

## DISSERTATION

# **DIE EXPRESSION UND SEKRETION VON APOLIPO- PROTEIN E IN ASTROZYTOMZELLEN WIRD VON IFN- $\beta$ -1b REGULIERT: IMPLIKATIONEN FÜR DIE KRANKHEITSAKTIVITÄT BEI MULTIPLER SKLEROSE**

Ausgeführt zum Zwecke der Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der technischen Wissenschaften unter der Leitung von

O. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. techn. Herbert Stachelberger

E 166

Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und  
technische Biowissenschaften

Eingereicht an der Technischen Universität Wien  
Fakultät für Technische Naturwissenschaften und Informatik

von

Dipl. Ing. Claudia Schwarz

Matrikelnr. 9126459

Gölsdorfasse 2/1/13

1010 Wien

Wien, im November 2003

*Claudia Schwarz*

## DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich bei der Abfassung dieser Dissertation unterstützten: Kollegen, Verwandte und Freunde. Die liebevolle Zuwendung meiner Familie und meiner Freunde ermöglichte mir diesen Abschluß meines Studiums an der Technischen Universität Wien.

Meinen besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. Herbert Stachelberger ausdrücken, dessen engagierte Betreuung nicht nur organisatorische Probleme klein erscheinen ließ. Ohne die unermüdliche fachliche Unterstützung durch Prof. Dr. Harald Kollegger und Dr. Mark Schiefermeier wäre meine praktische Arbeit am Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie nicht so reibungslos verlaufen. Cand. med. Mark Bachner war mir ein wichtiger Helfer im Labor und bei Computerproblemen, er war für die Organisation und Betreuung der Liquor-Serum-Daten in Form einer Access-Datenbank verantwortlich. Ihnen und allen anderen Kollegen sei dafür herzlich gedankt.

## WIDMUNG

Gewidmet meinem verstorbenen Vater, Mag. Hans Schwarz, der mich ermutigt hat, nicht den einfachsten Weg zu gehen.

## **DIE EXPRESSION UND SEKRETION VON APOLIPOPROTEIN E IN ASTROZYTOMZELLEN WIRD VON IFN- $\beta$ -1b REGULIERT: IMPLIKATIONEN FÜR DIE KRANKHEITSAKTIVITÄT BEI MULTIPLER SKLEROSE**

Das Apolipoprotein E (ApoE) hat wichtige Funktionen im Lipidstoffwechsel und bei Reifungs- und Regenerationsprozessen im zentralen und peripheren Nervensystem. ApoE fördert die Neusynthese von Zellmembranen indem es die Verfügbarkeit von Cholesterinestern erhöht. Beim Menschen liegt das ApoE-Gen polymorph vor (Chromosom 19), wobei im wesentlichen sechs ApoE-Genotypen – korrespondierend zu drei ApoE-Isoformen – existieren. Die Isoformen weisen unterschiedliche Rezeptor-Affinitäten und unterschiedliche Wechselwirkungen mit diversen anderen Molekülen auf, woraus sich deren charakteristischer Einfluß auf die Pathogenese neurologischer und nicht-neurologischer Erkrankungen ergibt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden einerseits die ApoE-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten im Vergleich zu denen anderer neurologischer Erkrankungen und denen (neurologisch) gesunder Personen gemessen. Dieser Vergleich wurde durch eine eigens für diesen Zweck angelegte Liquor-Serum-Datenbank ermöglicht. Andererseits wurde *in vitro* die Auswirkung einer Inkubation mit IFN- $\beta$ -1b auf die ApoE-Expression und die ApoE-Sekretion in astrozytären Zelllinien verschiedener ApoE-Genotypen bestimmt.

Für diese Studien wurden am Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie ein ApoE-ELISA zur Messung der ApoE-Konzentrationen in Serum und Liquor etabliert. Zur Bestimmung der ApoE-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen wurde der größeren Sensitivität wegen ein ApoE-Western Blot eingesetzt, der aus kommerziell erhältlichen Antikörpern zusammengestellt wurde. Relative Veränderungen der ApoE-mRNA-Menge wurden unter Verwendung einer zweistufigen RT-PCR mit internem Standard ermittelt.

Nach der sorgfältigen Optimierung aller Analyseverfahren wurde die ApoE-mRNA-Expression von Gos-3- und LN-405-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen IFN- $\beta$ -1b(Betaferon®)-Konzentrationen (1 000, 100, 10 und 1 U/ml Medium) gemessen und mit den entsprechenden Veränderungen der ApoE-Synthese und der ApoE-Sekretion verglichen. Der ApoE-Western Blot bestätigte den bereits auf RNA-Ebene gefundenen Trend, daß bei LN-405-Zellen eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht. Somit fanden sich nach Inkubation mit 1 000 U IFN- $\beta$ -1b/ml Medium eine deutlich ausgeprägtere Wirkung auf die ApoE-Synthese und die ApoE-Sekretion als bei einer Stimulation mit 100 U/ml Medium. Bei den Gos-3 Zellen wurde ähnlich wie bei den LN-405-Zellen der bei den RT-PCR-Experimenten gefundenen Trend durch den Western Blot auf der Proteinebene bestätigt. Bei kleineren IFN- $\beta$ -1b-Konzentrationen (100 U/ml Medium) war eine deutlicherer stimulatorischer Effekt auf die ApoE-Synthese und die ApoE-Sekretion zu beobachten als bei 1 000 U/ml Medium (negative Dosis-Wirkungs-Beziehung). Eine mögliche Erklärung für die gegenläufigen Dosis-Wirkungs-Beziehungen in beiden Zell-Linien kann im unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Tumorzell-Linien zu finden sein. Eine alternative Deutung der Ergebnisse ergibt sich aus dem ApoE-Genotyp der untersuchten Zellen: Gos-3-Zellen besitzen den ApoE-Genotyp  $\epsilon$ 3/3 und sind weniger entdifferenzierte Zellen, weswegen spekuliert werden darf, daß die hier beobachtete Gegenläufigkeit von IFN- $\beta$ -1b-Dosis und der Steigerung von ApoE-Expression und ApoE-Synthese das physiologische Verhalten von humanen Astrozyten *in vivo* eher widerspiegelt. LN-405-Zellen haben den vielleicht weniger neuroprotektiv wirksamen Genotyp  $\epsilon$ 3/2 und zeigen erst bei höheren IFN- $\beta$ -1b-Konzentrationen eine Stimulation der ApoE-Synthese und die ApoE-Expression.

Die Auswertung der Liquor-Serum-Datenbank ergab, daß sich die ApoE-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und neurologisch gesunden Kontrollpersonen nicht statistisch signifikant unterscheiden, wiewohl ein Trend zu niedrigeren ApoE-Konzentrationen bei beiden Patienten-Gruppen zu erkennen war.

## **THE EXPRESSION AND SECRETION OF APOLIPOPROTEIN E IN ASTROCYTOMA CELLS IS REGULATED BY IFN- $\beta$ -1b: IMPLICATIONS FOR DISEASE ACTIVITY IN MULTIPLE SCLEROSIS**

Apolipoprotein E (ApoE) plays an important role in lipid metabolism as well as in the maturing and regenerating central and peripheral nervous system. In addition, ApoE permits the de novo synthesis of cellular membranes by increasing the availability of cholesterol esters. The human ApoE gene is polymorphic (located on chromosome 19) with 6 main ApoE genotypes and 3 ApoE isoforms. The ApoE isoforms show different receptor binding affinities and different interactions with other molecules. This may influence the pathogenesis of various neurological and nonneurological disorders.

This thesis had two objectives. On the one hand, *in vitro* experiments were carried out in order to find out, whether the incubation of human astrocytes (with different ApoE genotypes) with IFN- $\beta$ -1b modulates ApoE expression and ApoE secretion. On the other hand, ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid (CSF) were measured in MS patients and compared to those of patients with other neurological diseases and those of neurologically healthy persons. This comparison was made possible by use of a CSF-serum-database.

In order to carry out these studies, a novel ApoE-ELISA was established at the research laboratory of the University Clinic of Neurology to measure ApoE concentrations in serum and CSF. A more sensitive ApoE-Western blot using commercially available antibodies was developed to determine ApoE concentrations in the supernatants of cell cultures. Relative changes in the amount of ApoE mRNA were measured by a two-step RT-PCR-method using an internal standard.

Gos-3 and LN-405 cells were cultivated and incubated with or without different concentrations of IFN- $\beta$ -1b (1 000, 100, 10 and 1 U/ml medium), ApoE mRNA expression was measured and compared to the corresponding changes in ApoE synthesis and ApoE secretion. A positive dose-response-relationship was found in LN-405 cells with respect to ApoE mRNA levels and confirmed by the ApoE Western blot documenting ApoE secretion into the cell culture supernatants. Stimulation with 1 000 U

IFN- $\beta$ -1b/ml medium caused a more pronounced increase in ApoE synthesis and ApoE secretion compared to a stimulation with 100 U IFN- $\beta$ -1b/ml medium. In Gos-3 cells the tendency found in RT-PCR experiments was confirmed by the results using the ApoE Western blot as well. In Gos-3 cells low concentrations of IFN- $\beta$ -1b (100 U/ml medium) caused a more pronounced increase in ApoE synthesis and ApoE secretion as did higher concentrations (1 000 U/ml medium). A possible explanation for this negative dose-response-relationship is the different degree of differentiation in both neoplastic astrocytoma cell lines. The different ApoE genotype of the cell lines may contribute to these results: Gos-3 cells carry the ApoE genotype  $\epsilon$ 3/3 and are less malignant. Therefore, they may represent physiologic human astrocytes in vivo more closely than LN-405 cells do. LN-405 cells carry the ApoE genotype  $\epsilon$ 3/2 (possibly provides less neuroprotection) and are more malignant compared to Gos-3 cells.

Analysing the CSF-serum-database it was found that there were no statistically significant differences in the ApoE concentrations in the CSF of patients with MS, with other neurological disorders and those of neurologically healthy control subjects. However, there was a trend towards lower ApoE concentrations in both groups of patients.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. Apolipoprotein E – ein vielseitiges Protein</b>	<b>1</b>
1.1 Genetische Aspekte und Proteinstruktur	1
1.2 Funktionen von ApoE im gesunden bzw. erkrankten Körper	3
1.2.1 ApoE im Lipidstoffwechsel	3
1.2.2 ApoE im Nervensystem	8
1.3 ApoE und neurologische Erkrankungen	10
1.3.1 ApoE und neurodegenerative Erkrankungen	10
1.3.2 ApoE-Konzentration im Liquor	12
1.4 Synthese und Sekretion von ApoE	13
1.4.1 ApoE-Synthese in nicht-neuronalen Zellen	13
1.4.2 ApoE-Synthese im Nervensystem	14
1.5 ApoE-Isoformen zeigen charakteristische Effekte im Nervensystem	17
1.5.1 Die ApoE-Isoformen modifizieren das Wachstum von Neuriten	17
1.5.2 Die ApoE-Isoformen modifizieren die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke	18
1.5.3 Apo E4 begünstigt die Entstehung pathologischer Strukturen im Zytoplasma von Nervenzellen	18
<b>2. Multiple Sklerose</b>	<b>19</b>
2.1 Was ist Multiple Sklerose?	19
2.2 Epidemiologie der Multiplen Sklerose	21
2.3 Plaques – MS-Läsionen im ZNS	22
2.4 Genetische Aspekte	24
2.5 Hypothesen zur Pathogenese der Multiplen Sklerose	26

2.6	Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	27
2.6.1	Schubförmige MS	27
2.6.2	Primär chronisch progrediente MS	27
2.6.3	Sekundär chronisch progrediente MS	28
2.6.4	Benigne MS	28
2.6.5	Maligne MS	28
2.7	Die Symptomatik der Multiplen Sklerose	29
2.7.1	EDSS-Score zur Beschreibung des Behinderungszustandes von MS-Patienten	30
2.8	Diagnose der MS	32
2.9	Apolipoprotein E, Interferone und Multiple Sklerose	33
2.9.1	Auswirkungen von IFN- $\beta$ und IFN- $\gamma$ auf die Aktivität der MS	34
2.9.2	Weitergabe der von IFNs transportierten Information - IFN-Signalling	35
2.10	IFN $\beta$ -Therapie der MS	37
<b>3.</b>	<b>Liquor-Serum-Datenbank</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>Zellkultur-Experimente</b>	<b>40</b>
	<b>METHODIK UND MATERIALIEN</b>	<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>Liquor-Serum-Datenbank</b>	<b>41</b>
1.1	Übersicht	41
1.2	Probenaufkommen	43
1.3	Aliquotierung der Proben	43
1.4	Dokumentation der klinischen Parameter und Laborwerte in einer Access-Datenbank	44
<b>2.</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>45</b>
2.1	Übersicht	45

2.2	Auswahl der Zelllinien	46
2.2.1	GOS-3	47
2.2.2	LN-405	49
2.2.3	SH-SY5Y	49
2.2.4	Kelly	51
2.3	Handhabung der Zellkultur	51
2.3.1	Sterile Arbeitsweise	51
2.3.2	Anzüchten von Zellen	52
2.3.3	Subkultivierung	53
2.3.4	Einfrieren von Zellen zur Lagerung	54
2.4	Experimente	55
2.4.1	RT-PCR	55
2.4.2	Western Blot	57
<b>3.</b>	<b>ApoE-ELISA</b>	<b>57</b>
3.1	Übersicht und Prinzip	57
3.2	Durchführung des ApoE-ELISA	58
3.2.1	Beschichten der Mikrotiterplatten (Coating)	58
3.2.2	Blocking	59
3.2.3	Auftragen der Standards und der Proben	60
3.2.4	Inkubation mit dem polyklonalen Anti-ApoE-Antikörper	61
3.2.5	Inkubation mit dem Enzymkonjugat	62
3.2.6	Nachweis durch Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat durch Alkalische Phosphatase	63
3.2.7	Auswertung	64
3.3	Optimierung des ApoE-ELISA	64
3.3.1	Konzentrationen der Antikörperlösungen	64
3.3.2	Konzentrationen der Standards und Proben	65
3.3.3	Messung der ApoE-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen	65

<b>4.</b>	<b>ApoE-RT-PCR</b>	<b>66</b>
4.1	Übersicht und Prinzip	66
4.1.1	RT-PCR-Methoden zur (semi-)quantitativen Messung spezifischer Target-mRNAs	67
4.1.2	Weitere Methoden zur Messung spezifischer Target-mRNAs	67
4.2	RNA-Isolierung	68
4.3	DNase-Behandlung	73
4.4	Umschreiben in cDNA (Reverse Transkription)	74
4.5	Polymerase Chain Reaction PCR	76
4.6	Optimierung der RT-PCR	79
4.6.1	Petrischalen für Zellkulturexperimente	79
4.6.2	RNase H-Behandlung	79
4.6.3	Aufschmelzen der RNA- und cDNA-Proben	79
4.6.4	Fällung der RNA	79
4.6.5	Zeitpunkte für die Probennahme	81
4.6.6	PCR	88
4.6.7	Agarose-Gel-Elektrophorese zur Quantifizierung	94
4.7	Quantifizierung der ApoE-RT-PCR	94
4.7.1	Mathematische Beschreibung der PCR	94
4.7.2	Prinzipien der Quantifizierung	95
4.7.3	Detektion und Quantifizierung der PCR-Produkte	99
4.7.4	Praktische Vorgangsweise bei der Quantifizierung	102
<b>5.</b>	<b>ApoE-Western Blot</b>	<b>105</b>
5.1	Übersicht und Prinzip	105
5.2	Durchführung des ApoE-Western Blot	106
5.2.1	Aufarbeitung des Zellkultur-Überstandes und der Zellproteine	106
5.2.2	Bradford-Test zur Bestimmung des Protein-Gehalts	107
5.2.3	SDS-PAGE	108
5.2.4	Elektro-Blotting	111
5.2.5	Blocking	112

5.2.6	Inkubation mit dem polyklonalen Anti-ApoE-Antikörper	113
5.2.7	Inkubation mit dem Enzym-Konjugat	113
5.2.8	Inkubation mit dem ECL-Substrat und Messung des Chemilumineszenz-Signals	115
5.3	Optimierung des ApoE-Western Blot-Verfahrens	115
5.3.1	Zeitpunkte für die Probennahmen	115
5.3.2	Bedingungen für die SDS-Page	116
5.3.3	Bedingungen für das Elektro-Blotting	120
5.3.4	Membran-Material	121
5.3.5	Blocking	121
5.3.6	Primäre Antikörper und sekundäre Antikörper (Enzym-Konjugate)	122
5.3.7	Detektion	124
5.4	Quantifizierung des ApoE-Western Blot-Verfahrens	126
<b>ERGEBNISSE</b>		<b>130</b>
<b>1.</b>	<b>In vitro-Experimente und Zellkultur</b>	<b>131</b>
1.1	Übersicht	131
1.2	RT-PCR	132
1.2.1	Dauer der Stimulation mit Betaferon®	132
1.2.2	Maximum der ApoE-Expression	134
1.2.3	Stimulation von LN-405-Zellen mit 1 000 U Betaferon® pro ml Medium	136
1.2.4	Stimulation von LN-405-Zellen mit 100 U Betaferon® pro ml Medium	137
1.2.5	Stimulation von LN-405-Zellen mit 10 U Betaferon® pro ml Medium	138
1.2.6	Stimulation von LN-405-Zellen mit 1 U Betaferon® pro ml Medium	138
1.2.7	Stimulation von Gos-3-Zellen mit 1 000 U Betaferon® pro ml Medium	139
1.2.8	Stimulation von Gos-3-Zellen mit 100 U Betaferon® pro ml Medium	140
1.2.9	Stimulation von Gos-3-Zellen mit 10 U Betaferon® pro ml Medium	140

1.2.10	Stimulation von Gos-3-Zellen mit 1 U Betaferon® pro ml Medium	141
1.2.11	Übersicht über die ApoE-Expression der beiden astrozytären Zell-Linien bei verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen	142
1.3	Western Blot	147
1.3.1	Dauer der Stimulation mit Betaferon®	147
1.3.2	Stimulation von LN-405-Zellen mit Betaferon®	151
1.3.3	Stimulation von GOS-3 Zellen mit Betaferon®	155
<b>2.</b>	<b>Liquor-Serum-Datenbank</b>	<b>165</b>
2.1	Übersicht	165
2.2	ApoE-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten und gesunden Personen	167
2.2.1	Ziel der Studie	167
2.2.2	Patientenkollektive und methodische Vorgangsweise	167
2.2.3	Ergebnisse	168
2.3	Untersuchung der ApoE-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis bei drei Gruppen: Multiple Sklerose-Patienten, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und neurologisch gesunden Personen	169
2.3.1	Ziele der Studie	169
2.3.2	Kollektive und methodische Vorgangsweise	170
2.3.3	Überprüfung der Hypothesen	171
	<b>DISKUSSION</b>	<b>176</b>
<b>1.</b>	<b>Optimierung der Methoden</b>	<b>177</b>
1.1	ApoE-ELISA	177
1.1.1	Faktoren, die die Meßgenauigkeit des ApoE-ELISA beeinflussen	178
1.2	RT-PCR zur semiquantitativen Analyse der ApoE-mRNA	179
1.2.1	Faktoren, die die Meßgenauigkeit der RT-PCR beeinflussen	180

1.3	ApoE-Western Blot	181
1.3.1	Faktoren, die die semiquantitative Messung mittels ApoE-Western Blot beeinflussen	182
<b>2.</b>	<b>In vitro-Experimente und Zellkultur</b>	<b>183</b>
2.1	Wirkungsweise der Interferone	183
2.1.1	Interferonwirkung in gesunden Personen und bei MS-Patienten	183
2.1.2	Interferonwirkung in vitro	184
2.2	RT-PCR-Experimente - Modifikation der ApoE-Expression durch IFN- $\beta$	185
2.2.1	Theoretische Aspekte	185
2.2.2	LN-405-Zellen	187
2.2.3	Gos-3-Zellen	188
2.2.4	Diskussion der Ergebnisse	188
2.3	ApoE-Western Blot – Modifikation der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion durch IFN- $\beta$	191
2.3.1	Theoretische Aspekte	191
2.3.2	LN-405-Zellen	191
2.3.3	Gos-3-Zellen	192
2.3.4	Diskussion der Ergebnisse	192
2.4	Schlußbetrachtungen	193
<b>3.</b>	<b>Liquor-Serum-Datenbank</b>	<b>193</b>
3.1	Pilotstudie	193
3.1.1	Theoretische Aspekte	193
3.1.2	Diskussion der Ergebnisse	193
3.2	Studie über die ApoE-Konzentrationen im Liquor von drei Gruppen: MS-Patienten, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und (neurologisch) gesunde (Kontroll-)Personen	194
3.2.1	Theoretische Aspekte	194
3.2.2	Diskussion der Ergebnisse	194
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>198</b>

# EINLEITUNG

## 1. Apolipoprotein E – ein vielseitiges Protein

Apolipoprotein E (ApoE) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34,2 kDa, codiert von 299 Aminosäuren (siehe Abb. 1.1). ApoE ist ein Hauptbestandteil mehrerer Klassen von Plasmalipoproteinen mit wichtigen Funktionen im Lipidmetabolismus und maßgeblich an der Regeneration von Nerven beteiligt. Daneben scheint ApoE an der Aktivierung einiger Klassen lipolytischer Enzyme teilzunehmen und in begrenztem Ausmaß gewisse immunmodulatorische Eigenschaften aufzuweisen <sup>1</sup>.

Abb. 1.1: Aminosäuresequenz des ApoE und Positionen der allelspezifischen Aminosäure-Substitutionen

### Aminosäuresequenz des Apolipoprotein E 3:

Die Sequenz des Signalpeptides ist blaugrün, die Positionen der Aminosäure-Substitutionen sind rot gedruckt

MKVLWAALLV	TFLAGCQAKV	EQAVETEPEP	ELRQQTEWQS	GQRWELALGR	FWDYLRWVQT
LSEQVQEELL	SSQVTQELRA	LMDETMKELK	AYKSELEEQL	TPVAEETRAR	LSKELQAAQA
RLGADMEDVC	GRLVQYRGEV	QAMLGQSTEE	LRVRLASHLR	KLRKRLLRDA	DDLQKRLAVY
QGAREGAER	GLSAIRERLG	PLVEQGRVRA	ATVGSLAGQP	LQERAQAWGE	RLRARMEEMG
SRTRDRLDEV	KEQVAEVRAK	LEEQAQQIRL	QAEAFQARLK	SWFEPLVEDM	QRQWAGLVEK
VQAAVGTSA	PVPSDNH				

### 1.1 Genetische Aspekte und Proteinstruktur

Das humane ApoE-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 19 und enthält 4 Exons (3597 Nucleotide). Die Translation der 1,2 kb langen ApoE-mRNA führt zu einem 317 Aminosäuren langen Vorläufer-Polypeptid (prä-ApoE). Posttranslationale Modifikationen umfassen Glykosylierung, Sialylierung (d.h. Ankopplung von Sialsäure-Resten) und die Entfernung des 18 Aminosäuren langen Signalpeptids; erst dann ist das reife ApoE-Protein

fertig zur Sekretion. Drei wichtige funktionelle Bereiche sind die Rezeptor-Bindungs-Domäne, die Lipid-Anlagerungs-Domäne und eine Region, die für die maximale Rezeptoraffinität ausschlaggebend ist <sup>1</sup>.

Das ApoE-Gen ist polymorph: drei ApoE-Allele (ApoE  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$ ) werden durch zwei Punktmutationen innerhalb der Codons 112 und 158 verursacht, die jeweils Basensubstitutionen im Protein bewirken (Cystein gegen Arginin oder umgekehrt; siehe Tab. 1.1). Die drei Allele legen die sechs wichtigsten ApoE-Genotypen ( $\epsilon 2/2$ ,  $\epsilon 3/2$ ,  $\epsilon 3/3$ ,  $\epsilon 4/2$ ,  $\epsilon 4/3$  und  $\epsilon 4/4$ ) fest. Die Allelhäufigkeiten und die Genotypverteilung in der europäischen Bevölkerung (Stichprobe: 4200 Personen) sind der Tab. 1.2 zu entnehmen <sup>2</sup>.

Darüber hinaus sind zahlreiche weitere, jedoch erheblich seltenere Mutationen bekannt. Diese sind im Gegensatz zu den oben angeführten Isotypen nicht so umfassend untersucht und können aufgrund ihres vereinzelt Auftretens selten bestimmten physiologischen Funktionen zugeordnet oder deren Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen nachgewiesen werden. Mutationen, die die Bindungsaffinität zum Rezeptor beeinflussen, sind freilich meist mit familiärer Dysbetalipoproteinämie assoziiert <sup>1</sup>.

Tab. 1.1: Erkennungssequenzen der Apolipoprotein E-Allele

Allel	Basensequenz (Codon 112)	Basensequenz (Codon 158)	Aminosäure (Codon 112)	Aminosäure (Codon 158)
$\epsilon 2$	TGC	TGC	Cys	Cys
$\epsilon 3$	TGC	CGC	Cys	Arg
$\epsilon 4$	CGC	CGC	Arg	Arg

Tab. 1.2: Häufigkeiten der ApoE-Genotypen und der ApoE-Allele in der gesunden Bevölkerung

ALLELE [%]		ApoE-GENOTYPEN [%]			
$\epsilon 2$	9.0	$\epsilon 2/2$	0.6	$\epsilon 3/2$	14.5
$\epsilon 3$	78.7	$\epsilon 3/3$	61.8	$\epsilon 4/3$	19.3
$\epsilon 4$	12.3	$\epsilon 4/2$	2.3	$\epsilon 4/4$	1.5

Die drei ApoE-Isoformen verursachen durch ihre unterschiedliche Bindungsaffinität zu den Lipoproteinrezeptoren (LDL-Rezeptor und LDL receptor-related protein LRP, auch ApoE-Rezeptor genannt) charakteristische, isoformspezifische Lipidprofile. Die veränderte Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und den selteneren Isoformen E2 und E4 kann pathogene Abläufe innerhalb des Lipidstoffwechsels und in weiterer Folge komplexe Krankheitsbilder des gesamten Organismus auslösen; dazu zählt z.B. die Arteriosklerose (siehe auch Abschnitt 1.2.1). Die ApoE-Isoformen modifizieren neben den veränderten Rezeptoraffinitäten auch die Aktivität des LDL-Rezeptors, die Verteilung von ApoE unter den Lipoproteinen, die Bildungsrate der LDL-Partikel und die Cholesterinabsorption<sup>1</sup>. Die unterschiedliche Wechselwirkung der ApoE-Isoformen mit anderen Molekülen wie  $\beta$ -Amyloid und die Beeinflussung der Tau-Phosphorylierung sind maßgebliche Einflußgrößen für die Pathophysiologie und die klinischen Verlaufsformen der Demenz vom Typ Alzheimer (siehe auch Abschnitte 1.5.2 und 1.5.3).

## **1.2 Funktionen von ApoE im gesunden bzw. erkrankten Körper**

### **1.2.1 ApoE im Lipidstoffwechsel**

Lipoproteine sind nichtkovalente Assoziate aus Lipid- und Proteinkomponenten. Sie dienen zum Transport der Lipide im Blut und ermöglichen somit die Versorgung aller Körpergewebe. Verschiedene Gruppen der Lipoproteine übernehmen spezielle Aufgaben bei der Umverteilung und Speicherung der Nahrungsfette und der endogen synthetisierten Lipide<sup>3-5</sup>. ApoE ist nicht nur eine strukturelle Komponente der Lipoproteine, sondern hat auch als Co-Faktor für verschiedene Enzyme und als Ligand für die selektive Aufnahme der Lipoproteine in das Gewebe physiologische Funktionen<sup>1</sup>. ApoE wird primär in den Hepatozyten synthetisiert und zum Aufbau der diversen Lipoproteinpartikel verwendet (siehe Tab. 1.3, entnommen aus<sup>4,5</sup>); daneben wird ApoE auch im Gehirn, vornehmlich in den Astrozyten (Stützzellen), gebildet. Das im Nervensystem produzierte ApoE ist im Vergleich zu dem von

der Leber sezernierten Protein durch einen höheren Gehalt an Sialinsäureresten, die durch posttranslationale Modifikationsprozesse angekoppelt werden, gekennzeichnet <sup>6,7</sup>.

Fehlt das funktionelle ApoE-Gen, so wird die Manifestation von verschiedenen Krankheiten wie z.B. der Typ III Hyperlipoproteinämie und der vorzeitigen Arteriosklerose begünstigt <sup>8</sup>.

Tab. 1.3: Struktur und Komponenten der diversen Lipoproteine

	Dichte [g/ml]	Ø [nm]	Proteine	Lipid:Protein
<b>Chylomikronen</b>	0.94	> 200	Apo A I, A II, B <sub>48</sub> , C I - III, E	99:1
<b>VLDL</b>	0.94-1.006	30-70	Apo B <sub>100</sub> , C I - III, E	90:10
<b>LDL</b>	1.006-1.063	15-30	Apo B <sub>100</sub>	80:20
<b>HDL</b>	1.063-1.21	6-14	Apo A I, A II, A IV, C I - III, E	50:50

#### *Transport von Nahrungstriglyceriden zu den Geweben*

Chylomikronen bewerkstelligen den Transport von Nahrungstriglyceriden innerhalb des Blutkreislaufs; Chylomikronen entstehen in den Mukosazellen der duodenalen Schleimhaut durch Assoziation von Triacylglyceriden, geringen Anteilen an Cholesterin und Phosphoglyceriden, sowie den Apolipoproteinen A I, A II und B<sub>48</sub>. Chylomikronen werden über die Lymphe dem Blutstrom zugeführt. An den endothelialen Oberflächen in den Geweben werden von den Triacylglyceriden freie Fettsäuren durch die Lipoproteinlipase abgespaltet; Apolipoprotein A und Cholesterin werden im Austausch gegen die Apolipoproteine E und C auf HDL-Vorstufen übertragen. Die Lipoproteinlipase kann mit ApoE assoziiert bleiben, was die Bindung der Chylomikron-Reste (Remnants) an das LDL Rezeptor-assoziierte Protein (LDL receptor-related protein LRP) der Hepatozyten erleichtert <sup>1,8,9</sup>. Die Remnants werden von der Leber unter Mitwirkung des Remnant-Rezeptors (erkennt die Apolipoproteine B<sub>48</sub> und E) resorbiert und abgebaut.

*Verteilung endogen synthetisierter Lipidpartikel*

Über Very Low Density Lipoproteins (VLDL) werden endogen synthetisierte Lipide im Organismus verteilt. VLDL bilden sich hauptsächlich in den Hepatozyten aus Triacylglyceriden, Cholesterin, Cholesterinestern, Phosphoglyceriden und den Proteinkomponenten Apo B<sub>100</sub>, C I – III und E. Abbauschritte durch die Lipoproteinlipase gemeinsam mit diversen Umbauprozessen führen zu Partikeln mittlerer Dichte (IDL; auch VLDL-remnants genannt) sowie in weiterer Folge zu Low Density Lipoproteins (LDL), die ausschließlich Apolipoprotein B<sub>100</sub> enthalten. Diese Abbauprozesse finden im Plasma statt. VLDL und LDL enthalten Apolipoprotein B<sub>100</sub>, das vom LDL-Rezeptor gebunden wird. Das in den VLDL ebenfalls vorhandene ApoE koppelt auch an das LRP und trägt somit wesentlich zur spezifischen Bindung an den LDL-Rezeptor bei <sup>9</sup>.

Low Density Lipoprotein-Partikel (LDL) weisen von allen Lipoproteinen den höchsten Gehalt an Cholesterin und Cholesterinestern auf. Sie können über LDL-Rezeptoren (besitzen N-terminale Bindungsstellen für die Apolipoproteine B<sub>100</sub> und E) an Zielzellen andocken. LDL-Rezeptoren finden sich auf der Oberfläche fast aller Zelltypen. Durch Wechselwirkung mit Clathrin sammeln sich viele Rezeptormoleküle in bestimmten Bereichen der Plasmamembran, den sogenannten coated pits; diese Membranbereiche können gemeinsam mit den gebundenen LDL-Partikeln durch Endozytose ins Innere der Zelle aufgenommen werden (dieser Vorgang wird als rezeptorvermittelte Endozytose bezeichnet). Nach Zerlegung der LDL werden die freigewordenen LDL-Rezeptoren wieder in die Plasmamembran eingebaut („Recycling“), die Cholesterinester und Core-Apoproteine werden in Vesikeln zu den „späten“ Lysosomen transportiert und dort abgebaut. Oberflächen-Apoproteine wie ApoE und die partikel-assoziierte Lipoproteinlipase werden größtenteils wieder in die Umgebung freigesetzt und somit ein Recycling ermöglicht <sup>10</sup>. Beide Komponenten können wieder in High density Lipoprotein-Partikel (HDL) aufgenommen werden <sup>9</sup>. Führt der Abbau der LDL zu hohen intrazellulären Cholesterinkonzentrationen, wird die endogene Cholesterinsynthese gehemmt.

*Rücktransport von Cholesterin und Triglyzeriden zur Leber*

HDL sind nicht einheitlich aufgebaut; mehrere Untergruppen können unterschieden werden. HDL-Partikel transportieren überschüssiges Cholesterin aus den Geweben zur Leber, wo es metabolisiert und zur Ausscheidung vorbereitet wird. HDL-Vorläufer entstehen beim Abbau von Chylomikronen. Vertreter der HDL<sub>1</sub>-Gruppe verdrängen durch ihren hohen Anteil an ApoE möglicherweise LDL kompetitiv von den LDL-Rezeptoren, somit würde die Aufnahme von zusätzlichem Cholesterin in extrahepatische Gewebe vermindert<sup>3-5</sup>.

Bei höheren Konzentrationen triglyceridreicher Partikel (das sind Chylomikronen und VLDL) innerhalb des physiologischen Bereiches (> 250 µg Neutrallipide/ml) werden ApoE-enthaltende Lipoproteine offenbar nur mehr zum Teil über den LDL-Rezeptor in die Zelle transportiert. Der andere Teil der Lipoproteine scheint über Bindung an die ebenfalls in der Zellmembran lokalisierten Heparansulfat-Proteoglykane in die Zelle aufgenommen zu werden, wenn die Kapazität der LDL-Rezeptoren erschöpft ist. Diese Art der Aufnahme von Lipoproteinen ist ein Transfermechanismus mit hoher Kapazität, aber geringer Affinität<sup>10,11</sup>. ApoE-enthaltende Lipoproteine binden außerdem noch an das LRP, ein Vorgang, der möglicherweise durch Assoziation von ApoE an Heparansulfat-Proteoglykane erleichtert wird. Umstritten ist, ob HPSG und LRP unabhängig, als Komplex oder konzertiert nacheinander agieren<sup>12</sup>. Frisch synthetisiertes und sezerniertes ApoE bleibt teilweise (ca. 12%) an die Heparansulfat-Proteoglykane gebunden, bevor es freigesetzt wird, dieser extrazelluläre „Proteoglykan-Pool“ ist für Hepatozyten und Makrophagen nachgewiesen<sup>13,14</sup>. Der an die Zelloberfläche gebundene Anteil des ApoE steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem Anteil des sezernierten ApoE. Sind nur wenige Liganden verfügbar, so kann das sezernierte ApoE wieder in die Zelle aufgenommen werden und einem (teilweisen) lysosomalen Abbau zugeführt werden. Sind Lipoproteine (HDL oder LDL) vorhanden, erfolgt die Sekretion von ApoE fast vollständig, d.h. der neuerliche Abbau ist stark reduziert, weil die Lipoproteine von der Zelloberfläche dissoziieren<sup>12</sup>. Der extrazelluläre „Proteoglykan-Pool“ kann sozusagen als posttranslatonaler Regulationsmechanismus der ApoE-Sekretion betrachtet werden<sup>14</sup>. Andere Forscher haben bei Hepatozyten eine betonte Retro-Endozytose von oberflächenasso-

ziiertem ApoE in Verbindung mit Lipoproteinen beobachtet, ohne eine Aussage über den ApoE-Abbau zu machen („secretion-recapture pathway“) <sup>10</sup>. Nach dem intrazellulären Abbau der triglyceridreichen Lipoproteine werden ApoE und andere Apolipoproteine wieder ins Medium freigesetzt, die Lipide und Core-Proteine werden zu den Lysosomen transportiert. Die Freisetzung von ApoE erfolgt schneller, wenn in der Umgebung genügend HDL-Partikel vorhanden sind <sup>10</sup>.

Der ApoE-Genotyp beeinflusst die Effizienz des Rücktransports von Cholesterin zur Leber, denn die ApoE-Isoformen beeinflussen den Abtransport des Cholesterinüberschusses aus den Geweben in unterschiedlicher Weise <sup>15</sup>. Die Aufnahme von nichtmetabolisiertem Cholesterin aus Gewebezellen und der Rücktransport zur Leber erfolgen durch bestimmte Unterklassen von HDL-Partikeln, die entweder Apolipoprotein A I oder ApoE enthalten (pre $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I und  $\gamma$ -LpE).  $\gamma$ -LpE-Teilchen enthalten ApoE 3 als Homodimer und finden sich nur im Plasma von Individuen, die mindestens ein ApoE  $\epsilon$ 3-Allel besitzen. ApoE 4 dagegen besitzt keine Cystein-Reste und kann somit nicht dimerisieren. Die  $\gamma$ -LpE-Fraktion eines ApoE  $\epsilon$ 3/3-Trägers sammelt rund zehnmal mehr zelleigenes Cholesterin als die  $\gamma$ -LpE-Fraktion von anderen ApoE-Genotypen.

Träger des Allels  $\epsilon$ 4 tendieren zu höheren Gehalten an LDL-Cholesterin als Träger des Allels  $\epsilon$ 3 und besitzen vermutlich eine stärkere Disposition für koronare Arteriosklerose. Das Allel  $\epsilon$ 2 bewirkt im allgemeinen einen erniedrigten Gehalt an LDL-Cholesterin und eine Verringerung des kardiovaskulären Risikos. Remnants von VLDL, LDL und Chylomikronen werden von LDL- oder Remnant-Rezeptoren der Hepatozyten erkannt, resorbiert und abgebaut (siehe auch Abschnitt 1.2.1). ApoE 2 hat eine sehr geringe Affinität für den Remnant-Rezeptor (100fach vermindert) verglichen mit ApoE 3, wodurch auch der Abbau der ApoE 2 enthaltenden Partikel verlangsamt ist <sup>1,15</sup>. Als Reaktion werden von den Leberzellen mehr LDL-Rezeptoren bereitgestellt und somit wird der durch Apolipoprotein B<sub>100</sub> vermittelte Abbau von LDL-Remnants beschleunigt (cholesterinsenkender Effekt von ApoE 2). ApoE 4 dagegen weist normale Bindungseigenschaften für beide Rezeptoren auf.

Allerdings zeigt ApoE 4 aufgrund einer gesteigerten Affinität für triglyceridreiche Lipoproteine einen beschleunigten Abbau der ApoE 4 enthaltenden Partikel. Dadurch wird die Expression des LDL-Rezeptors vermindert und in weiterer Folge die Konzentration des LDL-Cholesterins im Plasma erhöht <sup>1,15</sup>.

### 1.2.2 ApoE im Nervensystem

#### *Aufbau des Nervensystems*

Das Nervensystem gliedert sich in die zwei Bereiche Zentralnervensystem ZNS (bestehend aus Gehirn und Rückenmark) und peripheres Nervensystem. Es besteht im wesentlichen aus drei verschiedenen Zelltypen:

- rund 10 Milliarden Nerven- oder Ganglienzellen (Neuronen) dienen der neuronalen Erregungsleitung und werden über Synapsen miteinander verknüpft
- Gliazellen (Neuroglia) mit Stütz- und Ernährungsfunktion
- Bindegewebe (umgibt das Gehirn, mit Basalmembran als Grenzfläche)

Das Gehirn hat im Gegensatz zu anderen Organen einen sehr hohen Lipidanteil von 50% in der Trockensubstanz, bedingt durch die außergewöhnliche Zusammensetzung der Membran der Myelinscheide (enthält rund 70% Lipide). Der Energiebedarf des Gehirns wird beinahe ausschließlich durch Glukose (im Hungerzustand auch durch Ketonkörper) gedeckt. Eine kontinuierliche Zufuhr von Glucose und anderen essentiellen Substanzen über den Blutkreislauf ist unbedingt notwendig. Im Zytosol der Neuronen finden sich viele Mikrotubuli für eine gerichtete Bewegung von Proteinen in Richtung Nervenende („axonaler Transport“). Die Blut-Hirn-Schranke ist eine selektiv durchlässige Schranke zwischen Blut und ZNS zum Schutz der Nervenzellen. Sie ist für Gase permeabel, verhindert aber den Durchtritt von geladenen Substanzen. Der Liquor cerebrospinalis (Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) befindet sich in den vier Hirnventrikeln sowie im Subarachnoidalraum und steht in ständigem Aus-tausch mit der interstitiellen Flüssigkeit. Der Liquor cerebrospinalis dient zum Schutz des ZNS gegen Druck- oder Stoßeinwirkung von außen <sup>3</sup>. Bei gewissen Krankheiten ist die Zusammensetzung des Liquor

cerebrospinalis (enthält neben Lymphozyten, Monocyten, diversen Proteinen und Glucose auch  $\gamma$ -Globuline) in charakteristischer Weise verändert; die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis (Liquordiagnostik) kann gegebenenfalls zur Diagnosesicherung eingesetzt werden (z.B. erhöhte  $\gamma$ -Globulin-Werte bei Multipler Sklerose) <sup>16</sup>.

#### *ApoE bei der Reifung des Nervensystems*

Die im Vergleich zum Erwachsenen deutlich höheren ApoE-Konzentrationen in Plasma und Serum im Säuglings- und Kindesalter reflektieren wahrscheinlich den bei Wachstum und Regeneration der Nervenzellen erhöhten Bedarf an Lipiden.

#### *ApoE bei der Regeneration nach Nervenverletzungen*

Nach einer Verletzung des ZNS oder im Verlauf von entzündlichen Prozessen werden Astrozyten aktiviert und proliferieren. Die so entstehende „Gliar Narbe“ behindert sowohl die neuronale Regeneration als auch die Remyelinisierung. Aktivierte Astrozyten und aktivierte Makrophagen sind entscheidend an der Entfernung von zellulären Abfallprodukten beteiligt.

Bei der Regeneration eines verletzten peripheren Nerven wurde am Beispiel des Nervus ischiadicus von Ratten eine stark vermehrte lokale ApoE-Sekretion sowie eine erhöhte ApoE-Konzentration festgestellt <sup>17</sup>. ApoE sorgt in Kooperation mit den LDL-Rezeptoren für einen gerichteten Lipidtransport zum verletzten Nerven. Die bei Regenerationsprozessen erforderliche Membran-Neusynthese erfordert auch eine gesteigerte Cholesterinaufnahme. Bei degenerativen Vorgängen am verletzten Nerven sammeln sich lokal vermehrt Lymphozyten sowie Monozyten und Makrophagen, wobei nur die Gewebemakrophagen eine erhöhte ApoE-Sekretion zeigen. Makrophagen speichern auch die bei dem Abbau der Myelinscheide freiwerdenden Fette (insbesondere Cholesterin) in Lipidtröpfchen. Cholesterin wirkt als Induktor für die ApoE-Synthese <sup>6,17</sup>. Die Regeneration beginnt bereits fünf Tage nach der Verletzung.

Dabei finden sich viele neue, aus Monozyten gebildete Gewebemakrophagen zwischen den Schwann-Zellen, in denen eine starke ApoE-Biosynthese nachweisbar ist (besonders im Golgi-Apparat und im Endoplasmatischen Retikulum). Die wachsende Spitze des regenerierenden Axons ist äußerst reich an LDL-Rezeptoren und wächst langsam in ein Bündel aus Schwann-Zellen ein (das Myelin wurde bei den degenerativen Vorgängen abgebaut). Der Höhepunkt der ApoE-Sekretion liegt zwischen dem siebten und zehnten Tag nach der Verletzung (200 bis 300fach vermehrte Produktion im Vergleich zum Normalzustand). Drei bis vier Wochen nach der Verletzung erreicht der ApoE-Gehalt in der extrazellulären Matrix und auch im interstitiellen Raum sein Maximum. Die Remyelinisierung beginnt etwa ab der dritten Woche nach der Verletzung. Die Schwann-Zellen zeigen durch eine sehr große Anzahl von LDL-Rezeptoren eine intensive Beladung mit ApoE und Apolipoprotein A I. Die ApoE-Produktion der Gewebemakrophagen endet allerdings spätestens nach der vierten Woche. Die Schwann-Zellen bilden eine neue Myelinhülle unter Verwendung ihrer eigenen Lipidspeichertröpfchen, die Lipiddepots in den Gewebemakrophagen werden erst ab der fünften Woche benützt. Ab der achten Woche erscheint der regenerierte Nerv völlig normal, eine nur unwesentlich erhöhte Anzahl von Gewebemakrophagen produziert weiterhin geringe Mengen an ApoE <sup>17</sup>.

### **1.3 ApoE und neurologische Erkrankungen**

#### **1.3.1 ApoE und neurodegenerative Erkrankungen**

Vor rund 10 Jahren wurde das ApoE  $\epsilon 4$  Allel als ein Risikofaktor für die Entwicklung der Demenz vom Typ Alzheimer identifiziert <sup>18-21</sup>. In jüngerer Vergangenheit wurde der ApoE-Polymorphismus auch mit verschiedenen anderen neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Eine hohe Inzidenz des ApoE  $\epsilon 4$  Allels wurde beispielsweise bei Patienten mit Temporallappenepilepsie gefunden <sup>22</sup>.

### *ApoE 3/3*

Der klinische Verlauf von einigen neurologischen Erkrankungen wie z.B. Multipler Sklerose, Morbus Wilson und Morbus Alzheimer dürfte ebenso wie die Remission neurologischer Defizite nach traumatischen Kopfverletzungen und Reanimation durch den ApoE-Genotyp  $\epsilon 3/3$  positiv beeinflusst werden<sup>21,23-26</sup>. Patienten mit dem ApoE-Genotyp  $\epsilon 3/3$  zeigen einen deutlich späteren Krankheitsbeginn bei Morbus Wilson als solche mit einem anderen ApoE-Genotyp<sup>23</sup>. Bei Patienten mit dem ApoE  $\epsilon 3/3$ -Genotyp findet man einen deutlich besseren neurologischen Zustand und eine höhere Überlebenschancen nach traumatischen Kopfverletzungen und Herz-Kreislauf-Stillstand als bei solchen mit einem anderen ApoE-Genotyp<sup>26-29</sup>. Offensichtlich verbessert die alleinige Präsenz des ApoE  $\epsilon 3/3$ -Genotyps bzw. der entsprechenden Proteinisoform die klinische Situation des Patienten bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer bzw. Morbus Wilson ebenso wie die Regenerationsfähigkeit des ZNS nach traumatischen bzw. ischämischen Hirnläsionen im Vergleich zu anderen Allelkombinationen<sup>23-25</sup>. Bei Multipler Sklerose ist bei Patienten des ApoE-Genotyps  $\epsilon 3/3$  eine geringere Schubfrequenz und ein langsames Fortschreiten der Erkrankung (kleinerer Progressionsindex) zu beobachten (siehe Abschnitt 2.6)<sup>30-32</sup>. Besonders das Protein der Isoform 3 dürfte demnach neuroprotektive Eigenschaften besitzen (siehe Abschnitt 1.5.3).

### *ApoE $\epsilon 4$ Allel*

Letztendlich sind die Forscher bis heute uneins, wie der nachteilige Effekt des ApoE  $\epsilon 4$  Allels (des ApoE E4) bei gewissen neurodegenerativen Erkrankungen auf molekularer Ebene zu erklären ist. Einige Studien belegen einen Zusammenhang zwischen dem ApoE  $\epsilon 4$  Allel und dem Progressionsindex bzw. der kognitiven Beeinträchtigung bei Multiple Sklerose-Patienten, andere Arbeitsgruppen haben keine derartige Beziehung nachgewiesen<sup>33-40</sup>.

