37R in der Situation der $\text{TNF}\alpha$ Stimulation auf (Abb. 39).

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurden iPS-abgeleitete Mikroglia (iPSdM) verwendet, um den Einfluss von mutantern SOD1 auf die mikrogliale Mitochondrienfunktion sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu untersuchen. Das Verfahren, um iPS-Zellen in Mikroglia zu differenzieren, wurde von dieser Arbeitsgruppe entwickelt.

7.1 Transduktion und Durchflusszytometrie

Zum intrazellulären Nachweis von SOD1 und zur durchflusszytometrischen Sortierung der Mikroglia wurde ein SOD1-EGFP Fusionsprotein verwendet. Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Albrecht Clement erstellt und in Witan et al., 2008 beschrieben; in der zitierten Arbeit wurden die Fusionsproteine in HEK293FT Zellen untersucht.

iPSdM lassen sich mit Lentiviralen Vektoren transduzieren und exprimieren stabil das SOD1-EGFP Fusionsprotein, was sich mittels der Immunocytochemie nachweisen lässt. Die Arbeitsgruppe von Dr. Albrecht Clement konnte die SOD1-EGFP-Proteine in allen in dieser Arbeit geschilderten Zelllinien auch mittels Westernblot nachweisen. In der durchflusszytometrischen Sortierung lagen nach zwei Transduktionen mehr mit SOD1 wt-EGFP transduzierte Zellen über dem Schwellenwert für positive Zellen als mit den SOD1 Mutanten G37R, G85R und G93A transduzierte Zellen.

Dies könnte auf die höhere Toxizität der SOD1 Mutanten zurückzuführen sein, die zumindest in Motoneuronen bekanntermaßen die Apoptose induzieren (Pasinelli et al., 2004). Daher wäre in Erwägung zu ziehen, dass zum Zeitpunkt der Sortierung mehr Zellen der Linie SOD1 wt-EGFP die erforderliche Anzahl an Fusionskonstrukten exprimierten, die nötig ist, um in der Durchflusszytometrie als EGFP-positiv zu gelten. Was allerdings dagegen spricht ist, dass durch eine höhere Anzahl an Transduktionen-zuletzt vier- dieses Problem umgangen werden konnte. Zudem zeigte die von der kollaborierenden Arbeitsgruppe angefertigte Westernblotanalyse eine vergleichbare Expression von SOD1-EGFP bei SOD1 wt und den SOD1-Mutanten bei den durchflusszytometrisch sortierten Zellen.

In Betracht zu ziehen wäre allerdings eine geringere Fluoreszenz der mSOD1-EGFP Proteine verglichen mit den SOD1 wt-EGFP-Fusionsproteinen. Derartige Resultate zeigten sich in der Arbeit von Zhang et al. (Zhang und Zhu, 2006), wo Zellen der Linie NSC34, einer murinen Motorneuron-ähnlichen Zelllinie sowie die Muskelzelllinie C2C12 und HEK293T Zellen untersucht wurden. Die Autoren verwendeten am C-Terminus mit EGFP markiertes SOD1, die verwendeten SOD1 Mutanten waren AV4, G85R und G93A. Alle mSOD1-EGFP-Proteine zeigten im Westerblot vergleichbare Expressionslevel. Es konnte gezeigt werden, dass mSOD1 weniger konformationsstabil ist als wtSOD1. Das könnte, so der Verweis auf zwei andere Arbeiten (Waldo et al., 1999), (Pédélecq et al., 2002) zu einer Konformationsänderung des EGFPs führen und so die Fluoreszenz verringern. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten SOD1 Proteine sind ebenso C-terminal mit EGFP markiert. Es muss also in Erwägung gezogen werden, dass der gleiche Mechanismus auch hier für eine geringere Fluoreszenz der mSOD1-EGFP transduzierten Zellen verantwortlich ist.

Die durchflusszytometrische Sortierung der Mikroglia war mit relativ hohen Zellverlusten verbunden. Das liegt zum Einen am physikalischen Stress, dem die Zellen während der Sortierung ausgesetzt waren. Zum Anderen musste aufgrund der hohen Autofluoreszenz im grünen Spektrum die Schwelle für EGFP-positive Zellen in der Durchflusszytometrie sehr streng gesetzt werden, um eine reine Zellpopulation zu gewährleisten. Ein Ansatz, dieses Problem zu umgehen, wäre die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen, die ein anderes Absorptionsspektrum aufweisen (z. B. mCherry). Zum Zeitpunkt der Experimente gab es jedoch nur die Möglichkeit mit EGFP markierte Zellen zu sortieren.

7.2 Stimulation mit GM-CSF

Nach der Durchflusszytometrie wurde ein Proliferationsstopp der iPsdM beobachtet, obwohl die Zellen in ausreichender Dichte auf die Kulturschalen ausgesät wurden.

Dies wurde als Reaktion auf den physikalischen Stress des Sortierungsprozesses gedeutet. Daher wurden die Zellen für insgesamt 10 Tage mit GM-CSF stimuliert, was zu einer guten Proliferation der iPsdM führte; danach war keine Stimulation mehr nötig.