### *ApoE $\epsilon$ 2 Allel*

Die meisten Untersuchungen haben das ApoE  $\epsilon$ 2 Allel wegen seiner geringen Häufigkeit nicht berücksichtigt; andere Studien zeigten divergierende Resultate. Der ApoE  $\epsilon$ 2/2-Genotyp ist mit Hyperlipoproteinämie gekoppelt und zeigt ein geringeres Risiko für Morbus Alzheimer<sup>21,41,42</sup>. Obwohl die Anwesenheit des ApoE  $\epsilon$ 2 Allels vorteilhafte Auswirkungen auf das Plasma-Lipidprofil hat und auf diese Weise das Risiko für Herzkrankheiten reduziert<sup>41,43</sup>, kann es die Entstehung von mikroangiopathie-bedingten Hirnschäden fördern<sup>42-44</sup> (siehe Abschnitt 1.2.1). Das ApoE  $\epsilon$ 2 Allel findet sich besonders selten bei Patienten mit Morbus Alzheimer, somit könnte bei dieser Erkrankung ein gewisser neuroprotektiver Effekt angenommen werden<sup>40</sup>.

### 1.3.2 ApoE-Konzentration im Liquor

Die Konzentration von ApoE im Liquor entspricht ungefähr einem Zehntel der Konzentration im Serum (Normalwerte: 70 mg/l im Serum, 6 mg/l im Liquor)<sup>45</sup>. Bei Kindern ist die ApoE-Konzentration im Liquor höher als bei älteren Personen, begründet durch das besonders in diesem Alter aktive neuronale Wachstum (siehe auch Abschnitt 1.2.2). Es wurden keine Unterschiede in den ApoE-Liquorkonzentrationen zwischen Männern und Frauen festgestellt. Die ApoE-Konzentrationen in Serum und Liquor korrelieren nicht, zeigen doch z.B. Personen des ApoE-Genotyps  $\epsilon$ 4/3 besonders hohe ApoE-Werte im Serum, während die entsprechenden ApoE-Konzentrationen im Liquor im Vergleich zu Personen mit den Genotypen ApoE  $\epsilon$ 3/3 und  $\epsilon$ 3/2 ausnehmend niedrig sind<sup>46</sup>. ApoE-Werte im Liquor reflektieren offenbar die lokale ApoE-Synthese im ZNS; Apolipoproteine wie ApoE und Lipide können wahrscheinlich nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren<sup>45</sup>.

Die ApoE-Konzentration im Liquor von Personen mit neurologischen Krankheiten (verschiedene, meist entzündliche Hirn- und Rückenmarkserkrankungen) ist signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen<sup>46</sup>. Anhand des sogenannten „ApoE-Index“ (wird aus dem Verhältnis der Konzentrationen von Albumin und ApoE in Liquor und Serum errechnet) kann bei der Multiplen Sklerose zwischen Schub und Remission unterschieden

werden<sup>47</sup>. Die Berücksichtigung der Albumingehalte, um den Übertritt von ApoE durch die Blut-Hirn-Schranke zu normieren, erscheint nun nicht mehr notwendig, da die ApoE-Werte im Liquor zum überwiegenden Teil einer lokalen Synthese entstammen<sup>45</sup>. Im Gegensatz zur Multiplen Sklerose werden bei an Morbus Alzheimer erkrankten Personen signifikant erniedrigte ApoE-Konzentrationen im Liquor gefunden<sup>48,49</sup>.

#### 1.4 Synthese und Sekretion von ApoE

Studien zur Expression und Sekretion von ApoE in verschiedenen Geweben legen die Vermutung nahe, dass die ApoE-Synthese gewebsspezifisch reguliert wird<sup>50</sup>.

##### 1.4.1 ApoE-Synthese in nicht-neuronalen Zellen

Die ApoE-Expression in der Leber wird durch zahlreiche positive und negative regulatorische Elemente, die in der Promoter-Region und weiter downstream gelegen sind, kontrolliert. Hormone und Ernährungsvarianten wirken als modulierende Faktoren. Cholesterin- und fettreiche Ernährung im allgemeinen sowie Östrogen erhöhen die ApoE-Synthese<sup>51,52</sup>, während sie durch Insulin vermindert wird<sup>53,54</sup>.

Die ApoE-Expression in Monozyten steigt während deren Differenzierung in einen makrophagenähnlichen Phänotyp<sup>55,58,59</sup>. In Makrophagen wird diese durch Cholesterin und LDL oder Oxysterole weiter aktiviert<sup>55-57,60,87</sup>. Diese erhöhte ApoE-Synthese dürfte zumindest zum Teil auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen sein. *In vitro* bewirkt eine Inkubation mit HDL eine Stimulation der ApoE-Sekretion und eine Verminderung des Abbaus von frisch synthetisiertem ApoE bei einer Makrophagenzelllinie<sup>58</sup>. Von Makrophagen sezerniertes ApoE kann die von Mitogenen oder Antigenen ausgelöste Proliferation von Lymphozyten vermindern/verhindern. ApoE weist also auch immunmodulatorische Funktionen auf<sup>61-63</sup>. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), das unter anderem von Lymphozyten und aktivierten T-Zellen ausgeschüttet wird, redu-

ziert zumindestens *in vitro* die Synthese von ApoE und LDL receptor-related protein in humanen Makrophagen, die aus Monozyten ausdifferenziert wurden<sup>64</sup>. Da die Menge der ApoE-mRNA unverändert bleibt, erfolgt die Regulation offenbar auf posttranslationalem Weg<sup>61</sup>. Die ApoE-Expression in Makrophagen ist im allgemeinen bei oxidativem Streß und entzündlichen Prozessen erhöht; ebenso wird die ApoE-Synthese und die ApoE-Expression in humanen Makrophagen durch oxidierte LDL stimuliert<sup>65,66</sup>.

Der ApoE-vermittelte Cholesterin-Metabolismus in humanen Makrophagen scheint eine gewisse Abhängigkeit vom ApoE-Genotyp aufzuweisen: obwohl ApoE  $\epsilon 4/4$  Makrophagen große Mengen an ApoE ausschütten, inkorporieren sie gleichzeitig große Mengen an cholesterinbeladenen ApoE-Partikel und neigen so zur Umwandlung in sogenannte Schaumzellen, die besonders reich an Cholesterinestern sind. Die Bildung von Schaumzellen ist ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose<sup>1,67</sup>.

#### 1.4.2 ApoE-Synthese im Nervensystem

ApoE wird im Nervensystem von Astrozyten, Oligodendrozyten und (zu einem geringeren Prozentsatz) von anderen nicht-neuronalen Zellelementen wie Monozyten/Makrophagen und der Mikroglia) sezerniert und spielt eine bedeutende Rolle bei der Umverteilung von Lipiden während der neuronalen Entwicklungsphase und bei der Regeneration von peripheren Nerven<sup>17,50,68,69</sup>. Besonders interessant ist die Beobachtung, daß Astrozyten im ZNS die ApoE-Synthese nach Verletzungen einstellen, während Astrozyten im peripheren Nervensystem die ApoE-Synthese in dieser Situation steigern<sup>70</sup>. Global gesehen jedoch steigt die ApoE-Synthese von Gliazellen nach Verletzungen sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem an<sup>50</sup>.

Die ApoE-Synthese der Astrozyten verändert sich im Laufe der Entwicklung: junge Astrozyten weisen einen höheren ApoE-Gehalt auf und sezernieren auch mehr ApoE als ältere<sup>68,69</sup>.

Die ApoE-Synthese in Makrophagen und Astrozyten ist in Anwesenheit von Cholesterin und LDL erhöht <sup>55-57,70</sup>, während Serumentzug *in vitro* und Inkubation mit IFN- $\gamma$  die ApoE-Synthese vermindert <sup>61,64,68</sup>. Die Hemmung der ApoE-Synthese und/oder -Sekretion scheint bei Cholesterin, LDL und IFN- $\gamma$  durch einen posttranslationalen Mechanismus zu erfolgen, denn die Konzentration der ApoE-mRNA („steady state level“) bleibt unverändert <sup>57,61</sup>. In Gegenwart von IFN- $\gamma$  ist bei Makrophagen keine betonte Retro-Endocytose von extrazellulärem ApoE, jedoch eine geringe Steigerung des Abbaus von intrazellulärem, noch nicht sezernierten, ApoE zu beobachten <sup>61</sup>.

Hormonelle Einflüsse und die Anwesenheit von Cholesterin modulieren die ApoE-Synthese offenbar auch in Zellpopulationen des Nervensystems: Insulin hemmt die ApoE-Sekretion, während Cholesterin die ApoE-Sekretion erhöht (bei gleich bleibender Menge der ApoE-mRNA). Demzufolge ist die ApoE-Expression posttranskriptionell reguliert, möglicherweise durch Freisetzung von intrazellulär gespeichertem ApoE <sup>70</sup>. Im Promotor des ApoE-Gens sind auch einige Regionen zu finden, die Sequenzhomologien zu dem sterol-reaktiven Enhancer-Element des LDL-Rezeptor-Gens enthalten <sup>70</sup>. Ebenso kann die Modulation der Aktivität des ApoE-Promoters zu einer Veränderung der Sekretionsleistung von Astrozyten führen; so bewirkt cAMP eine Aktivitätssteigerung des Promoters. Der Effekt ist noch ausgeprägter, wenn cAMP in Kombination mit Retinolsäure (ein überaus effizientes Reagens für die Zellreifung, häufig zur Differenzierung *in vitro* angewendet) eingesetzt wird <sup>50</sup>. cAMP-vermittelte Transkriptionssignale werden über Bindung von Effektormolekülen an AP-2-Bindungsregionen (daneben können auch CRE- oder NF $\kappa$ B-Bindungsstellen genutzt werden) umgesetzt. Der Transskriptionsfaktor AP-2 dürfte also an der Regulation der ApoE-Expression mitbeteiligt sein, denn im Promotor für das ApoE-Gen befinden sich mehrere AP-2-Bindungsstellen und die AP-2-Expression selbst wird durch cAMP gefördert. AP-2 wird von neuronalen und astrozytären Zellen exprimiert und scheint wichtig für die Differenzierung zu sein <sup>50</sup>.

Die ApoE-Synthese in Astrozyten scheint außerdem durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst zu sein. Epidermal Growth Factor bedingt eine mäßige Erhöhung der ApoE-Sekretion in Astrozyten, wohingegen Basic Fibroblast Growth Factor oder eine Kombination der Zytokine Interleukin  $1\alpha$ , Interleukin  $1\beta$  und IFN- $\gamma$  zu einer geringfügigen Verminderung führt <sup>68,71</sup>. In Mäuse-Astrozyten sinkt die ApoE-Syntheserate in Gegenwart von IFN- $\gamma$  auf die Hälfte, während ApoE zugleich in den Zellen akkumuliert <sup>72</sup>. IFN- $\gamma$  könnte demgemäß das Targeting von ApoE oder einen anderen Schritt des intrazellulären ApoE-Transports blockieren oder hemmen. Im Vergleich dazu bewirkt IFN- $\beta$  in Kulturen von humanen und Mäuse-Astrozyten eine Steigerung der ApoE-Synthese <sup>68,69,72</sup>.

Nach einer Verletzung des ZNS werden die Astrozyten aktiviert, d.h. der protoplasmatische ruhende Zustand geht in einen reaktiven über, der große Unterschiede bezüglich Expression und Sekretion diverser Proteine aufweist. Aktivierte Astrozyten sind entscheidend am Abbau von degenerierenden Axonen beteiligt. Die Regulation der ApoE-Synthese scheint mit der Art und dem Ort der Verletzung sowie dem Ausmaß der neuronalen Degeneration zu variieren. Möglicherweise wird die ApoE-Synthese in Astrozyten erst aktiviert, wenn sich in der unmittelbaren Umgebung große Mengen an Myelinabfallprodukten angesammelt haben <sup>74</sup>. Chemisch induzierte Hirnschädigungen und ischämische zerebrale Läsionen führen im Tierversuch (Ratten, Wüstenspringmäuse) zu einer gesteigerten ApoE-Expression <sup>69,73-76</sup>. Üblicherweise kommt die ApoE-Expression in Astrozyten nach einer Verletzung des ZNS nach maximal einer Woche völlig zum Erliegen <sup>74,77</sup>. Die unausgesetzte Aktivierung der Astrozyten, wie z.B. im Falle neurodegenerativer Erkrankungen, könnte dazu führen, daß die optimalen ApoE-Konzentrationen durch die Astrozyten nicht mehr aufrechterhalten werden können.

Bei bezüglich des ApoE-Gens heterozygoten Individuen ist das Verhältnis der Mengen der vorhandenen mRNAs der beiden Allele üblicherweise konstant <sup>78</sup>. Ist jedoch die relative Expression von ApoE  $\epsilon 4$ -mRNA gesteigert, so kann dies ein Indiz für die Alzheimer Krankheit sein. Auch nach Verletzungen des Nervensystems kann das Allel-Verhältnis der ApoE-mRNAs gestört sein <sup>79</sup>.

*In vitro* wird die ApoE-Expression bei Stimulation mit Lipopolysacchariden (so kann eine virale Infektion im Labor nachgeahmt werden) stark reduziert. Wenn dem Medium kein Serum zugesetzt wird, ist oft gar keine oder eine stark verminderte ApoE-Sekretion zu beobachten <sup>68</sup>.

Obgleich Astrozyten, Oligodendrozyten und Makrophagen als die primären ApoE-Produzenten im Nervensystem angesehen werden, zeigen neuere Forschungsergebnisse, daß auch neuronale Zellen unter gewissen Umständen ApoE produzieren können <sup>71,78,80,81</sup>. Über die Regulation der ApoE-Synthese in dieser Zellpopulation ist nur wenig bekannt. Bei Menschen und anderen Primaten ist anhand von immunhistochemischen Studien eine ApoE-Synthese in mehreren Klassen von Neuronen nachgewiesen worden, wobei diese vornehmlich im Zellsoma erfolgt. Sie ist wesentlich schwächer als die intensiven ApoE-Synthese-prozesse in den umgebenden Gliazellen, die dort auch in den Zellfortsätzen stattfinden <sup>82</sup>. *In vitro* bewirkt die Inkubation mit Nerve Growth Factor eine Steigerung der ApoE-Expression in Neuroblastoma-Zellen, während extrazellulär vorhandenes ApoE die Synthese hemmt. ApoE 4 senkt die ApoE-Synthese am effektivsten, ApoE 2 wirkt diesbezüglich schwächer als ApoE 3 <sup>71</sup>.

## **1.5 ApoE-Isoformen zeigen im Nervensystem charakteristische Effekte**

### **1.5.1 Die ApoE-Isoformen modifizieren das Wachstum von Neuriten**

Die rezeptorvermittelte Koppelung und Endozytose von ApoE enthaltenden VLDL-Partikeln spielt eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel des ZNS und bei der Regeneration von peripheren Nerven. *In vitro*-Versuche zeigten, daß die verschiedenen ApoE-Allele das Wachstum von Neuriten deutlich modifizieren. Die Zugabe von cholesterinreichen VLDL-Partikeln zu den Nervenzellen führt zu einer starken Verzweigung der Neuriten. Wird demselben Ansatz noch ApoE 3 zugefügt, so wird das (gerichtete) Längenwachstum stimuliert und die Verzweigung der Neuriten gehemmt. Bei Zugabe von VLDL und

ApoE 4 hingegen werden sowohl Längenwachstum als auch Verzweigungsvorgänge erschwert. Dieses unterschiedliche Verhalten wird möglicherweise durch eine veränderte ApoE-Rezeptor-Wechselwirkung verursacht <sup>83,84</sup>.

#### 1.5.2 Die ApoE-Isoformen modifizieren die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke

Lösliches (monomeres), im Blut zirkulierendes Amyloid  $\beta$  wird beim Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke zur Hälfte abgebaut, im Komplex mit ApoE 4 hingegen passiert es diese Barriere intakt. In Form eines extrazellulären polymeren Protein-Polysaccharid-Komplexes lagert sich Amyloid  $\beta$ , das dominierende Protein der charakteristischen Läsionen der Alzheimer Krankheit, in den typischen „Plaques“ im ZNS-Parenchym ab. Die Plaque-Bildung im Gehirn steigt mit der Häufigkeit des Allels  $\epsilon 4$ ; möglicherweise verstärkt ApoE 4 die Tendenz zur Bildung von senilen Plaques durch Ablagerung von Amyloid  $\beta$ , weil lösliches Amyloid  $\beta$  in größeren Mengen die Blut-Hirn-Schranke passiert <sup>84,85</sup>. ApoE 4 und Amyloid  $\beta$  bilden *in vitro* einen stabilen Komplex, während die Wechselwirkung zwischen ApoE 3 und Amyloid  $\beta$  hingegen weit weniger stark ist <sup>84</sup>. ApoE 2 und ApoE 3 bremsen den Transport von Amyloid  $\beta$  in das ZNS, somit kann diesen beiden Proteinen ein gewisser neuroprotektiver Effekt zugeschrieben werden <sup>85</sup>.

#### 1.5.3 ApoE4 begünstigt die Entstehung pathologischer Strukturen im Zytoplasma von Nervenzellen

Das im ZNS und im peripheren Nervensystem ubiquitär vorhandene Tau-Protein ( $\tau$ -Protein), ist vorwiegend in den Axonen lokalisiert. Dieses Protein besitzt drei bis vier Bindungsstellen für Tubulin, das Hauptprotein der Mikrotubuli (es bildet röhrenförmige Strukturen zur Zellstabilisierung und zum intrazellulären „axonalen“ Transport). Bestimmte Aminosäure-Reste des  $\tau$ -Protein sind stets phosphoryliert. Ist jedoch das Gleichgewicht zwischen Protein-Kinasen und Protein-Phosphatasen gestört, so kann es zu einer Hyperphosphorylierung kommen. Hyperphosphoryliertes  $\tau$ -Protein besitzt eine verminderte Bindungsaffinität für Mikrotubuli, dadurch wird das Zytoskelett

destabilisiert und der axonale Transport behindert.  $\tau$ -Protein in hyperphosphoryliertem Zustand wurde vor allem in faserartigen helikalen Strukturen im Zytoplasma von Neuronen (paired helical filaments) nachgewiesen, die neben den senilen Plaques als typische Läsionen der Alzheimer Krankheit gelten <sup>84</sup>.

ApoE 2 und ApoE 3 verhindern wahrscheinlich durch Anlagerung an das  $\tau$ -Protein die Bildung von paired helical filaments, dadurch werden die Bindungsstellen für die Mikrotubuli geschützt und die spezifische Koppelung zwischen  $\tau$ -Protein und Mikrotubulin ermöglicht. Im Gegensatz dazu kann ApoE 4 nicht an das  $\tau$ -Protein binden. Wird allerdings ein Serin-Rest innerhalb der Bindungsdomänen für Mikrotubuli im Zuge der Hyperphosphorylierungsprozesse mit einem Phosphatrest versehen, so können sich auch die ApoE-Isoformen E2 und E3 nicht mehr an das  $\tau$ -Protein anlagern <sup>86</sup>.

## **2. Multiple Sklerose**

Im Folgenden soll näher auf die Multiple Sklerose (MS) eingegangen werden, da Patienten mit dieser neurodegenerativen Erkrankung im Mittelpunkt der Liquor-Serum-Datenbank-Studie stehen. Die daneben durchgeführten Zellkultur-Experimente sollen zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von IFN- $\beta$  in der immunmodulatorischen Behandlung von MS-Patienten beitragen.

### **2.1 Was ist Multiple Sklerose?**

Die MS ist eine entzündliche Entmarkungserkrankung des Zentralnervensystems (ZNS = Gehirn und Rückenmark), sie wird auch als Encephalomyelitis disseminata bezeichnet. Die MS kann schubhaft oder chronisch progredient verlaufen. In den charakteristischen MS-Läsionen, sie werden Plaques oder

Demyelinisierungsherde genannt, erfolgt im Laufe eines Entzündungsprozesses ein Abbau der Myelinscheiden (weiße Substanz) der Nerven, während die Zellkörper (graue Substanz) meist unversehrt bleiben<sup>88-90</sup>.

Myelin bildet eine fetthaltige Membran, die den Nervenzellfortsatz (Axon) umgibt und durch Isolationseffekte eine schnellere neuronale Erregungsleitung ermöglicht (50 bis 125 m/s im Gegensatz zu marklosen Nervenfasern mit nur 1 m/s). Die Myelinscheide wird in regelmäßigen Abständen durch die sogenannten Ranvier-Schnürringe unterbrochen, an denen besonders viele Kanäle für den Einstrom von Natriumionen lokalisiert sind. Die Axonmembran besitzt ein negatives Ruhepotential von rund 80 mV, das durch Ionengradienten aufrechterhalten wird (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>). Die Erregungsleitung erfolgt durch die Depolarisierung der Axonmembran, die nur an den nicht durch Myelin geschützten Bereichen erfolgen kann. Ein ankommendes Aktionspotential bewirkt am nächstfolgenden Ranvier-Schnürring eine passive Depolarisierung. Wenn diese einen gewissen Schwellenwert überschreitet, wird der Einstrom von Natriumionen ausgelöst, die Axonmembran depolarisiert und somit der Reiz weitergeleitet („saltatorische“ Erregungsleitung). Die Zerstörung der Myelinscheide bei intaktem Axon führt zu einer Verzögerung der Reizweiterleitung, die sich nach Remyelinisierung weitgehend normalisieren kann, während eine axonale Schädigung zu bleibenden Störungen der Erregungsleitung führt, die die Patienten als nicht reversible Behinderung erleben<sup>91,93</sup>.

Im Verlauf der Erkrankung treten viele („multiple“), im gesamten ZNS verteilte („disseminierte“), unscharf begrenzte Entzündungsherde auf. Nach dem initialen Myelinabbau in der aktiven entzündlichen Phase erfolgt später zum Teil eine Remyelinisierung, zum Teil eine „Narbenbildung“ aus Bindegewebe mit Verhärtung des betreffenden Areals (gr. skleros, hart). Je nach Lokalisation der Plaques und dem Ausmaß der Myelinschädigung treten unterschiedliche neurologische Symptome auf<sup>91,92</sup>.

Die genetische Disposition, die auslösenden Faktoren und die Pathogenese der MS sind nicht vollständig aufgeklärt. Wahrscheinlich wird die MS durch ein Zusammenspiel von genetischer Disposition und umweltbedingten Faktoren verursacht, möglicherweise existieren auch Genorte mit protektiver Wirkung<sup>89-91,94</sup>.

## 2.2 Epidemiologie der Multiplen Sklerose

Die Epidemiologie beschäftigt sich mit der Häufigkeitsverteilung von Krankheiten bezüglich Alter, Geschlecht und geographischer Lokalisation sowie den Faktoren, die die Entstehung und den Verlauf der Krankheit beeinflussen (Determinanten). Unter Zuhilfenahme von statistischen Größen, sogenannten Raten, können auch quantitative Aussagen gemacht werden. Die Raten werden immer für eine bestimmte Bevölkerung und einen festgelegten Zeitraum berechnet.

Die Prävalenzrate gibt die Anzahl der Kranken bezogen auf 100 000 Einwohner an. Die Inzidenzrate gibt die Anzahl der Neuerkrankungen pro Kalenderjahr an<sup>91</sup>. Der Anteil der MS-Patienten an der Gesamtbevölkerung in gemäßigten Breiten beträgt rund 1 - 2 Promille (das entspricht einer Prävalenzrate von 100 - 200 MS-Fällen pro 100 000 Einwohnern). Das durchschnittliche Alter bei Krankheitsbeginn liegt zwischen 20 und 40 Jahren, wobei Frauen rund zwei Jahre früher erkranken als Männer. Pro Jahr treten in etwa 3 - 4 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner auf. Die MS befällt bevorzugt Frauen. Das Verhältnis zwischen den beiden Geschlechtern wird mit 1,8:1 angegeben (die geschlechtsspezifische Prävalenz liegt bei 137,1 Fällen/100 000 Einwohnern für Frauen und 82,0 Fällen/100 000 Einwohnern für Männer)<sup>89,91</sup>.

Die Prävalenz zeigt eine geographische Abhängigkeit: es wird eine Zunahme der Prävalenz mit steigendem Abstand vom Äquator beobachtet. In Europa und Nordamerika ist ein deutliches Nord-Süd-Gefälle vorhanden, ebenso in Asien, wo allerdings um den Faktor 10 geringere Prävalenzen beobachtet

werden <sup>91</sup>. Eine Studie hat eine Korrelation zwischen der Häufigkeit der MS und den Schifffahrtsrouten der Wikinger beschrieben (möglicherweise ist ein „nordisches Gen“ an der Krankheitsentstehung beteiligt) <sup>92</sup>.

Es bestehen auch Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit je nach Zugehörigkeit zu ethnischen Gruppen: die MS ist bei den Eskimos, Bantu-Stämmen, Maori und ungarischen Zigeunern praktisch nicht bekannt, bei den Orientalen ist sie zehnmal seltener als in Nordeuropa <sup>89,91</sup>.

### 2.3 Plaques – MS-Läsionen im ZNS

Plaques sind disseminiert verteilte, großflächige Entmarkungsherde, die häufig ineinander übergehen und manchmal fingerförmige Ausläufer entlang größerer Gefäße in die umgebende weiße Substanz aufweisen. Die Herde sind aufgrund gliöser Narbenbildung (durch Wucherung der Zellfortsätze der Astrozyten, die für den Stoffaustausch zwischen Nervenzellen und Blutgefäßen verantwortlich sind) von harter Konsistenz. Die Plaques können überall im Gehirn und Rückenmark auftreten, manifestieren sich aber bevorzugt in der Umgebung von Blutgefäßen <sup>89-91</sup>.

In den Läsionen kommt es während der aktiven (entzündlichen) Phase zum Verlust der Markscheiden und zur drastischen Reduzierung der Oligodendroglia (das sind kleine, wenig verzweigte Zellen, die vor allem während der Markscheidenreifung Myelin bilden), die Axone hingegen bleiben zu Beginn der Erkrankung von den Degenerationsprozessen verschont. Die granulären Abbauprodukte des Myelins werden von Makrophagen aufgenommen und abgebaut. Im Rahmen der entzündlichen Prozesse wird die Blut-Hirn-Schranke durchlässig, dadurch können Entzündungszellen ins ZNS einwandern (aktivierte T-Lymphozyten passieren wahrscheinlich unter Mitwirkung von Adhäsionsmolekülen die Blut-Hirn-Schranke). In aktiven Entmarkungsherden finden sich zahlreiche Zellen des Immunsystems, z.B. Lymphozyten und Plasmazellen, aber auch Makrophagen und Monozyten (im Blut befindliche, zur Phagozytose befähigte Zellen, die sich nach der Auswanderung in das ZNS

zu ortsständigen gewebetypischen Makrophagen ausdifferenzieren) sind hier anzutreffen. Die phagozytierenden Zellen exprimieren Klasse-II-Histokompatibilitäts-Antigene (dadurch wird in weiterer Folge die zelluläre Immunantwort ermöglicht). Ebenfalls im Herd befindliche Plasmazellen synthetisieren Immunglobuline (Antikörper) wie IgG, IgM und IgA. Die entzündlichen Infiltrate in den Läsionen enthalten vorwiegend verschiedene Arten von T-Lymphozyten: T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>-Zellen) finden sich bevorzugt in den Entmarkungszonen, T-Killer-Zellen (CD8<sup>+</sup>-Zellen) im Herdzentrum. Bei MS-Patienten werden regelmäßig autoreaktive T-Zellen, die gegen körpereigene Proteine gerichtet sind, im Blut und Liquor cerebrospinalis nachgewiesen, weswegen die MS als sogenannte Autoimmunerkrankung angesehen wird <sup>89,91,95-97</sup>.

Die Zellen der Immunabwehr kommunizieren über die Ausschüttung gewisser hormonähnlicher Substanzen, der Zytokine oder Lymphokine (z. B. Interleukine, Interferone, Tumor-Nekrose-Faktor), die über komplizierte Feedback-Mechanismen deren Aktivierung und Differenzierung steuern. Die Entzündungsreaktion spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung neuer Herde. Ob die myelinproduzierenden Oligodendrozyten das bevorzugte Ziel der Autoimmunreaktion sind, oder vielmehr als Folge des Myelinabbaus degenerieren, ist noch ungeklärt. Zusammenfassend kann die MS als „T-Zell-vermittelte“ Autoimmunerkrankung bezeichnet werden.

Chronisch aktive Plaques zeigen zusätzlich zu den Anzeichen der andauernden Entzündung oxidative Schädigungen der DNA, die wiederum mit der Verteilung der aktivierten Microglia und der aktivierten Makrophagen zu korrelieren scheinen. Immunmediatoren wie die Tumornekrose-Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$ , die zur Pathogenese der MS beitragen, und die bei MS nachgewiesene erhöhte Bildung von Stickstoffoxid fördern die Entstehung reaktive Sauerstoffradikale ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ) <sup>98</sup>.

In den Randgebieten der Plaques sind nach einiger Zeit manchmal dünne Markscheiden zu beobachten, die durch Remyelinisierung entstanden sind. Die hierfür benötigten Oligodendrozyten sind entweder während der initialen Entmarkungsphase verschont geblieben, später aus der Umgebung „einge-

wachsen“ oder aber aus Stammzellen neu entstanden<sup>89-91,95,96</sup>. In den Bereichen, wo lokal eine Myelinsynthese stattfindet, trägt der ApoE-vermittelte Lipidtransport zur Reparatur und Neusynthese der Myelin-Membranen bei<sup>17</sup>.

## 2.4 Genetische Aspekte

Im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten sind häufig eine erhöhte Zellzahl (90% Lymphozyten) und Immunglobuline nachzuweisen<sup>89,91</sup>. Das deutet darauf hin, daß Immunzellen ins ZNS gelangen konnten; ein Vorgang, der normalerweise zuverlässig durch die Blut-Hirn-Schranke verhindert wird. Daher kann angenommen werden, daß für MS disponierende Gene in irgendeiner Weise an der Immunantwort beteiligt sind. Wahrscheinlich ist außerdem die Unterscheidung des Immunsystems zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“ beeinträchtigt, da in Blut und Liquor von MS-Patienten regelmäßig gegen körpereigene Antigene gerichtete Antikörper bzw. T-Zellen gefunden werden<sup>89,91,99-101</sup>.

Das ZNS ist im gesunden Körper durch die Blut-Hirn-Schranke von Immunsystem nahezu vollständig abgetrennt. Die Blut-Hirn-Schranke ist dreischichtig aufgebaut: die Tight Junctions (eng verbundene Endothelzellen, die die Hirn- und Rückenmarksarterien auskleiden) werden durch die Basalmembran und ein dichtes Netzwerk aus Astrozytenfortsätzen verstärkt. Darüber hinaus besitzt das ZNS keine Verbindung zum lymphatischen System, daher können körperfremde Antigene auch auf diesem Wege nicht in dieses Organ eindringen. Wenn jedoch entzündliche Prozesse die Blut-Hirn-Schranke durchlässig machen (Schrankenstörung), können aktivierte T-Lymphozyten (besonders wenn sie gegen Antigene des ZNS gerichtet sind) die Blut-Hirn-Schranke passieren. Weitere Aktivierungs- und Proliferationsprozesse können die Einwanderung anderer Zellen des Immunsystems begünstigen und eine protrahiert ablaufende Immunreaktion einleiten, die sich als lokale Entzündung in verschiedenen Hirnregionen manifestiert (vergleiche Abschnitt 2.3).

Das HLA-System ist eine wichtige Komponente bei der Induktion der zellulären Immunantwort und durch die große genetische Variabilität der entsprechenden Gen-Loci gekennzeichnet. Von Makrophagen (Monozyten) und B-Lymphozyten werden Bruchstücke von Antigenen (sogenannte Epitope) „präsentiert“. Patrouillierende, für das betreffende Epitop spezifische T-Lymphozyten werden dadurch weiter aktiviert und lösen durch Sekretion von Lymphokinen eine Immunantwort aus. T-Zellen können Antigene aber nur erkennen, wenn sie gemeinsam mit den körpereigenen HLA-Antigenen (auch als major histocompatibility complex MHC bezeichnet) dargeboten werden. Diese HLA-Proteine sind genetisch überaus polymorph, jedes Individuum verfügt über einen charakteristischen unverwechselbaren Satz dieser „Präsentier-teller“. Es existieren zwei Untergruppen der HLA-Antigene: Klasse I-HLA-Moleküle werden von T-Killer-Zellen erkannt und werden von fast allen Zellen (ausgenommen jedoch von denen des ZNS) exprimiert; Klasse II-HLA-Moleküle dagegen finden sich nur auf Zellen mit direkter immunologischer Funktionen (die Expression der Klasse II-HLA-Moleküle ist lymphokinabhängig) und treten mit T-Helferzellen in Wechselwirkung. Diese sezernieren Lymphokine und aktivieren Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Killer-Zellen (Induktion der Immunantwort). Das ZNS kann in diesem Fall über die Klasse II-HLA-Proteine mit dem Immunsystem in Kontakt treten<sup>89,91</sup>. Akute und chronische Entzündungsprozesse, wie sie im Verlauf der MS auftreten, sind durch eine Vielfalt an Zytokinen geregelt, die unter anderem auch das Expressionsmuster der Klasse I und II HLA-Moleküle genauso wie dasjenige diverser Adhäsionsmoleküle der Zellmembran verändern<sup>89,90,102,103</sup>.

In verschiedenen ethnischen Gruppen sind meist verschiedene HLA-Typen mit der MS vergesellschaftet. In der kaukasischen Bevölkerungsgruppe vermittelt das HLA-DR2-Allel ein vierfach höheres Risiko für die MS, allerdings sind rund 40% der MS-Patienten HLA-DR2-negativ. Mit der Methode des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) werden neue, serologisch nicht zugängliche Abschnitte und bis jetzt nicht bekannte Zusammenhänge zwischen bestimmten Genorten und der MS untersucht. Da die Immunantwort nicht nur durch die Gene des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes

(MHC bzw. HLA) geregelt wird, sind vermutlich noch andere, für die MS disponierende Genorte an der Krankheitsentstehung beteiligt; für die MS-Empfänglichkeit spielen allerdings mit Sicherheit auch Umwelteinflüsse wie z.B. Virusinfektionen eine entscheidende Rolle.

In frischen MS-Läsionen finden sich aktivierte T-Lymphozyten, HLA-DR-exprimierende Zellen und Plasmazellen (ausdifferenzierte B-Zellen), die Autoantikörper gegen Myelinbestandteile synthetisieren. Die ZNS-Endothelien und Astrozyten exprimieren durch das im Rahmen der Aktivierungsprozesse freigesetzte IFN- $\gamma$  Klasse-II-HLA-Moleküle und sind somit in die Immunreaktion eingebunden<sup>89,91</sup>. Aktivierte Astrozyten können jedoch auch selbst Lymphokine sezernieren. Durch die Wechselwirkungen zwischen Lymphozyten und den antigen-präsentierenden Zellen wird die Immunantwort in Gang gesetzt, über Lymphokinausschüttung erfährt das Zusammenwirken der autoimmunologischen Entzündungsmechanismen seine Feinabstimmung.

## 2.5 Hypothesen zur Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die auslösenden Faktoren sind ebenso wie die Pathogenese der MS noch nicht geklärt. Es existieren jedoch Hinweise, die ein Zusammenspiel von genetischer Disposition (HLA-System und andere zum Teil noch nicht identifizierte Gene) und umweltbedingten Einflüssen (Infekte, emotionaler Streß) vermuten lassen<sup>89,91</sup>.

Auf die Bedeutung der Klasse-II-HLA-Genorte wurde bereits in Abschnitt 2.4 hingewiesen. Infektionen im Kindesalter oder in der Pubertät können bei prädisponierten Personen ein Initialereignis für die MS-Entstehung darstellen, sofern bei dieser Gelegenheit ein Durchlässigwerden der Blut-Hirn-Schranke gegeben war (Sensibilisierung). Später kann durch einen exogenen Faktor wie eine neuerliche Infektion oder emotionalen Streß die MS manifest werden, indem die vorher gebildeten, gegen körpereigene Epitope (im ZNS) gerichteten Immunzellen aktiviert werden und eine übersteigerte Immunantwort (sekundäre Hypersensitivitätsreaktion) auslösen<sup>89,91</sup>.

## 2.6 Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

So vielfältig sich die Symptomatik der MS (siehe Abschnitt 2.7) je nach der Lokalisation der Plaques präsentiert, so unterschiedlich kann sich diese Krankheit über die Jahre entwickeln. Die MS kann entweder schubförmig verlaufen oder aber sich kontinuierlich weiter verschlechtern. Daneben existieren äußerst gutartige und sogenannte maligne Krankheitsformen <sup>89,91</sup>.

Die von den MS-Symptomen verursachte funktionelle Beeinträchtigung bzw. der Behinderungszustand der MS-Patienten kann durch eine charakteristische Maßzahl, den EDSS-Score, abgeschätzt werden (siehe auch Abschnitt 2.7) <sup>104</sup>. Als Progressionsindex bezeichnet man das Verhältnis von EDSS-Score zur Dauer der MS in Jahren <sup>168</sup>.

### 2.6.1 Schubförmige MS

Ein Schub wird definiert als das Auftreten von neuen oder das Wiederauftreten von alten Krankheitssymptomen, die über mindestens 24 bis 48 Stunden (bis maximal 12 Monate) bestehen bleiben <sup>89-91</sup>. In der Zeit zwischen den Schüben tritt eine Besserung der Symptome ein oder sie verschwinden sogar gänzlich (Remission). Dieser Krankheitsverlauf wird im angloamerikanischen Sprachraum als „relapsing-remitting“ (RR) bezeichnet. Knapp die Hälfte der MS-Patienten zeigt einen schubförmigen Verlauf, wobei der mittlere Progressionsindex bei 0,4 liegt.

### 2.6.2 Primär chronisch progrediente MS

Die primär chronisch progrediente Verlaufsform (PCP) ist durch eine langsame, aber kontinuierliche Verschlechterung der Symptome gekennzeichnet, der durchschnittliche Progressionsindex beträgt 1,1. Ungefähr 15 % aller MS-Patienten zeigen diesen Krankheitsverlauf.

### 2.6.3 Sekundär chronisch progrediente MS

Als sekundär chronisch progredient (SCP) wird eine Krankheitsform bezeichnet, die anfangs durch Jahre hindurch schubförmig verläuft und später in ein chronisch progredientes Stadium übergeht (ca. 30 % aller MS-Erkrankungen). Der Übergang von der schubförmigen in die sekundär chronisch progrediente Verlaufsform geht oftmals mit einer deutlichen Erhöhung des Progressionsindex einher.

### 2.6.4 Benigne MS

Die benigne Verlaufsform schreitet besonders langsam fort (der durchschnittliche Progressionsindex bleibt unter 0,1), sie tritt in rund 5 % aller MS-Erkrankungen auf. Im Extremfall wird die Diagnose MS post mortem pathologisch-anatomisch gestellt, ohne daß zu Lebzeiten Symptome aufgetreten wären. Durch das sehr empfindliche bildgebende Verfahren der Magnetresonanztomographie (Magnetic Resonance Imaging MRI) können sogar „stumme“ Läsionen bei klinisch gesunden Probanden (*in vivo*) erfaßt und dokumentiert werden.

### 2.6.5 Maligne MS

Als maligne werden solche Verläufe bezeichnet, die innerhalb von fünf Jahren zum Tode oder zu schwersten Behinderungen führen. Rund 5 % aller MS-Patienten zeigen dieses Krankheitsbild, der durchschnittliche Progressionsindex liegt im Bereich von 3,0.

## 2.7 Die Symptomatik der Multiplen Sklerose

Die Anzahl und Ausdehnung der Demyelinisierungsherde oder Plaques ist für die Symptomatik der MS weniger ausschlaggebend als die Lokalisation<sup>89,91</sup>.

- Ist der Sehnerv (Opticusneuritis) von MS-Läsionen betroffen, so kommt es zu Verschwommensehen oder einer vollständigen, meist jedoch reversiblen Erblindung.
- Ist der Hirnstamm (das ist die Verbindung zwischen Gehirn und Rückenmark) von einem MS-Herd befallen, können folgende Symptome auftreten: Trigeminusneuralgie (einseitige, spontan auftretende Schmerzattacken im Gesicht), Gesichtslähmung, Schwindelattacken, Sprachstörungen, Ataxie.
- Befinden sich Plaques im Kleinhirn, so treten u.a. Koordinationsstörungen auf: der Intentionstremor erschwert gezielte Bewegungen, weiters können Unsicherheiten beim Gehen und Stehen (Ataxie) auftreten.
- Ist das Rückenmark von den MS-Läsionen betroffen, können grundsätzlich zwei verschiedene Symptomgruppen in Erscheinung treten. Einerseits sind Störungen der Gefühlswahrnehmung (Parästhesien, Hyp- und Dysästhesien) möglich, die sich als Kribbeln, Taubheitsgefühl oder Schmerz in den Extremitäten oder am Stamm manifestieren. Andererseits kann durch im Rückenmark gelegene Herde der Tonus der Muskeln beeinflusst werden. Typischerweise wird die Bewegungsfähigkeit durch eine permanente krampfartige Anspannung der Muskeln eingeschränkt (spastische Para-; Hemi- oder Tetraparese; eine vollständige Lähmung heißt Plegie). Weiters können verschiedenartige Blasen- und Mastdarmstörungen auf Plaques zurückgehen, die im Rückenmark lokalisiert sind.

Neben diesen organischen Störungen treten im Verlauf der MS auch psychische Beeinträchtigungen wie Depressionen oder im Gegenteil eine euphorische Anhebung der Stimmung auf. Darüber hinaus leiden viele MS-Patienten an anhaltender Müdigkeit und dem Phänomen, daß sich alle ihre Symptome bei hohen Umgebungstemperaturen oder Fieber drastisch verschlechtern können.

### 2.7.1 EDSS-Score zur Beschreibung des Behinderungszustandes von MS-Patienten

Seit rund 40 Jahren versuchen die Neurologen, das Ausmaß der funktionellen Einschränkungen und den Behinderungszustand der MS-Patienten durch eine Maßzahl auszudrücken. Der MS-Forscher Kurtzke regte an, Symptome, die einzelnen funktionellen Systemen des ZNS zugeordnet werden können, nach dem Schweregrad zu klassifizieren (von 0 = normal bis 6 = gravierend) und daraus einen charakteristischen Zahlenwert zu errechnen. Die Beurteilungskriterien wurden im Laufe der Zeit verfeinert, die Berechnungsmethoden modifiziert. Seit 1983 existiert der sogenannte Expanded Disability Status Scale oder kurz EDSS-Score <sup>104</sup>. Der EDSS-Score ist eine Summenzahl, die sich aus dem Grad der Beeinträchtigung in sechs funktionellen Systemen ergibt: Pyramidenbahn (Muskelkraft), Kleinhirn (Koordination), Hirnstamm (Augenbeweglichkeit, Mimik, Sprache u.a.m.), sensible Afferenzen (Oberflächen- und Tiefensensibilität, Schmerz- und Temperaturempfinden), Blase/Mastdarm (Urinieren, Stuhlgang), zerebrale Funktionen (Antrieb, Denken). Der EDSS-Score beginnt bei 0 (keine Beeinträchtigung) und steigt in Schritten von 0,5 Punkten bis zum Maximalwert von 10 (Tod durch MS-Symptome) an. Die Bestimmung des EDSS-Scores (vereinfacht) ist aus der Tab. 2.1 ersichtlich <sup>105</sup>.

Tab 2.1. Der EDSS-Score beschreibt das Ausmaß der Beeinträchtigung von MS-Patienten

Behinderungsstatus	EDSS
Normale neurologische Befunde	0,0
Keine Behinderung, Beeinträchtigung in 1 FS	1,0
Keine Behinderung, Beeinträchtigung in > 1 FS	1,5
Minimale Behinderung, Beeinträchtigung in 1 FS	2,0
Minimale Behinderung, Beeinträchtigung in > 1 FS	2,5
Uneingeschränkt gehfähig, leichte bis mäßige Behinderung	3,0
Uneingeschränkt gehfähig, mäßige Behinderung	3,5
Gehfähig für mindestens 500 m	4,0
Gehfähig für mindestens 300 m, ganztägig arbeitsfähig, benötigt minimale Hilfe	4,5
Gehfähig für mindestens 200 m, Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivitäten zu beeinträchtigen	5,0
Gehfähig für 100 m, normale tägliche Aktivität unmöglich	5,5
Mit einseitiger Unterstützung 100m gehfähig oder > 100 m mit beidseitiger Unterstützung	6,0
Benötigt beidseits Hilfsmittel um 20 m zu gehen, oder zwischen 10 und 100 m mit beidseitiger Unterstützung, oder < 50 m mit einseitiger Hilfe	6,5
Unfähig mehr als 5 m zu gehen, rollstuhlpflichtig, bewegt Rollstuhl selbst, transferiert ohne Hilfe	7,0
Unfähig mehr als ein paar Schritte zu gehen, an den Rollstuhl gebunden, benötigt Hilfe zum Transfer, bewegt Rollstuhl selbst	7,5
Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden, pflegt sich weitgehend selbständig, nützlicher Gebrauch der Arme	8,0
Weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages, einiger nützlicher Gebrauch der Arme, einige Selbstpflege	8,5
Hilflos, kann essen und kommunizieren	9,0
Gänzlich hilflos	9,5

FS: funktionelles System wie etwa Pyramidenbahn, Sensible Afferenzen, Kleinhirn etc.

Die sogenannte Inter-Rater-Variability, d.h. der mittlere Unterschied bei der Festlegung des EDSS-Scores eines Patienten durch mehrere Untersucher zum selben Zeitpunkt, beträgt rund einen Punkt. Ein weiterer Nachteil des EDSS-Scores liegt in der Betonung der funktionellen Beeinträchtigungen, die die Fortbewegung betreffen. Andere Symptome werden in geringerem Umfang

berücksichtigt. Es muß darauf hingewiesen werden, daß der Abstand zwischen den einzelnen EDSS-Scores nicht gleich ist, d.h. eine Steigerung des EDSS-Scores von 5 auf 7 entspricht beispielsweise einer größeren relativen Zunahme der Beeinträchtigung des Patienten als eine Zunahme von EDSS 1 auf EDSS 3.

## 2.8 Diagnose der MS

Die Diagnose der MS wird vorwiegend aufgrund anamnestischer Angaben (die MS gilt erst als gesichert, wenn die Anzeichen zweier Schübe oder mindestens zwei MS-Läsionen vorliegen) und klinischer Befunde gestellt und kann durch Laboruntersuchungen wegen der fehlenden Spezifität nur schlecht abgesichert werden<sup>106,107</sup>. Bei rund 85% der MS-Patienten kann die Diagnose durch folgende auffällige Befunde bei Laboruntersuchungen bestätigt werden: Nachweis MS-typischer Läsionen mittels der Magnetresonanztomographie, erhöhter IgG-Index und/oder „oligoklonale Banden“ im Liquor cerebrospinalis.

Der mit der MS (noch) am besten korrelierende Laborparameter ist das Auftreten der sogenannten „oligoklonalen Banden“ im Liquor cerebrospinalis. Bei intrathekaler IgG-Synthese produzieren einige B-Zell-Klone große Mengen an Antikörpern, die mittels Isoelektrischer Fokussierung als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Allerdings wird eine intrathekale Immunglobulin-Synthese auch bei chronischen Infektionen des ZNS beobachtet, bei der MS indes ist der IgG-Anteil dieser Banden besonders hoch<sup>89,91</sup>.

Ein weiterer wichtiger Befund, die Erhöhung der Zellzahl im Liquor cerebrospinalis, ist vor allem durch das Auftreten autoreaktiver T-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen bedingt.

Daneben finden sich bei vielen MS-Patienten Befunde in der Magnetresonanztomographie des Gehirns und des Rückenmarks, die auf Demyelinisierungsherde hinweisen, und Latenzerhöhungen bei elektrophysiologischen Untersuchungen wie den visuell und den somatosensorisch evozierten Potentialen.<sup>89,91,107</sup>

## 2.9 Apolipoprotein E, Interferone und Multiple Sklerose

Der ApoE-Polymorphismus bedingt funktionelle Charakteristika, die mit unterschiedlicher Tendenz zu neurodegenerativen und demyelinisierenden Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (vergleiche Abschnitte 1.2.2 und 1.4.2). Bei vielen entzündlichen Erkrankungen des ZNS sind erhöhte ApoE-Konzentrationen zu beobachten. Bei MS-Patienten hingegen wurden erniedrigte ApoE-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis sowie eine Verringerung der intrathekalen ApoE-Produktion nachgewiesen<sup>33,108</sup>. Gleichzeitig ist aber die ApoE-Konzentration in Serum signifikant erhöht<sup>37</sup>. Möglicherweise kann so eine Beeinträchtigung der Remyelinisierung (durch einen Mangel an Cholesterin zum Aufbau der Myelinmembran) erklärt werden, indem der Ablauf der Reparaturmechanismen gestört ist und somit die MS rasch fortschreitet<sup>108</sup>. Der ApoE-Index gibt die Verteilung des ApoE zwischen Liquor und Serum an, er kann als Hinweis für das Vorliegen eines akuten Schubes angesehen werden oder aber eine Remission anzeigen<sup>37,45,47</sup>. Der mittlere ApoE-Index im Liquor ist in der Remissionsphase der MS vierfach erhöht (verminderter ApoE-Gehalt im Serum, gesteigerte ApoE-Synthese im ZNS).