Granulozyte-monozyte colony stimulating factor (GM-CSF) wurde zunächst in seiner Funktion als Stimulator der Hämatopoese beschrieben. Daneben ist er aber auch schon lange als potenter Stimulator der Proliferation (Giulian und Ingeman, 1988), (Fischer et al., 1993) und Inhibitor der Apoptose (Gehrmann, 1995) von Makrophagen und Mikroglia bekannt. Er spielt neben INF γ , TNF α und M-CSF eine Rolle beim Priming von Makrophagen (Hamilton und Anderson, 2004) und nicht aktivierten Mikroglia. Das Priming führt u.a. zu einer erhöhten MHC II Expression und damit einer erhöhten Fähigkeit zur Antigenpräsentation (Moisse und Strong, 2006).

GM-CSF polarisiert Mikroglia in Richtung eines M1 Phänotyps, dieser zeichnet sich u.a. durch eine hohe Expression von CD80 und CCR7 aus. (Durafourt et al., 2012).

Auch bei der Differenzierung von embryonalen Stammzellen in Mikroglia (ESdM) sowie den in dieser Arbeit verwendeten iPsdM wurde GM-CSF verwendet (Beutner et al., 2010), (unveröffentlicht).

7.3 Immunozytochemie

In den immunzytochemischen Färbungen wurden das SOD1-Protein sowie der für Mikroglia und Makrophagen spezifische Marker Iba1 angefärbt. Für beide wurden in Kaninchen produzierte Primärantikörper verwendet. Diese wurden mit in Ziegen gewonnenen Sekundärantikörpern markiert, welche den roten Farbstoff Cy3 tragen. Um SOD1 und Iba1 dennoch getrennt darzustellen wurde eine indirekte Methode gewählt: SOD1 bildet ein Fusionsprotein mit EGFP, sodass für die Aufnahmen das EGFP Signal mit dem Cy3 Signal des Iba1 co-lokalisiert wurde. Hierbei zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung von Iba1 und EGFP.

Wurde dagegen SOD1 mit Cy3 markiert und mit EGFP co-lokalisiert, sah man erwartungsgemäß ein homogenes Bild.

Es zeigte sich eine relativ gleichmäßige Verteilung des EGFP-SOD1 Proteins, wobei die Zellkerne etwas schwächere Signale aufweisen. SOD1 ist ein primär zytosolisches Protein, das aber auch in den Zellkern diffundieren kann. Somit ist die geringere Fluoreszenz im Bereich der Kerne erwartbar. In PC12 Zellen konnte gezeigt werden, dass ein angehängtes GFP die Diffusionskapazität von SOD1 nicht verändert (Stevens et al., 2010).

7.4 Mitochondriale Messungen

Es wurden die Funktionen der mitochondrialen Komplexe I und IV sowie der Citratsynthase untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mit SOD1 wt oder mit den SOD1 Mutanten transduzierten Zellen. Auch nach Stimulation mit den Zytokinen TNF α , INF γ , dem TLR4 Aktivator LPS sowie einer Co-Stimulation mit LPS und INF γ ergaben sich keine Unterschiede in der mitochondrialen Aktivität, wenn man sie mit den nicht stimulierten Zellen vergleicht.

In der Literatur wurden mitochondriale Alterationen in Motorneuronen *in-vitro* und *in-vivo* im mSOD1-Modell beschrieben (Menzies et al., 2002), (Menzies, 2002), (Kirkinezos et al., 2005), (Li et al., 2010), (Son et al., 2007), (Ferri et al., 2008). Jedoch sind bisher keine mitochondrialen Auffälligkeiten in mSOD1 exprimierenden Mikroglia bekannt- eine derartige Untersuchung konnte in der Literatur via Pubmed Suche mit den Stichwörtern „microglia, mitochondria, ALS“ bzw. „microglia, mitochondria, SOD1“ nicht gefunden werden.

Möglicherweise sind Mikroglia weniger anfällig als Motorneurone für eine mSOD1 induzierte Störung der Mitochondrien. Die Menge und Aktivität des Enzyms iNOS (Chen et al., 2010) ist in Mitochondrien von mSOD1 Mäusen erhöht; iNOS produziert das Stickstoffradikal NO, welches zusammen mit Superoxid zu dem noch aggressiveren Radikal Peroxynitrit reagieren kann.

Es ist bekannt, dass Mikroglia über ein höheres antioxidatives Potential als Neurone verfügen (Dringen, 2005). Dies spiegelt sich u.a. in einem höheren zellulären Gehalt von Glutathion- einem wichtigen antioxidativem Peptid- wider (Chatterjee et al., 1999). Das Enzym Glutathionperoxidase, welches die Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid katalysiert, weist in Mikroglia in Hirnschnitten eine deutlich höhere Immunreaktivität auf als in Neuronen (Lindenau et al., 1998). Dies konnte auch in Zellkulturmodellen sowohl für die Immunreaktivität als auch für die katalytische Aktivität des Enzyms bestätigt werden (Hirrlinger et al., 2000), (Hollensworth et al., 2000).