Bei der Regeneration der Markscheide in den Randgebieten der Plaques werden Fette, insbesondere Cholesterin, zum Aufbau der Myelinmembran benötigt. Die beim Myelinabbau freigesetzten Fette werden von Makrophagen gespeichert, wobei die Anhäufung von Cholesterin als Induktor für die ApoE-Synthese wirkt. Die Schwann-Zellen, die im peripheren Nervensystem Myelin produzieren, exprimieren während der Regeneration und Remyelinisierung eines verletzten Nerven eine äußerst große Anzahl an LDL-Rezeptoren, an die ApoE koppeln kann<sup>17</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, daß ApoE nach einer Verletzung neuronaler Strukturen verstärkt exprimiert wird<sup>6,17</sup>. Dieser Sachverhalt ermöglicht einen gerichteten Lipidtransport zu den Arealen, in denen eine massive Neusynthese der Myelinmembran stattfindet (vergleiche Abschnitte 1.2.2 und 1.4). Möglicherweise wird die Effizienz der Remyelinisierung (und in weiterer Folge der Krankheitsverlauf der MS) einerseits durch den ApoE-Genotyp und andererseits vom Ausmaß der ApoE-Synthese und

ApoE-Expression beeinflusst. Jedoch konnte bei der Multipen Sklerose (MS) bis dato keine vom Normalkollektiv abweichende Allel-Verteilung nachgewiesen werden <sup>37,40</sup>.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich die klinische Progressionsrate von 70 an relapsing-remitting MS leidender Patienten im Hinblick auf die ApoE-Genotypverteilung untersucht <sup>30</sup>. Die klinische Progressionsrate und die Schubfrequenz waren bei Patienten mit dem ApoE-Genotyp  $\epsilon 3/3$  kleiner als bei Patienten mit anderen Genotypen. Die Ergebnisse dieser kleinen Pilotstudie wurden durch die Resultate einer österreichischen 374 MS Patienten umfassenden Multicenter-Studie bestätigt <sup>31</sup>.

### 2.9.1 Auswirkungen von IFN- $\beta$ und IFN- $\gamma$ auf die Aktivität der MS

IFN- $\beta$  wirkt generell eher entzündungshemmend und antiproliferativ, daher wird es als immunmodulatorische Therapie bei schubförmiger und sekundär progredienter MS eingesetzt <sup>109-115</sup> (siehe auch Abschnitt 2.10). Da nun der klinische Verlauf der MS in Abhängigkeit vom ApoE-Genotyp variiert, bleibt noch zu klären, ob auch die klinischen und zellulären Effekte der IFN- $\beta$ -Therapie (bzw-Stimulation) in Patienten oder (neuronalen und astrozytären) Zellkulturen je nach ApoE-Genotyp unterschiedlich ausfallen oder ob die Wirksamkeit dieser Therapie nur von anderen Faktoren bestimmt wird (siehe auch Abschnitt 2.10). In astrozytären Zellkulturen von Mensch und Maus bewirkt IFN- $\beta$  eine Steigerung der ApoE-Sekretion, während IFN- $\gamma$  eine Hemmung hervorruft <sup>68,69,72</sup>. Es ist jedoch bekannt, daß die Schubfrequenz durch IFN- $\gamma$  erhöht und das Fortschreiten der MS beschleunigt wird <sup>109,110,116</sup>. Die Konzentration von IFN- $\gamma$  im Liquor von MS-Patienten scheint erhöht zu sein und könnte vielleicht als Indikator oder Anzeichen eines nahenden Krankheitsschubes gewertet werden (ähnlich auch der Tumornekrose-Faktor  $\alpha$ ) <sup>88-90,117,118</sup>. IFN- $\gamma$  stimuliert die Synthese von MHC Klasse I Molekülen, Adhäsionsmolekülen der Zelloberfläche und in geringerem Ausmaß auch von MHC Klasse II Molekülen; wohingegen die Expression von für die Myelinsynthese benötigten Genen in Oligodendrozyten herabgesetzt wird <sup>103,119</sup>. Adhäsionsmoleküle wie z. B. Intercellular Adhesion Molecule 1

(ICAM-1) dürften die Passage der T-Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS erleichtern, und dort werden Monozyten/Makrophagen sowie die Mikroglia durch Anwesenheit von IFN- $\gamma$  und anderen Zytokinen aktiviert <sup>89</sup>. Aufgrund seiner mitogenen Eigenschaften fördert IFN- $\gamma$  die Proliferation in Zellkulturen von humanen Astrozyten; ähnliche Mechanismen können *in vivo* die Gliosebildung begünstigen <sup>103</sup>. In gemischten Zellkulturen bestehend aus neuronalen Zellen und Gliazellen (Maus) scheint IFN- $\gamma$  sogar neuronale Zellen zu schädigen <sup>120</sup>.

In kultivierten mononukleären Zellen, die aus dem peripheren Blut isoliert wurden (PBMC; aus dem buffy coat von gesunden Blutspendern gewonnen), wirken sowohl IFN- $\beta$  als auch IFN- $\gamma$  hemmend auf die ApoE-Expression, wobei IFN- $\gamma$  auch die ApoE-Sekretion dosisabhängig senkt, unabhängig davon, ob auch IFN- $\beta$  im Ansatz vorhanden ist <sup>33</sup>. Es scheint sogar ein gewisser synergistischer Effekt in Anwesenheit beider Zytokine zu bestehen. Der Abfall in den ApoE-Konzentrationen könnte eine schwere Beeinträchtigung der Regenerationsprozesse bedeuten. Die Verminderung der ApoE-Sekretion war unabhängig vom ApoE-Genotyp zu beobachten <sup>33</sup>.

#### 2.9.2 Weitergabe der von IFNs transportierten Information - IFN-Signalling

Die Weitergabe von extrazellulär eintreffenden Signalen an die korrespondierenden intrazellulären Wirkungsorte wird durch ein weitläufiges Netzwerk interagierender Proteine bewerkstelligt. Diese „Informationshighways“ (signalling pathways) sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie z.B. Proteinexpression, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (von der Zelle selbst veranlaßter Zelltod, „Selbstmord“). Einer der wichtigsten und am meisten benutzten Wege ist die (mitogen activated protein kinases) MAPK-Signal-Kaskade, die offenbar sogar auf mehreren, teilweise überlappenden Routen beschritten werden kann <sup>121,122</sup>. Wachstumsfaktoren, Zytokine und viele andere Proteine binden an ihre spezifischen membrangebundenen Rezeptoren an der Zelloberfläche und triggern eine Fülle intrazellulärer Vorgänge. Über die Phosphorylierung von Rezeptoren und die Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen (ebenfalls durch Phosphorylierung) werden die

Signale zu regulatorischen Molekülen in Zytoplasma oder im Kern weitergeleitet. Darüber hinaus können auch Streßsignale aus der Umgebung, wie z.B. Hitzeschock oder ein Mangel an Wachstumsfaktoren Enzyme der MAPK-Signal-Kaskade aktivieren <sup>123</sup>.

Durch IFNs ausgelöste Transkriptionssignale werden über den JAK/STAT-Weg (JAK: Janus Kinases; STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription) weitergeleitet. Zwei Familien von membrandurchspannenden Rezeptoren, namentlich die Gruppe der Zytokin-Rezeptoren und die Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren aktivieren den JAK/STAT-Weg <sup>124</sup>. Zu den Zytokin-Rezeptoren zählen die IFN- $\alpha/\beta$ - und die IFN- $\gamma$ -Rezeptoren, die aus mehreren Komponenten bestehen, von denen die Ligandenbindungsregion und Signalweiterleitungsdomäne die wichtigsten sind. Die JAKs bilden eine Klasse von löslichen Tyrosinkinasen, bestehend aus Tyk2, Jak1, Jak2 und Jak3. Die JAKs sind an die zytoplasmatischen Domänen der Rezeptorproteine angelagert; sie sind verantwortlich für die Aktivierung der STAT-Proteine, indem sie diese an gewissen Aminosäureresten phosphorylieren. IFN- $\gamma$  bewirkt eine Aktivierung von Jak2, die dann zu einer Phosphorylierung von STAT1 führt. Phosphorylierte STAT1-Proteine dimerisieren und können in den Nukleus übertreten, wo sie an die DNA binden und die Transkriptionsaktivität der betreffenden Gene modifizieren. Die Signaltransmission nach Ankopplung von IFN- $\alpha/\beta$  umfasst die Aktivierung von Tyk2 und Jak1 sowie einige STAT-Proteine. STAT2 wird ausschließlich nach Anregung durch Typ II IFNs (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) aktiviert. Aufgrund der großen Anzahl möglicher Liganden wird die Signalweiterleitung durch Parameter wie die Affinität eines bestimmten STAT-Proteins zum betreffenden Rezeptor-Kinase-Komplex, die Dauer der gesteigerten Transkription und die Homo- oder Heterodimerisation von STAT-Proteinen den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Eine anhaltende Aktivierung der Transkription ist charakteristisch für IFN- $\gamma$ -induzierte Gene <sup>124</sup>.

## 2.10 IFN- $\beta$ -Therapie der MS

Die bis jetzt für die MS angewendeten Therapiekonzepte sind nicht völlig zufriedenstellend – die mäßige Effizienz und das Vorhandensein verschiedener Nebenwirkungen konventioneller Behandlungsmethoden wie z.B. die Gabe von Korticosteroiden veranlassen die Ärzte und Wissenschaftler, die Suche nach neuen Therapieansätzen nicht aufzugeben<sup>88-90,114</sup>. Seit Anfang der neunziger Jahre werden in der MS-Therapie anti-inflammatorische Zytokine eingesetzt, von denen IFN- $\beta$  das prominenteste und am häufigsten angewendete ist<sup>109-115</sup>. Die Familie der Typ I-Interferone umfasst die beiden Gruppen der IFN- $\alpha$ -Proteine (zumindest 18 unabhängige Gene, davon 4 Pseudogene) und der IFN- $\omega$ -Proteine (zumindest 6 Gene, davon 5 Pseudogene) sowie IFN- $\beta$  (ein einzelnes Gen)<sup>125</sup>. Alle binden mit unterschiedlicher Affinität an denselben Rezeptor, der sich aus mehreren Komponenten zusammensetzt und in der Zellmembran lokalisiert ist (siehe auch Abschnitt 2.9.2).

IFN- $\beta$  reduziert die Häufigkeit und die Schwere der Schübe und scheint auch den Fortschritt der Erkrankung zu verlangsamen. Über die Wirkungsweise von IFN- $\beta$  ist bis heute nur wenig bekannt; es scheint das Verhältnis der aktivierten zu den nicht aktivierten T-Lymphozyten zu verschieben und einen Einfluß auf die Migration der T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke hinweg im Verlaufe eines MS-Schubes auszuüben. IFN- $\beta$  wirkt unter gewissen Umständen als Gegenspieler der entzündungsfördernden Zytokine<sup>89,112,114,115</sup>. Einige dieser Zytokine wie beispielsweise IFN- $\gamma$  sind offenbar während eines Schubes erhöht und bewirken unter anderem eine Hemmung der ApoE-Synthese in den Monozyten/Makrophagen, die sich in verstärktem Ausmaß in den aktiven Läsionen finden<sup>33</sup>. Bis jetzt gibt es keine Untersuchungen darüber, ob der ApoE-Genotyp einen Einfluß darauf hat, wie gut sich MS-Patienten von einem Schub erholen.

Besonders wichtig für die Wirksamkeit der Typ I IFNs in der MS-Behandlung scheint die Tatsache zu sein, daß IFN- $\beta$  die Expression von Interleukin-12 (IL-12) hemmt. Andere Therapien wie die Gabe von Korticosteroiden oder intravenös verabreichte Immunglobuline zeigen gleichfalls diesen Effekt.

Im Tiermodell der MS, der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), hat sich das Vorhandensein von IL-12 als entscheidend für die Manifestation und Pathogenese erwiesen (IL-12-Knockout-Mäuse bekommen keine EAE). Auch für die pathologische Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia ist IL-12 mitverantwortlich. IL-12-mRNA wird vermehrt in den aktiven Läsionen der MS gefunden. Die IL-12 Synthese spiegelt ebenso wie die Plasma- und Liquorkonzentrationen von IL-12 die Aktivität der Krankheit wider <sup>126,127</sup>.

Allerdings zeigt die IFN- $\beta$ -Therapie nicht bei allen Patienten die erhoffte Wirksamkeit. IFN- $\beta$  fungiert, wie schon oben erwähnt, als Ligand für den Typ I IFN-Rezeptor. Möglicherweise kann IFN- $\beta$  jedoch auch eine entzündungsfördernde Immunantwort auslösen, eventuell durch Bindung an den Typ II IFN-Rezeptor (der eigentlich von IFN- $\gamma$  benützt wird) oder an einen bis jetzt unbekanntem Rezeptor, der durch Bindungsstudien identifiziert werden konnte. IFN- $\gamma$  bewirkt durch Bindung an seinen Rezeptor eine Vielzahl an physiologischen und pathologischen Ereignissen, von denen eine die Aktivierung der im Falle von MS im ZNS befindlichen Makrophagen ist. Aktivierte Makrophagen sezernieren eine Vielzahl von biologisch aktiven Substanzen, die neuronale Zellen schädigen oder vernichten können. Zu ihnen zählen unter anderem Prostaglandine, Zytokine, Stickoxid, Wasserstoffsuperoxid und Quinolinsäure (QUIN). Werden neuronale Zellkulturen den Zellkultur-Überständen von aktivierten Makrophagen ausgesetzt, so sind Zellschädigungen, die bis zum Zelltod gehen können, die Folge. Ein Inhibitor der QUIN-Biosynthese verhindert indes die Zellschädigungen. Erhöhte QUIN-Konzentrationen wurden auch im Liquor von MS-Patienten während eines Schubes nachgewiesen. Unabhängig davon wurde vorgeschlagen, QUIN als Marker für das Vorliegen von entzündlichen Vorgängen im ZNS zu verwenden. Die QUIN-Bildung dürfte hauptsächlich über die IFN-Rezeptoren ausgelöst werden, bevorzugt durch den Typ II IFN-Rezeptor. So könnte eine intensive QUIN-Synthese bei IFN- $\beta$ -Gabe ein Versagen dieser Behandlung ankündigen <sup>128</sup>.

IFN- $\beta$  weist immunmodulatorische Eigenschaften auf wie z.B. einen hemmenden Effekt auf T-zellvermittelte Entzündungsprozesse und damit die Freisetzung von Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ; nebenbei werden die entzündungshemmenden Interleukine IL-10 und IL-4 vermehrt exprimiert. Diese positiven Wirkungen sind jedoch nicht bei allen MS-Patienten zu beobachten: in kultivierten PBMCs ist bei 3 von 18 Patienten die Häufigkeit von autoaktiven T-Zellen, die gegen das basische Myeloprotein, das ist ein Hauptbestandteil des Myelins, gerichtet sind, bei Behandlung mit IFN- $\beta$  unverändert oder sogar größer. Die erhöhte Produktion von Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in manchen Patienten unter IFN- $\beta$ -Therapie kann zur Entstehung der grippeartigen Symptome beitragen, die bisweilen als Nebenwirkung dieser Behandlung auftreten. So könnte die Veränderung der Zytokinausschüttung bei bzw. nach IFN- $\beta$ -Gabe eine Aussage darüber erlauben, welche Patienten für eine IFN- $\beta$ -Therapie geeignet sind <sup>129</sup>.

### **3. Liquor-Serum-Datenbank**

Für diverse Fragestellungen wäre es bereits in der Vergangenheit wünschenswert gewesen, Blut-, Serum- und Liquorproben verschiedener Patientenkollektive zur Hand zu haben. Ein Antrag an die Ethikkommission bezüglich der Abnahme und Archivierung dieser Proben wurde angenommen.

Im Verlauf von zwei bis drei Jahren wurde von jeder routinemäßig in der Ambulanz der Neurologischen Universitätsklinik durchgeführten Lumbalpunktion je ein Röhrchen Vollblut (à 7 ml) und eine kleine Menge Liquor (ca. 1,5 bis 2 ml) zusätzlich für die Datenbank gesammelt, sofern der Patient sein Einverständnis dazu gegeben hat. Die Patientendaten, Laborwerte aus routinemäßigen Laboruntersuchungen und die Ergebnisse der am Forschungslabor

durchgeführten Experimente wurden in einer MS Access-Datenbank dokumentiert, anonymisiert, organisiert und ausgewertet (siehe auch Methodik, Abschnitt 1).

Ich habe im Rahmen dieser Dissertation bei MS-Patienten, Patienten anderer neurologischer Erkrankungen und bei neurologisch gesunden Personen, ApoE-Genotypen sowie ApoE-Konzentrationen in Serum und Liquor bestimmt (siehe auch Methodik, Abschnitt 3).

#### **4. Zellkultur-Experimente**

Als Ergänzung zu den Auswertungen der Serum-Liquor-Datenbank habe ich Zellkultur-Experimente durchgeführt. Die Modifizierung der Expression und Sekretion von ApoE in der Zellkultur von humanen Astrozyten-Zelllinien durch IFN- $\beta$  (in verschiedenen Konzentrationen) im Vergleich zu unstimulierten Zellen könnte gewisse Aufschlüsse über die Wirkungsweise von IFN- $\beta$  geben. Wird die ApoE-Synthese in Anwesenheit von IFN- $\beta$  gesteigert, so kann das als positiv für die Regenerationsprozesse im Rahmen einer Remission (Verschwinden bzw. Verminderung der Symptome zwischen zwei Schüben) gewertet werden. Diese Beobachtung wurde an Astrozyten von einigen Wissenschaftern gemacht<sup>68,69,72</sup>, Studien an anderen Zelltypen wie mononukleären Zellen konnten dies nicht bestätigen<sup>33</sup>.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirksamkeit einer IFN- $\beta$ -Therapie wäre eine andersartige Beeinflussung der ApoE-Synthese je nach ApoE-Genotyp, der den Krankheitsverlauf der MS beeinflusst. Die beiden untersuchten Zelllinien besitzen verschiedene ApoE-Genotypen, weswegen eine Aussage über die genotyp-spezifischen Unterschiede der IFN-induzierten ApoE-Synthese möglich sein könnte.

# METHODIK UND MATERIALIEN

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden einerseits die ApoE-Konzentrationen im Liquor bei MS-Patienten im Vergleich zu denen anderer neurologischer Erkrankungen und denen (neurologisch) gesunder Personen untersucht. Dieser Vergleich wurde durch eine Liquor-Serum-Datenbank ermöglicht, die am Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie etabliert wurde. Die anamnestischen, klinischen und Labordaten von 160 Patienten wurden in die Liquor-Serum-Datenbank aufgenommen.

Andererseits wurde die Auswirkung der IFN- $\beta$ -Stimulation (Betaferon®, Schering) auf die ApoE-Expression und die ApoE-Sekretion in astrozytären Zell-Linien verschiedener ApoE-Genotypen bestimmt. Bewirkt IFN- $\beta$  eine Erhöhung der ApoE-Sekretion, so kann dies im Hinblick auf den positiven Einfluß des ApoE auf die Neuroregeneration zur Erklärung der positiven Effekte der IFN- $\beta$ -Therapie bei MS-Patienten beitragen.

## 1. Liquor-Serum-Datenbank

### 1.1 Übersicht

Bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen sind die molekularen Mechanismen, die ihnen zugrunde liegen, nicht oder nur lückenhaft bekannt. Eine Möglichkeit, die klinische Relevanz von Hypothesen zur Pathogenese zu untersuchen, besteht darin, die Meßergebnisse von Routine-Parametern und neu etablierten Parametern aus dem Liquor cerebrospinalis mit den anamnestischen und klinischen Daten von Patienten, von denen der Liquor stammt, in Beziehung zu setzen. Die Liquor-Serum-Datenbank dient als Grundlage für die Beantwortung aktueller und zukünftiger Fragen zur Pathogenese diverser neurologischer Erkrankungen. In den Jahren 2000 bis 2002 wurde am

Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie eine Liquor-Serum-Datenbank zur Korrelation von Labordaten mit den klinischen Parametern bei Multipler Sklerose und anderen neurologischen Erkrankungen etabliert.

Zwischen dem Blut- und dem Liquorraum herrscht bezüglich der Konzentration der Blutbestandteile und anderer chemischer Verbindungen ein Steady State, das durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird: Dichte der Blut-Liquor-Schranke (altersabhängig), Größe und Lipophilität der betreffenden Moleküle (ausschlaggebend für passive Diffusion) und eventuell vorhandene Transportsysteme für bestimmte Moleküle <sup>178</sup>. Ob beispielsweise IgG-Moleküle, die im Liquor gefunden werden, aus dem Serum stammen oder intrathekal produziert wurden, kann durch Errechnung eines Index' entschieden werden, der auf dem Vergleich zwischen den Konzentrationen von Albumin und IgG jeweils in Liquor und Serum beruht. Eine Möglichkeit, diesen Zusammenhang auszudrücken, lautet:  $IgG_{Li}/IgG_{Se} : Alb_{Li}/Alb_{Se}$ . Erhält man nach Auflösung des Doppelbruchs (Grenz-Index nach Link) einen Wert  $> 0,7$ , so liegt eine intrathekale IgG-Synthese vor <sup>179</sup>. Analog lassen sich Grenzwerte und Indices für andere Proteine, die in Serum und Liquor vorkommen, berechnen, so auch für das ApoE, das im Blickpunkt dieser Dissertation steht.

Um die pathogenetische und diagnostische Relevanz von chemischen Verbindungen, die in Serum und Liquor anzutreffen sind, zu beurteilen, ist es notwendig, deren Konzentration in beiden Körperflüssigkeiten zu messen, zu klären, ob diese Substanzen intrathekal produziert worden sind und schließlich die ermittelten Konzentrationen oder Indices mit den wichtigsten klinischen Parametern der betreffenden neurologischen Krankheiten in Beziehung zu setzen.

## 1.2 Probenaufkommen

Nachdem der Aufbau einer Liquor-Serum-Datenbank durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Wien und des Allgemeinen Krankenhauses der Stadt Wien bewilligt worden war, konnte mit dem Sammeln der Proben begonnen werden.

Allen Patienten, die sich an der Ambulanz der Universitätsklinik für Neurologie aus welchen Gründen auch immer einer Lumbalpunktion unterziehen mußten, wurde eine Teilnahme an der Studie freigestellt und eine Einverständniserklärung vorgelegt. Das Einverständnis des Patienten vorausgesetzt, wurde für die Liquor-Serum-Datenbank 7 ml Vollblut und 3 ml Liquor abgenommen. Monatlich wurden Liquor- und Serumproben von etwa 8 Patienten verarbeitet.

## 1.3 Aliquotierung der Proben

Liquor- und Serumproben wurden in der Ambulanz direkt nach der Abnahme von einem Mitarbeiter des Forschungslabors zur Aliquotierung und Archivierung abgeholt. Die endgültige Lagerung der Proben erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Vom Vollblut wurden 2 Aliquote à 0,5 ml genommen, ehe daraus durch Zentrifugation (3000 rpm bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 Minuten) Serum gewonnen wurde. Das Serum wurde in 0,5- und 1 ml-Aliquoten eingefroren, zwei zusätzliche 50  $\mu\text{l}$ -Aliquote waren für den ApoE-ELISA vorgesehen.

Der Liquor wurde vor der Aliquotierung auf artifizielle Blutbeimengung untersucht; blutige Proben wurden eliminiert. Es wurden Aliquote von 0,25, 0,5 und 1 ml genommen; für den ApoE-ELISA wurden zusätzlich noch zwei 120  $\mu\text{l}$ -Aliquote eingefroren.

#### 1.4 Dokumentation der klinischen Parameter und Laborwerte in einer Access-Datenbank

Die klinischen Daten und laborchemischen Routine-Parameter der Patienten sowie die aus Serum und Liquor gewonnenen Werte wurden in eine Access-Datenbank eingegeben (siehe Abb. 1.1). Diese Datenbank enthält auch die klinischen Bewertungsscores und dient als Grundlage für die retro- und/oder prospektive Korrelation der Labordaten mit den klinischen Daten.

Abb. 1.1 Daten und Parameter der Liquor-Serum-Datenbank

<b><u>Allgemeine Parameter</u></b>	
Alter	
Geschlecht	
Diagnose	
Klinische Zusatzbefunde	
<b><u>Routine-Parameter im Liquor:</u></b>	
Zellzahl	(Fuchs-Rosenthal-Kammer)
Gesamteiweiß [mg/dl]	(Photometrie)
Zytologie/Sediment	(May-Grünwald-Giemsa-Färbung, Lichtmikroskopie)
Albumin, IgM, IgG, IgA [mg/dl]	(Nephelometrie)
Albumin-Index [ $Al_{Li}/Al_{Se}$ ]	
IgG-Grenzindex nach Link [ $IgG_{Li}/IgG_{Se} \cdot Al_{Li}/Al_{Se}$ ]	
ApoE [mg/dl]	(ELISA)
<b><u>Routine-Parameter in Serum:</u></b>	
Albumin IgM, IgG, IgA [mg/dl]	(Nephelometrie)
(ApoE [mg/dl])	(ELISA)
(ApoE-Genotyp)	(PCR)

## 2. Zellkultur

### 2.1 Übersicht

Die ersten Zellkultur-Experimente wurden Anfang des vorigen Jahrhunderts durchgeführt, um tierische Zellen frei von den systemischen Variationen im Versuchstier zu untersuchen. Die medizinische Forschung konzentrierte sich bald auf Säugetier- und humane Tumorzellen. Zellkultur-Experimente erwiesen sich als besonders geeignet zur Erforschung intrazellulärer Vorgänge wie z.B. der Replikation und Transkription von DNA, der Proteinsynthese sowie des Metabolismus verschiedener Substanzen, diverser Signaltransduktionsprozesse, der Zell-Zell-Interaktionen und der Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung. Die Zellkultur entwickelte sich zu einem bedeutenden Werkzeug für die Untersuchung lebender Zellsysteme.

Die Vorteile der Zellkultur-Technik bestehen in der Kontrolle der physikalischen und chemischen Parameter der Umgebung wie beispielsweise des pH-Werts, der Temperatur, des osmotischen Drucks sowie der Partialdrucke von Sauerstoff und Kohlendioxid. Physiologische Bedingungen wie der Serumanteil im Medium können zwar konstant gehalten, aber nicht exakt definiert werden. Nach ein oder zwei Passagen (das sind die Subkultivierungen, die vorgenommen werden müssen, wenn die Zellen wachsen und die Zelldichte zu groß geworden ist) sind die in einer Kultur enthaltenen Zellen von einheitlichem Typ (homogene Kultur), während Untersuchungen an Gewebeproben, die immer heterogen bezüglich des Zelltyps sind, größere statistische Variabilität aufweisen. Zellkulturen können *in vitro* geringen Mengen bzw. Konzentrationen von Reagenzien ausgesetzt werden, die direkten Zutritt zur Zelle haben, während bei Versuchen *in vivo* größere Mengen dieses Reagens nötig sind, die nur zu einem geringen Prozentsatz (10%) in das untersuchte Gewebe gelangen, da der Großteil schon vorher metabolisiert wird oder in andere Gewebe übertritt.

Zellkulturen müssen unter strikt sterilen Bedingungen gehandhabt werden, weil tierische Zellen wesentlich langsamer wachsen als viele der möglichen Kontaminationen wie beispielsweise Bakterien, Hefen oder Pilze. Zellen von

vielzelligen Organismen sind nicht leicht zu kultivieren, weil dazu komplexe Medien erforderlich sind, um deren normale Umgebung zu simulieren. Kulturen, die aus differenzierten Zellen bestehen, können leicht die typischen phänotypischen Charakteristika des Gewebes verlieren, aus dem sie hervorgegangen sind. Durch die Abwesenheit von Inducern wie z.B. Hormonen oder durch overgrowth mit undifferenzierten Zellen, die in der Primärkultur ebenfalls enthalten sind, können bestimmte Zelleigenschaften verloren gehen. Durch den Einsatz (serum-freier) selektiver Medien können solche Probleme unterbunden oder zumindest verringert werden. Die Charakterisierung der kultivierten Zellen mittels stabiler Marker, die auf den funktionalen Zellen der Gewebe ebenfalls nachweisbar sind, ist besonders bei Zell-Linien erforderlich, die zur Instabilität neigen und von Passage zu Passage deutliche Unterschiede in Wachstumsrate und der Fähigkeit, einen differenzierten Zelltyp zu entwickeln, aufweisen können. In der Zellkultur gehen die für die beteiligten Zelltypen charakteristischen Interaktionen ebenso verloren wie der Kontakt zum Nerven- und endokrinen System.

Primäre Zellkulturen, die direkt aus einem Zellaggregat des betreffenden Gewebes hervorgehen, weisen typische viele Eigenschaften des Gewebes auf, haben aber nur eine begrenzte Lebensdauer, d.h. es kann nur eine gewisse Anzahl an Subkultivierungen durchgeführt werden, bevor die Zellen sterben. Kontinuierliche Zelllinien dagegen, wie sie durch Transformation aus primären Kulturen entstehen oder aus neoplastischen Zellen gewonnen werden, sind weitgehend homogen (nur ein oder zwei Zelltypen) und ähneln eher Precursor- als ausdifferenzierten Zellen der betreffenden Zellfamilie <sup>130</sup>.

## 2.2 Auswahl der Zelllinien

Es versteht sich von selbst, daß für die Untersuchung der Auswirkungen von IFN- $\beta$  auf normale neuronale und astrozytäre Zellen keine primäre Zellkultur verwendet werden kann, weil aus ethischen Gründen kein humanes Zellmaterial von Gesunden gewonnen werden darf.

Astrozytäre Zellen sind für die Myelinproduktion verantwortlich und synthetisieren ApoE; beide Eigenschaften sind für die klinische Remissionen in der MS unerlässlich und werden möglicherweise durch eine IFN- $\beta$ -Therapie beeinflusst. Neueren Forschungsergebnissen zufolge können auch neuronale Zellpopulationen, wie *in vitro* beobachtet wurde, ApoE synthetisieren<sup>71,78,80,81</sup>.

Am Beispiel von je zwei astrozytären (GOS-3, LN-405) und neuronalen (Kelly, SH-SY5Y) Zell-Linien sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Inkubation mit IFN- $\beta$  auf deren ApoE-Expression und -sekretion aufweist. Allerdings stellte sich die Kultur von SH-SY5Y-Zellen als problematisch heraus, sodaß die neuronalen Zell-Linien nur bei Vorversuchen verwendet und die endgültigen Experimente nur mit den beiden astrozytären Zell-Linien durchgeführt wurden. Alle Zell-Linien wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Abteilung Menschliche und Tierische Zellkulturen) in Braunschweig gekauft.

#### 2.2.1 GOS-3

Gos-3 ist eine humane Astrozytom/Oligodendrogliom-Zell-Linie, die aus dem gemischten Astro-Oligodendrogliom (Grad II/III) einer 55-jährigen Frau etabliert wurde. Gos-3-Zellen zeigen auf ihrer Oberfläche neuroepitheliale Marker wie Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) und Vimentin. Gos-3-Zellen synthetisieren Ciliary NeuroTrophic Factor (CNTF), Leukemia Inhibitory Factor (LIF) und deren Rezeptoren. Die Morphologie von Gos-3-Zellen zeigt fibroblastoide (längliche) Zellen mit kleinen Fortsätzen, die adhären als Monolayer (das ist eine genau einlagige Zellschicht) wachsen (siehe Abb. 2.1 und 2.2).

Die Gos-3-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% Fetal Calf Serum (FCS), dem 4 mM L-Glutamin zugesetzt wurde, kultiviert (Abb. 2.3). Im Inkubator sind 37 °C bei absoluter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> einzuhalten. Die Generationszeit beträgt laut DSMZ rund 50 Stunden.

Abb. 2.1 Gos-3-Zellen

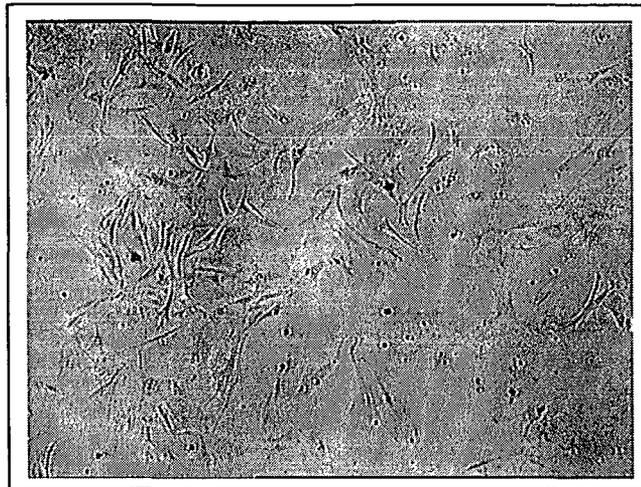


Abb. 2.2 Gos-3-Zellen; ca. 400fach vergrößert

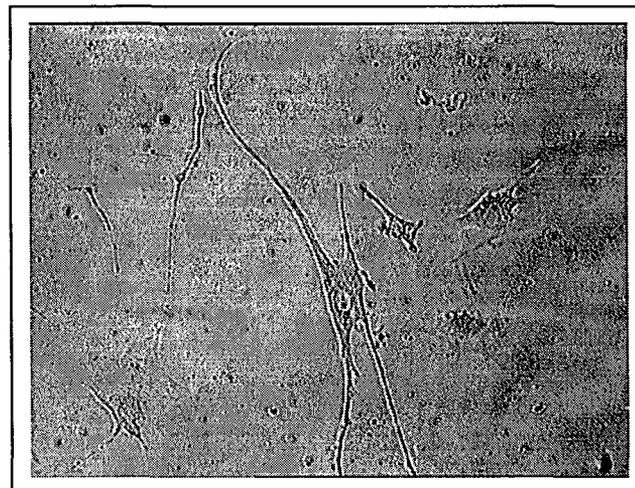


Abb. 2.3 Medium für Gos-3-Zellen

**Medium für Gos-3-Zellen**

500 ml DMEM low glucose (Gibco®)

50 ml FCS (Gibco®)

11 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco®)

5,6 ml Penicillin/Streptomycin [10 000U bzw. 10 000 µg/ml] (Gibco®)

Sterilfiltrieren und bei +4 °C lagern

(langfristige Lagerung bis zu 1 Jahr bei - 20 °C, da sonst L-Glutamin abgebaut wird)

### 2.2.2 LN-405

LN-405 ist eine humane Astrozytom-Zell-Linie, die aus einem Astrozytom (Grad IV) einer 62-jährigen Frau etabliert wurde und die den astrozytären Marker GFAP exprimiert. Morphologisch sind fibroblastoide Zellen mit Fortsätzen zu beobachten, die in Form einer Monolayer kultiviert werden. LN-405-Zellen sind deutlich größer als die Gos-3-Zellen und haben besser erkennbare innere Strukturen. Laut DMSZ haben LN-405-Zellen eine Generationszeit von 60 Stunden, also nur geringfügig weniger als die Gos-3-Zellen. In unseren Experimenten wuchsen die LN-405-Zellen allerdings deutlich langsamer als die Gos-3-Zellen. Es wird empfohlen, die Zelle bei 37 °C und 10%CO<sub>2</sub> bei absoluter Luftfeuchtigkeit zu kultivieren. Nach Rücksprache mit dem DSMZ bezüglich einer Kultivierung von GOS-3 und LN-405 im selben Brutschrank soll für beide Zelllinien 5% CO<sub>2</sub> gewählt werden. Die Zusammensetzung des Mediums für LN-405-Zellen ist aus Abb. 2.4 ersichtlich.

Abb. 2.4 Medium für LN-405 -Zellen

#### **Medium für LN-405-Zellen**

500 ml DMEM low glucose (Gibco®)  
50 ml FCS (Gibco®)  
5,5 ml Penicillin/Streptomycin [10 000U bzw. 10 000 µg/ml] (Gibco®)

Sterilfiltrieren und bei +4 °C lagern  
(langfristige Lagerung bis zu 1 Jahr bei - 20 °C)

### 2.2.3 SH-SY5Y

SH-SY5Y sind humane Neuroblastom-Zellen, die eine klonale Subzell-Linie der Neuroepitheliom-Zell-Linie SK-N-SH (entstanden aus einer Knochenmarksbiopsie eines an einem metastasierenden Neuroblastom leidenden 4jährigen Mädchens) repräsentieren. Nach DSMZ-Richtlinien soll die Zell-Linie in DMEM mit 15 bis 20% FCS kultiviert werden. Am Forschungslabor

wurden SH-SY5Y-Zellen entweder in DMEM mit F12 Nutrient Mix und 10% FCS oder in DMEM mit geringem Glucosegehalt und 10% FCS kultiviert (siehe Abb. 2.5). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und absoluter Luftfeuchtigkeit sowie 5 bis 10 % CO<sub>2</sub>.

Abb. 2.5 Medium für SH-SY5Y-Zellen

#### **Medium für SH-SY5Y-Zellen**

500 ml DMEM + F12 Nutrient Mix (Gibco®)  
50 ml FCS (Gibco®)  
5.5 ml Penicillin/Streptomycin [10 000U bzw. 10 000 µg/ml] (Gibco®)

Sterilfiltrieren und bei +4 °C lagern  
(langfristige Lagerung bis zu 1 Jahr bei - 20 °C)

Die Morphologie der SH-SY5Y-Zellen zeigt epithelartige Zellen, die vorwiegend als Monolayer wachsen und bei hoher Zelldichte Zellcluster bilden können. Die Zellen wachsen meist nicht bis zur vollständigen Konfluenz (100%-ige Bedeckung der zur Verfügung stehenden Oberfläche). Diese Morphologie veränderte sich deutlich nach einigen Passagen; die Zelldichte sank stark, die einzeln liegenden, eher abgerundeten Zellen bildeten keine Zellcluster mehr. Die Generationszeit liegt laut Angaben des DSMZ bei mehr als 55 Stunden. Bei den geringen Zelldichten der zweiten Phase, deren Zellen weniger stark am Substrat hafteten, schien die Generationszeit geringer zu sein, denn trotz geringer Zelldichte konnten die Zellen relativ oft gesplittet (subkultiviert) werden. Die schnellere Vermehrung und die geringere Anhaftung an der Kulturflasche deuteten auf eine Veränderung des Phänotyps („Transformation“) hin, welche spontan auftreten oder durch äußere Reize wie die Aufnahme viralen genetischen Materials, oder durch chemische Karzino-gene ausgelöst werden kann. Eine Veränderung des Phänotyps zeigt folgende Charakteristika: Entwicklung einer kontinuierlichen Zell-Linie (beliebig viele Passagen möglich), weniger konsequente Wachstumskontrolle durch Kontakt-inhibierung (d.h. die Zellen stellen ihr Wachstum ein, sobald sie in Kontakt zur nächstgelegenen Zelle gelangen) und Anregung des Wachstums durch auto-

krine Prozesse (*in vivo* wird auch Malignität beobachtet); zusätzlich können die Zellen auch die Fähigkeit bekommen, in Suspension zu wachsen. Die meisten „normalen“ Zell-Linien haben hingegen eine begrenzte Lebensspanne von 20 bis 100 Generationszyklen<sup>130</sup>.

#### 2.2.4 Kelly

Kelly-Zellen sind humane Neuroblastom-Zellen, die adhären am Untergrund wachsen. Die morphologisch runden bis fusiformen Zellen mit neuritischen Fortsätzen bilden Mono- und Multilayer. Die Kelly-Zellen werden nach DSMZ-Richtlinien bei 37 °C, absoluter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS kultiviert werden (siehe Abb. 2.6). Die Zellen wachsen äußerst schnell, mit einer Generationszeit von 30 bis 40 Stunden, daher kann bei der Subkultivierung eine starke Verdünnung von bis zu 1:10 vorgenommen werden.

Abb. 2.6 Medium für Kelly-Zellen

#### **Medium für Kelly-Zellen**

500 ml RPMI 1640 (Gibco®)  
50 ml FCS (Gibco®)  
5,5 ml Penicillin/Streptomycin [10 000U bzw. 10 000 µg/ml] (Gibco®)

Sterilfiltrieren und bei +4 °C lagern  
(langfristige Lagerung bis zu 1 Jahr auf – 20 °C)

### 2.3 Handhabung der Zellkultur

#### 2.3.1 Sterile Arbeitsweise

Der Umgang mit Zellen erforderte eine sterile Arbeitsweise. Es wurden stets Handschuhe getragen, die regelmäßig mit 70%igem Alkohol oder einer anderen Desinfektionslösung gereinigt oder getauscht wurden. Es wurde in einer sterilen Werkbank (Laminar Flow Hood) gearbeitet, in der sich nur die nötigsten Gerätschaften befanden. Vor Arbeitsbeginn wurde die Belüftung ein- und

das UV-Licht ausgeschaltet. Nach Beendigung der Arbeiten wurde die Arbeitsfläche der Werkbank sorgfältig gereinigt und desinfiziert. Das UV-Licht wurde bis zur nächsten Benützung eingeschaltet, die Belüftung abgedreht.

Wurde mit verschiedenen Zell-Linien gearbeitet, empfahl es sich, jeweils vor dem Wechsel zur nächsten Zell-Linie das UV-Licht für 15 bis 20 min bei gleichzeitiger Belüftung einzuschalten, damit die Wahrscheinlichkeit einer gegenseitigen Kontamination verringert wurde.

### 2.3.2 Anzüchten von Zellen

Die in 2 ml-Ampullen in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden schonend im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Das entsprechende Medium wurde zur Anzucht mit weiteren 10% FCS versetzt und ebenfalls auf 37 °C erwärmt.

In einem 15 ml-Falcon®-Röhrchen wurden rund 10 ml Anzuchtmedium vorgelegt, dann der Inhalt der Ampulle zupipettiert und vorsichtig gemischt. Um die Zellen nach diesem Waschvorgang wieder zu isolieren, wurde eine Zentrifugation durchgeführt (300 rpm bei Raumtemperatur für 5 Minuten). Das überstehende Medium wurde vorsichtig in der sterilen Werkbank abgesaugt und die Zellen in insgesamt 14 ml Anzuchtmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Teilen in 2 kleine Kultur-Fläschchen (mit je 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) aufgeteilt und im Brutschrank angezüchtet. Am nächsten Tag konnte mit dem Auflichtmikroskop überprüft werden, ob die Zellen am Substrat anhaften. Am dritten Tag nach der Aussaat wurden die Zellen entweder nur „gefüttert“ (d.h. nach dem Absaugen des verbrauchten Mediums wurde frisches angewärmtes Medium zupipettiert – je nach dem morphologischen Zustand der Zellen wurde noch Anzucht- oder schon „normales“ Medium verwendet) – oder schon das erste Mal gesplittet (subkultiviert).

### 2.3.3 Subkultivierung

Nach rund 3 Tagen, wenn die Zellen (fast) die ganze Wachstumsfläche bedeckt hatten, mußten die Zellen „gesplittet“ werden. Dieser Vorgang wird auch als Passage oder Subkultivierung bezeichnet.

Zunächst wurde das benötigte Medium im Wasserbad vorgewärmt. In der sterilen Werkbank wurden Pipetten, Pipettierhilfe und sterile Pasteurpipetten bereitgelegt, nachdem die Arbeitsfläche mit 70%igem Alkohol oder einer anderen Desinfektionslösung gereinigt und 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt wurde. Ein oder mehrere Aliquote der zur Ablösung der Zellen benötigten Trypsin-Lösung (Zusammensetzung siehe Abb. 2.7) werden aufgetaut. Die größte Aktivität des Enzyms und damit die schnellste Ablösung der Zellen wurde bei rund 37°C beobachtet.

Abb 2.7 Trypsin-EDTA-Lösung

#### **0,05 %ige Trypsin-Lösung mit EDTA**

200 ml 1x PBS  
4 ml 10 %ige Trypsin-Stocklösung (Gibco®)  
40 mg EDTA

sterilfiltrieren und in 4 ml-Aliquoten bei -20 °C lagern

Die Kulturflaschen wurden aus dem Brutschrank geholt und nach mikroskopischer Begutachtung der Morphologie in der sterilen Werkbank deponiert. Das verbrauchte Medium (Zellkultur-Überstand, konditioniertes Medium, Supernatant) wurde mit einer sterilen Pasteurpipette, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, abgesaugt. Die astrozytären Zellen wurden sorgfältig mit 1x PBS gewaschen, da noch vom Medium anhaftende Serumkomponenten die Trypsinreaktion hemmen können. Neuronale Zellen hafteten weniger fest und konnten direkt mit der Trypsinlösung behandelt werden. Es wurden rund 3 ml 1x PBS pro 25 cm<sup>2</sup>-Fläschchen pipettiert, zum Waschen der Zellen leicht geschwenkt und wieder mittels Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend konnte die Trypsinlösung zugegeben werden (ca. 2 ml pro 25 cm<sup>2</sup>-Fläschchen). Die

vom Enzym Trypsin verursachte Ablösung der Zellen von Substrat konnte lichtmikroskopisch verifiziert werden. Wenn sich der Großteil der Zellen abgerundet hatte und einige schon (fast) abgelöst waren, wurde die Trypsin-Lösung abgesaugt. Die Zellen konnten noch rund 1 Minute bei Raumtemperatur stehengelassen werden, damit sich die Zellen vollständig vom Substrat lösten. Hafteten immer noch einige Zellen am Untergrund, so konnte zur Suspendierung ein Zellschaber benutzt werden (das rein mechanische Abschaben der Zellen wäre auch eine Möglichkeit der Subkultivierung). Bevor die Zellmembranen Schädigungen durch Trypsinverdau davontrugen, wurden die Zellen in 7 ml angewärmtem Medium (der Serumanteil beendet die Trypsinreaktion) suspendiert. In zwei frischen Kulturfläschchen wurden schon jeweils 3,5 ml Medium vorgelegt, die jetzt mit der Hälfte der Zellsuspension ergänzt wurden. Die Zelldichte wurde noch einmal abschließend lichtmikroskopisch kontrolliert, ehe die Zellen wieder im Brutschrank verwahrt wurden. Dieses Splitverhältnis von 1:2 erwies sich als gut geeignet für die LN-405-Zellen, wohingegen Gos-3- und Kelly-Zellen zur Subkultivierung oft deutlich stärker verdünnt werden mußten.

#### 2.3.4 Einfrieren von Zellen zur Lagerung

Bei der Subkultivierung können nicht benötigte Zellen zum Aufbau eines Gefrierstocks (Aliquote von konzentrierten Zellsuspensionen zur Anzucht von Zellen, werden auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt) verwendet werden. Erst wenn genügend Ampullen einer Zell-Linie in Flüssigstickstoff gelagert sind, kann mit den Experimenten begonnen werden, weil die Zellen nach einer gewissen Anzahl von Passagen zu altern beginnen und dann auch Veränderungen in Morphologie und Metabolismus aufweisen können.

Zum Einfrieren wird zur Vermeidung von Membranschädigungen beim Einfrier-Prozeß ein spezielles Einfrier-Medium verwendet (siehe Abb. 2.8). Das enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) setzt die Oberflächenspannung herab und bewirkt eine möglichst gleichmäßige Eiskristallbildung, die die Zellstrukturen möglichst wenig schädigt.

Abb. 2.8 Einfrier-Medium

**Einfriermedium**

80 % fertiges Medium für die betreffende Zelllinie  
10 % FCS  
10 % DMSO

Pro 25 cm<sup>2</sup>-Kulturfläschchen bzw pro Ampulle sind 2 ml nötig

Eine (fast) konfluente Kulturflasche wurde, wie bei der Subkultivierung (siehe Abschnitt 2.3.2) mit Trypsin behandelt. Die Zellen wurden anschließend in je 2 ml Einfriermedium suspendiert und in 2 ml-Kryoampullen (Costar®) pipetiert. Die Ampullen wurden einen Tag lang bei -80 °C tiefgefroren und dann zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff transferiert.