Die gute Fähigkeit der Mikroglia Sauerstoff- und Stickstoffradikale unschädlich zu machen erscheint sinnvoll, da sie als Phagozyten große Mengen dieser Stoffe bilden können und sich selbst vor deren deletären Auswirkungen schützen müssen. Beson-

ders in einer proinflammatorischen Umgebung ist das antioxidative Potential der Mikroglia wichtig. Hier zeigte sich, dass eine Stimulation mit LPS und INF γ zwar den zytosolischen, nicht aber den mitochondrialen Glutathiongehalt in Mikroglia reduziert, wogegen TNF α den zytosolischen Glutathiongehalt erhöht (Dringen, 2005). In einer anderen Studie erhöhte TNF α Stimulation die Aktivität der SOD1 in Mikroglia (Dopp et al., 2002), was zu einer höheren Umsetzung von H $_2$ O $_2$ führt.

Stimulation mit LPS und INF γ induzierte iNOS und SOD2, wogegen SOD1 und Katalase unbeeinflusst waren (Noack et al., 1999). Somit könnte ein hypothetischer toxischer Effekt der Zytokinstimulation auf die Mitochondrien der iPSdM wieder durch eine erhöhte antioxidative Aktivität ausgeglichen werden.

Es besteht hier jedoch auch die Möglichkeit -analog zu den diskutierten Ergebnissen der Durchflusszytometrie, dass das Fusionsprotein aufgrund seiner Größe oder sonstiger Eigenschaften nicht in vergleichbarer Weise wie natives mSOD1 mit den Mitochondrien interagieren kann.

7.5 Messung von Superoxid

Es gibt Hinweise darauf, dass mutantes SOD1 via Überaktivierung von NOX2 zur vermehrten Produktion von ROS bei ALS beiträgt (Harraz et al., 2008), in der zitierten Arbeit wurden Mäuse mit der SOD1 Mutation G93A verwendet. Zwei Untersuchungen konnten zeigen, dass die Expression von NOX1, NOX2 und NOX4 mit der Krankheitsaktivität im SOD1 Mausmodell sowie bei ALS Patienten positiv korreliert. (Marden et al., 2007), (Dunckley et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion von extrazellulären Superoxid Anionen mit Hilfe der DHE Fluoreszenz Methode gemessen. Hierbei zeigte sich die höchste ROS Produktion bei Zellen der Line SOD1 G37R in der Situation der TNF α Stimulation.

Es wurde jedoch nicht wie erwartet eine bedeutend höhere ROS Produktion bei den mSOD1 überexprimierenden Zellen beobachtet. Auch eine in anderen Studien gezeigte verringerte Produktion von NO und ROS bei SOD1 wt überexprimierenden Mikroglia (Chang et al., 2001), (Dimayuga et al., 2007) konnte hier nicht gezeigt werden. Im Gegenteil zeigte sich bei einer Costimulation mit LPS und INF γ eine höhere ROS Produktion bei der Line SOD1 wt im Vergleich zur Linie SOD1 G93A.

Die ROS vermittelte Toxizität von mSOD1 entsteht durch die Unfähigkeit des mSOD1 sich von der NOX2 Untereinheit Rac1 zu lösen und so die NOX2 Aktivität herunter zu regulieren (Harraz et al., 2008). Möglicherweise kommt dieser Mechanismus bei dem SOD1-EGFP Fusionsprotein aufgrund seiner Größe (341 Aminosäuren im Vergleich zu den 154 Aminosäuren des nativen SOD1) nicht zum Tragen. Auch die veränderte Tertiärstruktur des SOD1-EGFP Fusionsproteins (Stevens et al., 2010) mag ein Grund für eine veränderte Interaktion mit Rac1 sein. In der Arbeit von Stevens et al. zeigte sich z.B., dass die Fähigkeit zur Oligomerisierung bei einem SOD1-G93A-EGFP-Fusionsprotein nicht vorhanden war.

7.6 Seneszenz von iPSdM

Als ein grundlegendes Problem, stellte sich die Notwendigkeit einer vierfachen Transduktion dar- bei einer geringeren Anzahl von Transduktionen wurde eine zu geringe Rate an EGFP-positiven Zellen bei der Sortierung erreicht. Dies hängt sicher auch mit der erwähnten Autofluoreszenz zusammen. Zwischen den einzelnen Transduktionen wurde jeweils eine Pause von 3-5 Tagen eingelegt, um nicht in das Zeitfenster der antiviralen Antwort zu fallen, welche nach einer Transduktion mit den Lentiviren gestartet wird. Hinzu kam, dass die Zellen nach der durchflusszytometrischen Sortierung lange brauchten, um sich zu erholen und wieder zu proliferieren. Dies alles führte dazu, dass die sortierten Zellen zum Zeitpunkt der funktionellen Untersuchungen bereits relativ hohe Passagen von ca. 17-20 erreicht hatten. Es wird angenommen, dass Mikroglia, die aus murinen embryonalen Stammzellen abgeleitet wurden (ESdM), sich bis zu einer Passage von 25 physiologisch verhalten. Die verwendeten iPSdM wurden aus humanen iPS-Zellen eines Mitte dreißigjährigen, männlichen Spenders differenziert. Daher könnte man annehmen, dass die Zellen bereits früher eine gewisse Seneszenz erreichen können. Allerdings wurde nachgewiesen, dass iPS Zellen während des Reprogrammierungsprozesses einen Großteil der Eigenschaften von embryonalen Stammzellen erwerben, wie die Expression der Telomerase (Gourronc und Klingelhutz, 2012).

8. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden aus humanen iPS-Zellen gewonnene Mikroglia (iPSdM) genetisch modifiziert, um ein *in-vitro* Modell für die mSOD1-vermittelte ALS zu erhalten, sowie die mitochondriale Funktion und die Produktion von Superoxid durch die iPSdM gemessen.

Dazu wurden SOD1-EGFP Fusionsgene in lentivirale Vektoren kloniert und iPSdM mit den daraus hergestellten Lentiviren transduziert. Die iPSdM ließen sich durchflusszytometrisch sortieren und zeigten anschließend nach notwendiger kurzer Stimulation mit GM-CSF wieder ein gutes Wachstumsverhalten. Die SOD1-EGFP Fusionsproteine ließen sich bei allen erstellten Zellreihen immunzytochemisch nach-

weisen, wobei auch die Kopplung der EGFP und SOD1-Proteine sichtbar wurde. Von einer auswärtigen Arbeitsgruppe konnte die Expression der SOD1-EGFP-Proteine auch im Westernblot nachgewiesen werden. In den durchgeführten photometrischen Analysen der mitochondrialen Enzyme zeigte sich bei den untransduzierten iPScM eine höhere Komplex I-Aktivität als bei nicht stimulierten Zellen. Bei der Komplex IV-Aktivität verhielt es sich anders herum, hier zeigten die transduzierten Zellen insgesamt eine höhere Aktivität als die untransduzierten Zellen. Ein sehr homogenes Bild ergab die Messung der Aktivität der Citrat-Synthase, wobei hier die Zellen der Linie G85R die tendenziell höchste Aktivität aufwiesen. Es konnten bei den Untersuchungen aber keine statistisch signifikanten Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette oder der Citratsynthase-Aktivität gezeigt werden.

Bei der Messung der Produktion von Superoxidionen *in vitro* zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Hier wiesen die Zellen der Linien SOD1 wt sowie SOD1 G37R die höchste Superoxid-Produktion auf, es zeigte sich aber nicht wie erwartet eine höhere Superoxidproduktion bei allen mit mSOD1 transduzierten iPScM im Vergleich zur SOD1 wt Linie.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die iPScM prinzipiell gut als Zellkulturmodell zum Studium neurodegenerativer Erkrankungen eignen. Sie lassen sich stabil genetisch modifizieren und zeigen ein gutes Proliferationsverhalten, sodass für funktionelle Untersuchungen stets genügend Zellen zur Verfügung stehen.

9. Ausblick

Aufgrund der hier beobachteten Autofluoreszenz im grünen Spektrum, sollten für zukünftige durchflusszytometrische Sortierungen besser fluoreszierende Proteine mit anderen Spektren als EGFP verwendet werden. Wegen der erwähnten möglichen Unterschiede im physikalisch-chemischen Verhalten zwischen unmarkiertem und EGFP-markiertem mSOD1 wäre es auch interessant, iPScM mit nicht EGFP markiertem mSOD1 zu transduzieren, wobei die Selektionierung hier mittels einer eingebrachten Antibiotika Resistenz vorgenommen werden könnte.

Als weiterer Schritt wäre die Generierung von iPS Zellen von Patienten mit sporadischer ALS und deren Differenzierung in Mikroglia und Astrozyten sinnvoll, wie es bereits für Motorneurone erfolgt ist (Dimos et al., 2008). *In vitro* Untersuchungen über

die Interaktionen von Neuronen, Mikro- und Astroglia -jeweils aus Patientenspezifischen iPS Zellen abgeleitet- könnten in Zukunft zur Aufdeckung der genauen Pathogenese der ALS und der Entwicklung effektiver Therapiestrategien beitragen.

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lentiviraler Vektor pLL 3.7 mit dem PGK-Promoter	36
Abb. 2: Vektorkarte pEGFP-N1.	49
Abb. 3: Testverdau Ligationsprodukt von PGK-Promoter und pLL3.7.	50
Abb. 4: Verdau pLL3.7-PGK und N1-SOD1-EGFP Vektoren	51
Abb. 5: Testverdau der pLL3.7 PGK-SOD1-EGFP Vektoren.....	52
Abb. 6: iPSdM SOD1 wt, Durchlicht	53
Abb. 7: iPSdM SOD1 wt	53
Abb. 8: Sortierung nach 2x Transduktion.....	55
Abb. 9: Sortierung nach 3x Transduktion.....	55
Abb. 10: Sortierung nach 4x Transduktion.....	56
Abb. 11: iPSdM untransduziert	58
Abb. 12: iPSdM pLL3.7-EGFP	58
Abb. 13: iPSdM SOD1 wt-EGFP	59
Abb. 14: iPSdM SOD1 G37R EGFP	59
Abb. 15: iPSdM SOD1 G85R-EGFP	60
Abb. 16: iPSdM SOD1 G93A-EGFP	60
Abb. 17: iPSdM untransduziert, anti-SOD1.	62
Abb. 18: iPSdM untransduziert, anti-Iba1	62
Abb. 19: iPSdM SOD1 G85R, anti SOD1.	62
Abb. 20: iPSdM SOD1 G85R, EGFP-Signal.....	62
Abb. 21: iPSdM SOD1 G85R, anti SOD1 EGFP merge	62
Abb. 22: iPSdM SOD1 G85R, anti Iba1.	63
Abb. 23: iPSdM SOD1 G85R, EGFP-Signal.....	63
Abb. 24: iPSdM SOD1 G85R, anti Iba (rot) 1 EGFP (grün) merge	63
Abb. 25: iPSdM wt, anti Iba1	63

Abb. 26: iPSdM wt EGFP- Signal	63
Abb. 27: iPSdM wt, Iba1 (rot) EGFP (grün) merge.	63
Abb. 28: iPSdM wt, anti SOD1	64
Abb. 29: iPSdM wt, EGFP-Signal	64
Abb. 30: iPSdM wt, SOD1 (rot) EGFP (grün) merge.	64
Abb. 31: iPSdM SOD1 wt. Iba1 (rot) , EGFP (grün) merge.....	64
Abb. 32: iPSdM SOD1 G85R Iba1 (rot), EGFP (grün) merge.....	64
Abb. 33: iPSdM SOD1 G93A. Iba1 (rot), EGFP (grün) merge	64
Abb. 34: iPSdM SOD1 G37R. Iba1 (rot), EGFP (grün) merge.....	64
Abb. 35: iPSdM EGFP-Kontrolle.....	67
Abb. 36: Aktivität des mitochondrialen Komplex I,	67
Abb. 37: Aktivität des mitochondrialen Komplex IV	68
Abb. 38: Aktivität der Citratsynthase.....	69
Abb. 39: Messung reaktiver Sauerstoffspezies.....	70

11. Literaturverzeichnis

- Ahmeti KB, Ajroud-Driss S, Al-Chalabi A, Andersen PM, Armstrong J, Birve A, Blauw HM, Brown RH, Bruijn L, Chen W, Chio A, Comeau MC, Cronin S, Diekstra FP, Soraya Gkazi A, Glass JD, Grab JD, Groen EJ, Haines JL, Hardiman O, Heller S, Huang J, Hung WY, Jaworski JM, Jones A, Khan H, Landers JE, Langefeld CD, Leigh PN, Marion MC, McLaughlin RL, Meininger V, Melki J, Miller JW, Mora G, Pericak-Vance MA, Rampersaud E, Robberecht W, Russell LP, Salachas F, Saris CG, Shatunov A, Shaw CE, Siddique N, Siddique T, Smith BN, Sufit R, Topp S, Traynor BJ, Vance C, van Damme P, van den Berg LH, van Es MA, van Vught PW, Veldink JH, Yang Y, Zheng JG. Age of onset of amyotrophic lateral sclerosis is modulated by a locus on 1p34.1. *Neurobiol. Aging* 2013; 34(1): 357.e7-19
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 2007; 10(12): 1538–1543
- Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, den Berg LH. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2012; 124(3): 339–352
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 351(3): 602–611
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103(43): 16021–16026
- Beghi E, Logroscino G, Chio A, Hardiman O, Mitchell D, Swingler R, Traynor BJ. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762(11-12): 1150–1157
- Benatar M, Kurent J, Moore DH. Treatment for familial amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009; 1: CD006153
- Bento-Abreu A, van Damme P, van Den Bosch L, Robberecht W. The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 2010; 31(12): 2247–2265
- Beutner C, Roy K, Linnartz B, Napoli I, Neumann H. Generation of microglial cells from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2010; 5(9): 1481–1494
- Bindokas VP, Jordán J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 1996; 16(4): 1324–1336

Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry VH, Styles P. Interleukin-1 beta -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J. Neurosci.* 2000; 2021: 8153–8159

Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 1990; 272-3: 229–237

Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 1992; 314: 616–621

Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 3125778: 1389–1392

Borras-Blasco J, Plaza-Macias I, Navarro-Ruiz A, Peris-Marti J, Anton-Cano A. Riluzole as a treatment for amyotrophic lateral sclerosis. *Rev Neurol* 1998; 27160: 1021–1027

Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM, Song Y, Gros-Louis F, Pasinelli P, Goolsby, H, Fontaine BA, Lemay N, McKenna-Yasek D, Frosch MP, Agar JN, Julien JP, Brady ST, Brown RH. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat. Neurosci.* 2010; 1311: 1396–1403

Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 1998; 2815384: 1851–1854

Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, Kenna K, McLaughlin R, Hardiman, O. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2011; 826: 623–627

Chang SC, Kao MC, Fu MT, Lin CT. Modulation of NO and cytokines in microglial cells by Cu/Zn-superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 319: 1084–1089

Chatterjee S, Noack H, Possel H, Keilhoff G, Wolf G. Glutathione levels in primary glial cultures: monochlorobimane provides evidence of cell type-specific distribution. *Glia* 1999; 272: 152–161

Chattopadhyay M, Valentine JS. Aggregation of Copper–Zinc Superoxide Dismutase in Familial and Sporadic ALS. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009; 117: 1603–1614

Chen K, Northington FJ, Martin LJ. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain Struct Funct* 2010; 2142-3: 219–234

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Julien JP, Goldstein LSB, Cleveland,

DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003; 3025642: 113–117

Dal Canto MC, Gurney ME. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* 1995; 6761: 25–40

Deng H, 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. 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.* 2006; 10318: 7142–7147

Dimayuga FO, Wang C, Clark JM, Dimayuga ER, Dimayuga VM, Bruce-Keller AJ. SOD1 overexpression alters ROS production and reduces neurotoxic inflammatory signaling in microglial cells. *J. Neuroimmunol.* 2007; 1821-2: 89–99

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 3215893: 1218–1221

Dopp JM, Sarafian TA, Spinella FM, Kahn MA, Shau H, de Vellis J. Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. *Neurochem. Res.* 2002; 2711: 1535–1542

Dringen R. Oxidative and Antioxidative Potential of Brain Microglial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005; 79-10: 1223–1233

Dunckley T, Huentelman MJ, Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Joshipura K, Halperin RF, Stamper C, Jensen KR, Letizia D, Hesterlee SE, Pestronk A, Levine T, Bertorini T, Graves MC, Mozaffar T, Jackson CE, Bosch P, McVey A, Dick, A, Barohn R, Lomen-Hoerth C, Rosenfeld J, O'connor DT, Zhang K, Crook R, Ryberg H, Hutton M, atz J, Simpson EP, Mitsumoto H, Bowser R, Miller RG, Appel, SH, Stephan, DA. Whole-genome analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2007; 3578: 775–788

Durafourt BA, Moore CS, Zammit DA, Johnson TA, Zaguia F, Guiot M, Bar-or A, Antel JP. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* 2012; 605: 717–727

Ezzi SA, Urushitani M, Julien J. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J. Neurochem.* 2007; 1021: 170–178

Ferger AI, Campanelli L, Reimer V, Muth KN, Merdian I, Ludolph AC, Witting, Anke. Effects of mitochondrial dysfunction on the immunological properties of microglia. *J Neuroinflammation* 2010; 71: 45

Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH, Beal MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1997; 695: 2064–2074

Ferri A, Nencini M, Cozzolino M, Carrara P, Moreno S, Carri MT. Inflammatory cytokines increase mitochondrial damage in motoneuronal cells expressing mutant SOD1. *Neurobiol Dis* 2008; 323: 454–460

Fischer HG, Bielinsky AK, Nitzgen B, Däubener W, Hadding U. Functional dichotomy of mouse microglia developed in vitro: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *J Neuroimmunol*. 1993; 451-2: 193–201

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol*. 2004; 1852: 232–240

Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med*. 2001; 224-5: 189–216

Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem*. 1975; 44: 147–159

Gehrmann J. Colony-stimulating factors regulate programmed cell death of rat microglia/brain macrophages in vitro. *J Neuroimmunol* 1995; 631: 55–61

Giulian D, Ingeman JE. Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J. Neurosci*. 1988; 812: 4707–4717

Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Ahtoniemi T, Jaronen M, Arens E, Akerman K, Chan PH, Koistinaho J. Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem*. 2008; 28313: 8446–8452

Gourronc FA, Klingelutz AJ. Therapeutic opportunities: Telomere maintenance in inducible pluripotent stem cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2012; 7301-2: 98–105

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique, Teepu. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 2645166: 1772–1775

Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors* 2004; 224: 225–231

Hanley J, Rastegarlar G, Nathwani AC. An introduction to induced pluripotent stem cells. *Br J Haematol* 2010; 1511: 16–24

Harras MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson Kathryn, Luo M, Paulson H, Schöneich C, Engelhardt JF. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J. Clin. Invest*. 2008; 1182: 659–670