**2.4 Experimente****2.4.1 RT-PCR**

Vor Beginn der Experimente wurde das von der Firma Schering erhaltene Betaferon® verdünnt und in Aliquoten eingefroren. Das Durchstech-Fläschchen enthielt 300 µg bzw. 9,6 Mio Einheiten (im folgenden als Units oder kurz U bezeichnet) IFN-β-1b-Lyophilisat und wurde mit dem beige packten Lösungsmittel (1,2 ml 0,54 %ige Kochsalzlösung mit pH 7) rekonstituiert. Jeder Mikroliter dieses Betaferon®-Stock enthielt 8 000 U. Es wurden Aliquote à 11 µl in sterilen Eppendorf-Gefäßen (500 µl) hergestellt und zur Langzeitlagerung bei -80 °C eingefroren.

Der Zeitrahmen, in dem die Probennahmen erfolgen mußten, um eventuelle Veränderungen in der ApoE-mRNA-Transkription erfassen zu können, mußte in Vorversuchen ermittelt werden.

Am Vortag der Stimulation mit Betaferon® (Schering; IFN-β-1b) wurden die in Kulturfläschchen vermehrten Zellen (die am dritten Tag wieder gesplittet werden mußten) trypsinisiert und für das Stimulationsexperiment in kleine Petrischalen von 3,5 cm Durchmesser transferiert. In jede kleine Petrischale wurden 1,5 ml des Medium vorgelegt, dann wurde je 1 ml der Zellsuspension zupi-

pettiert. Die Petrischalen wurden noch einmal lichtmikroskopisch kontrolliert und wieder in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag, als die Zellen gut angewachsen waren, konnte der Stimulationsversuch erfolgen. Die Zugabe des Stimulationsmediums definierte den Zeitpunkt null, die einzelnen Meßpunkte wurden durch die einzelnen Petrischalen repräsentiert. Für eine komplette Serie von 7 Petrischalen waren bei LN-405-Zellen zwei Kulturflaschen nötig, während bei den beiden anderen Zell-Linien eine ausreichte (dieser Schritt war wichtig für die Vorausplanung der Experimente; es mußten zum gewünschten Zeitpunkt ausreichend viele dicht bewachsene Zellkulturfläschchen zur Verfügung stehen).

Vor der Stimulation mußte das Stimulationsmedium vorbereitet werden: Für 2 Serien à 7 Petrischalen wurden rund 30 bis 32 ml Medium (2,5 ml Medium pro Petrischale) benötigt. Sollte im Versuch mit 1 000 U/ml Medium stimuliert werden, so wurden zu den 32 ml Medium 4 µl Betaferon®-Stocklösung zupipettiert. Bei Stimulation mit 100, 10 oder 1 U/ml mußte die Betaferon®-Stocklösung vorher entsprechend verdünnt werden. Das Stimulationsmedium und das normale Medium für die Kontrollversuche wurden auf 37 °C erwärmt. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit frischem Nähr- oder Stimulations-Medium versehen (für Kontroll- und Stimulations-Experimente). Von den Serien à 7 Petrischalen dienten zwei als Nullpunkts-Referenz, die übrigen 5 wurden zu definierten Zeitpunkten zur Probenahme (RNA-Isolierung) verwendet. Für die Messung der Veränderung der ApoE-mRNA-Transkription unter Stimulation mit Betaferon® erwies sich eine Probenahme bei 15, 30, 45, 60 und 120 min nach dem Stimulationszeitpunkt als günstig.

Es wurden Stimulationsversuche mit 1 000, 100 und 10 U Betaferon®/ml Medium bei den beiden astrozytären Zelllinien (Gos-3 und LN-405) durchgeführt; je ein Kontrollversuch mit 1 U Betaferon®/ml Medium wurde zur Bestimmung der Wirkungsschwelle eingesetzt.

### 2.4.2 Western Blot

Die Vorbereitung der Experimente, bei denen ein Western Blot verwendet wurde, war prinzipiell ähnlich wie bei den RT-PCR-Experimenten. Es wurden ebenfalls Serien zu 7 kleinen Petrischalen verwendet, wobei eine Petrischale als Kontrolle/Referenz galt und nicht stimuliert wurde. Allerdings mußten die Zeitpunkte für die Probenahmen anders gewählt werden. Wurde der Zeitpunkt der Zugabe des Stimulationsmediums als Nullpunkt angenommen, so erfolgten die Probenahmen nach 60, 90, 120, 150, 195 und 240 Minuten, um ApoE sowohl in den solvatisierten Zellproteinen (Information über die ApoE-Expression) als auch in den Supernatants (Information über die ApoE-Sekretion) zufriedenstellend analysieren zu können.

## 3. ApoE-ELISA

### 3.1 Übersicht und Prinzip

Zur Messung der ApoE-Konzentration des in Liquor und Serum wurde ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Ein für ApoE spezifischer monoklonaler Antikörper, der an eine Mikrotiterplatte gebunden (immobilisiert) worden war, isolierte ApoE aus der komplex zusammengesetzten Probenflüssigkeit. Die Anlagerung eines weiteren gegen ApoE gerichteten Antikörpers sowie die Ankoppelung eines Enzyms, das durch Umsetzung eines geeigneten Substrates das Mess-Signal (Licht im UV- oder VIS-Bereich, Fluoreszenz, Chemilumineszenz) erzeugt, ermöglichte die spektrometrische Bestimmung der ApoE-Konzentration durch Vergleich mit einer Standardkurve.

Die in Zellkultur-Überständen vorhandenen geringen ApoE-Konzentrationen lagen im Bereich der unteren Nachweisgrenze des ELISA und wurden deswegen mit Hilfe des ApoE-Western Blots ermittelt (siehe Abschnitt 5).

Der ApoE-ELISA wurde von mir am Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie in Form des oben beschriebenen „Sandwich-ELISA“ (es wurden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch für das gewünschte Protein sind) vorwiegend nach Angaben von Garcia *et al.* sowie Krul und Cole etabliert; mit geringen Modifikationen bezüglich der verwendeten Enzyme und des Detektionssystems<sup>131,132</sup>. Auch die Angaben der Arbeitsgruppe von Kee *et al.*<sup>133</sup>, welche einen ApoE-ELISA entwickelt hat, der käuflich verfügbare Antikörper einsetzt, wurden von mir berücksichtigt. Kee *et al.* und Krasnoff *et al.*<sup>133,134</sup> empfehlen, ApoE-Standards und Antikörper in PBS-Lösungen zu verdünnen, die BSA als Trägerprotein enthalten, um so die in geringen Konzentrationen enthaltenen Proteine zuverlässig in Lösung zu halten.

Im Vergleich zu anderen Methoden zur Messung der ApoE-Konzentration im Serum ist der ELISA eine billige Methode, die keine speziellen und teuren Geräte und Reagenzien benötigt wie beispielsweise die Immuno-Nephelometrie (die allerdings mit 30 Minuten pro Analyse wesentlich schneller Ergebnisse liefert). Zudem sind die Reagenzien für den Sandwich-ELISA relativ lange stabil und diese Methode ist angenehm in der Handhabung im Vergleich zu Methoden, bei denen radioaktive Reagenzien eingesetzt werden müssen (Radioimmunoassay RIA).

Im Verlauf der ersten orientierenden Experimente mußten etliche Parameter angepaßt werden, um die Spezifität und die Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Die einzelnen Probleme und deren Lösung werden in Abschnitt 3.3 besprochen.

## **3.2 Durchführung des ApoE-ELISA**

### **3.2.1 Beschichten der Mikrotiterplatten (Coating)**

Mikrotiterplatten (Falcon® Pro-Bind Assay Plate, U-bottom) wurden mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, um das gesuchte Protein aus einer komplexen Probenlösung zu isolieren.

Ein monoklonaler Anti-ApoE Antikörper (Mouse Monoclonal Anti-human ApoE antibody, ICN Pharmaceuticals, Inc.) wurde in geeigneter Verdünnung [1 µg/ml] in die Vertiefungen (wells) der Mikrotiterplatten pipettiert (100 µl/well; Abb. 3.1), und über Nacht bei +4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Bei dieser und allen folgenden Inkubationen wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm abgedeckt, um Ungenauigkeiten durch Verdunstung zu vermeiden.

#### Abb.3.1 Coating mit monoklonalem Anti-ApoE-Antikörper

##### **Mouse Monoclonal Anti-Human ApoE Antibody**

(ICN Pharmaceuticals, Inc.)

Aliquote der Stocklösung [0,1 mg/ml, je 205 µl] bei -80°C lagern, bei Bedarf 1:100 mit 1x PBS verdünnen (ergibt Arbeitslösung von 1 µg/ml)

#### 3.2.2 Blocking

Unspezifische Bindungen, die ein störendes Hintergrundsignal verursachen, wurden durch Absättigen mit 1%iger Bovine Serum Albumine-Lösung (BSA; SIGMA®) auf ein Minimum reduziert.

Die Mikrotiterplatten wurden nach dem Coating gründlich mit PBS-T gewaschen (2x je 200 µl/well; Zusammensetzung siehe Abb. 3.2). Die Waschschritte konnten per Hand erfolgen, wobei nach dem Abgießen der Lösung die Platten immer sorgfältig auf Papierhandtüchern „ausgeschlagen“ wurden, bevor die nächste Lösung pipettiert wurde. Zum Waschen der Mikrotiterplatten kann auch ein geeigneter Mikrotiterplatten-Washer oder ein ELISA-System verwendet werden (Dynatech® MR7000 Elisa System). Pro well wurden 150 µl BSA-Lösung (Zusammensetzung siehe Abb. 3.2) zum Blocking verwendet, wobei die Mikrotiterplatten 3 Stunden bei Raumtemperatur sanft geschüttelt wurden.

## Abb. 3.2 Lösungen für das Blocking

**PBS-T**

1x Phosphate Buffered Saline (aus 10x PBS, SIGMA®) + 0,5% Tween-20 (Calbiochem®)

**1%ige BSA-Lösung**

1% BSA (SIGMA®) in 1x PBS

3.2.3 Auftragen der Standards und der Proben

Damit die gemessenen Absorptionen im aussagekräftigen Bereich lagen und zuverlässige Resultate erzielt wurden, mußten die Standards und Proben geeignet verdünnt werden. Alle Verdünnungen erfolgten mit PBS-BSA-T (siehe Abb. 3.3).

## Abb. 3.3 ApoE-Standard

**PBS-BSA-T**

1x PBS + 1% BSA + 0,5% Tween-20

Zur Vermeidung mikrobieller Infektionen auf +4 °C lagern

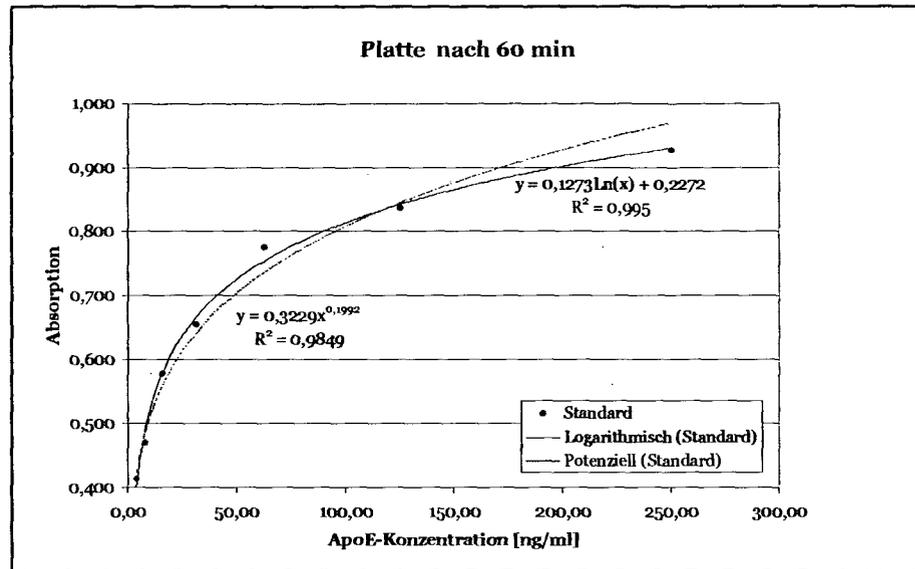
**ApoE Stock-Lösung [5 µg/ml]**

250 µg ApoE + 50 ml PBS-BSA-T

Aliquote bei -80 °C lagern

Als Standard wurde humanes rekombinantes ApoE (ICN Pharmaceuticals, Inc.) verwendet. Eine Stock-Lösung von 5 µg ApoE/ml wurde zubereitet (Zusammensetzung siehe Abb. 3.3) und in Aliquoten von 105 µl bei -80 °C gelagert. Für die Eichkurve wurden ApoE-Konzentrationen von 250 bis 3,91 ng/ml eingesetzt. Jede Standard-Lösung ergab sich aus der Standard-Lösung der nächsthöheren Konzentration durch Verdünnung 1:1, d.h. es wurden jeweils gleiche Volumina der ApoE-Standardlösung und PBS-BSA-T gemischt. Eine typische Standard- oder Eichkurve ist in Abb. 3.4 dargestellt.

Abb. 3.4 Eichkurve



Die Liquorproben wurden 1:200, 1:300 oder 1:400 verdünnt, die Serumproben hingegen 1:3000, 1:4000 oder 1:5000. Jede Messung wurde dreifach durchgeführt, d.h. drei verschiedene wells wurden mit derselben Probenlösung beschickt (Messung im „Triplicate“). Für jede Probe wurden alle 3 Konzentrationen analysiert, um eventuelle Fehler bei der Verdünnung erkennen zu können und eine zuverlässige Mittelwertbildung zu gewährleisten.

Die Mikrotiterplatte wurde nach dem Blocking gründlich mit PBS-T (4x je 200 µl/well) gewaschen. Pro well wurden jeweils 100 µl Standard- oder Proben-Lösung pipettiert und über Nacht bei +4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

### 3.2.4 Inkubation mit dem polyklonalen Anti-ApoE-Antikörper

Durch Koppelung eines polyklonalen ApoE-spezifischen Antikörpers (siehe Abb. 3.5) kann die ApoE-Menge bzw. -Konzentration letztendlich nachgewiesen werden. Dieser Antikörper wird als auch primärer Antikörper bezeichnet, weil der Nachweis bzw. die Quantifizierung erst durch einen weiteren, den sekundären, Antikörper erfolgt.

Die Mikrotiterplatte wurde nach der Bindung der Standard- und Probenlösungen erneut gründlich mit PBS-T (4x je 200 µl/well) gewaschen. Pro well wurden 100 µl einer 1:10 000 Verdünnung des primären Antikörpers zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Abb 3.5 Primärer Anti-ApoE-Antikörper

**Goat Polyclonal Anti-Human ApoE-Antibody** (CALBIOCHEM®)

Aliquote der Stocklösung [0,92 mg/ml, je 200 µl] bei -80°C lagern, bei Bedarf 1:100 mit PBS-BSA-T verdünnen (ergibt Arbeitslösung von 1:10 000)

### 3.2.5 Inkubation mit dem Enzymkonjugat

Ein Enzymkonjugat ist ein gegen den primären Antikörper gerichteter Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Das Enzym ermöglicht durch Umsetzung eines geeigneten Substrates den ApoE-Nachweis. Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) erzeugt durch Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) einen löslichen Farbstoff.

Die Mikrotiterplatte wurde nach der Ankoppelung des primären Antikörpers erneut 4x mit je 200 µl PBS-T/well gewaschen. Pro well wurden jeweils 100 µl einer 1:10 000 Verdünnung des AP-Konjugats (siehe Abb. 3.6) zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Abb. 3.6 Enzymkonjugat (sekundärer Antikörper)

**Rabbit Anti-Goat IgG AP-Conjugate** (CALBIOCHEM)

Stocklösung [1:100 in PBS-BSA-T verdünnt; 5 µg/ml], bei +4°C lagern

Arbeitslösung: 1:100 verdünnen in PBS-BSA-T (Gesamtverdünnung 1: 10 000)

### 3.2.6 Nachweis durch Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat durch Alkalische Phosphatase

Die Umsetzung von pNPP durch das Enzym AP zu einem löslichen gelben Farbstoff ermöglicht die spektrometrische Bestimmung der ApoE-Konzentration bei 405 nm.

Die Mikrotiterplatte wurde sorgfältig mit TBS-T (siehe Abb. 3.7) gewaschen (4x mit je 200 µl/well). Es wurde TBS-T anstelle von PBS-T verwendet, weil das im PBS enthaltene anorganische Phosphat die Aktivität der AP hemmt. pNPP-Substrat-Puffer und pNPP-Substrat-Lösung wurden entsprechend der Herstelleranweisungen (Calbiochem®, Zusammensetzung siehe Abb. 3.7) vorbereitet. Es wurden pro well jeweils 100 µl der fertigen Substrat-Lösung pipetiert und ca. 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation setzte die AP das Substrat zu einem gelben Farbstoff um. Anschließend wurden die Absorptionswerte bei 405 nm mit dem Dynatech® MR7000 Elisa System gemessen.

Abb. 3.7 Tris-Buffered Saline und pNPP-Substrat-Lösung

#### **5x Tris-Buffered Saline TBS** (1 Liter)

0,05 M Tris Base (SIGMA®)  
0,138 M NaCl  
0,0027 M KCl  
Mit konzentrierter. HCl pH = 8,00 einstellen, sterilisieren

#### **TBS-T**

1x TBS + 0,5% Tween-20

#### **pNPP-Substratlösung** (30 ml)

600 µl pNPP-Substrat-Puffer  
600 µl pNPP-Substrat-Stock-Lösung  
28,8 ml Aqua destillata

### 3.2.7 Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der für die Proben gemessenen Absorptionswerte mit der gleichzeitig erstellten Eichkurve. Um Proben und Standards exakt korrelieren zu können, war es notwendig, die Eichkurve für jede Platte erneut zu messen.

Die Meßwerte für die einzelnen Standard-Konzentrationen wurden gegebenenfalls unter Auslassung eventueller Ausreißer gemittelt. Anschließend wurden verschiedene Kurvenanpassungen (logarithmisch, potentiell) durchgeführt und bezüglich des Korrelationskoeffizienten verglichen. In den meisten Fällen erwies sich die logarithmische Näherung als die beste. Die entsprechende Geradengleichung wurde dann zur Errechnung der Proben-Konzentrationen aus dem Mittelwert der Absorptionswerte der Dreifach-Messung benützt. Die drei verschiedenen Konzentrationen der Proben dienten als Kontrollmaßnahme für die Richtigkeit des ermittelten Konzentrationswerts, da auf diese Weise Fehler bei der Verdünnung oder beim Pipettieren aufgedeckt werden können.

## 3.3 **Optimierung des ApoE-ELISA**

### 3.3.1 Konzentrationen der Antikörperlösungen

Bereits im Verlauf der ersten Versuche konnte die Konzentration des monoklonalen Coating-Antikörpers von 10 µg/ml über 5 µg/ml auf 1 µg/ml gesenkt werden. Auch die Konzentration des primären polyklonalen Anti-ApoE-Antikörpers (0,184 µg/ml) erwies sich als mehr als ausreichend und konnte auf 0,092 µg/ml (das entspricht einer Verdünnung von 1:10 000) verringert werden. Die Konzentration des sekundären Antikörpers, des Enzymkonjugats, war mit 0,1 µg/ml unnötig hoch. Nach einer Senkung auf 0,05 µg/ml (das entspricht einer Verdünnung von 1:10 000) war das Signal immer noch zufriedenstellend, vorausgesetzt die Inkubationszeit mit dem pNPP-Substrat war lang genug (ca. 60 min).

### 3.3.2 Konzentrationen der Standards und Proben

Die ApoE-Standard-Verdünnungsreihe wurde durch eine Reihe von aufeinanderfolgenden 1:1-Verdünnungen hergestellt. Verschiedene Ausgangskonzentrationen wurden getestet: 500, 250, 200 und 100 ng/ml. Als besonders geeignet hinsichtlich des Konzentrationsbereichs der Proben und des Intervalls der einzelnen Standardlösungen erwies sich eine Ausgangskonzentration von 250 ng/ml. Die untere Nachweisgrenze des ApoE-ELISAs liegt bei ca. 1 ng ApoE/ml.

Die Verdünnungen 1:1 000 und 1:2000 erwiesen sich als zu konzentriert für Serumproben; optimale Verdünnungen waren 1:3000, 1:4000 und 1:5000. Die Verdünnung der Proben erfolgte am besten zweistufig; die Vorverdünnung von 1:100 wurde dann in einem zweiten Schritt (1:30, 1:40 bzw. 1:50) auf den gewünschten Endwert verdünnt.

Liquorproben wurden anfangs entsprechend den Angaben in der Literatur um eine Zehnerpotenz weniger stark verdünnt als die Serumproben. Verdünnungen von 1:100 und 1:150 erwiesen sich als zu konzentriert; optimal waren Verdünnungen von 1:200, 1:300 und 1:400.

### 3.3.3 Messung der ApoE-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen

Die ApoE-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen (Supernatants) unstimulierter astrozytärer Zell-Linien lagen im Bereich der unteren Nachweisgrenze des ApoE-ELISA, sodaß sie mit dem oben beschriebenen ApoE-ELISA nicht zuverlässig und reproduzierbar bestimmt werden konnten. Auch der Einsatz eines anderen, empfindlicheren Detektionssystems (4-Methylumbelliferylphosphat in einem Carbonat/Bicarbonat-Puffer vom pH 9,8) brachte nicht den gewünschten Gewinn an Sensitivität. Die erhaltenen Absorptionswerte waren zu gering und zu wenig verschieden vom Blindwert (Blank), um eine zuverlässige Quantifizierung zu gewährleisten.

Eine weitere Möglichkeit für das Misslingen des ApoE-ELISA in Zellkultur-Überständen könnte darin liegen, daß ein als Inhibitor wirkender Inhaltsstoff den Meßvorgang stört. Ein Kontrollversuch ergab jedoch, daß weder das Medium alleine noch ein von Zellen konditioniertes Medium ein Funktio-

nieren des ELISA verhindern, sondern daß vielmehr die ApoE-Konzentrationen zu gering für einen Nachweis mit dem ELISA waren. Wurden die Verdünnungen der ApoE-Stock-Lösung mit Medium oder mit dem konditionierten Medium bereitet, so ergaben sich im Vergleich zu einer regelrecht hergestellten Standardverdünnungsreihe bei Verdünnung mit Medium allein kein Unterschied in den Absorptionswerten, bei Verdünnung mit konditioniertem Medium sind die Absorptionswerte lediglich geringfügig erhöht.

#### 4. ApoE-RT-PCR

In den Zellkulturen der astrozytären Zelllinien GOS-3 und LN-405 wurden die Veränderungen der ApoE-Expression und der ApoE-Sekretion nach Stimulation („Induktion“) mit IFN- $\beta$  untersucht werden. Die Menge der ApoE-mRNA wurde mit Hilfe einer Reverse Transkription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) bestimmt, während die Proteinmenge unter Verwendung eines Western Blots ermittelt wurde.

##### 4.1 Übersicht und Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur selektiven Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäureabschnitte eingesetzt. Aufgrund ihrer Empfindlichkeit ist diese Methode geeignet, viele Fragestellungen in Biochemie, Molekularbiologie und Medizin klären zu helfen.

Die zu analysierende RNA wird aus kultivierten Zellen (oder aus dem Gewebe) isoliert, durch verschiedene Verfahren (RNase H-Behandlung, DNase-Behandlung) gereinigt und durch Reverse Transkription (reverse transcription, RT) in cDNA umgeschrieben. In einem zweiten Schritt wird eine PCR unter Verwendung der entsprechenden Primer durchgeführt. Aus der Konzentration der Endprodukte der PCR kann auf die Mengen(-verhältnisse) der verschiedenen

spezifischen mRNAs im Ausgangsmaterial geschlossen werden (siehe Abschnitt 4.7). Diese beiden Schritte können auch in nur einem Ansatz durchgeführt werden.

Für schwierig zu amplifizierende Targets, wie das hier untersuchte GC-reiche ApoE-Fragment, empfiehlt sich jedoch die oben erwähnte zweistufige Vorgangsweise, weil dadurch die beiden Reaktionen durch Feinabstimmung der einzelnen Parameter besser reguliert werden können.

#### 4.1.1 RT-PCR-Methoden zur (semi-)quantitativen Messung spezifischer Target-mRNAs

Eine solche zweistufige RT-PCR für ein Fragment aus der ApoE-mRNA wurde z.B. von Gérard *et al.* <sup>135</sup> beschrieben, allerdings mit einem anderen Primer-Paar als es in dieser Untersuchung verwendet wird. Auch andere Gruppen haben eine (relative) Quantifizierung der ApoE-mRNA durch RT-PCR durchgeführt, wobei die Quantifizierung meist anhand von inneren Standards verschiedenster Art erfolgte <sup>67,136-146</sup>. Radioaktivität wird nur selten für den Nachweis benötigt. Üblicherweise werden PCR-Produkte verschiedener Länge zur Detektion herangezogen, wobei die Länge für die Quantifizierung normiert werden sollte.

#### 4.1.2 Weitere Methoden zur Messung spezifischer Target-mRNAs

Eine alternative Methode zum Nachweis spezifischer mRNAs mittels Oligonukleotid-Sonden ist der Dot-Blot, eine Variante des Northern Blots, der jedoch für die relative Quantifizierung nur bei Verwendung mehrerer Standards und Auswertung durch lineare Regression geeignet ist <sup>56,57,70,147</sup>. Northern Blot-Methoden sind im allgemeinen deutlich weniger empfindlich <sup>141,148</sup> als Verfahren, die in irgendeiner Weise auf einer RT-PCR basieren, deren untere Nachweisgrenze bei 1 pg der spezifischen Target-mRNA (im Ansatz) bzw. bei  $10^4$  Molekülen liegen kann. Außerdem besteht nur die Möglichkeit einer semi-quantitativen Bestimmung der mRNA-Menge, wobei die relativen Unter-

schiede in der Transkription bei mindestens dem zweifachen (der ursprünglichen Menge) liegen müssen; geringere Veränderungen können nicht erfaßt werden.

Ein weiteres, allerdings noch exotisches Verfahren zur Messung der (absoluten) Mengen von spezifischen Target-mRNAs ist der sogenannte RNA-Excess Solution Hybridization Assay, bei dem sehr geringe Veränderungen in der Expression spezifischer mRNAs und auch die absolute Anzahl der betreffenden mRNA-Moleküle bestimmt werden können<sup>52,73,149-152</sup>. Die Hybridisierung eigens angefertigter Riboprobes (das sind Oligoribonukleotid-Sonden) unter optimierten Bedingungen garantiert eine quasi doppelte Bestätigung, daß die gewünschte Sequenz, das gewünschte Target erfaßt wird. Die Riboprobes werden für die Detektion mittels Szintillationszählung radioaktiv markiert.

#### 4.2 RNA-Isolierung

Die beiden Astrozyten-Zell-Linien GOS-3 und LN-405 waren bei dieser Untersuchung das Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung, wobei das Trizol®-Reagenz (Life Technologies)<sup>153</sup> verwendet wurde. Diese Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung schützt die RNA während des Zellaufschlusses und ermöglicht nach der RNA-Isolierung eine sequentielle Fällung von DNA und Protein. Mit dieser Methode kann RNA auch aus sehr geringen Mengen Gewebe oder Zellen (50 bis 100 mg oder  $5 \times 10^6$ ) isoliert werden.

Beim Arbeiten mit RNA muß eine sterile Arbeitsweise eingehalten werden; stets müssen Handschuhe getragen werden, um einen Abbau der RNA durch der Haut anhaftende RNasen zu vermeiden. Alle verwendeten Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße, die mit der RNA-haltigen Lösung in Berührung kommen, müssen zur Vermeidung einer eventuellen RNase-Aktivität sorgfältig sterilisiert werden. Vor Arbeitsbeginn wurden Arbeitsplatz und Pipetten zur Dekontaminierung mit UV-Licht bestrahlt (20 Minuten). Die Zentrifuge wurde währenddessen auf +4 °C vorgekühlt.

Von dicht bewachsenen Kulturflaschen wurde der Zellkultur-Überstand abgesaugt. Anschließend wurde 1 ml Trizol®-Reagenz pro 10 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche zugegeben (3 ml je 25 cm<sup>2</sup>-Flasche oder 1 ml je 3,5 cm-Petrischale) und mit der Pipette vorsichtig über die Zellen gespült, ohne die Zellschicht abzulösen. Die nach der Lyse der Zellmembranen verbliebene RNA-hältige Trizol®-Lösung wurde in ein frisches steriles Eppendorf-Gefäß transferiert, durch Vortexen homogenisiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden 0,2 ml Chloroform/1 ml Trizol®-Reagenz zupipettiert und kräftig für mindestens 15 Sekunden gevortext. Es wurde erneut 3 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde für 15 Minuten bei 13 000 U/min und 4 °C zentrifugiert.

Die obere wäßrige Phase ohne Beimengung der schmierigen Interphase (kann leichter abgenommen werden, wenn das Eppendorf-Gefäß gekippt wird) wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß transferiert und 0,5 ml Isopropanol/1 ml Trizol®-Reagens zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen durch Vortexen und kurzem Abzentrifugieren wurde 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte wiederum ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt mit 13 000 U/min und bei 4 °C. Aus der verbleibenden organischen Phase wurden die Zellproteine isoliert (siehe Abschnitt 4.2.1).

Der Überstand über dem winzigen Pellet (das je nach Reinheit auch durchsichtig sein kann) wurde nun sehr vorsichtig entfernt und verworfen. Dieser Vorgang läßt sich vorteilhaft durch die Verwendung immer kleinerer Pipetten bewerkstelligen. Die entsprechend geringeren Volumina wirbeln das Pellet weniger wahrscheinlich auf. Dabei sollte bei jedem Pipettier-Schritt eine neue Spitze verwendet werden, um eine Störung des Pellets durch eingetragene Luft zu verhindern. Das Pellet wurde mit 1 ml kaltem 70%igem Ethanol (+4 °C, das verwendete Wasser muß mit Diethylpyrocarbonat DEPC behandelt sein) gewaschen. Das Pellet wurde dann 5 Minuten lang mit 9 100 U/min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Wasch-Schritt wurde nach Bedarf noch ein bis zwei Mal wiederholt. Zweimaliges Waschen des Pellets erwies sich als ausreichend.

Zum Trocknen des Pellets wurde der Überstand wie oben beschrieben abgenommen. Um auch die letzten Flüssigkeitsreste entfernen zu können, wurde zwischen den einzelnen Pipettierschritten immer wieder kurz abzentrifugiert. Sammelte sich am Boden des Eppendorf-Gefäßes keine Flüssigkeit mehr, so war das Pellet „air-dry“ – weiteres Trocknen hätte die Löslichkeit der RNA drastisch verschlechtert. Das RNA-Pellet wurde in 60 µl DEPC-Wasser je 25 cm<sup>2</sup>-Flasche (bzw. 20 µl je Petrischale) aufgenommen und zur Rehydrierung 10 Minuten lang am Thermo-Mixer bei 65 °C und unter leichtem Schütteln inkubiert. Um eine homogene Lösung zu erreichen, wurde die Lösung zwischendurch nachhaltig durchmischt – dies wurde entweder durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen und Abzentrifugieren erreicht. Zur Kontrolle der Qualität der Isolierung wurde die RNA auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen und die Elektrophorese in 0,5 x TBE-Puffer mit Ethidiumbromid (Zusammensetzung der benötigten Lösungen siehe Abb. 4.1) bei 95 Volt und Raumtemperatur durchgeführt. Die Abb. 4.2 und 4.3 zeigen jeweils ein Agarose-Gel mit diversen RNA-Proben der beiden Zell-Linien Gos-3 und LN-405.

Abb 4.1 Elektrophorese-Bedingungen

**5x TBE Puffer**

0,45 M Tris-Base (TRIZMA® Base, SIGMA®)  
0,45 M Borsäure pro analysi (MERCK)  
10 mM EDTA (SIGMA®)

pH 8,0 einstellen und autoklavieren, muß zum Gebrauch geeignet verdünnt werden  
oder 10x TBE Stock (Biowhittaker)

**Ethidiumbromidlösung**

10 mg Ethidiumbromid (MERCK) auf 1 ml aqua dest.  
Für jedes 50 ml-Gel werde 3 µl verwendet; pro Liter Puffer gibt man 60 µl zu

**Zusammensetzung des Agarosegels**

0,3 g Ampli-Size Agarose (BioRad)  
0,5 g Low-Melting Agarose (Margaritella)  
40 ml 0,5x TBE-Puffer  
2,4 µl Ethidiumbromidlösung [10 mg/ml] (MERCK)

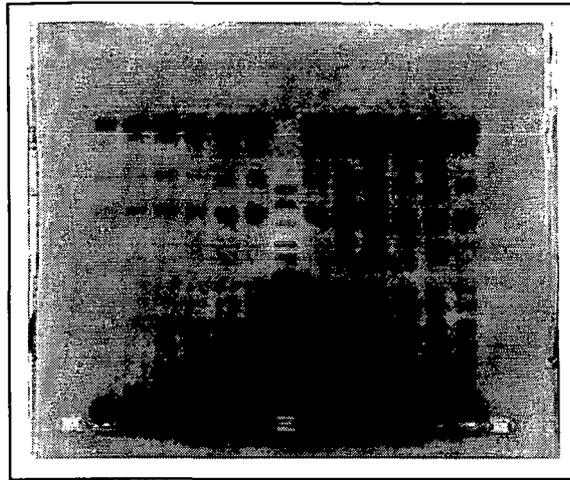
**Gel Loading Buffer**

0,25% Bromphenolblau (MERCK)  
0,25% Xylene Cyanol FF SIGMA®)  
30% Glycerin wasserfrei reinst (MERCK)  
steril filtrieren

**Auftrag pro Lane**

2,5 µl fertig mit Loading Buffer vermischten Msp I-Marker (New England BioLabs Inc.)  
4 oder 5 µl RNA + 1 µl Loading buffer

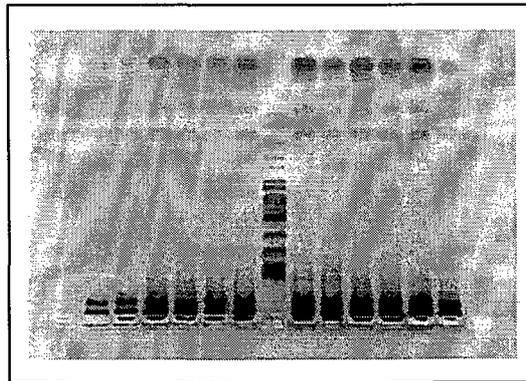
Abb. 4.2 RNA-Proben von Gos-3-Zellen auf 2%igem AgaroseGel



Lanes 1 und 15  
Lanes 2-7 und 9-14  
Lane 8

leer  
RNA-Proben von Gos-3-Zellen, unstimuliert bzw.  
nach Stimulation mit 1 000 U Betaferon/ml  
Marker Msp-I

Abb. 4.3 RNA-Proben von LN-405-Zellen auf 2%igem AgaroseGel



Lanes 1 und 15  
Lanes 2-7 und 9-14  
Lane 8

leer  
RNA-Proben von LN-405-Zellen, unstimuliert bzw.  
nach Stimulation mit 1 000 U Betaferon/ml  
Marker Msp-I

### 4.3 DNase-Behandlung

Um die eventuell vorhandene kontaminierende genomische DNA abzubauen, wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt.

Der Ansatz (siehe Abb. 4.4; 300 µl/25 cm<sup>2</sup>-Flasche bzw. 100 µl/Petrischale) wurde eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 30 µl bzw. 10 µl 10x Stop-Puffer dazupipettiert und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert (Denaturierung des Enzyms). Nach der Inkubation wurde das gleiche Volumen (330 µl bzw. 110 µl) „gesättigtes“ Phenol (Phenol:Chloroform 3:1) zugegeben und durch Vortexen gemischt.

Abb.4.4 Ansatz für die DNase-Behandlung

#### **Ansatz (300 µl):**

Menge	Substanz, Konzentration	Konz. im Ansatz
55 µl	RNA	
2 µl	DNase I [10 U/µl]	70 U/ml
30 µl	MgCl <sub>2</sub> [100 mM]	10 mM
10 µl	Prime RNase-Inhibitor [1 000 U/ml]	3000 U/ml
203 µl	DNase-Puffer	

Der RNase-Inhibitor ist von der Firma Eppendorf, die DNase I von der Firma Roche

Anschließend wurde 5 Minuten lang bei 13 000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand (ungefähr 330 µl/25 cm<sup>2</sup>-Flasche bzw. 110 µl/3,5 cm-Petrischale) wurde ohne Beimengung der Interphase in ein frisches steriles Eppendorf-Gefäß transferiert. Dann wurden 33 µl bzw. 11 µl 10x Natriumazetat-Lösung (3 M) sowie das 2,5fache Volumen (900 µl bzw. 300 µl) kaltes (4 °C) 100%iges Ethanol zugegeben. Die RNA wurde durch Inkubation über Nacht bei -20 °C gefällt.

Die RNA wurde nach der Fällung 5 Minuten lang bei 13 000 U/min und 4 °C abzentrifugiert; ein Pellet war allerdings nicht immer erkennbar, oft war nur ein zarter Schleier am Boden der Eppendorf-Gefäße zu sehen. Der Überstand wurde wie oben beschrieben vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde sodann mit 0,5 ml 75%igem Ethanol (muß mit DEPC-Wasser herge-

stellt sein) gewaschen. Es folgte erneut ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 9 100 U/min und 4°C. Durch sorgfältiges Absaugen der überstehenden Flüssigkeit wurde das RNA-Pellet getrocknet. Das Pellet wurde mit 20 µl bzw. 12 µl DEPC-Wasser versetzt und durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C rehydratisiert. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder Vortexen und Abzentrifugieren erleichterten das Lösen der RNA.

#### 4.4 Umschreiben in cDNA (Reverse Transkription)

Der gesamte RNA-Pool (mRNA und rRNA, „total RNA“) wird unter Verwendung von oligo-dT-Primern durch die Reverse Transkriptase in die wesentlich stabilere cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion ist der erste Schritt der RT-PCR, die zur Analyse der (relativen) Mengen spezifischer mRNAs herangezogen wird. Oligo-dT-Primer synthetisieren lediglich cDNA-Äquivalente der mRNA-Moleküle (die einen Poly-A-Schwanz besitzen), während als Primer eingesetzte Random-Hexamere den gesamten RNA-Pool in cDNA übertragen.

Die Zusammensetzung der RT-Reaktion wird in den Abb. 4.5 und Abb. 4.6 erläutert. Das endgültige Volumen des Ansatzes betrug 20 µl für die RT-Reaktion. Für die RT-Reaktion und für die PCR wurden 200 µl-PCR-Röhrchen (Biozym) verwendet. Sämtliche Komponenten wurden für alle geplanten Ansätze gemeinsam gemischt (Master-Mix 1), nur die RNA wurde in jedes Röhrchen separat zupipettiert. Die RNA mußte vor jedem Gebrauch erhitzt („geschmolzen“) werden, um eine gleichmäßige Konzentration in allen Ansätzen zu gewährleisten. Die RNA wird für das Aufschmelzen entweder 10 min lang bei 65 °C oder aber 5 min lang bei 70 °C inkubiert.

Abb. 4.5 Komponenten der RT-Reaktion – Teil 1

**Komponenten der RT-Reaktion – Teil 1** (Mengenangaben pro Ansatz)

5 µl RNA [0,1 – 1 µg/µl]  
1 µl Oligo-dT [0,6 µg/µl, 18-mer]  
1 µl dNTP-Mix [je 10 mM]  
5,5 µl DEPC-Wasser

In jedes Röhrchen werden 7,5 µl Master-Mix 1 vorgelegt, dann wird die RNA zugegeben; vor der Inkubation wird abzentrifugiert

Nach 5-minütiger Inkubation der Ansätze bei 65 °C wurden die Röhrchen auf Eis gestellt und die restlichen Komponenten (Master-Mix 2, siehe Abb. 4.6) zugegeben. Dann wurde durch Vortexen gemischt und der Ansatz durch Abzentrifugieren am Boden des Eppendorf-Gefäßes gesammelt. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 42 °C wurde je Ansatz 1 µl (= 200 U) der Reversen Transkriptase (Superscript-Enzym, Invitrogen) zupipettiert. Die Ansätze wurden nun 60 Minuten lang bei 42 °C inkubiert, danach folgte eine viertelstündige Inkubation bei 70 °C zur Inaktivierung des Enzyms. Die cDNA konnte nun im Gegensatz zur RNA bei -20 °C gelagert werden.

Abb. 4.6 Komponenten der RT-Reaktion – Teil 2

**Komponenten der RT-Reaktion – Teil 2** (Mengenangaben pro Ansatz)

4 µl 5x RT-Puffer  
2 µl 100 mM DTT  
0,5 µl Prime RNase-Inhibitor [1 000 U/ml] (Eppendorf)

In jedes Röhrchen werden 6,5 µl dieses Mastermix' 2 zugegeben, gemischt und abzentrifugiert

#### 4.5 Polymerase Chain Reaction PCR

Die PCR ist der zweite Teil einer RT-PCR, die im vorgehenden Schritt hergestellte stabile cDNA dient als Ausgangsmaterial. Die PCR muß sorgfältig optimiert werden, damit deren Resultate (relative Menge eines spezifischen Gens, hier von ApoE) zuverlässig sind.

Ein Vergleich der Mengen an PCR-Produkt für ApoE und ein konstitutiv exprimiertes Gen („Housekeeping-Gen“; wir verwendeten Genabschnitte von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), einem Enzym der Glykolyse, und von  $\beta$ -Actin, einem Bestandteil des Zellskeletts, ergab die relative ApoE-Menge, die unter verschiedenen Zellkultur-Bedingungen (Stimulation mit Betaferon®, unstimulierte Zellen) unterschiedlich sein konnten.

Der Ansatz für die PCR ist aus Abb. 4.7 ersichtlich, das PCR-Programm aus Abb. 4.8. Die optimale Annealing-Temperatur wurde anhand eines Temperatur-Gradienten ermittelt. Für die PCR wurde ein Gradienten-Cycler der Firma MJ Research (DNA-Engine PTC-200, Peltier Thermal Cycler) verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie die Längen der entsprechenden PCR-Produkte sind in Abb. 4.9 dargestellt.

Abb. 4.7 Ansatz für die PCR-Reaktion

**Ansatz für die PCR-Reaktion** (25  $\mu$ l)

2,5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer  
 0,5  $\mu$ l dNTP-Mix [je 10 mM]  
 0,25  $\mu$ l Taq-Polymerase [5 U/ $\mu$ l] (Boehringer Mannheim)  
 1,25  $\mu$ l DMSO (MERCK)  
 17  $\mu$ l DEPC-Wasser  
 1  $\mu$ l Primer-Mix, forward und reverse [je 12,5  $\mu$ M]  
 2,5  $\mu$ l cDNA-Probe

Abb. 4.8 PCR-Programm

**PCR-Programm**

96 °C	5 min	} insgesamt 35 Zyklen
96 °C	1 min	
65 °C	1 min 30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	180 min	

Abb. 4.9 Sequenzen der verwendeten Primer (stets in 5' nach 3'-Richtung angegeben) und Länge der PCR-Produkte

ApoE-RT forward:	TTC CTG GCA GGA TGC CAG GC	<b>ApoE-RT</b> <b>269 bp</b>
ApoE-RT reverse:	GGT CAG TTG TTC CTC CAG TTC	
ApoE forward:	TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA	<b>ApoE</b> <b>217 bp</b>
ApoE reverse:	ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A	
GAPDH forward:	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G	<b>GAPDH</b> <b>240 bp</b>
GAPDH reverse:	TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT	
$\beta$ -Actin forward:	CAA GAG ATG GCC ACG GCT GCT	<b><math>\beta</math>-Actin</b> <b>274 bp</b>
$\beta$ -Actin reverse:	TCC TTC TGC ATC CTG TCG GCA	

Nach der PCR wurde der gesamte Ansatz (25  $\mu$ l) mit 5  $\mu$ l Gel Loading Buffer (siehe Abb. 4.1) versetzt und ein Aliquot (3 bis 8  $\mu$ l) auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen waren wie oben beschrieben 0,5x TBE mit Ethidiumbromid, 95 V und Raumtemperatur. Das Agarose-Gel wurde mit dem für Ethidiumbromid-Gele vorgesehenen Filter mit geeigneter Blende und der geringstmöglichen Verschlusszeit aufgenommen. Durch die Wahl der Blende wurde der optimale Kontrast eingestellt. Um die Fehler bei der Quantifizierung möglichst klein zu halten, wurde der größtmögliche Bildausschnitt gewählt. Dann wurde das Gel mit einem Imaging System (ChemiImager der Firma Biozym®) in computerlesbarer Form dokumentiert und als TIFF-File gespeichert (siehe Abb. 4.10).

## 4.6 Optimierung der RT-PCR

### 4.6.1 Petrischalen für Zellkulturexperimente

Die für die Experimente verwendeten Petrischalen mußten für jede Zell-Linie sorgfältig ausgewählt werden. Wachstumsversuche zeigten, daß sich GOS-3-Zellen vornehmlich auf Petrischalen der Firma Corning® (Suspension Culture Dish, Corning® Inc.) vermehren während LN-405-Zellen jene der Firma Falcon® (EASY GRIP™ Tissue Culture Dish, Falcon®) bevorzugen.

### 4.6.2 RNase H-Behandlung

Die RNase H baut selektiv den RNA-Anteil in hybriden RNA:DNA-Doppelhelices ab. Ein Einsatz dieses Enzyms nach der RT-Reaktion kann die Spezifität der PCR verbessern und evtl. die Ausbeute erhöhen. Vorversuche zeigten jedoch, daß dieser Schritt nur äußerst geringe Auswirkungen zeigt und wurde daher bei der beschriebenen RT-PCR nicht eingesetzt.

### 4.6.3 Aufschmelzen der RNA- und cDNA-Proben

Bei diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß es für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von großer Wichtigkeit ist, die RNA- und cDNA-Proben vor der Verwendung für die RT-Reaktion bzw. für die PCR zu erhitzen („schmelzen“). Dafür wurden die Proben entweder 10 min lang bei 65 °C oder 5 min lang bei 70 °C inkubiert. Bei diesen Intervallversuchen wurde auch die Behandlung mit DNase wieder in den Versuchsablauf eingefügt. Wahrscheinlich wegen der größeren Reinheit und wegen der geringeren Konzentration der RNA-Präparation erwies es sich als vorteilhaft, die Housekeeping-Gene bis zur Zykluszahl  $n = 25$  zu amplifizieren, um ein ausreichendes Signal zu erhalten.

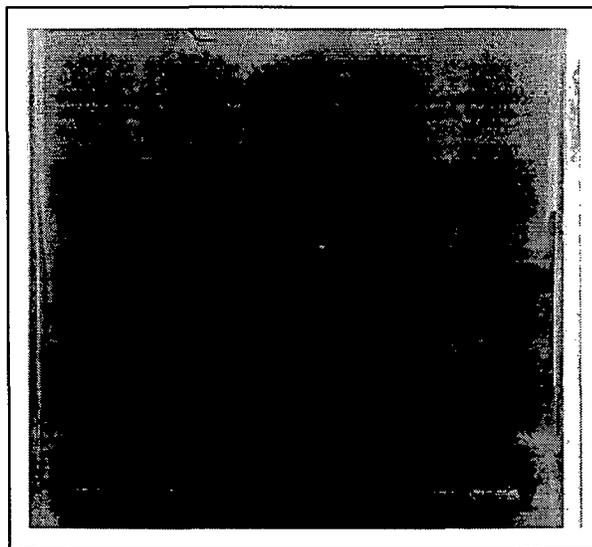
### 4.6.4 Fällung der RNA

Die Eppendorf-Gefäße sollten während der RNA-Fällung im Rahmen der Behandlung mit DNase in einem Rack aufbewahrt werden, damit sich die geringen Mengen RNA nicht an ungeeigneter Stelle ablagern und während der Sol-

vatisierung sicher gelöst werden können. Häufig entstand kein richtiges Pellet, sondern nur ein zarter Niederschlag, der nur weiterverarbeitet werden konnte, wenn er sich am Boden der Eppendorf-Gefäße befand.

Ob die Durchführung der RT oder in weiterer Folge auch der PCR überhaupt sinnvoll wäre, wurde besonders bei den ersten Experimenten durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese der frisch rehydratisierten RNA-Pellets überprüft (solange die Handhabung der RNA noch nicht perfekt war, konnte die RNA leicht im Laufe der Isolierungs- und Reinigungsschritte verloren gehen). Dabei wurde jedoch kein spezielles Formaldehydgel verwendet. Zur Orientierung, ob überhaupt RNA vorhanden war, war ein „normales“ Agarose-Gel, wie es zur Quantifizierung der PCR-Produkte eingesetzt wurde, absolut ausreichend (siehe Abb. 4.11).