- Henkel JS, Beers DR, Siklós L, Appel SH. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol. Cell. Neurosci.* 2006; 313: 427–437
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann. Neurol* 2004; 552: 221–235
- Hermosura MC, Garruto RM. TRPM7 and TRPM2-Candidate susceptibility genes for Western Pacific ALS and PD? *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 17728: 822–835
- Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.* 2004; 1862: 134–144
- Hirrlinger J, Gutterer JM, Kussmaul L, Hamprecht B, Dringen R: Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev. Neurosci.* 2000; 225-6: 384–392
- Hollensworth SB, Shen C, Sim JE, Spitz DR, Wilson GL, LeDoux SP. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 288: 1161–1174
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 993: 1604–1609
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2012; 4311: 3063–3070
- Jonsson PA, Ernhill K, Andersen PM, Bergemalm D, Brännström T, Gredal O, Nilsson P, Marklund SL. Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2004; 127Pt 1: 73–88
- Kanouchi T, Ohkubo T, Yokota T. Can regional spreading of amyotrophic lateral sclerosis motor symptoms be explained by prion-like propagation? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2012; 837: 739–745
- Kirkinezos IG, Bacman SR, Hernandez D, Oca-Cossio J, Arias LJ, Perez-Pinzon MA, Bradley WG, Moraes CT. Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J. Neurosci.* 2005; 251: 164–172
- Li Q, Vande Velde C, Israelson A, Xie J, Bailey AO, Dong M, Chun SJ, Roy T, Winer L, Yates JR, Capaldi RA, Cleveland DW, Miller TM. ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 10749: 21146–21151

- Lindenau J, Noack H, Asayama K, Wolf G. Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 1998; 242: 252–256
- Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J. Neurosci.* 2002; 2212: 4825–4832
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brännström T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 2004; 431: 5–17
- Liu Y, Hao W, Dawson A, Liu S, Fassbender K. Expression of amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutant increases the neurotoxic potential of microglia via TLR2. *J. Biol. Chem* 2009; 2846: 3691–3699
- Marden JJ, Harraz MM, Williams AJ, Nelson K, Luo M, Paulson H Engelhardt JF. Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* 2007; 11710: 2913–2919
- Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K. Mutated Human SOD1 Causes Dysfunction of Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 27733: 29626–29633
- Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 10729: 13046–13050
- Mendoza L, 2007. Lentiviral Vectors Information and Biosafety Considerations. <http://www.vcu.edu/oehs/chemical/biosafe/lentiviralvectors.pdf>. (Zugriffsdatum: 21.04.2013)
- Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2002; 125Pt 7: 1522–1533
- Menzies FM, Ince PG, Shaw PJ. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem. Int.* 2002; 406: 543–551
- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 3: CD001447
- Moisse K, Strong MJ. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Basis of Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2006; 176211–12: 1083–1093
- Mosley RL, Gendelman HE. Control of neuroinflammation as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Exp. Neurol.* 2010; 2221: 1–5

- Napoli I, Kierdorf K, Neumann H. Microglial precursors derived from mouse embryonic stem cells. *Glia* 2009; 5715: 1660–1671
- Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 2009; 1583: 1030–1038
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 2008; 1322: 288–295
- 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 VMY. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 2006; 3145796: 130–133
- Noack H, Possel H, Rethfeldt C, Keilhoff G, Wolf G. Peroxynitrite mediated damage and lowered superoxide tolerance in primary cortical glial cultures after induction of the inducible isoform of NOS. *Glia* 1999; 281: 13–24
- Ohnishi S, Ito H, Suzuki Y, Adachi Y, Wate R, Zhang J, Nakano S, Kusaka H, Ikehara S. Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 2009; 1296: 216–224
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B: Mitochondrial Oxidative Stress. Implications for Cell Death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 471: 143–183
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 2004; 431: 19–30
- Pédelacq J, Piltch E, Liong EC, Berendzen J, Kim C, Rho B, Park MS, Terwilliger TC, Waldo GS. Engineering soluble proteins for structural genomics. *Nat. Biotechnol.* 2002; 209: 927–932
- Perrier E. Human microglia generated from induced pluripotent stem cells as an inflammatory model system for SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. Köln: Bachelor's Thesis B. sc. Neurosciences University of Cologne, 2011.
- Polymenidou M, Cleveland DW. The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell* 2011; 1473: 498–508
- Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci.* 2001; 2110: 3369–3374
- Rentzos M, Rombos A, Nikolaou C, Zoga M, Zouvelou V, Dimitrakopoulos A, Alexakis T, Tsoutsou A, Samakovli A, Michalopoulou M, Evdokimidis I. Interleukin-15 and Interleukin-12 Are Elevated in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Eur Neurol* 2010; 635: 285–290

Rothstein JD, van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1995; 381: 73–84

Ryu JK, Nagai A, Kim J, Lee MC, McLarnon JG, Kim SU. Microglial activation and cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: in vitro and in vivo studies. *Neurobiol Dis* 2003; 122: 121–132

Shibata N, Asayama K, Hirano A, Kobayashi M. Immunohistochemical study on superoxide dismutases in spinal cords from autopsied patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurosci* 1996; 185-6: 492–498

Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Sasaki S, Kato T, Matsumoto S, Shiozawa Z, Komori T, Ikemoto A, Umahara T. Cu/Zn superoxide dismutase-like immunoreactivity in Lewy body-like inclusions of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1994; 1791-2: 149–152