Abb 4.11 Agarose-Gel zur Kontrolle der RNA-Isolierung



Lanes 1, 2, 3, 7, 8  
Lane 4  
Lane 5  
Lane 6

leer  
total RNA, Gos-3  
Marker Msp-I  
total RNA, SH-SY5Y

#### 4.6.5 Zeitpunkte für die Probennahme

Da nun die für die Auswertung optimalen Zykluszahlen  $n$  für jedes gemessene Gen unter den oben beschriebenen Bedingungen bekannt waren, konnten die ersten Stimulationsversuche mit Betaferon® durchgeführt werden.

Das Betaferon®-Lyophilisat wurde mit dem beigepackten Lösungsmittel (0,54% NaCl, pH 7,00) zu einer Stocklösung der Konzentration 8000 U/ $\mu$ l verdünnt und in 11  $\mu$ l-Aliquoten auf  $-80$  °C gelagert. Es wurden 12 dicht mit GOS-3-Zellen bewachsene Flasks vorbereitet und zu einem festgelegten Zeitpunkt mit 1 000 U Betaferon®/ml stimuliert. Die Probenahmen (2 Flasks pro Zeitpunkt; je eine stimulierte Flask und eine unstimulierte Flask als Kontrolle) erfolgten 12, 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden nach der ersten Stimulation. Das Stimulationsmedium wurde alle 24 Stunden erneuert. Bei jeder Probennahme wurde die RNA nach der Trizol®-Methode (siehe Abschnitt 4.2) isoliert. Ein gleich gestalteter Versuch wurde mit der Zelllinie LN-405 ausgeführt. Jede Probe wurde in der PCR an 4 verschiedenen Zykluszahlen  $n$  ausgewertet, wobei für ApoE die folgende Werte  $n = 26, 29, 32, 35$  herangezogen wurden (im Gegensatz zu den  $n = 14, 17, 20, 23$  für die Housekeeping-Gene). Für die ApoE-Messungen wurde das Primer-Paar ApoE verwendet, da damit ein reineres PCR-Produkt zu erzielen war als bei Verwendung des Primer-Paares ApoE-RT. Beide Zell-Linien zeigten ähnliche Steigungen in der linearen Phase (Diagramme siehe Abb. 4.12 und Abb. 4.13). Die relativen Werte allerdings bewiesen noch keinen deutlichen Trend der stimulierten gegenüber der Kontrollgruppe (Diagramme siehe Abb. 4.14 bis 4.17).

Abb.4.12 Erste Stimulationsversuche, Diagramm: Absolutwerte Intensität gegen Zykluszahl n bei Gos-3-Zellen

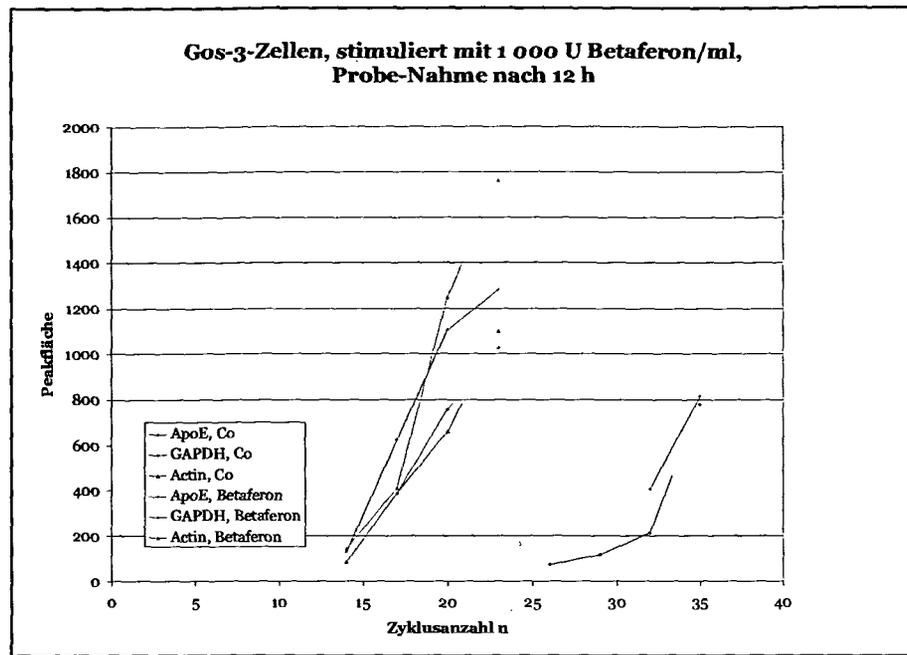


Abb.4.13 Erste Stimulationsversuche, Diagramm: Absolutwerte Intensität gegen Zykluszahl n bei LN-405--Zellen

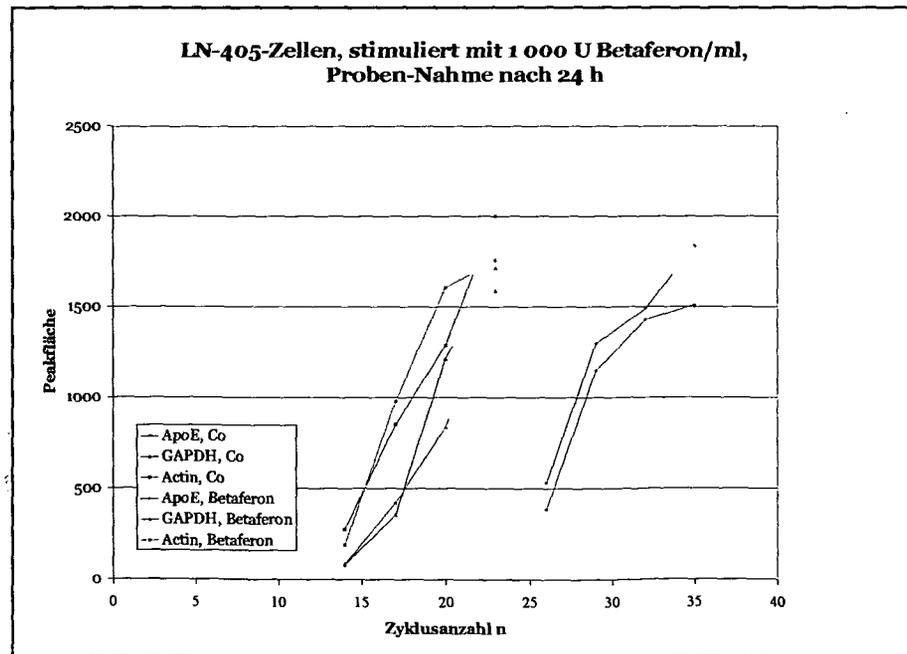


Abb. 4.14 Erste Stimulationsversuche, Diagramm: Relative Mengen ApoE zum Zeitpunkt der Probenahme bei Gos-3-Zellen, bezogen auf GAPDH

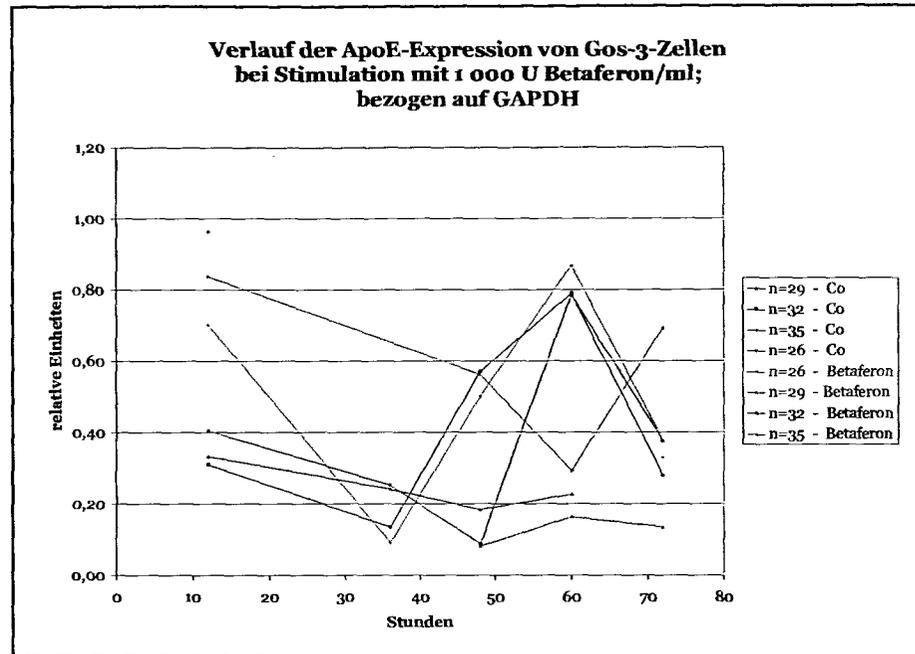


Abb. 4.15 Erste Stimulationsversuche, Diagramm: Relative Mengen ApoE zum Zeitpunkt der Probenahme bei Gos-3-Zellen, bezogen auf  $\beta$ -Actin

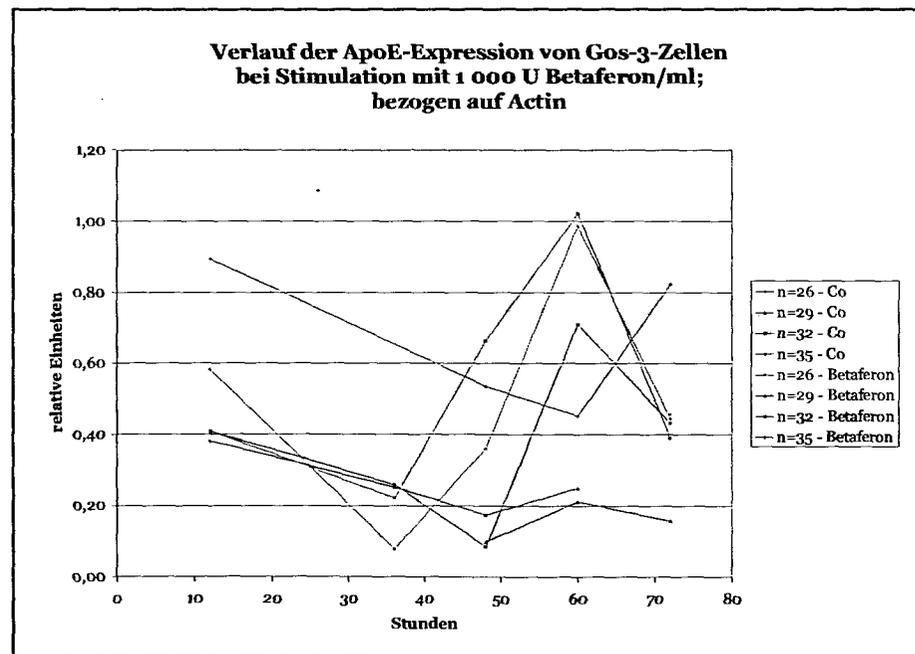


Abb 4.16 Erste Stimulationsversuche, Diagramme Relative Mengen ApoE gegen Zykluszahl n bei LN-405-Zellen, bezogen auf GAPDH

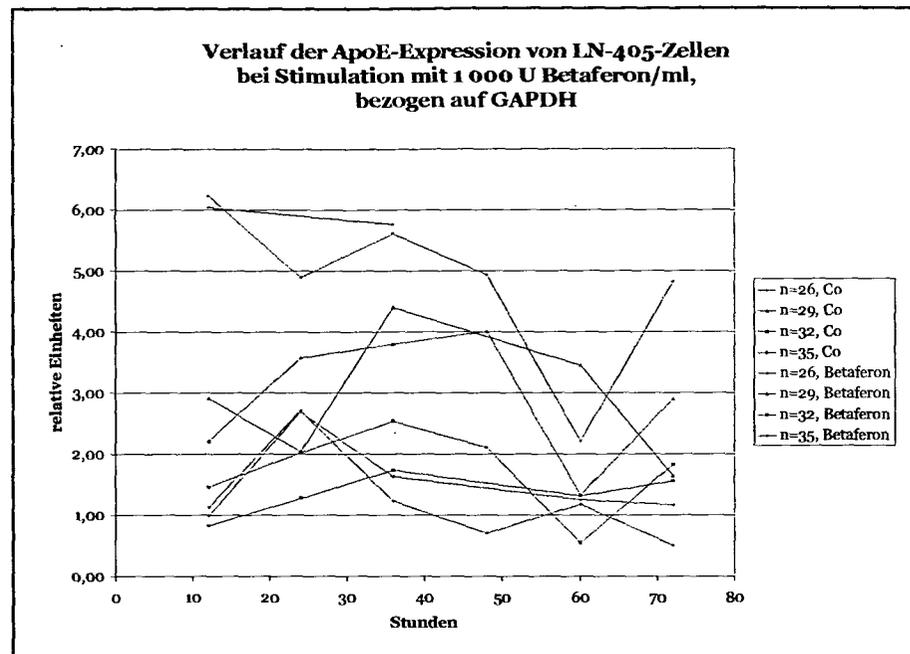
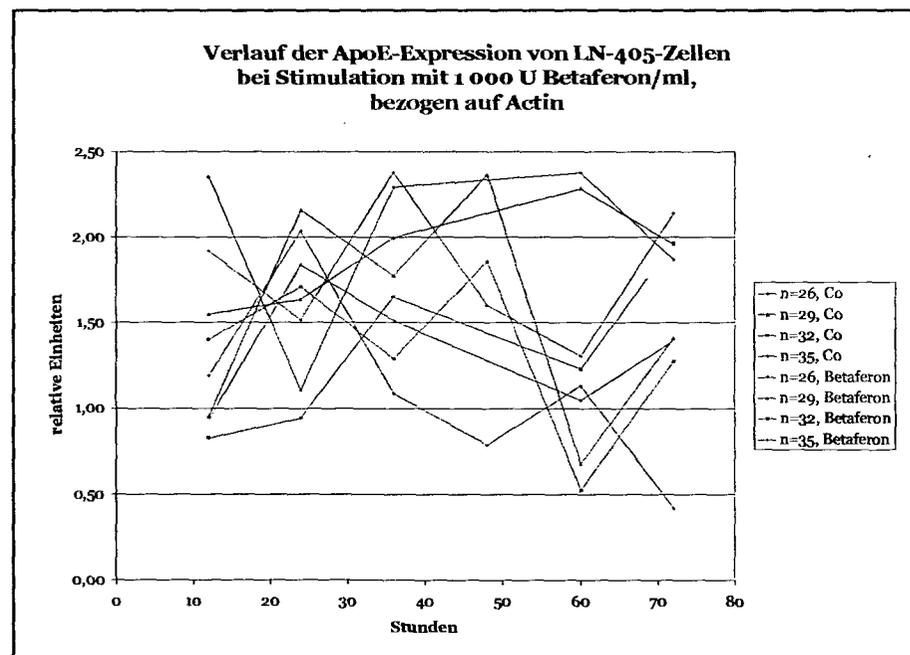


Abb 4.17 Erste Stimulationsversuche, Diagramme Relative Mengen ApoE gegen Zykluszahl n bei LN-405-Zellen, bezogen auf  $\beta$ -Actin



Aus diesen Versuchen konnten vorläufig (optimale) Zykluszahlen für alle untersuchten Gene abgeleitet werden: die Ansätze für die Housekeeping-Gene wurden nach  $n = 17$  aus der PCR-Maschine entfernt während die ApoE-Ansätze bis  $n = 35$  amplifiziert wurden.

Die langfristige Stimulierung (100 und 1 000 U Betaferon®/ml Medium) ergab keine Abweichungen in der ApoE-Expression der Zell-Linien GOS-3, LN-405 und SH-SY5Y im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Offenbar werden stimulationsbedingte Effekte auf die ApoE-Expression, so es diese überhaupt gibt, in einem anderen Zeitrahmen wirksam. Da eine noch längerfristige Modifizierung der ApoE-Expression kaum vorstellbar schien, wurde der Zeitrahmen für den nächsten Versuch enger gewählt. Eine konfluente Flask GOS-3-Zellen wurde am Tag vor der Stimulation in sechs Petrischalen gesplittet. Die Probenahmen erfolgten in kürzeren Intervallen, das heißt 30, 60, 120, und 240 min nach der Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium. Ein ähnlicher Versuch wurde auch mit LN-405 -Zellen durchgeführt. Die Veränderung der ApoE-Expression unter Stimulationsbedingungen für die untersuchten Zell-Linien ist den Abbildungen 4.18 und 4.19 zu entnehmen.

Abb. 4.18 ApoE-Expression der Gos-3-Zellen über 240 min

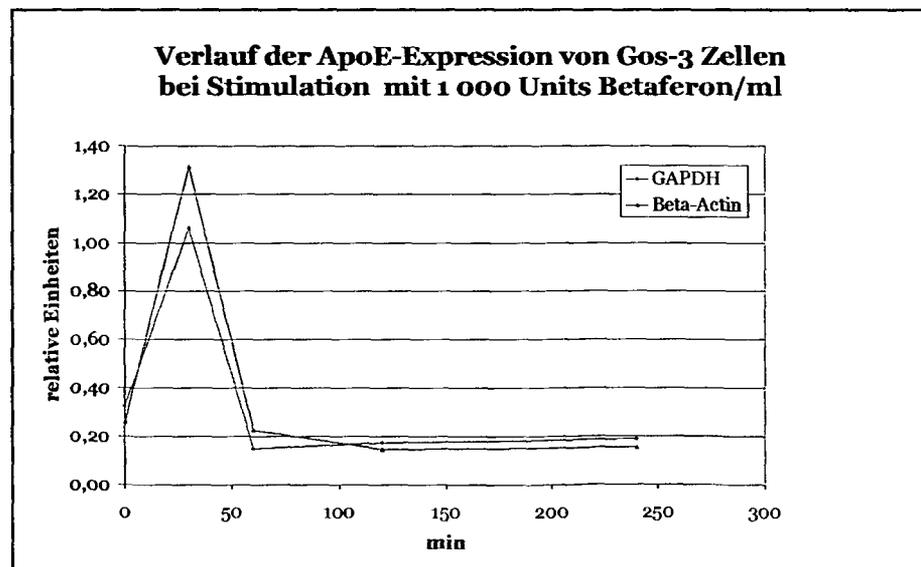
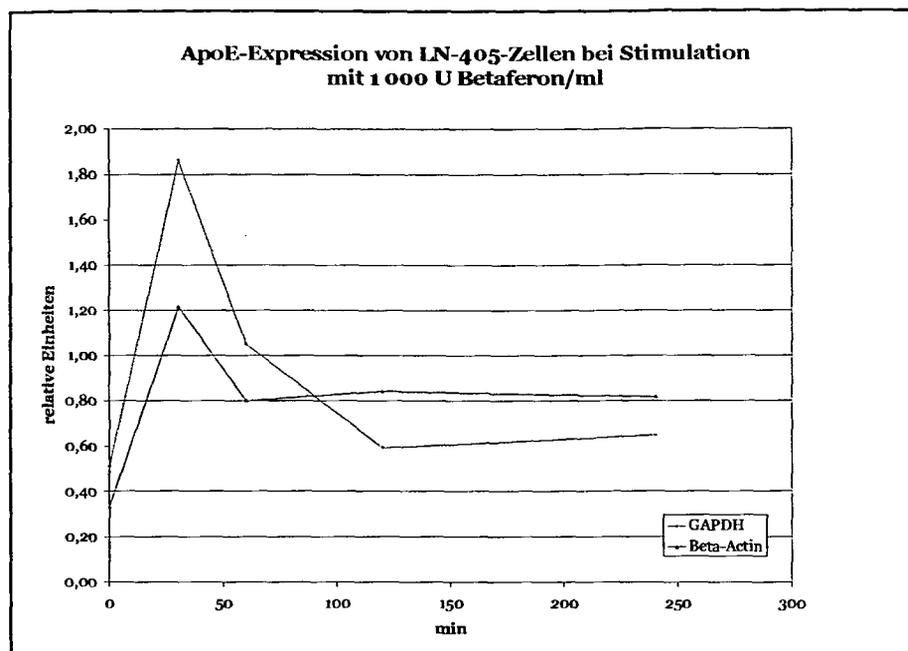


Abb. 4.19 ApoE-Expression der LN-405-Zellen über 240 min



Der zeitliche Verlauf der ApoE-Expression unter Stimulationsbedingungen konnte durch eine weitere Verkürzung der Intervalle genauer modelliert werden. Die Isolierung der RNA-Proben wurde 15, 30, 45, 60 und 120 min nach der Stimulation mit Betaferon® durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden für GOS-3- und LN-405-Zellen und verschiedene Betaferon®-Konzentrationen (1 000, 100, 10, 1 U Betaferon®/ml Medium) angestellt. Diverse ApoE-Expressionsprofile sind den Diagrammen in Abb. 4.20 und Abb. 4.21 zu entnehmen.

Abb. 4.20 ApoE-Expressionsprofil der Gos-3-Zellen über 120 min

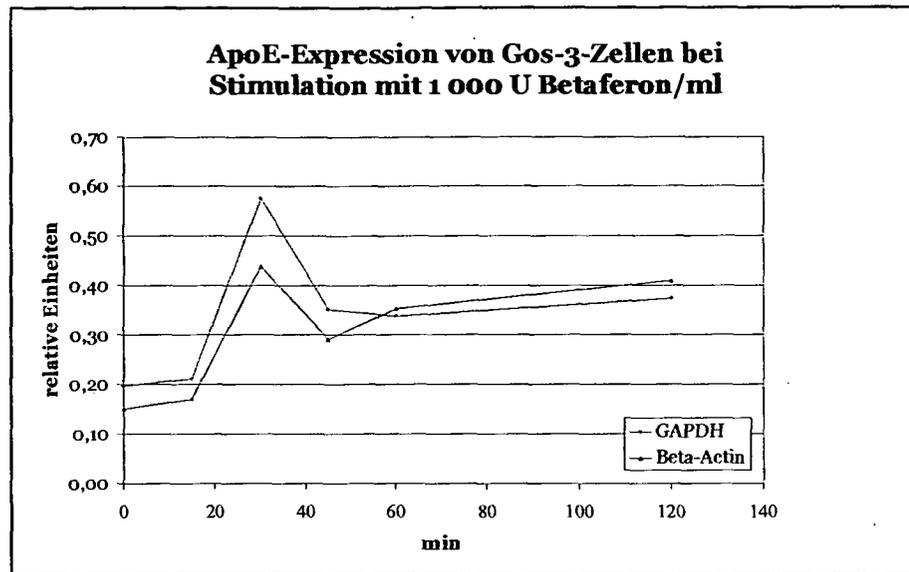
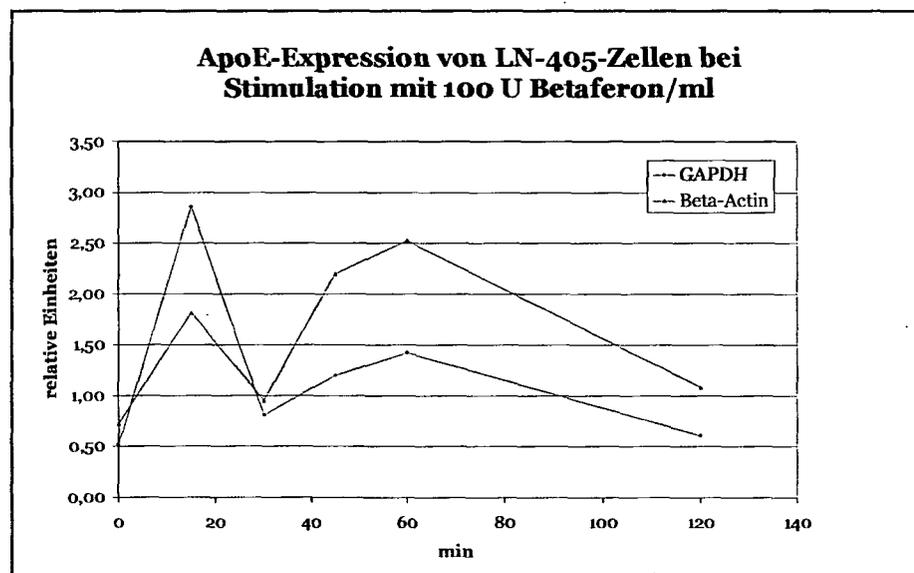


Abb. 4.21 ApoE-Expressionsprofil der LN-405-Zellen über 120 min



4.6.6 PCR*Auswahl der ApoE Primer und Zugabe von 5 % DMSO*

In Vorversuchen wurde die Spezifität und Effektivität der beiden ApoE-Primer-Paare verglichen, wobei der schon länger im Forschungslabor verwendete ApoE-Primer zuverlässigere Resultate erbrachte als der extra für RT-Reaktionen geschaffene ApoE-RT-Primer, zu dem auch ein extra dafür vorgesehener interner Standard für die RT-PCR erhältlich ist (siehe auch Abschnitt 4.5). Für den Einsatz des ApoE-RT-Primer-Paares wurde ein PCR-Programm mit einer Annealing Temperatur von 64 °C entwickelt (siehe Abb. 4.22). Die optimale Annealing-Temperatur von 64 °C wurde mit Hilfe eines Gradienten-Cyclers (DNA-Engine PTC-200, Peltier Thermal Cycler) ermittelt; die Dauer der einzelnen Zyklusphasen der PCR wurde durch vergleichende Experimente anhand der Reinheit und Ausbeute der PCR-Produkte für ApoE und die Housekeeping-Gene bestimmt.

Abb 4.22 PCR-Programm für das ApoE-RT-Primer-Paar

<b>PCR-Programm</b>		
95 °C	8 min	} insgesamt 35 Zyklen
95 °C	1 min	
64 °C	1 min 30 s	
72 °C	1 min 30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	3 h	

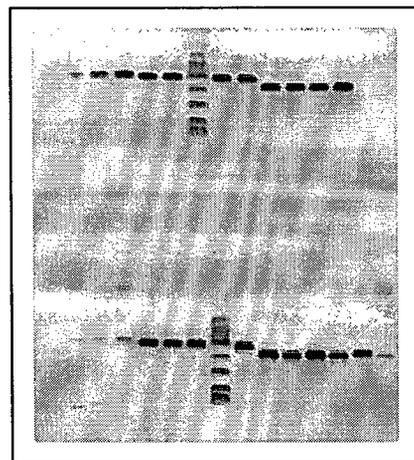
Wenn allerdings die bereits bekannten ApoE-Primer verwendet werden, so sollen (wie bereits bei der zur Genotypisierung eingesetzten PCR ermittelt) dem PCR-Ansatz 5 % DMSO zugefügt werden. In diesem Falle erfolgt die PCR mit größerer Effizienz und Spezifität, da die Bildung von Primer-Dimeren und verschwommen erscheinenden Banden durch unspezifische Amplifikation verhindert werden. Die Zugabe von DMSO ist besonders für die korrekte Ampli-

fikation des ApoE-Fragments erforderlich, beeinflusst aber auch die Amplifikation der PCR-Produkte der als innerer Standard verwendeten Housekeeping-Gene nicht negativ.

#### *Lineare Phase der PCR zur semiquantitativen Bestimmung der ApoE-Menge*

Die Mengenverhältnisse zwischen Struktur-Gen und Housekeeping-Gen(en) sind nur aussagekräftig, wenn die Messung während der linearen Phase der PCR erfolgt. Die lineare Phase wird wahrscheinlich von den Housekeeping-Genen schneller erreicht, da die Menge ihrer mRNA vermutlich deutlich größer ist als die eines Strukturgens wie ApoE (siehe Abschnitt 4.7, Quantifizierung).

Abb. 4.23 Agarose-Gel nach PCR; 4-Punkt-Eichung



#### Obere Reihe:

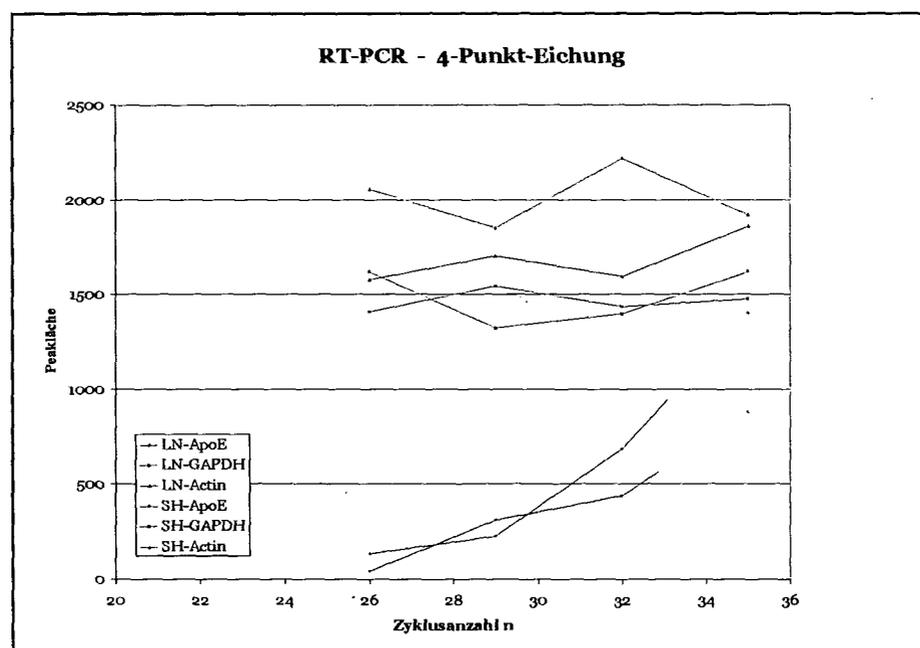
Lanes 1 bis 4	LN-405-Zellen, ApoE, nach Zyklus Nr. 26, 29, 32, 35
Lanes 5,6 und 8,9	LN-405-Zellen, GAPDH, nach Zyklus Nr. 26, 29, 32, 35
Lanes 10 bis 13	LN-405-Zellen, $\beta$ -Actin, nach Zyklus Nr. 26, 29, 32, 35
Lane 7	Marker Msp-I
Lane 14	Blindwert
Lane 15	leer

#### Untere Reihe:

Lanes 1 bis 4	SH-SY5Y-Zellen, ApoE, nach Zyklus Nr. 26, 29, 32, 35
Lanes 5-7 und 9	SH-SY5Y-Zellen, GAPDH, nach Zyklus Nr. 26, 29, 32, 35
Lanes 10 bis 13	SH-SY5Y-Zellen, $\beta$ -Actin, nach Zyklus Nr. 26, 29, 32, 35
Lane 8	Marker Msp-I
Lane 25	LN-405-Zellen, BDNF, nach 35 Zyklen
Lane 26	SH-SY5Y-Zellen, BDNF, nach 35 Zyklen

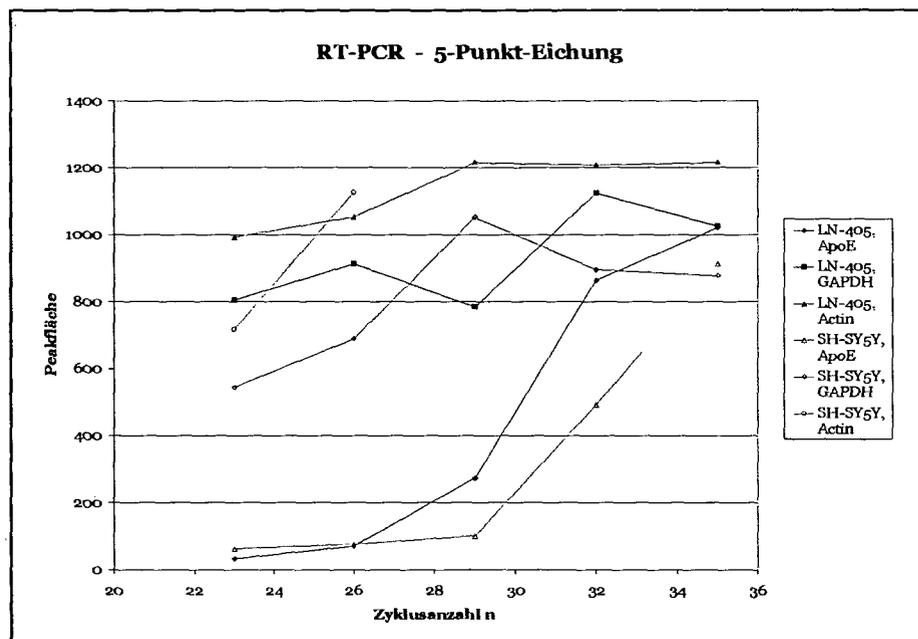
Diese Vermutung wurde überprüft, indem pro Probe mehrere Ansätze vorbereitet wurden, die unterschiedlich lange an der PCR-Reaktion (verschiedene Zyklusanzahl  $n$ ) teilhatten. Ergaben sich für alle untersuchten Gene gleiche (oder zumindest ähnliche) Steigungen, so waren die erhaltenen Daten geeignet zur Ermittlung der relativen Menge eines bestimmten Strukturgens (hier ApoE). Die Linearität der ApoE-PCR wurde anhand einer 4- bzw. 5-Punkt-Eichung überprüft. Diese ersten Versuche wurden der Einfachheit halber ohne DNase- und RNase H-Behandlung durchgeführt. Die Röhren wurden nach (23) 26, 29, 32 und 35 Zyklen aus dem PCR-Gerät herausgenommen und dann in einer anderen PCR-Maschine oder im Wasserbad weitere 10 min bei 72 °C inkubiert (abschließende Extension wie im PCR-Programm). Unter diesen Bedingungen waren allerdings die Housekeeping-Gene bereits in der Sättigungs- bzw. Plateauphase, während sich die ApoE-PCR noch in der linearen Phase befand (Agarose-Gel siehe Abb. 4.23, Diagramm Absolutwerte gegen Zyklusanzahl  $n$  siehe Abb. 4.24). Auch eine Verdünnung der PCR-Produkte der Housekeeping-Gene (1:10, 1:50) brachte keine Verbesserung, die Sättigung blieb unverändert.

Abb. 4.24 Diagramm 4-Punkt-Eichung (26, 29, 32, 35 Zyklen)



Eine 5-Punkt-Eichung erbrachte bei gleicher Durchführung wie oben beschrieben keine wesentliche Verbesserung, obwohl geringere Mengen an PCR-Produkt (3 µl statt 8 µl) auf das Agarose-Gel aufgetragen wurden. Auch bei Zyklus 23 waren die Housekeeping-Gene bereits in der Plateauphase, somit ergab die Ermittlung der relativen Mengen der ApoE-mRNA keine zuverlässigen Ergebnisse. Die Absolutwerte für das PCR-Produkt des ApoE-Gens zeigten allerdings die zu erwartende sigmoide Kurve (siehe auch Abschnitt 4.7, Quantifizierung), wenn diese gegen die Zykluszahl n aufgetragen wurden. Das entsprechende Diagramm ist der Abb. 4.25 zu entnehmen.

Abb.4.25 Diagramme 5-Punkt-Eichung (23,26, 29, 32, 35Zyklen)



Um die Messung bei allen Genen in der linearen Phase der PCR durchzuführen, wurden die Housekeeping-Gene bei niedrigeren Zykluszahlen (n = 11, 14, 17, 20, 23) gewertet, die ApoE-Produkte hingegen weiterhin bei den oben angegebenen Zykluszahlen. Im Diagramm Absolutwerte (Intensität) gegen

Zykluszahl  $n$  waren nun bei allen getesteten Zell-Linien (GOS-3, LN-405 und SH-SY5Y) ähnliche Steigungen zu beobachten und keine der Reaktionen war zum Test-Zeitpunkt bereits in der Sättigungsphase, die Messungen erfolgten also innerhalb der linearen Phase (Abb. 4.26 bis 4.28).

Abb. 4.26 Diagramm 5-Punkt-Eichung Gos-3-Zellen (verschiedene Zykluszahlen)

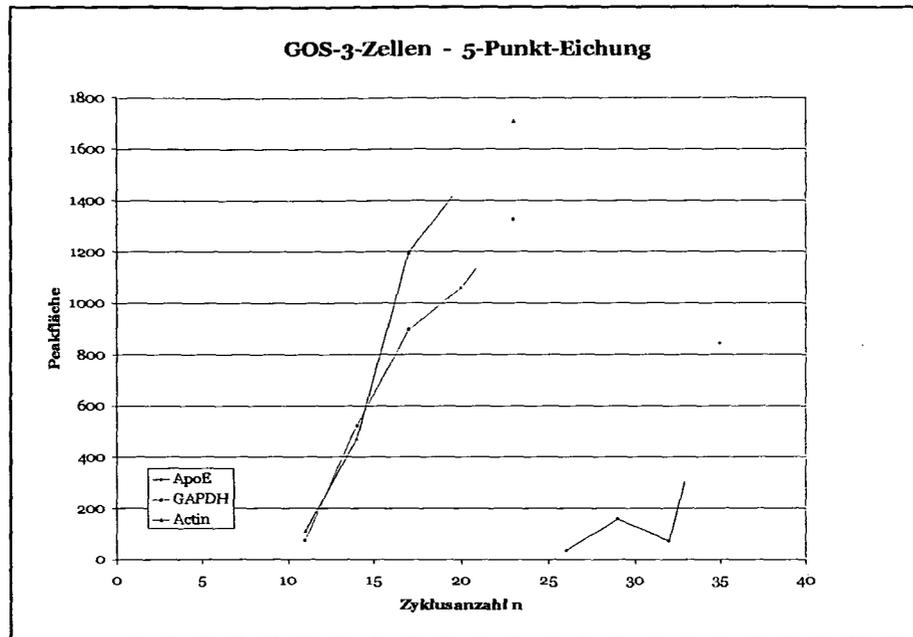


Abb. 4.27 Diagramm 5-Punkt-Eichung LN-405-Zellen (verschiedene Zyklus-  
zahlen)

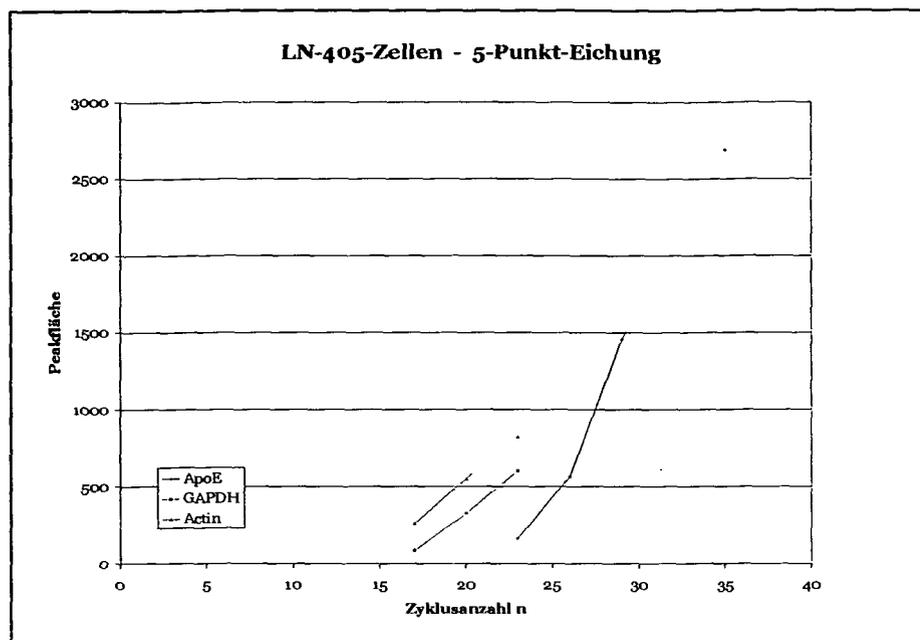
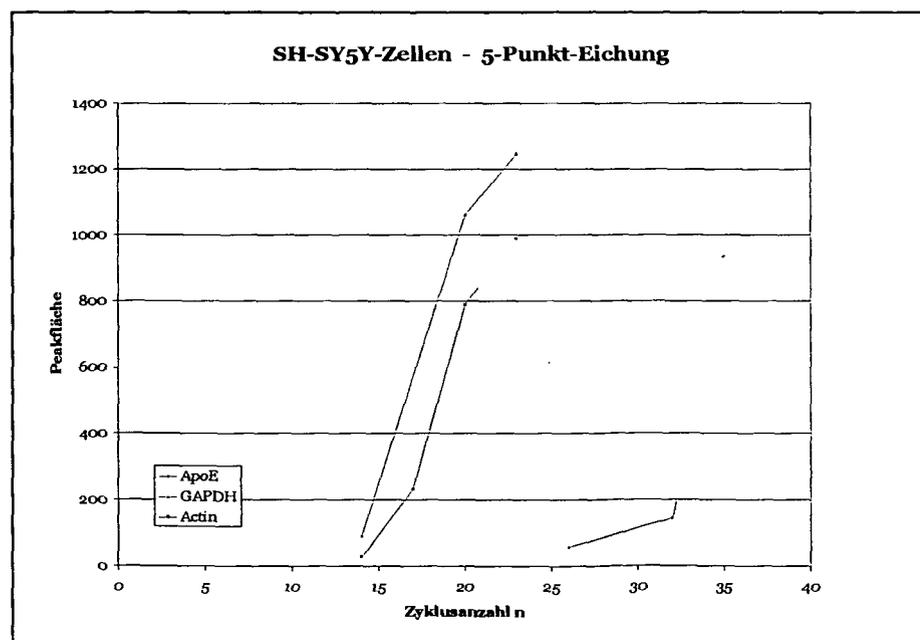


Abb. 4.28 Diagramm 5-Punkt-Eichung SH-SY5Y--Zellen (verschiedene Zyklus-  
zahlen)



#### 4.6.7 Agarose-Gel-Elektrophorese zur Quantifizierung

Zur Verbesserung der Genauigkeit der Quantifizierung wurden in der Agarose-Gel-Elektrophorese zum Auftragen der PCR-Produkte anstatt der 15-Well-Kämme (jede Lane wurde mit je 3  $\mu$ l PCR-Produkt beschickt) 8-Well-Kämme verwendet, bei denen jede Lane mit 10  $\mu$ l beladen wurde. So bewirkte ein eventueller Pipettierfehler beim Laden nur einen prozentuell geringeren Fehler.

#### 4.7 **Quantifizierung der ApoE-RT-PCR**

In vielen Fällen ist es ausreichend zu wissen, ob ein bestimmtes PCR-Produkt (Target) vorhanden ist oder nicht. In der quantitativen PCR hingegen ist die (relative oder absolute) Menge der PCR-Produkte von Interesse. Relative Änderungen oder Unterschiede in der Konzentration sind zumeist leichter zu ermitteln als absolute Mengen (wie viele Moleküle/wieviel ng einer bestimmten mRNA-Spezies enthält die Probe?)<sup>154</sup>.

##### 4.7.1 Mathematische Beschreibung der PCR

Das PCR-Edukt wird während der PCR exponentiell vervielfältigt (amplifiziert), d.h. die Menge des PCR-Produkts verdoppelt sich in jedem Zyklus (siehe Abb. 4.29). Die Amplifikationseffizienz E (das ist jener Anteil der Targetmoleküle, der während jedes Zyklus verdoppelt wird) bleibt während der exponentiellen Phase der PCR konstant (meist bis zum Zyklus 20 bis 30), danach sinkt E langsam, bis die PCR schließlich in die Plateauphase eintritt. Das Absinken von E kommt durch die Anhäufung des PCR-Produkts oder die in der späten Phase der PCR limitierend geringen Konzentration einer Reaktionskomponente zustande.

Abb. 4.29 Mathematische Beschreibung der PCR

Exponentielle Phase der PCR:

$$Y_n = Y_{n-1} * (1 + E)$$

$Y_n$	Anzahl der Targetmoleküle nach dem Zyklus n
$Y_{n-1}$	Anzahl der Targetmoleküle nach dem Zyklus n-1
E	Amplifikationseffizienz mit $0 \leq E \leq 1$

Anhäufung des PCR-Produkts:

$$Y = Y_0 * (1 + E)^n$$

Y	Anzahl der Moleküle des PCR-Produkts
$Y_0$	Anzahl der Moleküle des PCR-Edukts
n	Anzahl der Zyklen
E	Amplifikationseffizienz mit $0 \leq E \leq 1$

E und damit in weiterer Folge auch der exponentielle Charakter der PCR unterliegen dem Einfluß etlicher Parameter wie beispielsweise Länge und Sequenz des Targets, relative Mengen der Bestandteile im Ansatz, Spezifität des Primer-Annealing, Temperaturverlauf, Menge der Targetmoleküle, Transkriptionsrate der DNA Polymerase. Kleine Unterschiede in E verursachen große Unterschiede in der Menge an PCR-Produkt und können so eine exakte Quantifizierung verhindern. Die Probenahme für die Quantifizierung muß daher grundsätzlich während der exponentiellen Phase der PCR erfolgen. Bei der Quantifizierung von mRNA-Molekülen muß darüber hinaus auch die Effizienz der RT Reaktion in Betracht gezogen werden. Sie wird durch ähnliche Faktoren beeinflusst wie die PCR.

#### 4.7.2 Prinzipien der Quantifizierung

Unterschiedliche Überlegungen können zu einer erfolgreichen Quantifizierung der PCR-Produkte führen. Interne Standards und kinetische Messung des Umsatzes der PCR sind geeignete Methoden, sofern die jeder Vorgangsweise eigenen Schwächen berücksichtigt werden.

*Kinetische Methoden*

Der Wert von E kann durch wiederholte Probennahme in aufeinanderfolgenden Zyklen während der exponentiellen Phase experimentell bestimmt werden. In jeder dieser Proben wird die Menge an PCR-Produkt gemessen. Daraus kann E berechnet werden (siehe Abb. 4.30).

Abb. 4.30 Allgemeine Gleichung für E

$$E = -1 + (P_i / P_{i-j})^{1/j}$$

j	Anzahl der Zyklen im Probennahme-Intervall
P <sub>i</sub>	Menge des PCR-Produkts im höheren Zyklus
P <sub>i-j</sub>	Menge des PCR-Produkts im niedrigeren Zyklus

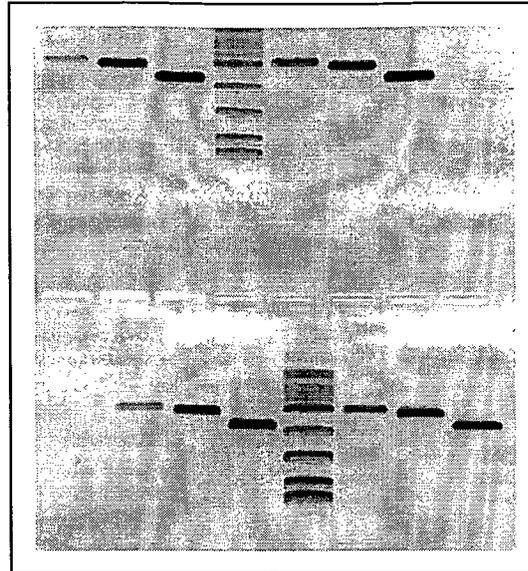
Trägt man die gemessenen Werte P<sub>i</sub> als Funktion der Zykluszahl n in einem doppelt logarithmischen Diagramm auf, kann log E aus dem Anstieg und log P<sub>0</sub> aus dem y-Achsenabschnitt bei n = 0 ermittelt werden (Formel siehe Abb. 4.31; Diagramm siehe Abb. 4.32). Diese semiquantitative Methode kann durch die Verwendung einer externen Vergleichsskala (externer Standard) zur Messung von absoluten Werten eingesetzt werden. Eine derartige Standardkurve, die auf einer Verdünnungsreihe des gereinigten PCR-Produktes basiert oder durch die Amplifikation mehrerer Verdünnungen der cDNA-Lösung entsteht, ermöglicht unter geeigneten Bedingungen (Analyse von Duplicates bzw. Triplicates für jede Probe, gleiche Werte von E, Analyse von Negativ- und Positiv-Kontrollen) genaue und reproduzierbare Ergebnisse bei vergleichsweise geringen Kosten.

Abb. 4.31 Ermittlung von P<sub>0</sub>

$$\log P_i = \log P_0 + n * \log * (1+E)$$

P <sub>0</sub>	Ursprüngliche Menge an Target-Molekülen
P <sub>i</sub>	Menge an Target-Molekülen nach der PCR

Abb. 4.10 Agarose-Gel zur Quantifizierung der relativen ApoE-mRNA-Menge  
(Gos-3-Zellen)



Obere Reihe:

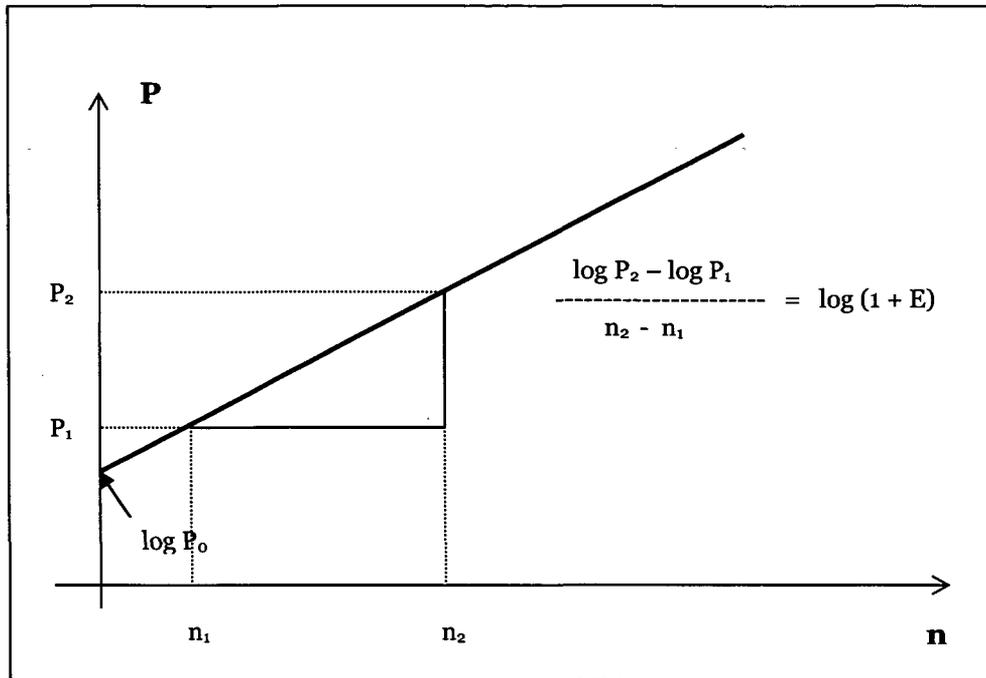
Lanes 1 und 5  
Lanes 2 und 6  
Lanes 3 und 7  
Lane 4  
Lane 8

ApoE (217 bp)  
GAPDH (240 bp)  
 $\beta$ -Actin (274 bp)  
Marker Msp-I  
leer

Untere Reihe:

Lanes 2 und 6  
Lanes 3 und 7  
Lanes 4 und 8  
Lane 5  
Lane 1

ApoE (217 bp)  
GAPDH (240 bp)  
 $\beta$ -Actin (274 bp)  
Marker Msp-I  
leer

Abb. 4.32 Diagramm zur Ermittlung von E und  $P_0$ 

#### Verwendung eines Internen Standards

Die Verwendung *nichtkompetitiver interner Standards* bei der sogenannten Multiplex PCR dient zur Bestimmung relativer Unterschiede ( $\geq 2$ -fache Menge) in der Ausgangskonzentration eines Targets (meist spezifische mRNAs) in verschiedenen Proben. Zusammen mit dem gewünschten Target wird eine andere zelluläre Sequenz vervielfältigt („Co-Amplification“), die keine Sequenzähnlichkeiten mit dem Target aufweist. Oft werden konstitutiv exprimierte Gene, sogenannte Housekeeping-Gene, als interner Standard herangezogen. Zu beachten ist dabei, daß der betreffende interne Standard während des gesamten Experiments (auch unter Stimulationsbedingungen) in derselben Konzentration vorliegen muß. Die Amplifikation des internen Standards wird entweder in einem separaten Ansatz oder auch im selben Röhrchen durchgeführt.

Zur verlässlichen semiquantitativen Bestimmung müssen für beide Sequenzen gleiche Werte für E und somit gleiche Effizienzen in der RT-Reaktion vorausgesetzt werden; zudem sollten für jede Probe mehrere Ansätze untersucht

werden. Die Probe-Nahme muß grundsätzlich während der exponentiellen Phase der PCR erfolgen. Der oft zu beobachtende große Unterschied in der anfänglich vorhandenen Anzahl der Moleküle (relative Unterschiede in der Expression der betreffenden Gene) kann zu Problemen bei der Quantifizierung führen, da die exponentielle Phase der PCR bei unterschiedlichen Zyklusanzahlen stattfindet und  $E$  sich in der folgenden Plateauphase ändert. Die Auswertung einer solchen Reaktion kann dennoch gelingen, wenn die Primer für den internen Standard erst bei einem späteren Zyklus zugegeben werden.

Die Verwendung *kompetitiver interner Standards* im Rahmen der sogenannten „Kompetitiven PCR“ erlaubt neben der Quantifizierung sogar weitgehende Sequenzhomologien zwischen internem Standard (Competitor) und Target, die größtmögliche Ähnlichkeit in der Effizienz der PCR gewährleisten sollten. Ein Competitor wird für jedes Target eigens hergestellt, beide besitzen dieselben Primer-Bindungsstellen. Auch die übrige Sequenz differiert nur wenig (beispielsweise kann durch eine oder mehrere Punktmutation(en) eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingeführt werden), sodaß die resultierenden PCR-Produkte gerade noch unterschieden werden können. Die große Ähnlichkeit zwischen Target und Competitor begünstigt auch in der Plateauphase sehr ähnliche Werte für  $E$ . Kompetitive PCR-Experimente können daher problemlos auch nach Erreichen der Plateauphase ausgewertet werden. Weisen Competitor und Target unterschiedliche Werte für  $E$  auf, so können lediglich die relativen Mengen für die beiden Komponenten sehr genau bestimmt werden, während eine absolute Quantifizierung unmöglich ist. Die in einer Probe enthaltene Menge an Target wird durch mehrere Experimente ermittelt (mehrere parallele Ansätze pro Probe). In jedem Ansatz ist der gleiche Anteil an Targetmolekülen ( $T_0$ ) vorhanden, diese werden zusätzlich mit verschiedenen (bekannten) Mengen an Competitor ( $S_0$ ) versetzt. Die Quantifizierung erfolgt bei äquimolaren Mengen von Target und Competitor besonders genau und zuverlässig anhand eines doppelt-logarithmischen Graphen:  $\log (T_n/S_n)$  vs.  $\log S_0$  (Formel siehe Abb. 4.33, Steigung = -1).

Abb. 4.33 Auswertung der kompetitiven PCR

$$\log (T_n/S_n) = \log T_o - \log S_o$$

$T_n$	Menge an Target-Molekülen nach dem n-ten Zyklus
$S_n$	Menge an Competitor-Molekülen nach dem n-ten Zyklus
$T_o$	Anfängliche Menge an Target-Molekülen
$S_o$	Anfängliche Menge an Competitor-Molekülen

Zeigt die Standardkurve der kompetitiven PCR eine von  $-1$  abweichende Steigung so kann dies verschiedenen Ursachen haben:

- Läuft die PCR in die Sättigungsphase, so entsteht ein systemischer Bias zugunsten des vorherrschenden PCR-Produktes ( $T_n/S_n >$  oder  $< T_o/S_o$ ). Da nur die Steigung niedrigere Werte annimmt, die Position des Äquivalenzpunktes jedoch unverändert bleibt, ist die Quantifizierung dennoch korrekt möglich.
- Mit Ethidiumbromid gefärbte Banden können auf Agarose-Gelen gekippte Standardkurven ergeben, wodurch die korrekte Quantifizierung allerdings nicht beeinträchtigt wird (auf Polyacrylamid-Gelen resultiert jedoch die übliche Steigung von  $-1$ ).
- Ist der Graph durch ungleiche Werte für  $E$  bei Target und Competitor verzerrt, so wird auch die Position des Äquivalenzpunkts verschoben und somit eine korrekte Quantifizierung unmöglich.

#### 4.7.3 Detektion und Quantifizierung der PCR-Produkte

Vorhandensein, Menge und Reinheit des PCR-Produkts werden mit Hilfe eines geeigneten Detektionssystems überprüft. Die Markierung des PCR-Produkts kann mit radioaktiven oder fluoreszierenden Labels durchgeführt werden. Diese Markierung kann bei der Amplifikation problemlos durch „gelabelte“ Desoxyribonukleotide oder Primer eingeführt werden. Auch die Anlagerung von helix-interkalierenden Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder die (sequenzspezifische oder Biotin/Streptavidin-vermittelte) Koppelung von Enzym-

Konjugaten können zum Nachweis verwendet werden. Lagern sich die Primer auch an nicht-targetspezifische Sequenzen an (mispriming), so wird die Reinheit des PCR-Produkts vermindert. Die exakte Quantifizierung kann unter diesen Umständen durch auf Oligonukleotid-Sonden basierenden Methoden erreicht werden, die über die Sequenzinformation ausschließlich das (korrekt gebildete) gewünschte PCR-Produkt erkennen.

#### *Nicht-sequenzspezifische Detektionssysteme*

Bei *elektrophoretischen Methoden* wie der Agarose-Gel-Elektrophorese oder der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) kann das PCR-Produkt entweder durch Ethidiumbromid-Färbung oder bei Verwendung von radioaktiv markierten Reagenzien durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

*High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) der PCR-Produkte mit anschließender Detektion der UV-Absorbanzen ermöglicht den Nachweis bis in den Femtogramm-Bereich (das entspricht ca.  $10^3$  Molekülen an PCR-Edukt). Bei Verwendung fluoreszenz-markierter PCR-Produkte in Kombination mit einem Fluoreszenz-Detektor kann die Nachweisgrenze noch deutlich nach unten verschoben werden.

In *Solid Phase-Assays* werden die mit Digoxigenin markierten PCR-Produkte kovalent oder über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an eine Mikrotiterplatte gebunden. Gegen Digoxigenin gerichtete Enzym-Konjugate (enthalten in vielen Fällen Peroxidase oder Alkalische Phosphatase) erlauben in Kombination mit einem chromogenen oder fluoreszierenden Substrat die einfache und effiziente Quantifizierung der PCR-Produkte. Zum quantitativen Nachweis spezifischer mRNA-Spezies kann eine Kombination von RT-PCR und *in vitro*-Transkription herangezogen werden („Transkriptionsvermittelte Quantifizierung“). Der am 5'-Ende der PCR-Produkte gekoppelte Promoter für die T7-RNA-Polymerase ermöglicht die Transkription in Gegenwart markierter Ribonukleotide. Durch die Verstärkung des Signals bei der Transkription eignet sich diese Methode besonders für niedrige Konzentrationen der betreffenden mRNA-Spezies.

### *Sequenzspezifische Detektionssysteme*

Bei den verschiedenen Dot-Blot-Methoden wird das denaturierte PCR-Produkt auf einer festen Phase (Nitrocellulose-Membran, Mikrotiterplatte) immobilisiert und durch Hybridisierung mit einer markierten Oligonukleotid-Sonde identifiziert. Bei sogenannten Reversen Dot-Blot Methoden wird die Sonde als Anker immobilisiert und das in Lösung befindliche PCR-Produkt spezifisch hybridisiert. Durch Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung wird ein Enzym angekoppelt, das durch Substrat-Umsetzung ein leicht meßbares Signal erzeugt. Die Signalintensität ermöglicht durch den Vergleich mit der Standardsubstanz in verschiedenen Konzentrationen eine relative Quantifizierung.

Das Prinzip des Enzyme-Linked Oligosorbent Assay (ELOSA) gestattet einen schnellen sequenzspezifischen und quantitativen Nachweis von PCR-Produkten. Die Molekülteile, die die Bindung an die feste Phase und die Signalerzeugung vermitteln, sind definitionsgemäß auf verschiedenen Strängen des aus PCR-Produkt und Oligonukleotid-Sonde gebildeten Hybridisierungsprodukts lokalisiert, sodaß nur das korrekt hergestellte PCR-Produkt ein Signal hervorruft. Es kann sowohl die Oligonukleotid-Sonde als auch das (durch Hitze oder Alkali) denaturierte PCR-Produkt immobilisiert vorliegen. Nach dem Hybridisierungsschritt unter stringenten Bedingungen (unter stringenten Bedingungen kann nur die korrekte Hybridisierung stabil erfolgen, wohingegen unkorrekte Hybridisierungen wegen der weniger festen Bindungen wieder gelöst werden) wird z.B. über eine Digoxigenin-Markierung ein Enzym-Konjugat angelagert, das - wie oben beschrieben - durch Umsetzung eines geeigneten Substrates ein meßbares Signal erzeugt. Interne Standards mit gleicher Länge wie das Target können bei kleinen Sequenzunterschieden durch eine zweite Sonde simultan quantifiziert werden.

Beim DNA-Immuno-Assay wird ein Antikörper zum Nachweis des PCR-Produktes herangezogen. Bei der Hybridisierung von PCR-Produkt und Oligonukleotid-Sonde entstehen DNA:DNA-Hybrid-Helices, die von einem monoklonalen Anti-dsDNA-Antikörper erkannt werden. Enzym-Konjugate erzeugen

in Kombination mit geeigneten Substraten ein quantitatives Signal, das durch Vergleich mit einer Standardkurve ausgewertet wird. Weder das PCR-Produkt noch die Sonde müssen bei dieser Methode markiert werden, wohingegen eine stringente Hybridisierung eminent wichtig ist.

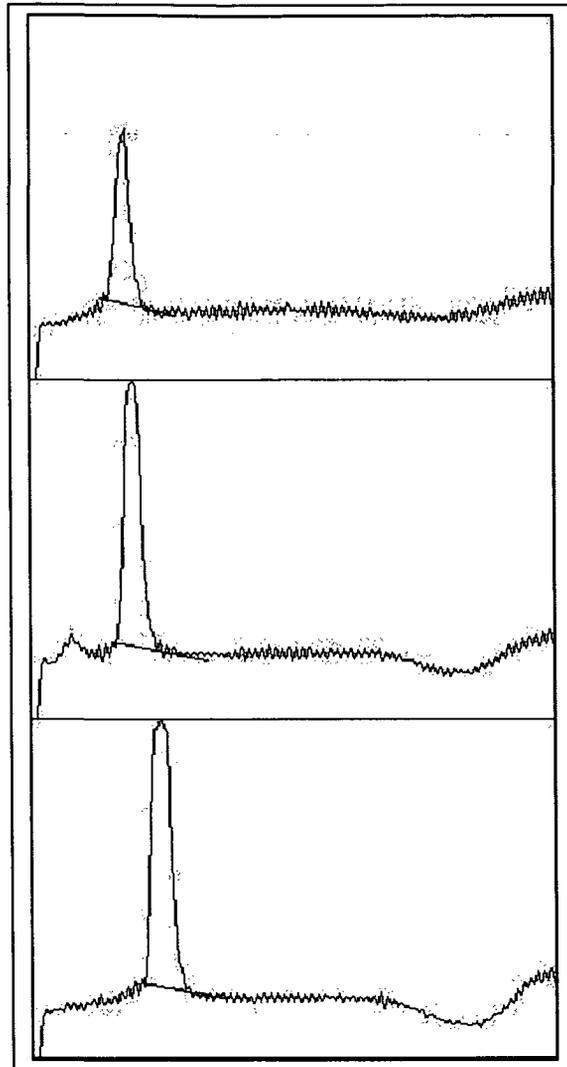
#### 4.7.4 Praktische Vorgangsweise bei der Quantifizierung

Die relative Menge des ApoE-PCR-Produktes wird durch die Verwendung von den Housekeeping-Genen GAPDH und  $\beta$ -Actin als interner Standard bestimmt (siehe Abschnitt 4.7.2). Die Intensität der einzelnen Banden wird als Maß für die Menge eines PCR-Produktes herangezogen.

Die Auswertung der nach der Agarose-Gel-Elektrophorese hergestellten TIFF-Files kann direkt mit der ChemiImager-Software (Einstellung: Spot Denso mit Auto-Background-Korrektur) durchgeführt werden. Die densitometrische Auswertung des Agarose-Gels (Messung der Bandenintensität) kann alternativ auch mit dem Softwarepaket ScionImage (das ist die PC-Version des bekannten NIH-Image) erfolgen. Beide Verfahren liefern vergleichbare Ergebnisse.

Die Flächen der einzelnen Banden werden mit der Maus genau umgrenzt und von der Software als Peak interpretiert, wobei die Fläche unter dem Peak mit der Banden-Intensität korreliert. Die ChemiImager-Software berücksichtigt automatisch die Hintergrundwerte, während bei dem Softwarepaket ScionImage die Fläche unter dem Peak selbst festgelegt werden muß (siehe Abb. 4.34), wobei gleichzeitig die Korrektur für störende Nebensignale bzw. ungleichmäßiges Hintergrundrauschen erfolgt. Die resultierenden Absolutwerte sind dimensionslose Zahlen, die direkt für die Ermittlung des relativen Mengenverhältnisses zwischen Struktur-Gen (hier ApoE) und Housekeeping-Gen(en) herangezogen werden oder auch in Beziehung zur Zykluszahl  $n$  gesetzt werden, um z.B. die lineare Phase einer PCR zu ermitteln.

Abb. 4.34 Bestimmung der Peak-Fläche



Von oben nach unten:

ApoE	217 bp
GAPDH	240 bp
$\beta$ -Actin	274 bp

Beispiele für typische Werte und Diagramme sind den Abb. 4.35 bis 4.37 zu entnehmen. Sind die zu vergleichenden PCR-Produkte verschieden lang, so lagern sie unterschiedliche Mengen an Ethidiumbromid in die Doppelhelix ein. Die Menge an Ethidiumbromid kann die Intensität der Banden ver-

fälschen und das Signal entspricht in diesem Fall nicht mehr ausschließlich der Menge des PCR-Produktes. Bei der Errechnung der relativen Werte wird daher die unterschiedliche Länge der PCR-Produkte durch Normierung berücksichtigt.

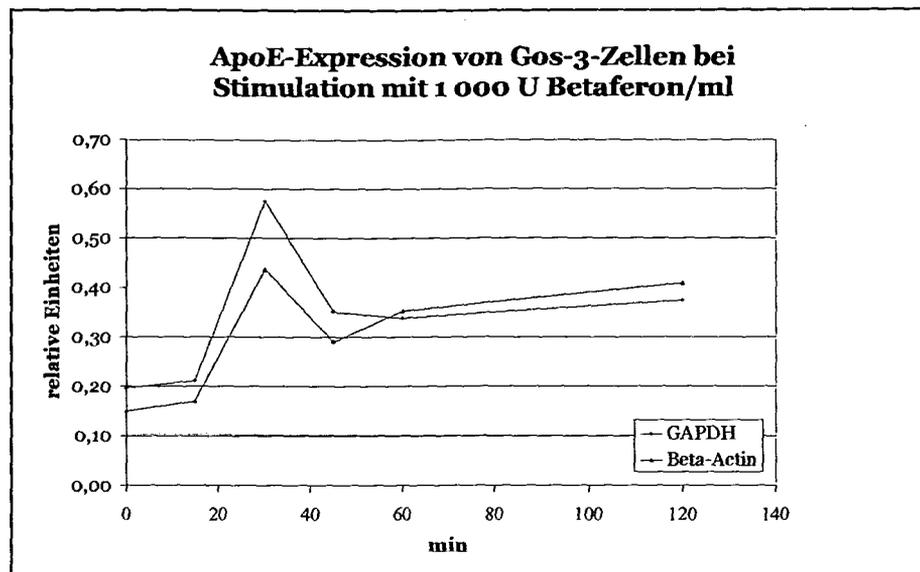
Abb. 4.35 Auswertung der erhaltenen Werte für die Peakfläche und Ermittlung der relativen Mengen der PCR-Produkte für ApoE bezüglich der Housekeeping-Gene GAPDH und  $\beta$ -Actin

<b>AUSWERTUNG</b>								
Probe	Cycles	Gen	Area	korr. Signal		relative Werte		
				bez. GAPDH	bez. Actin	bez. GAPDH	bez. Actin	
G1	35	ApoE	207	229	261	0,1977	0,1515	
G1	25	GAPDH	1158					
G1	25	Actin	1725					
G2	35	ApoE	541	598	683	0,5058	0,3433	
G2	25	GAPDH	1183					
G2	25	Actin	1990					
G3	35	ApoE	286	316	361	0,2119	0,1707	
G3	25	GAPDH	1493					
G3	25	Actin	2115					
G4	35	ApoE	692	765	874	0,5759	0,4382	
G4	25	GAPDH	1329					
G4	25	Actin	1994					
G5	35	ApoE	548	606	692	0,3514	0,2913	
G5	25	GAPDH	1725					
G5	25	Actin	2375					
G6	35	ApoE	601	665	759	0,3386	0,3538	
G6	25	GAPDH	1963					
G6	25	Actin	2145					
G7	35	ApoE	703	778	888	0,3747	0,4100	
G7	25	GAPDH	2075					
G7	25	Actin	2165					

Abb. 4.36 Beziehung zwischen Zeitpunkt der Probennahme und relativer Menge der ApoE-mRNA (Diagramm siehe Abb. 4.37)

Probe	Typ	Zeit [min]	relative Werte	
			gg. GAPDH	gg. Actin
G1	Co	0	0,1977	0,1515
G2	Co	0	0,5058	0,3433
G3	Ind	15	0,2119	0,1707
G4	Ind	30	0,5759	0,4382
G5	Ind	45	0,3514	0,2913
G6	Ind	60	0,3386	0,3538
G7	Ind	120	0,3747	0,4100

Abb. 4.37 Veränderung der ApoE-Expression bei Stimulierung mit Betaferon®



## 5. ApoE-Western Blot

### 5.1 Übersicht und Prinzip

Die geringen ApoE-Konzentrationen in den Zellkultur-Überständen und in der Proteinfraction der Zellen können nicht exakt und reproduzierbar mit dem ApoE-ELISA gemessen werden. Dies macht daher die Etablierung eines empfindlicheren ApoE-Western Blot-Verfahrens (auch Immuno-Blot genannt) notwendig. Hierbei werden die nach der Größe aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert und anschließend unter Verwendung nichtradioaktiver Detektionsmethoden mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch eine denaturierende SodiumDodecylSulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Die Proteine werden mittels Elektro-Blotting auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran (PolyVinylidenDiFluorid) übertragen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wird die Membran einem sogenannten Blocking unterzogen, d.h. sie wird

einem komplexen Proteingemisch wie z.B. non-fat dry milk oder Bovine Serum Albumine (BSA) ausgesetzt. Dann wird ein spezifischer ApoE-Antikörper aufgebracht, der durch Koppelung mit einem Enzym-Konjugat und anschließender Umsetzung eines geeigneten Substrates durch Bildung eines Farbstoffes oder über Chemilumineszenz nachgewiesen wird.

Die Etablierung und Optimierung des ApoE-Western Blot wurde unter Berücksichtigung verschiedener Literaturangaben durchgeführt. Die bereits vorhandenen Antikörper und Reagenzien wurden nach Möglichkeit eingesetzt. Richtwerte für die Konzentration des Trenngels und die Proteinmenge pro Lane konnten in verschiedenen Artikeln gefunden werden <sup>7,70,82</sup>. Der Nachweis der ApoE-Bande(-n) mithilfe einer Chemilumineszenzmethode wurde von verschiedenen Autoren empfohlen <sup>13,61</sup>, wobei dann auf den Einsatz radioaktiver Substanzen verzichtet werden kann. Manche Wissenschaftler erachten eine Immunpräzipitation des ApoE vor der SDS-PAGE für notwendig <sup>13</sup>. Diese Fällungsreaktion wurde allerdings nicht durchgeführt, da der Western Blot auch dann sensitiv und spezifisch war und ein eventueller Materialverlust beim Präzipitationsschritt vermieden werden konnte.

## **5.2 Durchführung des ApoE-Western Blot**

### **5.2.1 Aufarbeitung des Zellkultur-Überstandes und der Zellproteine**

Die Zellkultur-Überstände wurden nach der Inkubation (mit oder ohne Stimulation durch Betaferon®) abgezogen und ohne weitere Behandlung direkt bei -80 °C tiefgefroren.

Die in der Zelle vorhandenen Proteine können nach der ersten Zentrifugation bei der Trizol®-RNA-Isolierung aus der organischen (Chloroform-)Phase extrahiert und aufbereitet werden (siehe Abschnitt 4.2).

Nach dem Abpipettieren der RNA-haltigen wässrigen Phase wird die verbleibende organische Phase samt Interphase mit 0,3 ml 100%igem Ethanol/ml Trizol-Lösung® versetzt und 3 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Fällung der DNA 5 min lang bei 4 800 rpm und +4 °C

zentrifugiert. Das DNA-Pellet war nicht in allen Fällen sichtbar und oft nur winzig. Der Überstand (ca. 800 µl) wurde vorsichtig abpipettiert, zu gleichen Teilen in je 2 frische Eppendorf-Gefäße übergeführt und mit jeweils 750 µl Isoopropanol vermischt und 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine bei 12 000 rpm und +4 °C 10 min lang pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Proteinpellet mit je 1 ml Guanidiniumhydrochloridlösung [0,3 M in 95%igem Ethanol] gewaschen (das Proteinpellet konnte in diesem Stadium bis zu 1 Monat bei + 4 °C aufbewahrt werden). Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnte das Pellet wieder durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 9 200 rpm und +4 °C abgetrennt werden. Der Waschschrift wurde weitere zwei Mal wiederholt. Anschließend wurden die Proteinpellets in je 1 ml Ethanol gewaschen, inkubiert und zentrifugiert (wie oben beschrieben) und ca. 5 min lang in der Vakuumzentrifuge („SpeedVac“; Centrifugal Evaporator Model No. GV2, Firma GyroVap) getrocknet. Die Proteinpellets sollen nach der Trocknung gerade den letzten Rest der Feuchtigkeit verloren haben, denn sonst wird die Resolvatisierung weiter erschwert. Jedes Pellet wurde in 200 µl 1%iger SDS-Lösung aufgenommen und unter starkem Schütteln am Thermomix bei 50 °C resolvatisiert (30 bis 50 min lang). Danach wurden alle zu einer Probe gehörigen Lösungen vereinigt und bei – 20 °C gelagert.

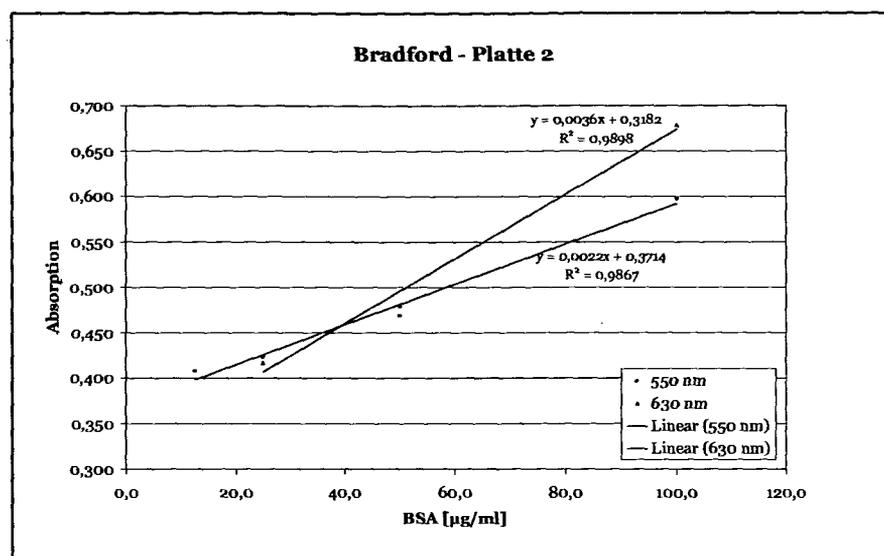
#### 5.2.2 Bradford-Test zur Bestimmung des Protein-Gehalts

Auf jede Lane des Polyacrylamid-Gels soll eine definierte Menge an Gesamtprotein aufgetragen werden (z. B. 50 µg), daher mußte vor Beginn der Analyse der Protein-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt werden. Der Bradford-Test wurde in Mikrotiterplatten angesetzt und durch Messung der Absorption ausgewertet. Idealerweise sollte die spektroskopische Messung bei 595 nm erfolgen; weil dieser Filter nicht zur Verfügung stand, erfolgten die Messungen bei 550 nm und 630 nm.

Die Proben wurden geeignet verdünnt, und jeweils 20 µl pro well vorgelegt. Anschließend werden 200 µl einer auf Eis aufbewahrten, mit Aqua destillata 5:1 verdünnten Bradford-Stocklösung (Bio-Rad®) zugefügt. Jede Messung

wurde dreifach durchgeführt. Nach ca. 5 Minuten wurde die Absorption bei 550 nm und 630 nm gemessen (Dynatech® MR7000 Elisa System, ein Filter für 595 nm war nicht verfügbar). Die Bestimmung des Protein-Gehalts erfolgt durch Vergleich mit einer gleichzeitig gemessenen Eichkurve, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von BSA-Standardlösungen angefertigt wurde (Konzentrationsbereich: 10 bis 100 µg/ml; siehe Abb. 5.1).

Abb. 5.1 BSA-Standardkurve für Bradford-Test



### 5.2.3 SDS-PAGE

Die Proteine wurden unter Verwendung eines Sammel- und eines Trenn-Gels elektrophoretisch nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

Die beiden Glasplatten der vertikalen Elektrophorese waren durch Spacer von 0,75 mm Dicke getrennt. Für 2 Gele waren ungefähr 16 ml Trenn-Gel und ca. 6 ml Sammel-Gel erforderlich. Zuerst wurde das ca. 12%ige Trenn-Gel unter Verwendung einer Spritze mit einer 0,75 mm-Kanüle möglichst blasenfrei gegossen (d.h. langsam und gleichmäßig). Nach dessen Aushärtung folgte die Herstellung des ca. 5%igen Sammel-Gels in gleicher Weise (Zusammensetzung siehe Abb. 5.2). Es wurde ein Kamm mit 10 Lanes verwendet. Die Taschen wurden nach Entfernung des Kamms ausgiebig mit Aqua destillata und

1x Running Buffer (Zusammensetzung siehe Abb. 5.3) gespült. Inzwischen wurden die Proben und der Marker (Rainbow™ Coloured Protein Molecular Weight Markers Low Range von Amersham Pharmacia Biotech) mit der entsprechenden Menge Sample Buffer (Zusammensetzung siehe Abb. 5.3) versetzt und 10 min lang bei 95 °C denaturiert. Äquivalente Proteilmengen (z.B. 30 µg; das entsprechende Volumen wurde für jede Probe aus den Resultaten des Bradford-Tests errechnet) wurden auf jede Lane aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte bei 80 V und Raumtemperatur in 1x Running Buffer (Zusammensetzung siehe Abb. 5.3). Für die Elektrophorese wurde eine Bio-Rad® Minigel-Apparatur verwendet.

Abb. 5.2 Gel-Zusammensetzung für die SDS-PAGE (2 Mini-Gele)

<b><u>Trenn-Gel:</u></b>	4,73 ml Aqua destillata
	0,33 ml 50%iges Glycerin
12%ig	3,63 ml Lower Buffer
	5,83 ml 30%ige Acrylamid-Lösung
	146 µl 10%iges APS (Bio-Rad®), frisch zubereitet
	24,2 µl TEMED
<b><u>Sammel-Gel:</u></b>	4,46 ml Aqua destillata
	1,91 ml Upper Buffer
5%ig	1,2 ml 30%ige Acrylamidlösung
	75 µl 10%iges APS Bio-Rad®, frisch zubereitet
	7,5 µl TEMED

Abb. 5.3 Lösungen für die SDS-PAGE

**5x SAMPLE BUFFER [10 ml]**

5 ml 50%iges Glycerin  
2,5 ml Upper Buffer  
2,5 ml Mercaptoethanol (Merck®)  
1 g SDS (Bio-Rad®)  
Bromphenolblau

Bei +4° lagern

**10 %iges APS**

100 mg Ammoniumpersulfat/ml, frisch zubereiten  
(bei +4° lagern, max. 2 Wochen)

**30%ige ACRYLAMIDLÖSUNG [100 ml]**

30 g Acrylamid (Bio-Rad®)  
0,8 g Bisacrylamid (Bio-Rad®)  
Aqua destillata auf 100 ml

Bei +4° lagern

**LOWER BUFFER [100 ml]**

18,17 g Tris Base (SIGMA®)  
70 ml Aqua destillata  
20 – 25 ml 6n HCl bis zum pH 8,8 zugeben  
4 ml 10%SDS (Bio-Rad®)

Bei +4° lagern

**UPPER BUFFER [100 ml]**

6,06 g Tris Base (SIGMA®)  
70 ml Aqua destillata  
HCl conc. bis zum pH 6,8 zugeben  
4 ml 10 %SDS (Bio-Rad®)

Bei +4° lagern

**5x RUNNING BUFFER [1 Liter]**

15 g Tris Base (SIGMA®)  
72 g Glycin  
50 ml 10% SDS (Bio-Rad®)  
pH 8,9 einstellen

Bei +4° lagern

#### 5.2.4 Elektro-Blotting

Die Proteine wurden nach der Elektrophorese, um sie dem Nachweis durch spezifische Antikörper zugänglich zu machen, mittels Elektro-Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Die auf ca. 9,5 x 6,5 cm zugeschnittene Nitrocellulose-Membran mußte vorher mit 1x Running Buffer angefeuchtet werden. Beim Hantieren mit der Membran wurden stets Handschuhe getragen, um später die korrekte und spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion zu ermöglichen. Das Blotting-Sandwich wurde in eisgekühltem 1x Blotting Buffer (für diese Zwecke kann der Puffer wiederverwendet werden; Zusammensetzung siehe Abb. 5.3) unter Beachtung der Richtung des später angelegten Stromflusses blasenfrei zusammgebaut; die durch die im Überschuß vorhandenen SDS-Anionen negativ geladenen Proteine wandern zur Anode. Der Tank der Bio-Rad® Blotting-Einheit wurde vollständig mit 1x Running Buffer gefüllt. Das Blotting erfolgte bei konstant 200 mA und +4 °C für 2 Stunden, d.h. die Spannung und die Leistung wurden auf den Maximalwert eingestellt. Unter diesen Bedingungen konnte eine konstante Blasenentwicklung und eine geringe Erwärmung des Puffers bei gutem Proteintransfer erreicht werden.

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran 5 bis 10 min lang bei Raumtemperatur in Ponceau's S Solution (SIGMA®) geschüttelt, um die auf der Membran befindlichen Proteine anzufärben. Anschließend wurde die Membran mit Leitungswasser gespült, bis die Banden sichtbar wurden. Die Membran wurde zugeschnitten und blasenfrei in Frischhaltefolie verpackt, um das Bandenmuster für die Dokumentation fotokopieren zu können. Die Membran wurde anschließend mit reichlich PBS-T (Zusammensetzung siehe Abb. 5.4) unter kräftigem Schütteln entfärbt.

Abb. 5.4 Lösungen für das Elektro-Blotting

**5x BLOTTING BUFFER [1 Liter]**

30,25 g Tris Base (SIGMA®)

142,6 g Glycin

5 g SDS (Bio-Rad®)

Bei +4° lagern

Arbeitslösung: Stock 1:5 verdünnen + 20% EtOH  
(d.h. 160 ml 5x Blotting Buffer + 640 ml Aqua destillata + 200 ml EtOH)

**10x PHOSPHATE BUFFERED SALINE PBS (SIGMA®)**

Zum Gebrauch 1:10 mit Aqua destillata verdünnen

**PBS-T**

1x PBS + 0,05% Tween-20

5.2.5 Blocking

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran einer Lösung eines komplexen Proteingemisches ausgesetzt. Dieser Schritt wird „Blocking“ genannt. Das Blocking und alle weiteren Schritte ähneln dem in Abschnitt 2 beschriebenen ApoE-ELISA, da hier gleichermaßen die spezifische Wechselwirkung zwischen Protein und Antikörper zum Nachweis ausgenutzt wird.

Die Membran wurde über Nacht bei +4 °C in einer Lösung von 1% Trockenmilchpulver (non-fat dry milk, SIGMA®) in 1x PBS oder 3% BSA (SIGMA®) in 1x PBS sanft geschüttelt. Die Blocking-Lösung kann ohne Verlust ihrer Effizienz bis zu dreimal wiederverwendet werden. BSA-Blocking bewirkt eine gute Reduktion des störenden Hintergrundsignals und meist ebenso gute Resultate wie das Blocking mit dem wesentlich teureren Trockenmilchpulver.

### 5.2.6 Inkubation mit dem polyklonalen Anti-ApoE-Antikörper

Die Membran mußte zwischen den einzelnen Inkubationen sorgfältig mit PBS-T gewaschen werden (4x je 8 min lang, unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur), um die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung sicherzustellen.

Die Membran wurde bei Raumtemperatur ca. 75 min lang mit dem humanen Anti-ApoE-Antikörper in geeigneter Verdünnung (diverse Antikörper wurden getestet, siehe Abb. 5.5) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die zufriedenstellenden Resultate, die aus der Verwendung eines polyklonalen Anti-ApoE-Antikörpers als primären Antikörper resultierten, konnten durch die Verwendung monoklonaler Anti-ApoE-Antikörper nicht weiter verbessert werden.

Abb. 5.5 Humane Anti-ApoE-Antikörper (primäre Antikörper)

**Polyklonaler Antikörper:****Goat Polyclonal Anti-Human ApoE Antibody (CALBIOCHEM®)**

Arbeitslösung: 1:10 000 verdünnt in PBS-T

Die Arbeitslösung ist 2 - 3x wiederverwendbar und soll bei +4 °C gelagert werden

**Monoklonale Antikörper:**

Mouse Monoclonal Anti-Human ApoE Antibody (Biogenesis®)

Arbeitslösung: 1: 5 000 verdünnt in PBS-T

Mouse Monoclonal Anti-Human ApoE Antibody (ICN PHARMACEUTICALS, INC  
Pharmaceuticals, Inc.)

Arbeitslösung: 1: 5 000 verdünnt in PBS-T

### 5.2.7 Inkubation mit dem Enzym-Konjugat

Nach erneutem Waschen mit PBS-T (4x je 8 min lang) wurde die Membran mit einem geeigneten Enzym-Konjugat, dem sekundären Antikörper, in entsprechender Verdünnung (siehe Abb. 5.6) bei Raumtemperatur für ca. 140 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert.

Das Enzym erlaubt durch Umsetzung eines geeigneten Substrates den Nachweis der ApoE-Bande. Nach Optimierung des Western Blot-Verfahrens (siehe Abschnitt 5.3) wurde letztendlich ein sekundärer Antikörper verwendet, der das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) enthält und in einer Verdünnung von 1:2 000 eingesetzt wird. HRP erzeugt bei der Umsetzung eines ECL-Substrates (Enhanced Chemical Luminescence; ChemiGlow™, AlphaInnotech Corp.) Chemilumineszenz-Signale, die mit dem ChemiImager (Biozym®) gemessen, dokumentiert und ausgewertet wurden (siehe Abschnitt 5.3).

Nachweise-Versuche mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP), die das Substrat BCIP/TNBT (Konzentrat, CALBIOCHEM®) in einen violetten Farbstoff umsetzt und somit die ApoE-Bande sichtbar macht, ergaben eine (zu) geringe Sensitivität. Auch bei dieser Methode kann die Membran bei Bedarf zu Dokumentationszwecken eingescannt und densitometrisch mit der ScionImage Software ausgewertet werden.

Abb. 5.6 Enzym-Konjugate (sekundäre Antikörper)

**Horseradish Peroxidase-Konjugate:**

**Rabbit Anti-Goat IgG HRP Conjugate (Molecular Probes®)**

Arbeitslösung: 1:2 000 verdünnt in PBS-T

Die Arbeitslösung ist 2 - 3x wiederverwendbar und soll bei +4 °C gelagert werden

**Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate (Molecular Probes®)**

Arbeitslösung: 1:10 000 verdünnt in PBS-T

**Alkalische Phosphatase-Konjugate:**

**Rabbit Anti-Goat IgG AP Conjugate (CALBIOCHEM®)**

Arbeitslösung: 1:10 000 verdünnt in PBS-T

**Goat Anti-Mouse IgG AP Conjugate (Molecular Probes®)**

Arbeitslösung: 1:10 000 verdünnt in PBS-T

### 5.2.8 Inkubation mit dem ECL-Substrat und Messung des Chemilumineszenz-Signals

Die Membran wurde nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper mit PBS-T gründlich gewaschen (4x je 8 min lang) und mit dem ECL-Substrat inkubiert.

Die Lösungen A und B des ChemiGlow™-Nachweissystems wurden zu gleichen Teilen gemischt (je 5 ml für 1 Membran). Die Membran wurde bei Raumtemperatur 5 min lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran möglichst blasen- und faltenfrei in Frischhaltefolie verpackt. Das Photographierkabinett des ChemiImager (Biozym®) wurde zur Vermeidung von Streulicht mit einer schwarzen Platte als Untergrund versehen und der für Chemilumineszenz-Messungen vorgesehene Filter in den Strahlengang der Kamera eingebracht. Die Membran wurde in das Photographierkabinett gelegt, der Bildausschnitt möglichst groß gewählt und das Kameraobjektiv fokussiert. Das von den Proteinbanden ausgesendete Chemilumineszenz-Signal wurde je nach Intensität 45 bis 120 s lang mit der Kamera gemessen, bis ein optimaler Kontrast zwischen Banden und Hintergrund erreicht war. Das Resultat wurde als TIFF-File gespeichert und densitometrisch ausgewertet (siehe Abschnitte 5.3 und 5.4).

## 5.3 **Optimierung des ApoE-Western Blot-Verfahrens**

### 5.3.1 Zeitpunkte für die Probennahmen

Aus dem Ablauf der Proteinsynthese ergibt sich, warum der Zeitrahmen für eine Messung der Veränderung der Proteinexpression bzw. Proteinsekretion unter Stimulationsbedingungen weiter gefaßt werden muß als für die Messung der Veränderung der mRNA-Transskription. Die Translation der ApoE-mRNA zum Protein und dessen Sekretion müssen ablaufen können, bevor ein Signal zu erfassen ist.

Beim Einsatz von Serien à 14 Proben (jeweils 2 Kontrollen als Nullpunkt-Referenz und 12 Meßpunkte) haben sich Zeiträume von 12 und 9 Stunden – die einzelnen Proben wurden jeweils nach 60 bzw. 45 min genommen - als zu lang erwiesen. Anhand der erhobenen Daten konnte festgestellt werden, daß die maximale ApoE-Synthese (im Zellprotein gemessen) nach rund 2 h auftritt, während die maximale ApoE-Sekretion nach rund 3 bis 4 h erfolgt. Erst wenn die Probennahmen rascher aufeinander folgen, könnten genauere Aussagen über den Stimulationsverlauf getroffen werden.

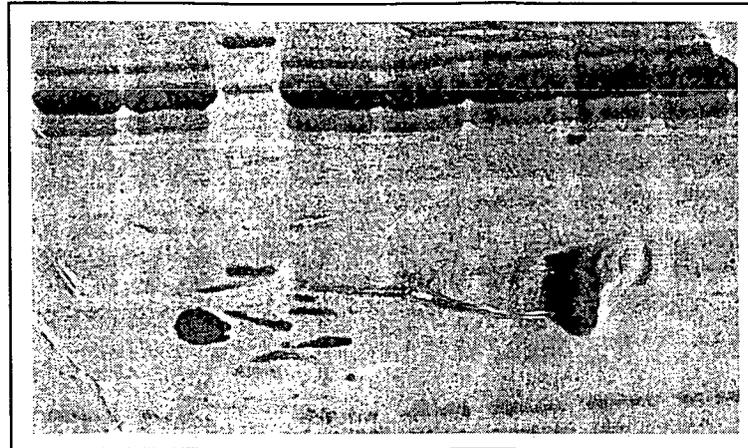
Werden die Proben in einem 4-Stunden-Experiment nach 60, 90, 120, 150, 195 und 240 min genommen (Serien à 7 Proben, wobei eine Petrischale als Kontrolle/Referenz gilt und nicht stimuliert wird), können sowohl Zellproteine (Information über ApoE-Synthese) als auch Supernatants (Information über ApoE-Sekretion) zufriedenstellend analysiert werden.

### 5.3.2 Bedingungen für die SDS-Page

#### *Proteinmenge*

Bei den ersten Versuchen mit Liquorproben wurden für Western Blots typische Proteinmengen von rund 10, 15, 17,5 und 20 µg pro Lane (entsprechend einem Volumen von 15 bis 40 µl) verwendet (Red Dye Staining siehe Abb. 5.7).

Abb. 5.7 Red Dye-Staining bei Liquorproben (von einer Probe wurden verschiedene Mengen aufgetragen)



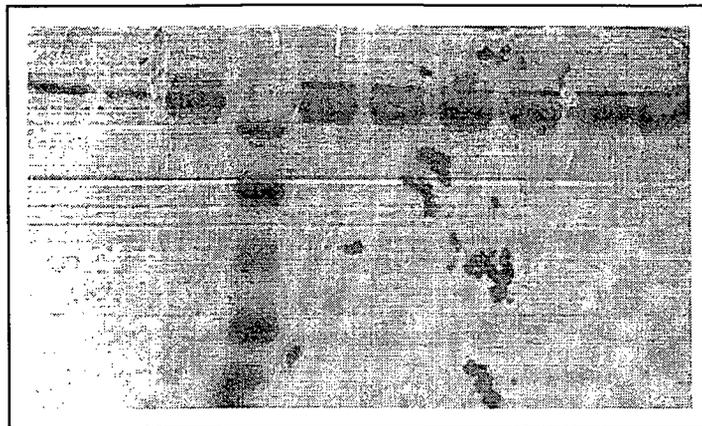
Lanes 1 und 2	10 µg Gesamtprotein
Lane 3	SDS Page Standards Low Range
Marker	
Lanes 4 und 5	15 µg Gesamtprotein
Lanes 6 und 7	17,5 µg Gesamtprotein
Lane 8	20 µg Gesamtprotein

Anmerkung: im unteren Bereich der Lanes 2 sowie 6 und 7 sind in der Frischhalte-Folie eingeschlossene Luftbläschen als dunkle Flecken sichtbar

Für ApoE-Bestimmungen in Supernatants mußten allerdings wesentlich größere Proteinmengen geladen werden. Erst 30 bis 100 µg Protein führten zu erkennbaren ApoE-Banden (BCIP/NBT-Farbreaktion als Nachweismethode).

Bei den Stimulationsversuchen mit IFN-β wurde Chemilumineszenz zur Detektion eingesetzt. Dabei konnten die pro Lane aufgetragenen Proteinmengen (Supernatants und resolvatisierte Zellproteine) deutlich reduziert werden. Typische Werte lagen bei dieser Nachweismethode zwischen 5 und 10 µg Gesamtprotein/Lane (siehe Abb. 5.8 und 5.9).

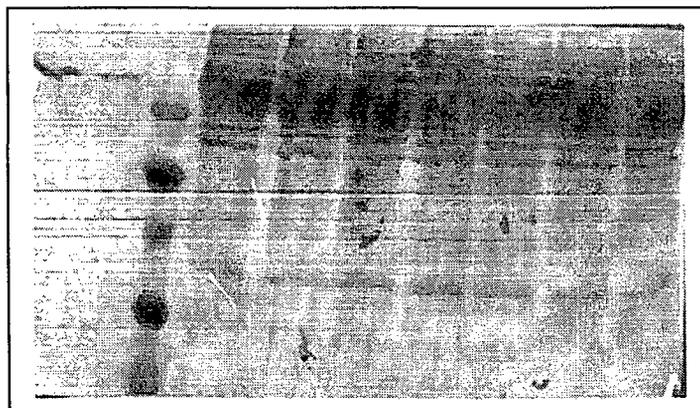
Abb. 5.8 Red Dye-Staining bei Zellkultur-Überständen von Gos-3-Zellen



Lane 1	ApoE-Standard, 0,75 ng
Lane 2	ApoE-Standard, 0,38 ng
Lane 3	Zellkultur-Überstand von Gos-3-Zellen, unstimulierte Kontrolle (5 µg)
Lane 4	Rainbow® Marker
Lanes 5 bis 10	Zellkultur-Überstände von Gos-3-Zellen, nach Stimulation mit 100 U Betaferon® (5 µg)

Anmerkung: im Bereich der Lanes 6 bis 8 sind in der Frischhalte-Folie eingeschlossene Luftbläschen als dunkle Flecken sichtbar

Abb. 5.9 Red Dye-Staining bei resolvatisierten Zellproteinen von Gos-3-Zellen



Lane 1	ApoE-Standard, 0,75 ng
Lane 2	ApoE-Standard, 0,38 ng
Lane 3	Rainbow® Marker
Lane 4	Zellproteine von Gos-3-Zellen, unstimulierte Kontrolle (5 µg)
Lanes 5 bis 10	Zellproteine von Gos-3-Zellen, nach Stimulation mit 100 U Betaferon® (5 µg)

### *Elektrophorese-Bedingungen*

Die in den ersten Experimenten verwendeten 100 bis 120 V (Raumtemperatur), ergaben keinerlei Instabilität des Gels und ermöglichten eine schnelle Elektrophorese. Im Verlauf der Optimierung wurde allerdings die Voltzahl, um eine bessere Auftrennung der einzelnen Banden zu gewährleisten, schrittweise auf 80 V (Raumtemperatur) gesenkt, wenn durch diese Maßnahmen Elektrophoresezeiten von 1,5 Stunden nicht überschritten wurden.