Shin JH, Lee YA, Lee JK, Lee YB, Cho W, Im DS, Lee JH, Yun BS, Springer JE, Gwag BJ. Concurrent blockade of free radical and microsomal prostaglandin E synthase-1-mediated PGE2 production improves safety and efficacy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 2012; 1225: 952–961

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 1501: 76–85

Son M, Puttapparthi K, Kawamata H, Rajendran B, Boyer PJ, Manfredi G, Elliott JL. Overexpression of CCS in G93A-SOD1 mice leads to accelerated neurological deficits with severe mitochondrial pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 10414: 6072–6077

Sta M, Sylva-Steenland RMR, Casula M, Jong JMBV de, Troost D, Aronica E, Baas F. Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation. *Neurobiol. Dis.* 2011; 423: 211–220

Stevens JC, Chia R, Hendriks WT, Bros-Facer V, van Minnen J, Martin JE, Jackson GS, Greensmith L, Schiavo G, Fisher EMC. Modification of superoxide dismutase 1 (SOD1) properties by a GFP tag-implications for research into amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS ONE* 2010; 53: e9541

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006; 1264: 663–676

Takeda T, Uchihara T, Mochizuki Y, Ishihara A, Nakamura A, Sasaki S, Uchiyama S, Iwata M, Mizutani T. Supranuclear ophthalmoparesis and vacuolar degeneration of the cerebral white matter in amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathological study. *Amyotroph Lateral Scler* 2012; 131: 74–83

Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate re-

lease from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* 2006; 28130: 21362–21368

Taylor DL, Diemel LT, Cuzner ML, Pocock JM. Activation of group II metabotropic glutamate receptors underlies microglial reactivity and neurotoxicity following stimulation with chromogranin A, a peptide up-regulated in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 2002; 825: 1179–1191

Taylor DL, Jones F, Kubota ESFCS, Pocock JM. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J. Neurosci.* 2005; 2511: 2952–2964

Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CCJ, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [¹¹C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol. Dis.* 2004; 153: 601–609

Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz, W. S. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2000; 123 (Pt 7): 1339–1348

Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Büchner M, Feistner H, Elger CE, Ludolph AC, Riepe MW, Kunz WS. Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci* 1999; 1691-2: 133–139

Vinceti M, Bonvicini F, Rothman KJ, Vescovi L, Wang F. The relation between amyotrophic lateral sclerosis and inorganic selenium in drinking water: a population-based case-control study. *Environ Health* 2010; 9: 77

Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 1999; 177: 691–695

Wang I, Wu L, Shen CJ. TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 2008; 1411: 479–485

Witan H, Kern A, Koziollek-Drechsler I, Wade R, Behl C, Clement AM. Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. *Hum. Mol. Genet.* 2008; 1710: 1373–1385

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 1995; 146: 1105–1116

- Zhang F, Zhu H. Intracellular conformational alterations of mutant SOD1 and the implications for fALS-associated SOD1 mutant induced motor neuron cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 17603: 404–414
- Zhang R, Gascon R, Miller RG, Gelinas DF, Mass J, Hadlock K, Jin X, Reis J, Narvaez A, McGrath MS. Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol* 2005; 1591-2: 215–224
- Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 10216: 5727–5732
- Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel, Stanley H. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 2010; 582: 231–243
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 45: 381–384
- Zhou J, Yi J, Fu R, Liu E, Siddique T, Rios E, Deng, Han-Xiang. Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2010; 2851: 705–712

12. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Harald Neumann danken, der es mir ermöglicht hat, an diesem interessanten und klinisch hochrelevanten Thema zu forschen und meine Doktorarbeit zu schreiben; vor allem auch dafür, dass er stets Zeit hatte für Ratschläge und Diskussionen. Ein herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Kristin Roy, die mich in die praktische Arbeit in der Zellkultur eingeführt hat und mir die von ihr entwickelten iPScM für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Ich möchte mich außerdem bei Estelle Perrier bedanken, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeit einen Teil der Stimulationsversuche für die mitochondrialen Messungen sowie die Stimulierungen und Messungen der Experimente zu den Sauerstoffradikalen durchgeführt hat. Ein großer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Albrecht Clement vom Institut für Pathobiochemie der Universitätsklinik Mainz für die Möglichkeit, die vom ihm entwickelten SOD1-EGFP Fusionskonstrukte zu verwenden und für die Durchführung der Westernblots. Weiterhin ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfram Kunz und Dr. rer. nat. Alexei Kudin von der Arbeitsgruppe für Neurochemie/Klinik für Epileptologie an der Universitätsklinik Bonn für die Durchführung der mitochondrialen Messungen und die Diskussion der Ergebnisse. Außerdem möchte ich mich bedanken bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Neumann, Dr. rer. nat. Yiner Wang, die mir gute Ratschläge bei den Klonierungen gab, Dr. rer. nat. Bettina Linnartz für die Ratschläge bei der confocalen Mikroskopie, Dr. rer. nat. Clara Beutner, Liviu Bodea, Jens Kopatz, Janine Claude, Rita Hass, Viola Dobberahn und Jessica Schuhmacher für ihre Kollegialität und die freundschaftliche Unterstützung.