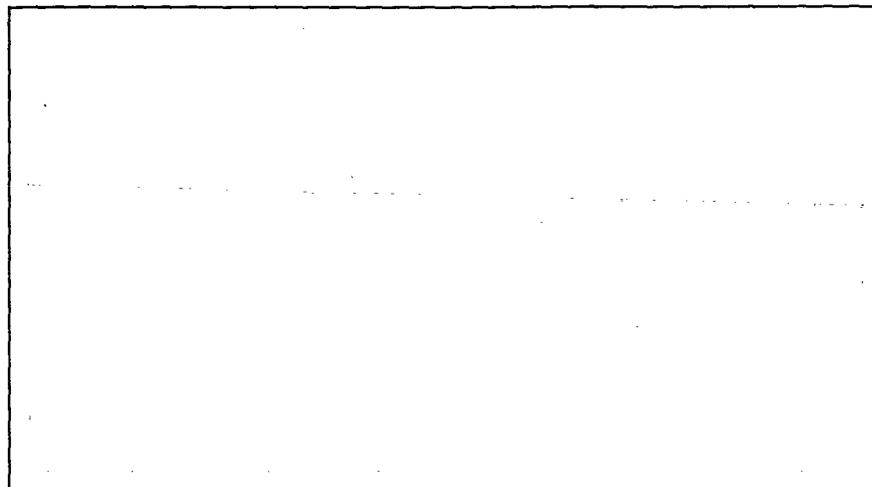
### *Marker*

Der Protein-Standard von Bio-Rad® (SDS Protein Standards Low Range) wurde 1:20 mit Aqua destillata und der entsprechenden Menge Sample Buffer verdünnt. Pro Lane wurden 10 µl des fertigen Marker-Gemisches aufgetragen. Später wurde alternativ der Rainbow®-Marker (Rainbow® Coloured Protein Molecular Weight Marker, Low Molecular Weight Range von Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt, der praktischerweise auch direkt nach dem Blotting (bereits ohne Detektion) sichtbar ist und somit einen gelungenen Proteintransfer anzeigt.

### *„Kalibrierung“ durch ApoE-Lösungen verschiedener Konzentration*

Eine Reihe von 1:1-Verdünnungen des ApoE-Standards, ausgehend von 150 ng/Lane, hatte sich mit der Kombination von polyklonalem Anti-ApoE-Antikörper und AP-Konjugat (BCIP/NBT-Farbreaktion) als zu konzentriert erwiesen. Eine Konzentrationsreihe ausgehend von 50 ng/Lane ließ sich mittels Farbreaktion gut detektieren (siehe Abb. 5.10). Durch die Alterung der Membran im Laufe der zweijährigen Lagerung vor dem Einscannen sind die sehr schwachen Banden im rechten Bereich der Membran nicht mehr (gut) sichtbar.

Abb. 5.10 ApoE-Verdünnungsreihe (BCIP/NBT-Farbreaktion)



Lane 1	50 ng ApoE-Standard
(Lane 2 Marker)	SDS Page Standards Low Range
Lane 3	25 ng ApoE-Standard
Lane 4	12,5 ng ApoE-Standard
Lane 5	6,3 ng ApoE-Standard
Lane 6	3,2 ng ApoE-Standard
Lane 7	1,6 ng ApoE-Standard
Lane 8	0,8 ng ApoE-Standard
Lane 9	0,4 ng ApoE-Standard

Anmerkung: ein Teiler Lane 1 und die ganze Lane 2 wurden beim Blotting nicht auf die Membran transferiert, da sich zwischen Gel und Membran eine Luftblase befand

Wurde allerdings mittels ChemiGlow™ detektiert, so wurden zur relativen Quantifizierung geringere ApoE-Mengen pro Lane aufgetragen. Die eingesetzten Mengen lagen meist zwischen 0,2 und 1 µg/Lane.

### 5.3.3 Bedingungen für das Elektro-Blotting

Beim ersten Versuch führten 200 V bei +4 °C nicht zum gewünschten Erfolg, sondern zum Sieden der Puffer-Lösung, dampfenden Sandwiches und verkohlten Elektroden. Trotz der eindeutig zu hart gewählten Bedingungen konnten auf der Membran mit Red Dye Banden nachgewiesen werden (vermutlich sind derart gegarte/denaturierte Proteine keiner Antigen-Antikörper-Reaktion

mehr zugänglich). Als Reaktion auf dieses Problem wurde das Elektro-Blotting mit 250 mA durchgeführt. Dies bewirkte jedoch keinen Proteintransfer vom Gel auf die Membran, auch die Blasenbildung war nur ganz gering. Erst als 200 mA konstant über den gesamten Blotting-Zeitraum von 2 Stunden gehalten wurden (Werte für U und P maximal), konnte der Proteintransfer erfolgreich stattfinden. Dabei konnte eine gleichmäßige Blasenbildung und eine unverändert niedrige Temperatur des Puffers erreicht werden.

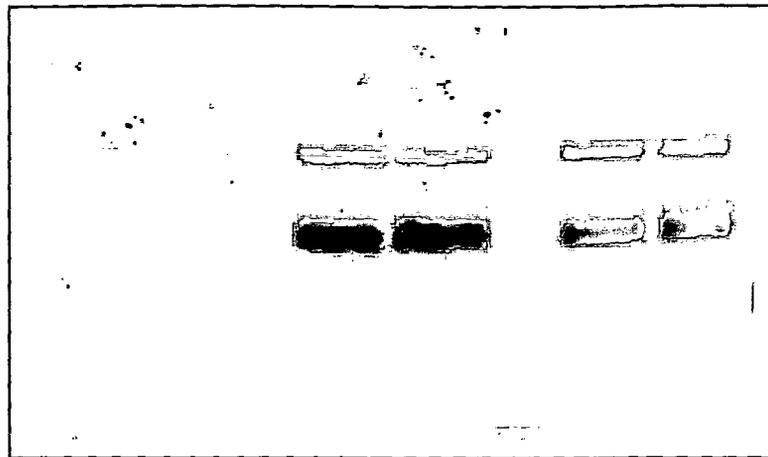
#### 5.3.4 Membran-Material

Nach einigen erfolglosen Versuchen mit der ECL-Nachweis-Methode habe ich Parallelversuche mit Nitrocellulose- (Protran®; Schleicher & Schüll) und PVDF-Membranen (Westran®; Schleicher & Schüll) durchgeführt, um herauszufinden, welches Membranmaterial die besten Meßergebnisse ergibt. PVDF-Membranen erzielten beim Nachweis der Banden eine deutlich geringere Sensitivität, daher wurden weiterhin Nitrocellulose-Membranen als Substrat für die Immobilisierung der Proteine verwendet.

#### 5.3.5 Blocking

BSA-Blocking (3% BSA in 1x PBS) bewirkte eine gute Reduktion des störenden Hintergrundsignals und lieferte ebenso gute Resultate wie sie bei Verwendung des wesentlich teureren Trockenmilchpulvers (non-fat dry milk, 1% in 1x PBS) erzielt werden. Es wurde anhand eines Experiments nachgewiesen, daß BSA keine Kreuzreaktionen mit dem polyklonalen Anti-ApoE-Antikörper auslöst, die durchaus möglich wären, ist BSA doch ein Serumprotein. Im selben Versuch wurde auch kontrolliert, ob das in den Supernatants enthaltene FCS (10 %) zu einer Reaktion mit dem polyklonalen Anti-ApoE-Antikörper führt. FCS verursachte ebenfalls keine störende Kreuzreaktionen (siehe Abb. 5.11).

Abb. 5.11 Überprüfung der Spezifität des polyklonalen Anti-ApoE-Antikörpers (BCIP/NBT-Nachweismethode)



Lane 1  
Lane 2  
Lane 3  
Lane 4  
Lane 5  
Lane 6  
Lane 7  
Lane 8  
Lane 9  
Lane 10

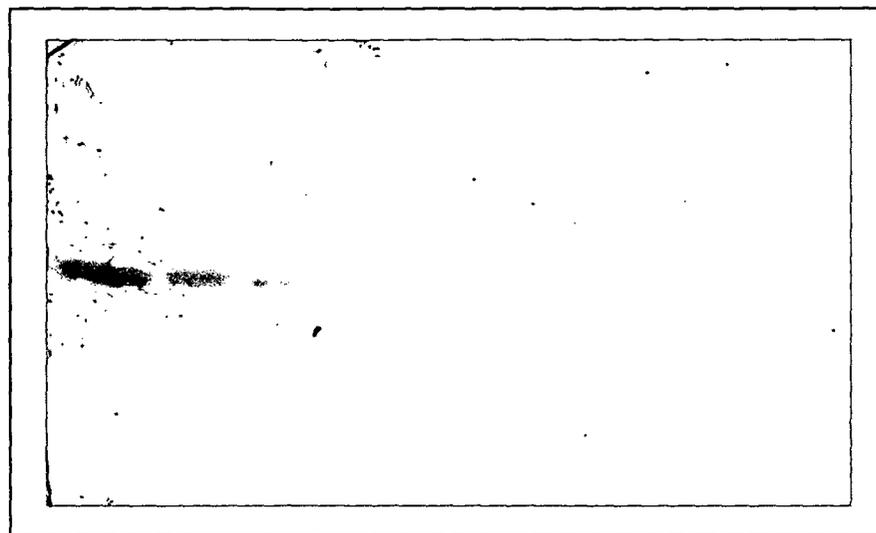
leer  
FCS, 1:1 000 verdünnt  
2 µg BSA  
120 µg Gelatine  
Liquor 2 (20 µg)  
Liquor 1 (20 µg)  
Rainbow® Marker  
Liquor 2 (10 µg)  
Liquor 1 (10 µg)  
leer

### 5.3.6 Primäre Antikörper und sekundäre Antikörper (Enzym-Konjugate)

Der polyklonale Anti-ApoE-Antikörper gemeinsam mit dem passenden AP-Enzym-Konjugat (gleiche Antikörper wie beim ApoE-ELISA, siehe Abschnitt 2.2; beide in Verdünnung 1:10 000) und der Entwicklung durch die BCIP/NBT-Farbreaktion funktionierte gut für die vergleichsweise hochkonzentrierten Liquor- und Serumproben. Die Verwendung eines monoklonalen Anti-ApoE-Antikörpers (Mouse Monoclonal Anti-ApoE Antibody, Molecular Probes®) in Kombination mit einem entsprechenden AP-Enzym-Konjugat (Anti-Mouse IgG AP Conjugate, Molecular Probes®) brachte nicht den erhofften Sensitivitätsgewinn, sondern zeigte im Gegenteil eine schlechtere Nachweisleistung (die verwendete Konzentration war für beide Antikörper 1:10 000).

Unter Verwendung des Systems aus polyklonalem Anti-ApoE-Antikörpern und dem dazugehörigen AP-Konjugat mit BCIP/NBT-Farbreaktion ist es auch gelungen, ApoE in frischen Zellkultur-Überständen nachzuweisen (Übersichtsversuch siehe Abb. 5.12). Vor allem in Zellkultur-Überständen von LN-405-Zellen konnte ApoE in zwei schwachen, aber deutlich sichtbaren Banden nachgewiesen werden, während die ApoE-Konzentration in Supernatants von Gos-3-Zellen geringer zu sein schien.

Abb. 5.12 ApoE-Nachweis in Liquor- und Supernatant-Proben (BCIP/NBT-Nachweismethode)



Lane 1	Liquor 1 (10 µg)
Lane 2	Liquor 2 (10 µg)
Lane 3	9,4 ng ApoE-Standard
Lane 4	37,5 ng ApoE-Standard
Lane 5	200 µg BSA
Lane 6	50 µg Zellkultur-Überstand von LN-405-Zellen (50 µg), Probe 1
Lane 7	50 µg Zellkultur-Überstand von LN-405-Zellen (50 µg), Probe 2
Lane 8	50 µg Zellkultur-Überstand von Gos-3-Zellen (50 µg)
Lane 9	Rainbow® Marker

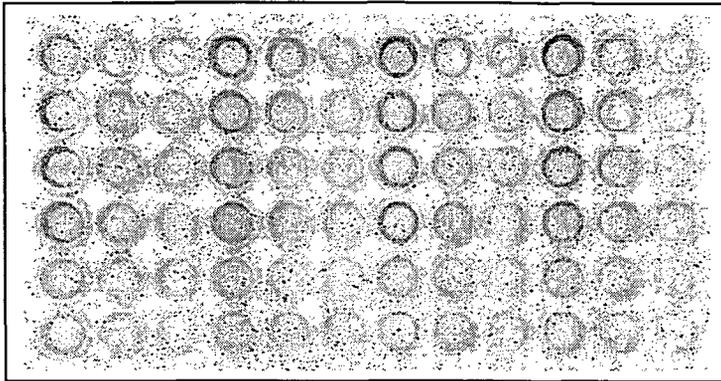
### 5.3.7 Detektion

Anfangs wurde bei Verwendung des polyklonalen Anti-ApoE-Antikörpers und eines geeigneten AP enthaltenden Enzym-Konjugats (wie beim ApoE-ELISA) mit der BCIP/NBT-Fertiglösung (Bio-Rad®) durch Farbreaktion detektiert. Diese Vorgangsweise führte bei Serum- und Liquor-Proben zum Erfolg, erwies sich allerdings für (relative) Quantifizierungen in Zellkultur-Überständen als zu wenig sensitiv (siehe auch Abschnitt 5.4).

Erste Versuche mittels ECL-Detektion (ChemiGlow™ West, Alpha Innotech Corp.) waren nicht erfolgreich. Bei Verwendung des monoklonalen Anti-ApoE-Antikörpers (1:10 000, Molecular Probes®) und des dazu passenden HRP-Konjugats (Anti-Mouse IgG-HRP Conjugate, Molecular Probes®; Verdünnung 1:50 000) waren überhaupt keine Banden ersichtlich, obwohl der Hersteller für den sekundären Antikörper eine Verdünnung von 1:100 000 empfiehlt. Auch konzentriertere Antikörper-Lösungen (primärer Antikörper: 1:5000, sekundärer Antikörper: 1:10 000) verbesserten die Situation nicht. Bei Einsatz des monoklonalen Anti-ApoE-Antikörpers der Firma ICN Pharmaceuticals, Inc (Coating-Antikörper für den ApoE-ELISA) als primärem Antikörper konnten unter Verwendung der ECL-Nachweismethode ebenfalls keine Banden sichtbar gemacht werden.

Erst ein Doppelversuch unter Verwendung beider Nachweismethoden (Farbreaktion BCIP/NBT und ECL ChemiGlow™ mit demselben primären Antikörper [polyklonaler Anti-ApoE-Antikörper von Calbiochem]) brachte Klarheit. Bei einer Verdünnung aller benötigten Antikörperlösungen von 1:10 000 funktionierte die Farbreaktion erstaunlich gut (auch in Supernatants), während die Chemilumineszenz-Detektion wiederum kein Resultat lieferte. Daraus ergab sich, daß der sekundäre Antikörper (Anti-Goat HRP Conjugate, Molecular Probes®) für die vorherigen mangelhaften Meßergebnisse verantwortlich sein mußte. Mit Hilfe von Bindungsstudien, die auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt wurden, konnte die optimale Konzentration des HRP-Konjugats herausgefunden werden. Nur eine Verdünnung des sekundären Antikörpers von 1:2 000 lieferte gute Resultate (siehe Abb. 5.13 A - C).

Abb.5.13 Bindungsstudien des HRP-Konjugats



A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	7	13	19	25	31	37	43	49	55	61	67
B	2	8	14	20	26	32	38	44	50	56	62	68
C	3	9	15	21	27	33	39	45	51	57	63	69
D	4	10	16	22	28	34	40	46	52	58	64	70
E	5	11	17	23	29	35	41	47	53	59	65	71
F	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72

B

C

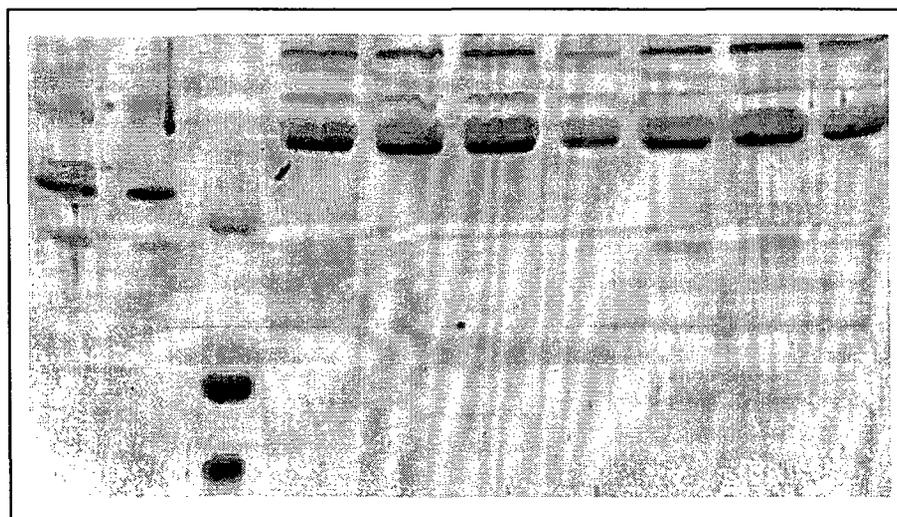
Nr.	Verd.	wash	times	Nr.	Verd.	wash	times	Nr.	Verd.	wash	times
1	1:2000	PBS/T	2x	25	1:5000	PBS/T	4x	49	1:10000	TBS/T	2x
2	1:2000	PBS/T	2x	26	1:5000	PBS/T	4x	50	1:10000	TBS/T	2x
3	1:2000	PBS/T	2x	27	1:5000	PBS/T	4x	51	1:10000	TBS/T	2x
4	1:2000	PBS/T	2x	28	1:5000	PBS/T	4x	52	1:10000	TBS/T	2x
5	1:2000	PBS/T	2x	29	1:5000	PBS/T	4x	53	1:10000	TBS/T	2x
6	1:2000	PBS/T	2x	30	1:5000	PBS/T	4x	54	1:10000	TBS/T	2x
7	1:5000	PBS/T	2x	31	1:10000	PBS/T	4x	55	1:2000	TBS/T	4x
8	1:5000	PBS/T	2x	32	1:10000	PBS/T	4x	56	1:2000	TBS/T	4x
9	1:5000	PBS/T	2x	33	1:10000	PBS/T	4x	57	1:2000	TBS/T	4x
10	1:5000	PBS/T	2x	34	1:10000	PBS/T	4x	58	1:2000	TBS/T	4x
11	1:5000	PBS/T	2x	35	1:10000	PBS/T	4x	59	1:2000	TBS/T	4x
12	1:5000	PBS/T	2x	36	1:10000	PBS/T	4x	60	1:2000	TBS/T	4x
13	1:10000	PBS/T	2x	37	1:2000	TBS/T	2x	61	1:5000	TBS/T	4x
14	1:10000	PBS/T	2x	38	1:2000	TBS/T	2x	62	1:5000	TBS/T	4x
15	1:10000	PBS/T	2x	39	1:2000	TBS/T	2x	63	1:5000	TBS/T	4x
16	1:10000	PBS/T	2x	40	1:2000	TBS/T	2x	64	1:5000	TBS/T	4x
17	1:10000	PBS/T	2x	41	1:2000	TBS/T	2x	65	1:5000	TBS/T	4x
18	1:10000	PBS/T	2x	42	1:2000	TBS/T	2x	66	1:5000	TBS/T	4x
19	1:2000	PBS/T	4x	43	1:5000	TBS/T	2x	67	1:10000	TBS/T	4x
20	1:2000	PBS/T	4x	44	1:5000	TBS/T	2x	68	1:10000	TBS/T	4x
21	1:2000	PBS/T	4x	45	1:5000	TBS/T	2x	69	1:10000	TBS/T	4x
22	1:2000	PBS/T	4x	46	1:5000	TBS/T	2x	70	1:10000	TBS/T	4x
23	1:2000	PBS/T	4x	47	1:5000	TBS/T	2x	71	1:10000	TBS/T	4x
24	1:2000	PBS/T	4x	48	1:5000	TBS/T	2x	72	1:10000	TBS/T	4x

#### 5.4 Quantifizierung des ApoE-Western Blot-Verfahrens

Die Ermittlung der relativen ApoE-Proteinmengen, welche von IFN- $\beta$ -stimulierten Zellen (im Vergleich zu unstimulierten Zellen) sezerniert wurden, wurde im wesentlichen ähnlich wie die Quantifizierung der PCR-Produkte der ApoE-RT-PCR durchgeführt. Der in das Medium abgegebene ApoE-Protein-Anteil wurde ebenso bestimmt wie die noch in den Zellen befindliche, frisch synthetisierte ApoE-Menge.

Die Quantifizierung war problematisch, weil stets mehrere ApoE-Banden detektierbar waren. In den Supernatants waren drei stärkere Hauptbanden zu sehen, während die aufgereinigten und rehydratisierten Zellproteine viele ApoE-Banden aufwiesen (siehe Abb. 5.14 bis 5.17). Das Auftreten mehrerer Banden resultierte aber nicht aus Kreuzreaktionen wegen ungenügender Spezifität der Antikörper, wie mehrmals überprüft wurde (siehe auch Abb. 5.9 und Abb. 5.11).

Abb. 5.14 ECL-Detektion von ApoE in Zellkultur-Überständen von Gos-3-Zellen

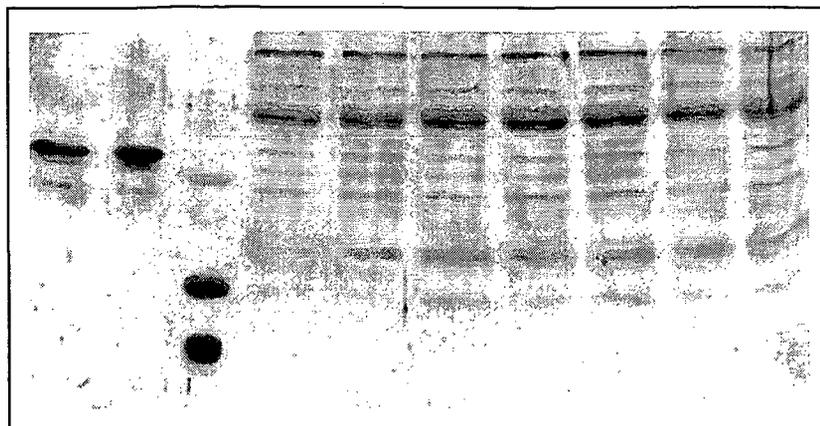


Lane 1  
Lane 2  
Lane 3  
Lanes 4 und 5  
Zellen, unstimulierte Kontrollen  
Lanes 6 bis 10

ApoE-Standard, 1,50 ng  
ApoE-Standard, 0,75 ng  
Rainbow®-Marker Low Range  
Zellkultur-Überstände von Gos-3-

Zellkultur-Überstände von Gos-3-Zellen,  
stimuliert mit 1 000 U Betaferon®

Abb. 5.15 ECL-Detektion von ApoE in Zellproteinen von Gos-3-Zellen

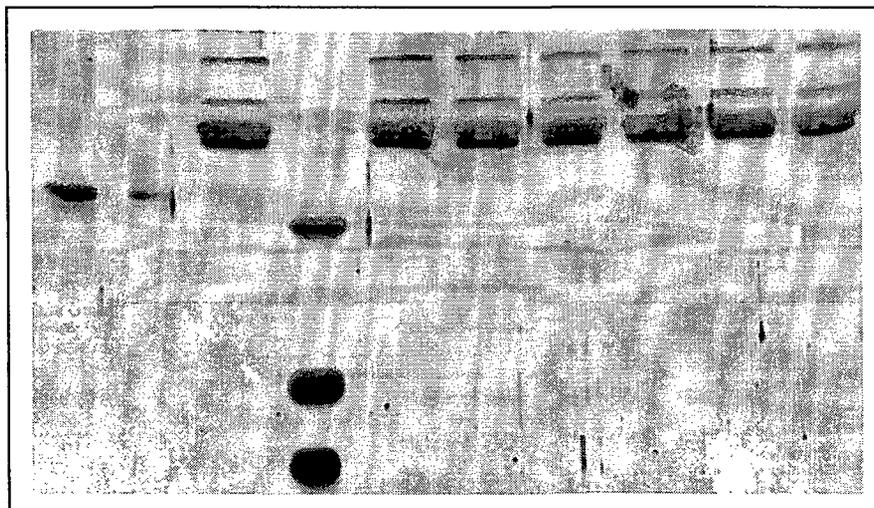


Lane 1  
Lane 2  
Lane 3  
Lane 4

Lanes 5 bis 10

ApoE-Standard, 0,75 ng  
ApoE-Standard, 0,38 ng  
Rainbow®-Marker Low Range  
Zellkultur-Überstand von Gos-3-Zellen,  
unstimulierte Kontrolle  
Zellkultur-Überstände von Gos-3-Zellen,  
stimuliert mit 1 000 U Betaferon®

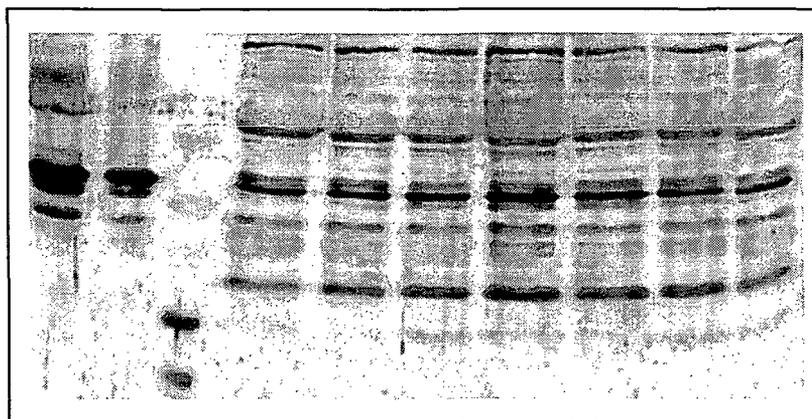
Abb 5.16 ECL-Detektion von ApoE in Zellkultur-Überständen von LN-405-Zellen



Lane 1  
Lane 2  
Lane 4  
Lanes 3 und 5 bis 10

ApoE-Standard, 0,75 ng  
ApoE-Standard, 0,38 ng  
Rainbow®-Marker Low Range  
Zellkultur-Überstände LN-405-Zellen,  
stimuliert mit 100 U Betaferon®

Abb.5.17 ECL-Detektion von ApoE in Zellproteinen von LN-405-Zellen



Lane 1  
Lane 2  
Lane 3  
Lane 4 und 5  
  
Lanes 6 bis 10

ApoE-Standard, 3,0 ng  
ApoE-Standard, 1,5 ng  
Rainbow®-Marker Low Range  
Zellkultur-Überstände von LN-405-  
Zellen, unstimulierte Kontrollen  
Zellkultur-Überstände von LN-405-  
Zellen, stimuliert mit 1 000 U Betaferon®

Bei den Supernatants traten die Hauptbanden bei ungefähr 28, 42 und 70 kDa auf. Die kleinste Bande dürfte einem Abbauprodukt von ApoE entsprechen, sie war auch beim ApoE-Standard nachzuweisen und könnte mit der Lagerung der Proben und Standard bei -80 °C in Zusammenhang stehen. Die 42 kDa-Bande entsteht vermutlich durch eine Anlagerung von 3 Sialsäureresten, da die Astrozyten zu einer ausgeprägten Sialylierung des ApoE neigen. Die größte ApoE-Bande bei 70 kDa dürfte durch eine Dimerisierung der ApoE-Moleküle zustandekommen, die in wässriger Lösung begünstigt wird. Diese Dimerisierung von ApoE-Molekülen wurde beim ApoE-Standard durch Auflösen des ApoE-Lyophilisats in einer 1%igen BSA-Lösung (BSA als Trägerprotein) verhindert.

Die aus den gereinigten und rehydrierten Zellproteinen gewonnenen Lösungen zeigten dieselben Hauptbanden gemeinsam mit zahlreichen weiteren schwächeren Nebenbanden verschiedenen Molekulargewichts. Da die Probennahme einer Momentaufnahme von verschieden weit synthetisierten ApoE-

Fragmenten entspricht, könnte in den angeführten Molekulargewichtsbereichen ein sogenannter „smear“ manifest werden, d.h. daß keine diskreten Banden auftreten, sondern das Signal über einen großen Bereich „verschmiert“ erscheint.

Zur Bestimmung der relativen ApoE-Mengen wurde also die Summe der Intensitäten der oben angeführten drei Hauptbanden herangezogen, die in den Supernatants und in den resolvasierten Zellproteinen gleichermaßen nachweisbar waren. Zur groben Orientierung die synthetisierten/sezernierten Absolutmengen betreffend kann mit der 34-kDa-Bande des ApoE-Standards verglichen werden.

## ERGEBNISSE

Die Ergebnisse von Zellkultur-Experimenten und die retrospektive Korrelation von ApoE-Konzentration im Liquor mit klinischen Daten sollten zur Klärung zweier Fragen beitragen:

1. Unterscheiden sich die ApoE-Konzentrationen von klinisch gesunden und neurologisch kranken Individuen?
2. Reagieren menschliche Astrozyten auf eine *in vitro*-Stimulation mit IFN- $\beta$ -1b? Und wenn ja, verhalten sich ApoE-Expression und ApoE-Sekretion unterschiedlich?

Stimulationsexperimente mit IFN- $\beta$  an astrozytären Zellen *in vitro*, in denen die ApoE-Expression (mRNA) und die ApoE-Synthese und -Sekretion (Protein) untersucht wurden, sollten Auskunft geben über die Transkriptionsrate des ApoE-Gens und über die Sekretion des Genprodukts unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von IFN- $\beta$ -1b (Betaferon®). Falls IFN- $\beta$  die ApoE-Genexpression erhöht, könnte darin ein Teil der positiven klinischen Wirkung des IFN- $\beta$ -1b bei MS-Patienten liegen.

Zusätzlich zu den Experimenten mit astrozytären Zell-Linien *in vitro* wurde eine Studie an drei, an der Ambulanz der Universitätsklinik für Neurologie rekrutierten Patientenkollektiven, durchgeführt, in der die ApoE-Konzentration erfaßt wurde. Die anschließend vorgenommene Korrelation mit den klinischen und anamnestic Daten kann eine Aussage über die Wichtigkeit von Labordaten oder Parametern (wie der ApoE-Synthese bzw. der ApoE-Konzentration im Liquor) für bestimmte Erkrankungen ermöglichen. Wenn die ApoE-Konzentrationen im Liquor, um einen möglichen Zusammenhang zwischen ApoE-Synthese und Krankheitsempfänglichkeit bzw. Krankheitsverlauf zu erfassen. Verglichen werden die ApoE-Konzentrationen im Liquor von drei Gruppen: gesunde Individuen, Patienten mit MS und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen.

## 1. In vitro-Experimente und Zellkultur

### 1.1 Übersicht

Die Veränderung der ApoE-Expression und -Sekretion bei Stimulierung mit IFN- $\beta$  sollte bei verschiedenen Zellpopulationen des ZNS untersucht werden. Für die Experimente wurden astrozytäre und neuronale Zell-Linien verschiedenen ApoE-Genotyps verwendet: die beiden astrozytären Zell-Linien Gos-3 (ApoE-Genotyp  $\epsilon 3/3$ ) und LN-405 (ApoE-Genotyp  $\epsilon 3/2$ ) und sowie die beiden neuronalen Zell-Linien SH-SY5Y (ApoE-Genotyp  $\epsilon 3/3$ ) und Kelly (ApoE-Genotyp  $\epsilon 4/3$ ).

Durch die aufwendigen und langwierigen Optimierungsprozesse für RT-PCR und Western Blot und verschiedene Probleme bei der Zellkultivierung in den kleinen Petrischalen (siehe Methodik und Materialien, Abschnitt 2.2) konnten die Stimulationsexperimente aus Zeitmangel nicht für alle vier vorgesehenen Zell-Linien durchgeführt werden. Die Entscheidung fiel zugunsten der astrozytären Zell-Linien, da die Astrozyten ohnedies als die Hauptproduzenten des im ZNS synthetisierten ApoE angesehen werden (siehe Einleitung, Abschnitte 1.2.2 und 1.4.2). Darüber hinaus synthetisierten die neuronalen Zell-Linien – wie in Vorversuchen ermittelt wurde – eine wesentlich geringere ApoE-Menge (bei 35 PCR-Zyklen gerade eben eine erkennbare Bande), die auch unter Stimulationsbedingungen nicht wesentlich intensiver war. Die Kultivierung der neuronalen Zell-Linien in den kleinen Petrischalen zur Durchführung der Stimulationsexperimente war problematischer als bei den astrozytären Zell-Linien; weder die Petrischalen der Firma Falcon® noch diejenigen der Firma Corning® Inc. waren für ein gleichmäßiges Wachstum dieser Zellen geeignet. Meist waren die Zellen schon nach dem Anwachsen über Nacht und vor der eigentlichen Stimulation abgerundet und die Zellmorphologie (Vesikelbildung, Abrundung der Zellen etc.) deutete auf Degenerationsprozesse hin. Auch eine Variation der Aussaatdichte in den Petrischalen konnte den Erhaltungszustand der Zellen nicht bessern.

Die Stimulation mit IFN- $\beta$  (Betaferon<sup>®</sup>, Schering) wurde mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, um herauszufinden, ob die Veränderung der ApoE-Expression dosisabhängig erfolgt und wann eine maximale Antwort auf die IFN- $\beta$ -Gabe erfolgt. Wird die ApoE-Expression und in weiterer Folge auch die ApoE-Sekretion durch IFN- $\beta$  gesteigert, so kann dies als neuroprotektiver Effekt gedeutet werden, der vielleicht auch bei der positiven IFN- $\beta$ -Wirkung bei MS-Patienten eine Rolle spielt.

## 1.2 RT-PCR

Nach der Optimierung der RT-PCR (Primer für ApoE, Annealing-Temperatur, Zyklusanzahl, Zugabe von 5 % DMSO etc.) wurden in beiden Zell-Linien bei verschiedenen Betaferon<sup>®</sup>-Konzentrationen (1 000 U, 100 U, 10 U und 1 U/ml Medium) jeweils mehrere Proben-Reihen gemessen, um die resultierende Veränderung in der ApoE-Expression zu bestimmen. Durch die Angabe eines Mittelwerts und der zugehörigen Standardabweichung wird eine größere Aussagekraft im Vergleich zu Einzelmessungen gewährleistet.

### 1.2.1 Dauer der Stimulation mit Betaferon<sup>®</sup>

Die über 12 und mehr Stunden durchgeführten Stimulationsexperimente zeigten keine signifikante Veränderung der ApoE-Expression (nicht einmal ein Trend wurde deutlich), wie aus den Abbildungen 1.1 und 1.2 ersichtlich ist.

Abb. 1.1 ApoE-Expression von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über 72 Stunden (relativ zu GAPDH)

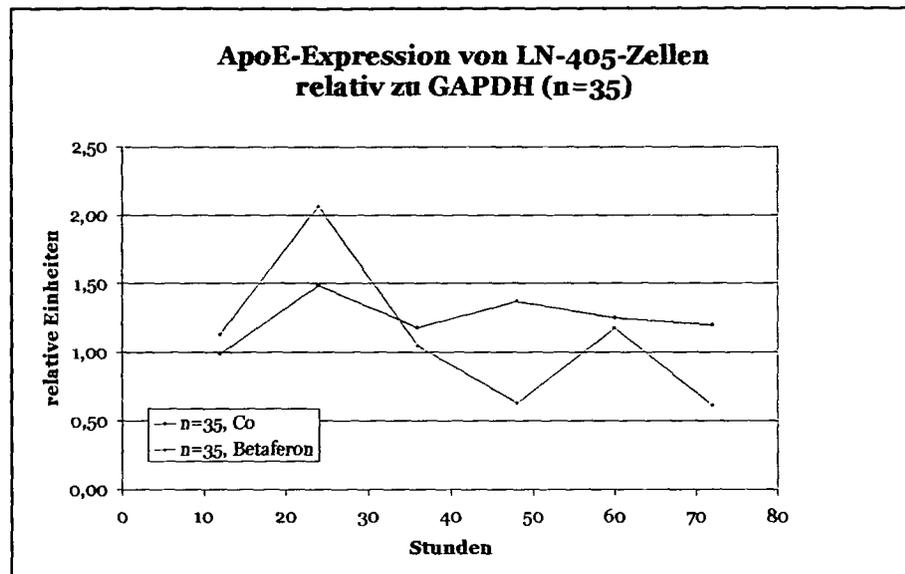
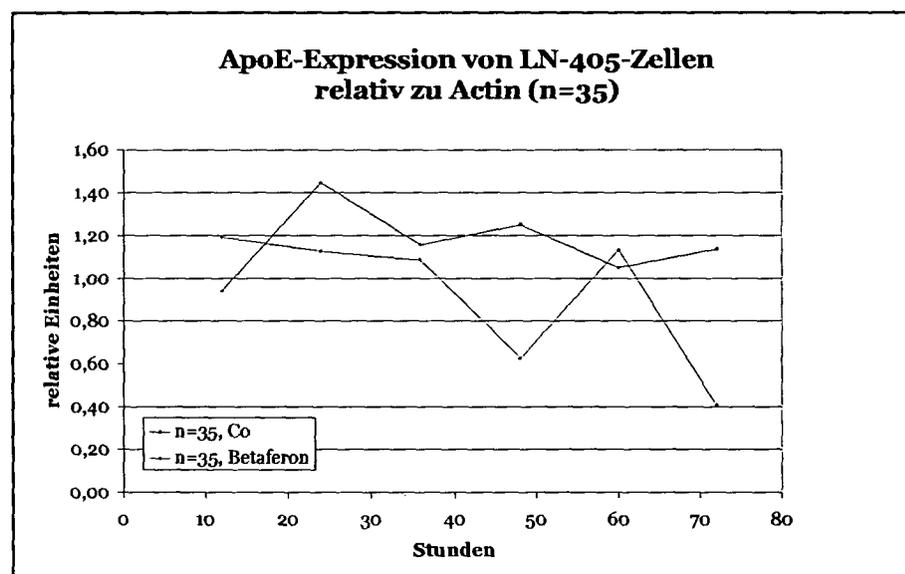
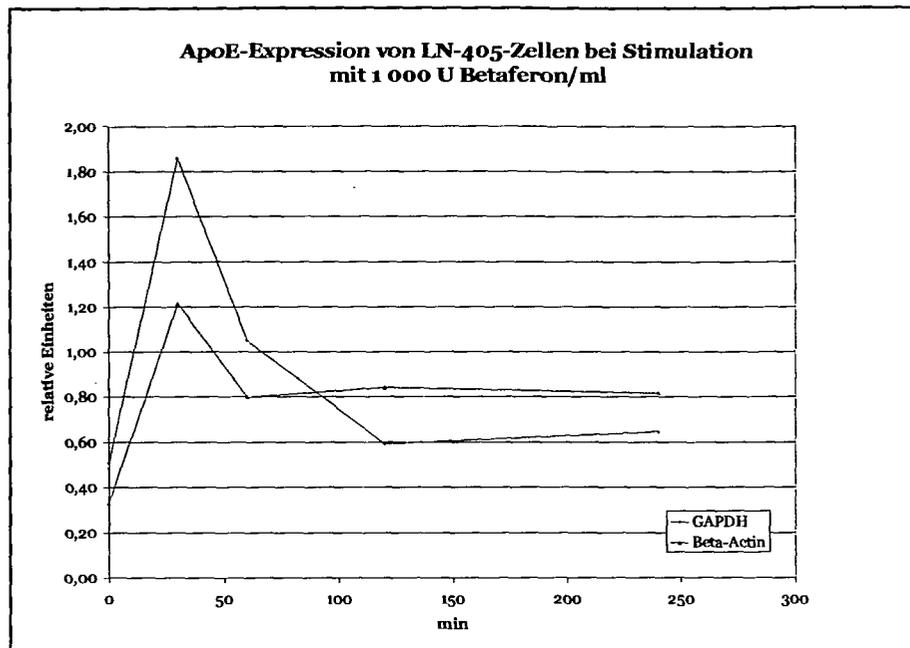


Abb.1.2 ApoE-Expression von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über 72 Stunden (relativ zu  $\beta$ -Actin)



Erst eine Verkürzung der Intervalle zwischen den einzelnen Probennahmen ließ eine Modifikation der ApoE-Expression durch Betaferon® erkennen (siehe Abb. 1.3).

Abb.1.3 ApoE-Expression von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über 240 Minuten



### 1.2.2 Maximum der ApoE-Expression

Die Intervalle zwischen den Probennahmen wurden schrittweise verringert, um den Zeitpunkt der maximalen Stimulation der ApoE-Expression durch Betaferon® möglichst genau zu bestimmen. Von anfangs 60 über 45 und 30 Minuten wurden die Intervalle verkürzt, bis letztendlich nur mehr 15 Minuten zwischen den einzelnen Meßpunkten lagen.

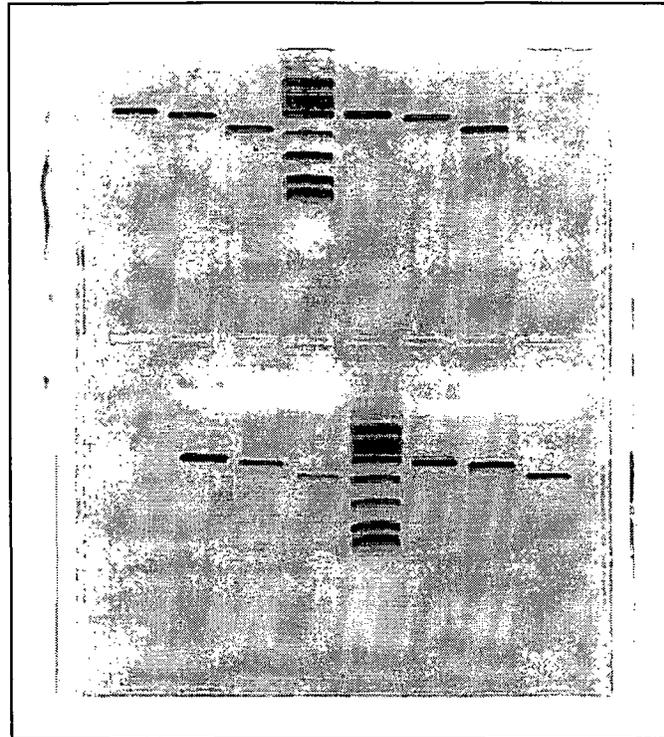
Ein Intervall von 15 Minuten zwischen den Meßpunkten erscheint als die zeitliche Untergrenze des Machbaren, wenn die RNA-Isolierung von einer Einzelperson durchgeführt wird (wenn zwei Zentrifugen zur Verfügung stehen), da die einzelnen Verfahrensschritte für jede Probe (jeden Meßpunkt) gesondert

durchgeführt werden müssen. Die RNA-Isolierung kann nicht erst dann begonnen werden, wenn alle Proben lysiert sind, da bei einer solchen Vorgangsweise zu befürchten ist, daß die RNA zumindest teilweise degeneriert.

Daß das Maximum der ApoE-Expression in dem Bereich rund um 1 Stunde nach der Stimulation liegt, war bereits nach den ersten Versuchen klar. Je kürzer die Intervalle zwischen den einzelnen Meßpunkten gewählt wurden, desto deutlicher war erkennbar, daß die maximale ApoE-mRNA-Menge bereits nach 15 oder 30 Minuten vorliegt. Wie den Diagrammen über die einzelnen Betaferon®-Konzentrationen zu entnehmen ist (siehe auch folgende Unterabschnitte), kann nicht definitiv entschieden werden, ob das Maximum der ApoE-Expression bei 15 oder 30 Minuten liegt. Ungeachtet dessen, wurde das Maximum, so es bei einem dieser Zeitpunkte lag, zur Bildung des Mittelwerts aus den einzelnen Versuchsserien für jede Zell-Linie und die verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen herangezogen.

In den folgenden Unterabschnitten (Abschnitte 1.2.3 bis 1.2.10) wird mit Beispiel-Diagrammen auf die Effekte der einzelnen Betaferon®-Konzentrationen auf die ApoE-Expression der beiden Zell-Linien eingegangen. Die PCR-Produkte für ApoE und die Housekeeping-Gene wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt (ein typisches Gel ist aus Abb. 1.4 ersichtlich). Die relativen Mengen des ApoE-Gen-Fragments im Vergleich zu denen der Housekeeping-Gene konnte durch Messung und Vergleich der Bandenintensität der diversen PCR-Produkte (wobei die Länge der amplifizierten Fragmente normiert wurde) mittels densitometrischer Analyse und Auswertung mit ScionImage (das ist die PC-Version des bekannten NIH Image) ermittelt werden. Abschließend gibt eine Übersichtstabelle über die durchschnittlichen Steigerungen der ApoE-Expression bei Stimulation mit den verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen Auskunft (siehe Abschnitt 1.2.11).

Abb. 1.4 Agarose-Gel zur semiquantitativen Analyse der Menge des ApoE-Fragments im Vergleich zu GAPDH und  $\beta$ -Actin



Obere Reihe:

Lane 1, 5	ApoE, 217 bp
Lane 2, 6	GAPDH, 240 bp
Lane 3, 7	$\beta$ -Actin, 274 bp
Lane 4	Marker Msp I

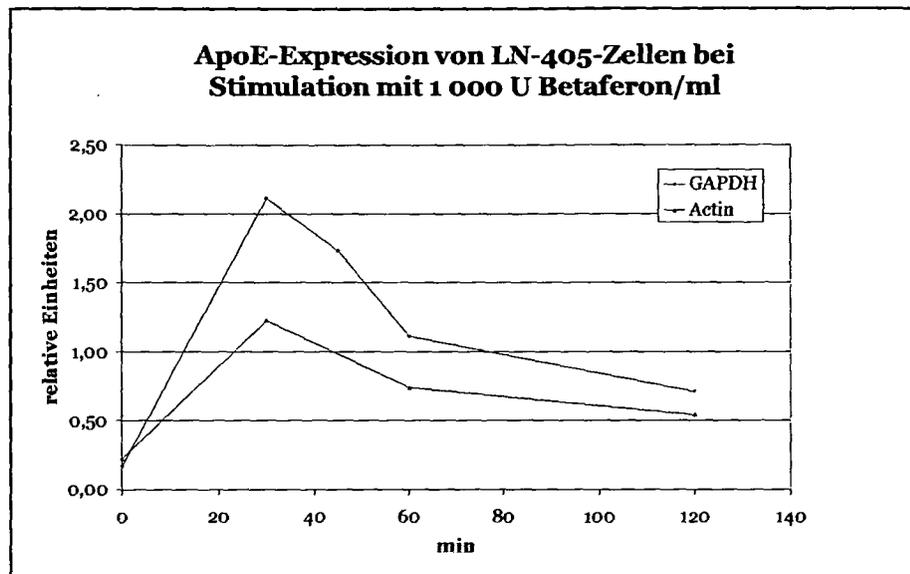
Untere Reihe:

Lane 2, 6	ApoE, 217 bp
Lane 3, 7	GAPDH, 240 bp
Lane 4, 8	$\beta$ -Actin, 274 bp
Lane 5	Marker Msp I

1.2.3 Stimulation von LN-405-Zellen mit 1 000 U Betaferon® pro ml Medium

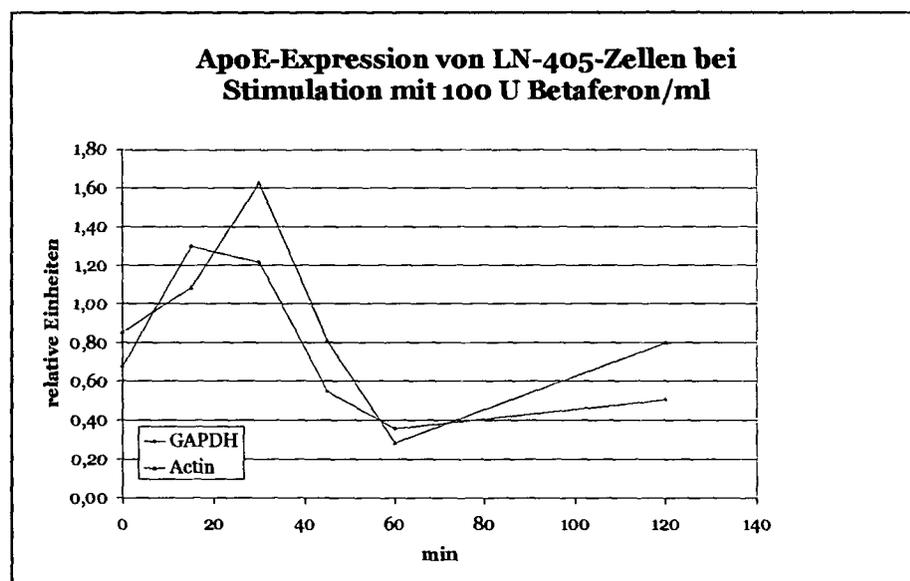
Wurden LN-405-Zellen mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nach 15 bis 30 min um das ca. 3fache erhöht; der Rückgang der zur Null-Linie erfolgte innerhalb von 1 bis 2 Stunden (siehe Abb. 1.5).

Abb. 1.5 Stimulation von LN-405-Zellen mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium



1.2.4 Stimulation von LN-405-Zellen mit 100 U Betaferon® pro ml Medium

Abb. 1.6 Stimulation von LN-405-Zellen mit 100 U Betaferon®/ml Medium

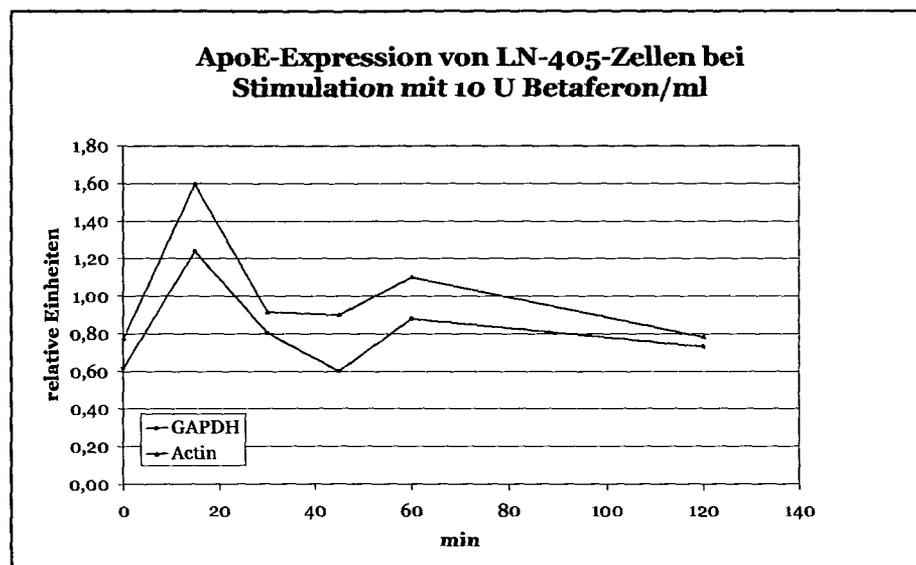


Wurden LN-405-Zellen mit 100 U/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nach 15 bis 30 min um das ca. 2fache erhöht; der Rückgang zur Null-Linie erfolgte nach rund einer Stunde (siehe Abb. 1.6).

#### 1.2.5 Stimulation von LN-405-Zellen mit 10 U Betaferon® pro ml Medium

Wurden LN-405-Zellen mit 10 U Betaferon®/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nach 15 bis 30 min um das ca. 2fache erhöht, der Rückgang zur Null-Linie erfolgte nach rund einer Stunde (siehe Abb. 1.7).

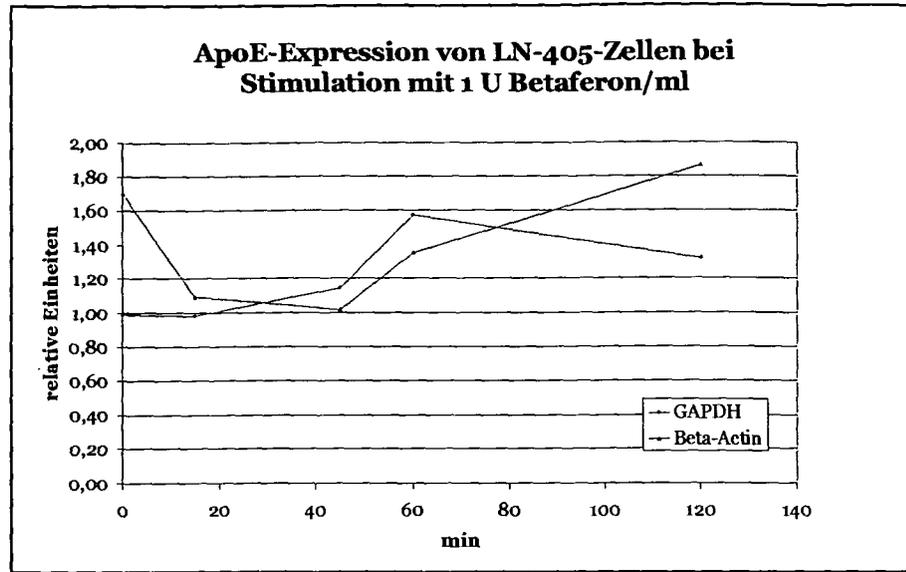
Abb. 1.7 Stimulation von LN-405-Zellen mit 10 U Betaferon®/ml Medium



#### 1.2.6 Stimulation von LN-405-Zellen mit 1 U Betaferon® pro ml Medium

Wurden LN-405-Zellen mit 1 U Betaferon®/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nicht wesentlich verändert (siehe. Abb. 1.8). Somit dürfte die (untere) Wirkschwelle des Betaferon® bei LN-405-Zellen zwischen 10 U und 1 U Betaferon®/ml liegen.

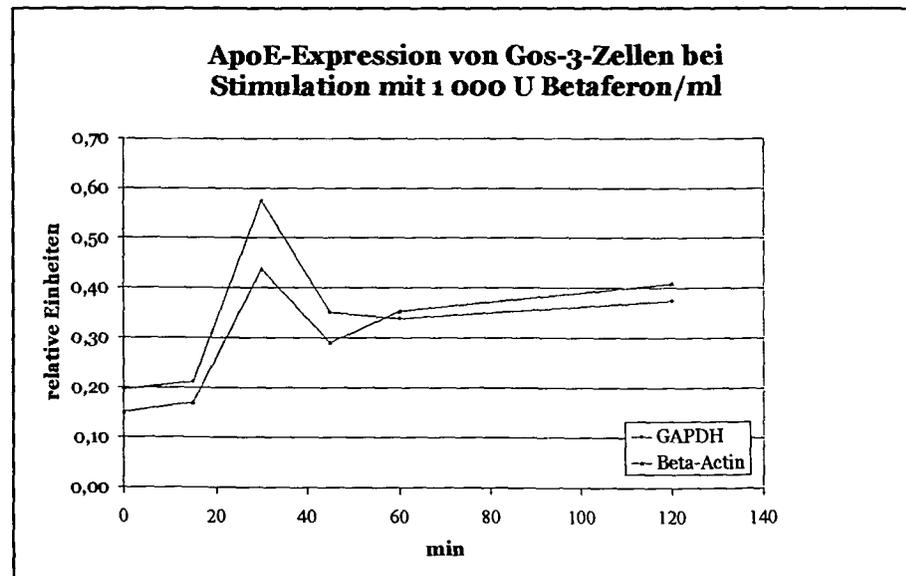
Abb. 1.8 Stimulation von LN-405-Zellen mit 1 U Betaferon®/ml Medium



1.2.7 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 1 000 U Betaferon® pro ml Medium

Wurden Gos-3-Zellen mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nach 15 bis 30 min um das ca. 3fache erhöht; der Rückgang zur Nulllinie erfolgte nach ungefähr einer Stunde (siehe Abb. 1.9).

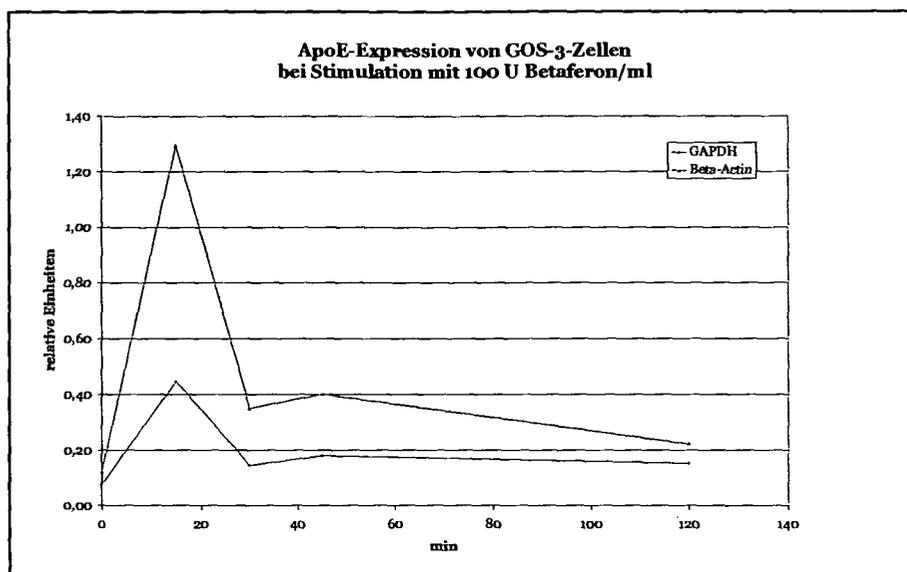
Abb. 1.9 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium



### 1.2.8 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 100 U Betaferon® pro ml Medium

Wurden Gos-3-Zellen mit 100 U Betaferon®/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nach 15 bis 30 min um zumindest das 4fache erhöht; der Rückgang zur Null-Linie erfolgte meist nach ungefähr einer Stunde (siehe Abb. 1.10; auffällig hier der rasche Abfall zur Null-Linie nach bereits 30 Minuten).

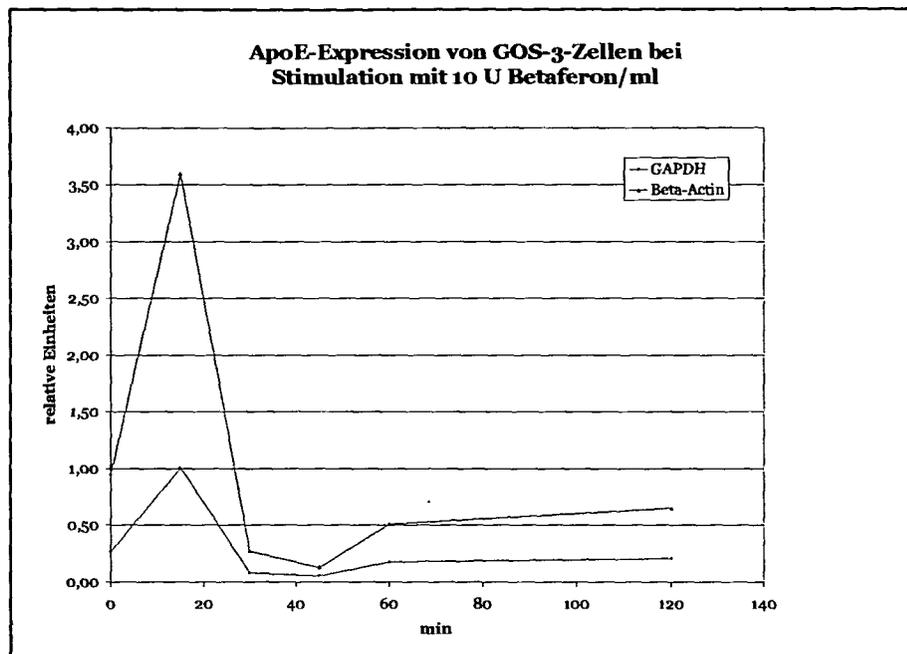
Abb. 1.10 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 100 U Betaferon®/ml Medium



### 1.2.9 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 10 U Betaferon® pro ml Medium

Wurden Gos-3-Zellen mit 100 U Betaferon®/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nach 15 bis 30 min um das ca. 3 bis 4fache erhöht; der Rückgang zur Null-Linie erfolgte meist nach ungefähr einer Stunde (siehe Abb. 1.11).

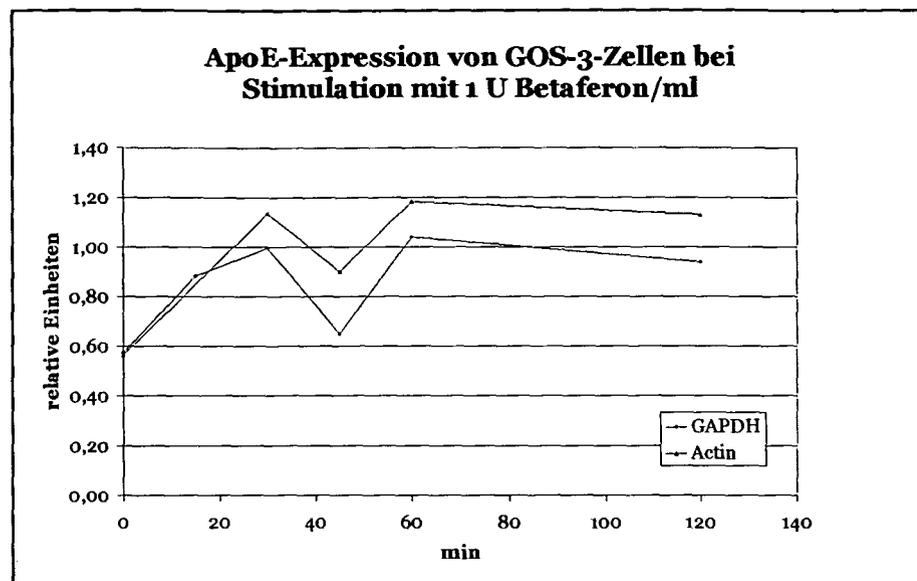
Abb. 1.11 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 10 U Betaferon®/ml Medium



#### 1.2.10 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 1 U Betaferon® pro ml Medium

Wurden Gos-3-Zellen mit 1 U Betaferon®/ml Medium inkubiert, so wurde die ApoE-Expression nicht wesentlich verändert (siehe Abb. 1.12). Somit dürfte, ebenso wie bei der anderen astrozytären Zell-Linie LN-405, die (untere) Wirkschwelle des Betaferon® bei Gos-3-Zellen zwischen 10 U und 1 U Betaferon®/ml liegen.

Abb. 1.12 Stimulation von Gos-3-Zellen mit 1 U Betaferon®/ml Medium



### 1.2.11 Übersicht über die ApoE-Expression der beiden astrozytären Zell-Linien bei verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen

Die Stimulationsexperimente mit Betaferon® wurden für jede Zell-Linie mit verschiedenen Konzentrationen (1 000 U, 100 U, 10 U und 1 U/ml Medium) durchgeführt. Die relativen Veränderungen der ApoE-Expression in den einzelnen Versuchsserien für die drei größten Betaferon®-Konzentrationen sind für Gos-3-Zellen der Abb. 1.13 zu entnehmen, für LN-405-Zellen der Abb. 1.14. 1 U Betaferon®/ml Medium lag, wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten festgestellt, bei beiden astrozytären Zell-Linien unterhalb der Wirkungsschwelle.

Abb. 1.13 ApoE-Expression von Gos-3-Zellen: Meßwerte der Stimulations-  
experimente bei verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen

Zell-Linie	Betaferon	Exp.Nr.	hk-Gen	rel. 0 min	rel. 15 min	rel. 30 min	rel. 45 min	rel. 60 min
Gos-3	1000 U	1	GAPDH	0,8623	2,1416	1,9397	0,6403	1,0007
Gos-3	1000 U	1	Actin	1,0859	2,4066	3,1026	1,5307	1,1624
Gos-3	1000 U	2	GAPDH	0,3260		1,0608		0,1503
Gos-3	1000 U	2	Actin	0,2625		1,3165		0,2279
Gos-3	1000 U	3	GAPDH	0,1977	0,2119	0,5759	0,3514	0,3386
Gos-3	1000 U	3	Actin	0,1515	0,1707	0,4382	0,2913	0,3538
Gos-3	1000 U	4	GAPDH	0,1776	0,2630	0,4700	0,3039	0,1613
Gos-3	1000 U	4	Actin	0,2503	0,6305	0,8601	0,8203	0,3355
Gos-3	1000 U	5	GAPDH	0,1901	0,0596	0,8315	0,4749	0,2326
Gos-3	1000 U	5	Actin	0,2787	0,1222	2,2858	0,8808	0,6721
Gos-3	100 U	1	GAPDH	0,0780	0,4490	0,1468	0,1797	
Gos-3	100 U	1	Actin	0,1233	1,2960	0,3504	0,4007	
Gos-3	100 U	2	GAPDH	0,1312	0,1556	0,1187	0,2802	0,1319
Gos-3	100 U	2	Actin	0,3174	0,3625	0,5269	1,0442	0,2706
Gos-3	100 U	3	GAPDH	0,0549	0,1991	0,1540		0,1675
Gos-3	100 U	3	Actin	0,1038	0,6523	0,3898		0,3275
Gos-3	100 U	4	GAPDH	0,1041	0,5677	0,5562	0,2965	
Gos-3	100 U	4	Actin	0,1687	1,1901	1,1495	0,6378	
Gos-3	10 U	1	GAPDH	0,1902	1,1385	0,1663		0,2014
Gos-3	10 U	1	Actin	0,5054	2,7062	0,3894		0,4608
Gos-3	10 U	2	GAPDH	0,1157	0,7342	1,3444	0,6434	0,0857
Gos-3	10 U	2	Actin	0,3442	1,6497	2,3602	1,8398	0,1249
Gos-3	10 U	3	GAPDH	0,1581	0,5566	0,2103	0,1071	0,0576
Gos-3	10 U	3	Actin	0,7173	2,2590	0,9294	0,2533	0,2579

Abb. 1.14 ApoE-Expression von LN-405-Zellen: Meßwerte der Stimulations-  
experimente bei verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen

Zell-Linie	Betaferon	Exp.Nr.	hk gene	rel. 0 min	rel. 15 min	rel. 30 min	rel. 45 min	rel. 60 min
LN-405	1000 U	1	GAPDH	0,5114		1,8611		1,2157
LN-405	1000 U	1	Actin	0,3325		1,0502		0,8013
LN-405	1000 U	2	GAPDH	0,1716		2,1177	1,7332	1,1147
LN-405	1000 U	2	Actin	0,2293		1,2294		0,7419
LN-405	1000 U	3	GAPDH	0,5258	1,7402	0,8162		0,4309
LN-405	1000 U	3	Actin	0,6295	1,5693	1,0942	0,9274	
LN-405	100 U	1	GAPDH	0,5223	2,8618	1,4280	1,1988	0,8082
LN-405	100 U	1	Actin	0,7270	2,5281	2,2019	1,8155	0,9537
LN-405	100 U	2	GAPDH	0,5485	1,3016	1,2182	0,6781	0,3569
LN-405	100 U	2	Actin	0,8097	1,0883	1,6271	0,8588	0,2849
LN-405	100 U	3	GAPDH	0,5105	2,1469	1,3071	1,1911	0,6221
LN-405	100 U	3	Actin	0,5543	2,1886	1,8608	1,3889	0,5778
LN-405	10 U	1	GAPDH	1,5327		2,2874	1,8130	1,2591
LN-405	10 U	1	Actin	1,1447		4,5853	2,0437	2,2515
LN-405	10 U	2	GAPDH	0,6197	1,2424	0,8043	0,6009	0,8808
LN-405	10 U	2	Actin	0,7781	1,5992	0,9175	0,9030	1,1022
LN-405	10 U	3	GAPDH	0,5955	1,1060	1,3825	1,2065	0,7373
LN-405	10 U	3	Actin	0,8035	1,5372	1,8940	1,5783	0,9713

Aus den folgenden Tabellen sind die relativen Anstiege der ApoE-Expression nach Stimulation mit Betaferon® für die beiden astrozytären Zell-Linien ersichtlich. Aufgrund der unterschiedlichen Relativwerte wurde die Vervielfachung der ApoE-Expression zweckmäßig durch Errechnung des Prozentwerts beim Maximum der ApoE-Expression (stets bei 15 oder 30 Minuten lokalisiert, wie aus den Abb. 1.13 und 1.14 erkennbar), wenn der Kontrollwert (bei 0 Minuten) als 100 % gewertet wird, angegeben. Ungeachtet dessen, wurde das Maximum, so es bei einem dieser Zeitpunkte lag, zur Bildung des Mittelwerts aus den einzelnen Versuchsserien für jede Zell-Linie und jede Betaferon®-Konzentration herangezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen, bezogen jeweils auf eine Betaferon®-Konzentration und das Housekeeping-Gen, sind für die Gos-3-Zellen aus Abb. 1.15 und für die LN-405-Zellen aus Abb. 1.16 ersichtlich.

Obwohl Gos-3-Zellen weniger ApoE exprimierten, dürften diese auf Stimulation mit Betaferon® etwas stärker reagieren als LN-405-Zellen. Besonders auffällig war weiters, daß Gos-3-Zellen bei den geringeren Konzentrationen von 100 und 10 U Betaferon® (Steigerung der ApoE-Expression auf das ca. 5fache, je nachdem, welches Housekeeping-Gen als Bezugspunkt verwendet wurde) eine größere Steigerung in der ApoE-Expression aufwiesen, als bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (Steigerung der ApoE-Expression auf lediglich das ca. 3fache).

Abb. 1.15 Relative Steigerung der ApoE-Expression von Gos-3-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen

Zell-Linie	Betaferon	Exp.Nr.	hk-Gen	% 15 min	% 30 min	% 45 min	% 60 min
Gos-3	1 000 U	1	GAPDH	248,4	225,0	74,3	116,0
Gos-3	1 000 U	1	Actin	221,6	285,7	141,0	107,0
Gos-3	1 000 U	2	GAPDH		325,4		46,1
Gos-3	1 000 U	2	Actin		501,6		86,8
Gos-3	1 000 U	3	GAPDH	107,2	291,3	177,7	171,3
Gos-3	1 000 U	3	Actin	112,7	289,2	192,3	233,5
Gos-3	1 000 U	4	GAPDH	148,1	264,7	171,2	90,8
Gos-3	1 000 U	4	Actin	251,9	343,7	327,7	134,1
Gos-3	1 000 U	5	GAPDH	31,3	437,3	249,8	122,4
Gos-3	1 000 U	5	Actin	43,9	820,1	316,0	241,1
Gos-3	100 U	1	GAPDH	575,5	188,2	230,3	
Gos-3	100 U	1	Actin	1051,1	284,2	325,0	
Gos-3	100 U	2	GAPDH	118,6	213,5	90,5	100,5
Gos-3	100 U	2	Actin	114,2	329,0	166,0	85,3
Gos-3	100 U	3	GAPDH	362,5	280,5		305,0
Gos-3	100 U	3	Actin	628,5	375,5		315,5
Gos-3	100 U	4	GAPDH	545,1	534,1	284,7	
Gos-3	100 U	4	Actin	705,6	681,5	378,2	
Gos-3	10 U	1	GAPDH	598,5	87,4		105,9
Gos-3	10 U	1	Actin	535,4	77,0		91,2
Gos-3	10 U	2	GAPDH	634,8	1162,4	556,3	74,1
Gos-3	10 U	2	Actin	479,3	685,8	534,6	36,3
Gos-3	10 U	3	GAPDH	352,2	133,0	67,8	36,4
Gos-3	10 U	3	Actin	314,9	129,6	35,3	36,0
<b>1 000 U</b>				<b>MW(GAPDH) 313,4</b>		<b>MW (Actin) 448,1</b>	
				SD (GAPDH) ± 75,2		SD (Actin) ± 225,7	
<b>100 U</b>				<b>MW(GAPDH) 424,1</b>		<b>MW (Actin) 678,6</b>	
				SD (GAPDH) ± 169,0		SD (Actin) ± 296,8	
<b>10 U</b>				<b>MW(GAPDH) 704,3</b>		<b>MW (Actin) 512,0</b>	
				SD (GAPDH) ± 415,3		SD (Actin) ± 186,5	

% prozentuelle Steigerung der ApoE-Expression.  
 MW Mittelwert aus den maximalen ApoE-  
 Expressionswerten nach 15 oder 30 Minuten.  
 SD Standardabweichung.

Abb. 1.16 Relative Steigerung der ApoE-Expression von LN-405-Zellen bei Stimulation mit verschiedenen Betaferon®-Konzentrationen

Zell-Linie	Betaferon	Exp.Nr.	Hk-Gen	% 15 min	% 30 min	% 45 min	% 60 min
LN-405	1 000 U	1	GAPDH		363,9		237,7
LN-405	1 000 U	1	Actin		315,8		241,0
LN-405	1 000 U	2	GAPDH		1233,8	1009,8	649,5
LN-405	1 000 U	2	Actin		536,1		323,5
LN-405	1 000 U	3	GAPDH	331,0	155,2		82,0
LN-405	1 000 U	3	Actin	249,3	173,8	147,3	
LN-405	100 U	1	GAPDH	547,9	273,4	229,5	154,7
LN-405	100 U	1	Actin	347,7	302,9	249,7	131,2
LN-405	100 U	2	GAPDH	237,3	222,1	123,6	65,1
LN-405	100 U	2	Actin	134,4	201,0	106,1	35,2
LN-405	100 U	3	GAPDH	420,6	256,1	233,3	121,9
LN-405	100 U	3	Actin	394,8	335,7	250,6	104,2
LN-405	10 U	1	GAPDH		149,2	118,3	82,1
LN-405	10 U	1	Actin		400,6	178,5	196,7
LN-405	10 U	2	GAPDH	200,5	129,8	97,0	142,1
LN-405	10 U	2	Actin	205,5	117,9	116,1	141,7
LN-405	10 U	3	GAPDH	185,7	232,1	202,6	123,8
LN-405	10 U	3	Actin	191,3	235,7	196,4	120,9
<b>1 000 U</b>				<b>MW(GAPDH) 642,9</b>		<b>MW (Actin) 367,1</b>	
				SD (GAPDH) ± 512,0		SD (Actin) ± 150,1	
<b>100 U</b>				<b>MW(GAPDH) 401,9</b>		<b>MW (Actin) 314,5</b>	
				SD (GAPDH) ± 156,2		SD (Actin) ± 101,1	
<b>10 U</b>				<b>MW(GAPDH) 194,0</b>		<b>MW (Actin) 280,6</b>	
				SD (GAPDH) ± 41,8		SD (Actin) ± 105,0	

% prozentuelle Steigerung der ApoE-Expression.  
 MW Mittelwert aus den maximalen ApoE-Expressionswerten nach 15 oder 30 Minuten.  
 SD Standardabweichung.

LN-405-Zellen zeigten die stärkste Antwort auf eine Betaferon®-Stimulation bei einer Konzentration von 1 000 U/ml Medium (Steigerung der ApoE-Expression auf das ca. 4fache), allerdings wurde auch bei 100 U/ml Medium ein Anstieg der ApoE-Expression in derselben Größenordnung (auf das ca. 3fache) beobachtet. Bei Stimulation mit nur 10 U Betaferon®/ml Medium war die Steigerung der ApoE-Expression allerdings geringer (auf das ca. 2fache). Diese Dosisabhängigkeit der ApoE-Expression nach Stimulation mit Betaferon®

stand in auffallendem Gegensatz zu der umgekehrten Dosisabhängigkeit bei Gos-3-Zellen. Wahrscheinlich erklärt sich dieser Gegensatz aus der unterschiedlichen Differenziertheit der beiden aus Tumorzellen etablierten Zell-Linien.

### 1.3 Western Blot

Nach der Optimierung des Western Blots (Antikörper, Nachweismethode, Blocking etc.) wurden in beiden Zell-Linien bei zwei Betaferon®-Konzentrationen (1 000 U und 100 U/ml Medium) mehrere Probenreihen gemessen, um mögliche Veränderungen in der ApoE-Synthese und der ApoE-Sekretion zu bestimmen. Für einen vollständigen Vergleich mit den Ergebnissen der RT-PCR-Experimente fehlt allerdings die Konzentration von 10 U Betaferon®/ml Medium; diese Experimente konnten aus Zeitmangel nicht durchgeführt werden.

Eine mögliche Veränderung in der ApoE-Synthese durch die Stimulation mit Betaferon® wurde durch die Messung der relativen Mengen an ApoE in den resolvisierten Zell-Proteinen (im Vergleich zu einem Kontrollwert ohne Stimulation) ermittelt. Die ApoE-Sekretion wurde durch die Messung der relativen Menge an ApoE im Zellkultur-Überstand beurteilt.

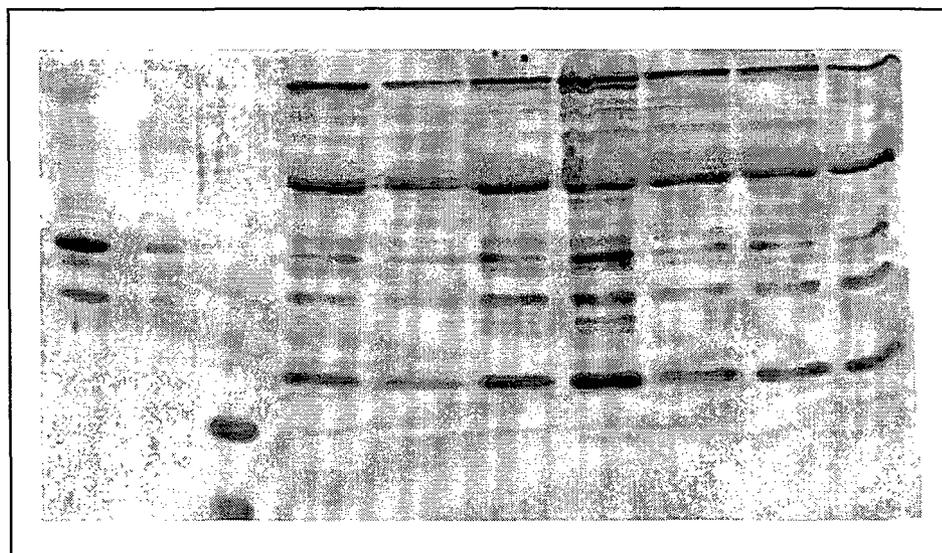
#### 1.3.1 Dauer der Stimulation mit Betaferon®

Bei den ersten orientierenden Experimenten wurden bei jeder Zell-Linie 12-stündige Stimulationen mit Betaferon® durchgeführt, wobei die Probenahmen jeweils stündlich erfolgten. Wie bereits früher erwähnt (siehe Methodik und Materialien, Abschnitt 5.4), sind nach dem Western Blot stets mehrere ApoE-Banden sichtbar; bei den Zellkultur-Überständen sind je nach Zell-Linie 3 bis maximal 4 Banden detektierbar, bei den solvatisierten Zell-Proteinen noch mehr als 4, aber meist schwächere Banden (siehe Abb. 1.17 und 1.18).

Bereits die Resultate der ersten Versuche ließen vermuten, daß die Veränderungen der ApoE-Synthese und -Sekretion bei Stimulation mit Betaferon®

nicht ganz so groß waren wie bei der Expression der ApoE-mRNA. Bei geringen relativen Steigerungen der Proteinmenge wie beispielsweise Verdoppelung auf 200 % geriet der Western Blot allerdings an die Grenze seiner Zuverlässigkeit hinsichtlich Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit. Eine zusätzliche Problematik lag in systembedingten Effekten, beispielsweise könnte gerade erst sezerniertes ApoE an der Zelloberfläche haftengeblieben und fälschlicherweise gemeinsam mit den Zellproteinen nachgewiesen worden sein). Obwohl nicht alle Experimente verwertbare Ergebnisse erbrachten, konnte dennoch ein gewisser Trend festgestellt werden (siehe Abschnitte 1.3.2 und 1.3.3).

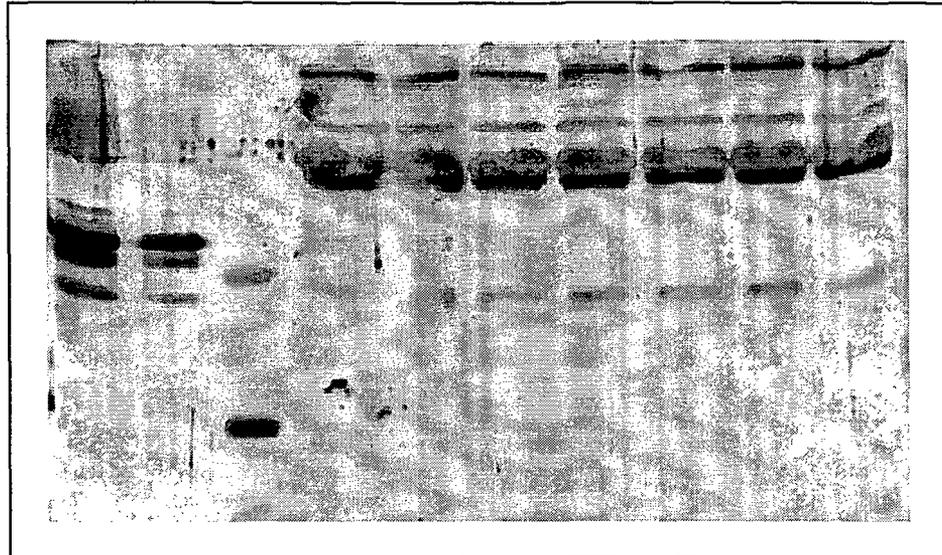
Abb. 1.17 ApoE-Western Blot der resolvtisierten Zell-Proteine von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über 12 Stunden (stündliche Probennahme)



Pro Lane wurden 20 µg Protein aufgetragen

Lane 1	ApoE-Standard, 3 ng
Lane 2	ApoE-Standard, 1,5 ng
Lane 3	Marker; von oben nach unten: 30 kDa, 20,1 kDa und 14,3 kDa
Lane 4 und 5	Unstimulierte Kontrollen
Lane 6	Zell-Proteine, Stimulation, 1 h
Lane 7	Zell-Proteine, Stimulation, 2 h
Lane 8	Zell-Proteine, Stimulation, 3 h
Lane 9	Zell-Proteine, Stimulation, 4 h
Lane 10	Zell-Proteine, Stimulation, 5 h

Abb. 1.18 ApoE-Western Blot der Zellkultur-Überstände von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über 12 Stunden (stündliche Probennahme)



Pro Lane wurden 20 µg Protein aufgetragen

Lane 1	ApoE-Standard, 3 ng
Lane 2	ApoE-Standard, 1,5 ng
Lane 3	Marker; von oben nach unten: 30 kDa, 20,1 kDa und 14,3 kDa
Lane 4 und 5	Unstimulierte Kontrollen
Lane 6	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 1 h
Lane 7	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 2 h
Lane 8	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 3 h
Lane 9	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 4 h
Lane 10	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 5 h

Die Abbildungen 1.19 und 1.20 zeigen die Veränderungen der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über einen Zeitraum von 12 Stunden. Der Vollständigkeit halber wurden alle registrierten Banden in die Darstellung aufgenommen. Die größte Aussagekraft dürften die Banden mittleren Molekulargewichts und die aufsummierten Datensätze besitzen.

Abb. 1.19 Relative Änderung der ApoE-Synthese von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon® (resolvatisierte Zell-Proteine)

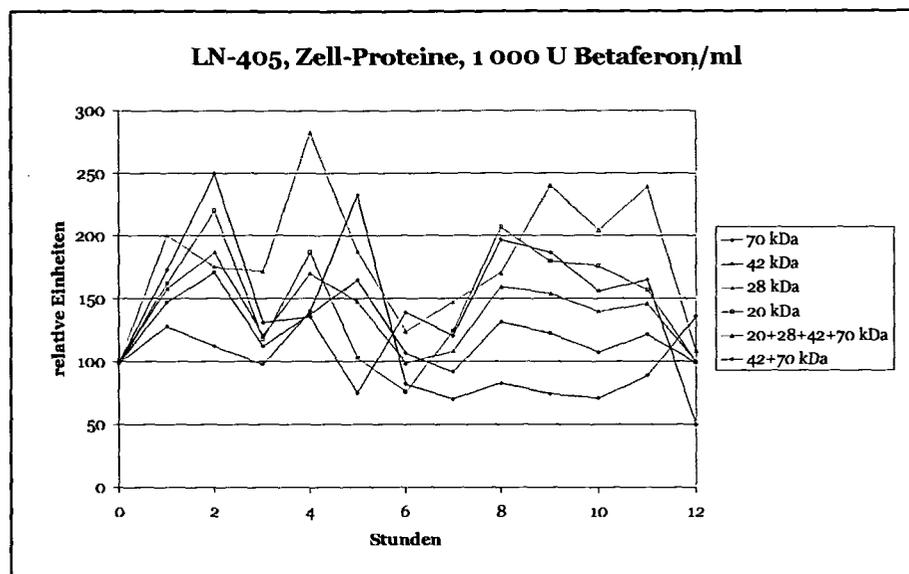
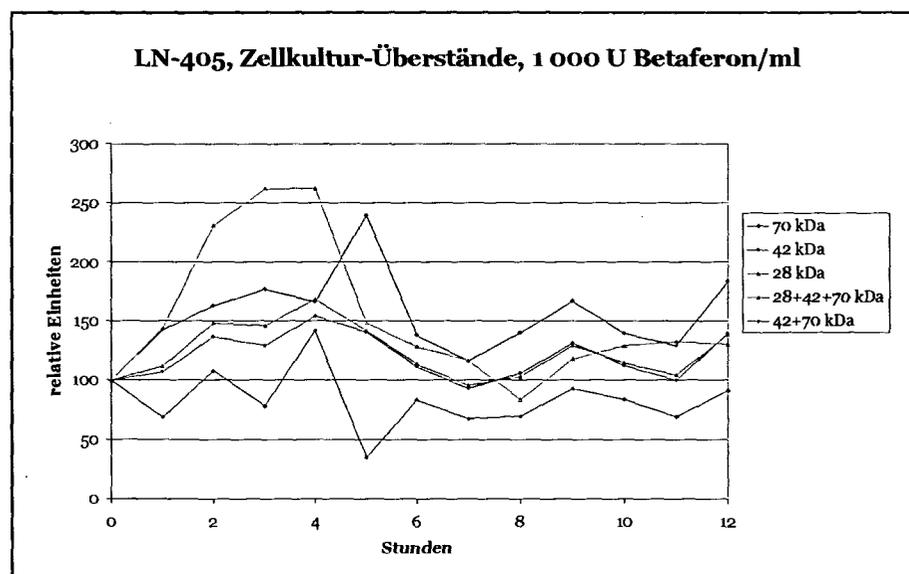


Abb. 1.20 relative Änderung der ApoE-Sekretion durch LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon® (Zellkultur-Überstände)



Bei Verkürzung der Inkubations- bzw. Stimulationszeit und der Intervalle zwischen den einzelnen Probennahmen konnten die Veränderungen der Synthese und Sekretion des ApoE genauer untersucht werden. Da sich die Maxima der ApoE-Mengen stets zwischen 2 und 3 Stunden zeigten, wurden schließlich nur noch 4-Stunden-Versuche durchgeführt.

### 1.3.2 Stimulation von LN-405-Zellen mit Betaferon®

#### *Stimulation mit 1 000 U Betaferon® pro ml Medium*

Die Stimulierung von LN-405-Zellen mit einer Betaferon®-Konzentration von 1 000 U/ml Medium wurde in insgesamt vier Versuchsreihen untersucht, wobei zwei Experimente eine Abschätzung hinsichtlich des Zeitpunkts und Ausmaßes der Steigerung der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion zuließen. Die Auswertung des einen der beiden Experimente wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt 1.3.1 dokumentiert; die Ergebnisse des anderen Versuchs sind aus den Abbildungen 1.21 und 1.22 ersichtlich. Beide Experimente zeigten eine Steigerung der ApoE-Synthese und der ApoE-Sekretion auf rund 200 bis 300 %, wenn die Summe der wichtigsten Banden als Bezugsgröße verwendet wurde (bei den einzelnen Molekulargewichten konnten auch abweichende Werte hinsichtlich des Zeitpunkts und des Ausmaßes der Steigerung beobachtet werden). Allerdings kann keine exakte Aussage über den Zeitpunkt der Steigerung gemacht werden, wiewohl die Maxima stets zwischen 1 und 3 Stunden nach dem Beginn der Stimulation lagen. Besonders schwierig sind die Resultate hinsichtlich der ApoE-Synthese zu interpretieren, da die Resolvtisierung der aufgereinigten Zell-Proteine manchmal problematisch war und daher stark schwankende Werte erhoben wurden.

Zwei weitere Versuchsreihen erbrachten hingegen keinerlei verwertbare Ergebnisse. Dies dürfte die Vermutung nahelegen, daß die beobachteten relativen Unterschiede der ApoE-Menge im Bereich der Nachweisgrenze des Western Blots lagen und somit dessen Sensitivität für die Messungen gerade ausreichte.

Abb. 1.21 Relative Änderung der ApoE-Synthese von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (resolvatisierte Zell-Proteine)

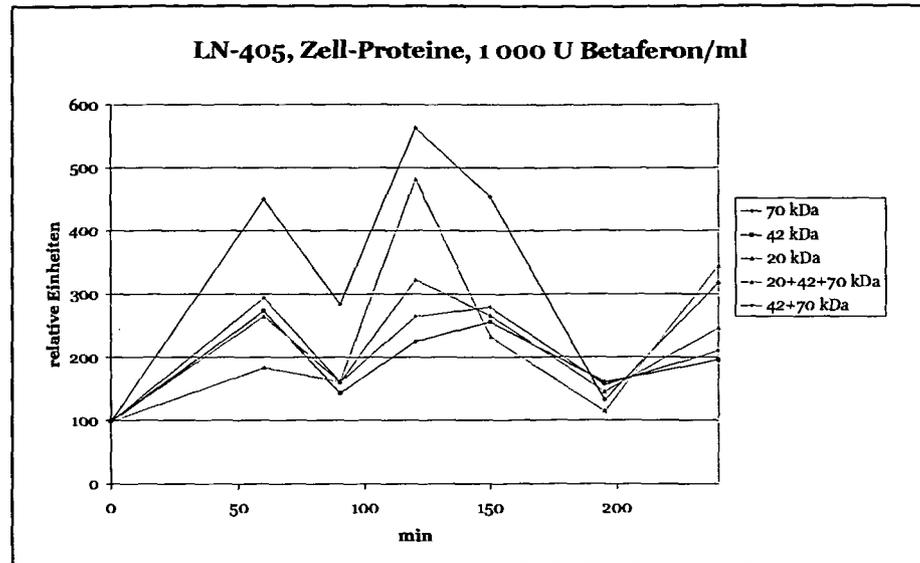
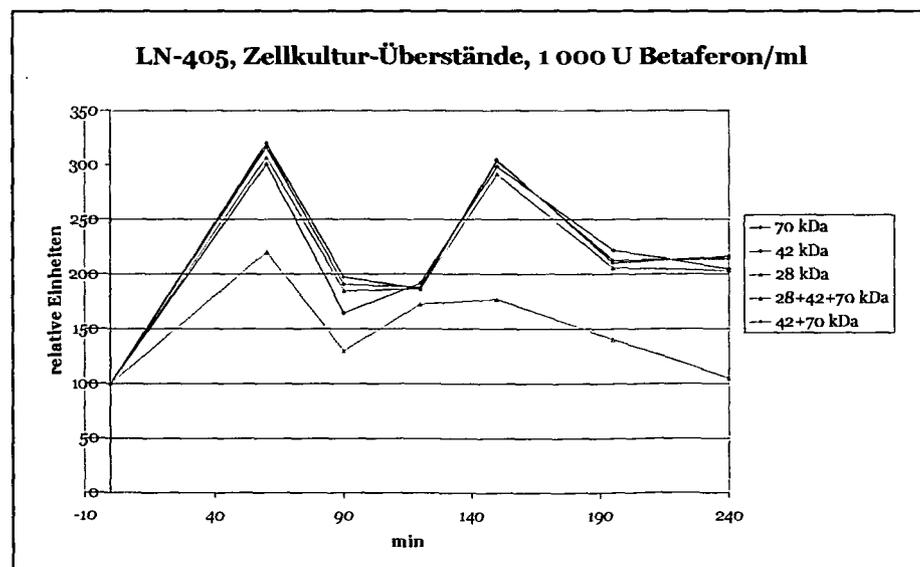


Abb.1.22 Relative Änderung der ApoE-Sekretion von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (Zellkultur-Überstände)



*Stimulation mit 100 U Betaferon® pro ml Medium*

Die Stimulation von LN-405-Zellen mit einer Betaferon®-Konzentration von 100 U/ml Medium wurde in insgesamt zwei Versuchsreihen untersucht, wobei nur ein Experiment eine Abschätzung hinsichtlich des Zeitpunkts und Ausmaßes der Steigerung der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion zuließ (siehe Abb. 1.23 und 1.24). Das andere Experiment erbrachte keine verwertbaren Resultate.

Die Änderungen der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion waren bei Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml deutlich geringer ausgeprägt als bei der Stimulation mit 1 000 U. Die ApoE-Synthese blieb bei Stimulation mit 100 U Betaferon® im wesentlichen unverändert, bis auf die geringe Steigerung auf rund 130 % 45 min nach Beginn der Stimulation. Die ApoE-Sekretion stieg auf einen ähnlichen Wert von rund 140 % 2 bis 3 Stunden nach Beginn der Stimulation.

Zusammenfassend soll erwähnt werden, daß der ApoE-Western Blot den bereits auf RNA-Ebene gefundenen Trend bestätigte, daß bei LN-405-Zellen eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht. Somit fanden sich bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium eine deutlich ausgeprägtere Wirkung auf die ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion als bei einer Stimulation mit 100 U/ml Medium.

Abb. 1.23 Relative Änderung der ApoE-Synthese von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium (resolvatisierte Zell-Proteine)

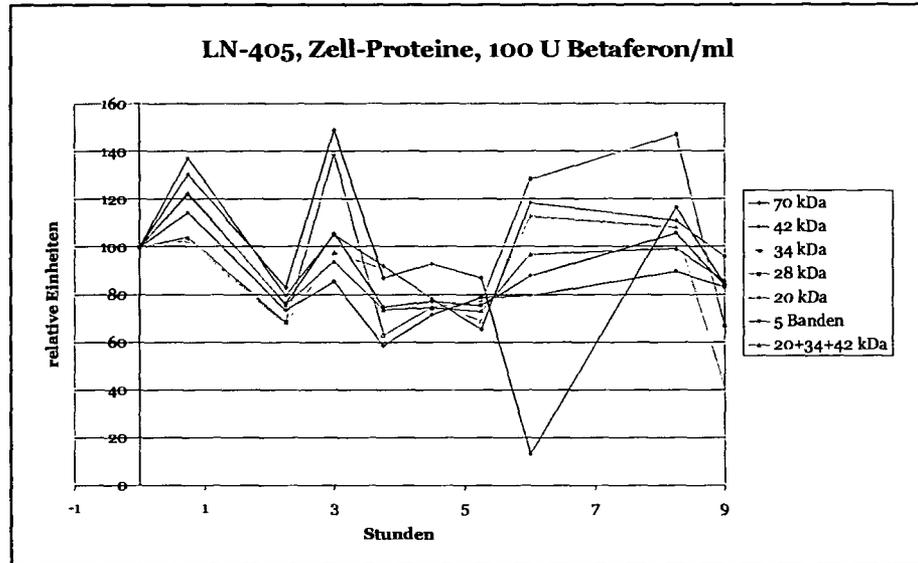
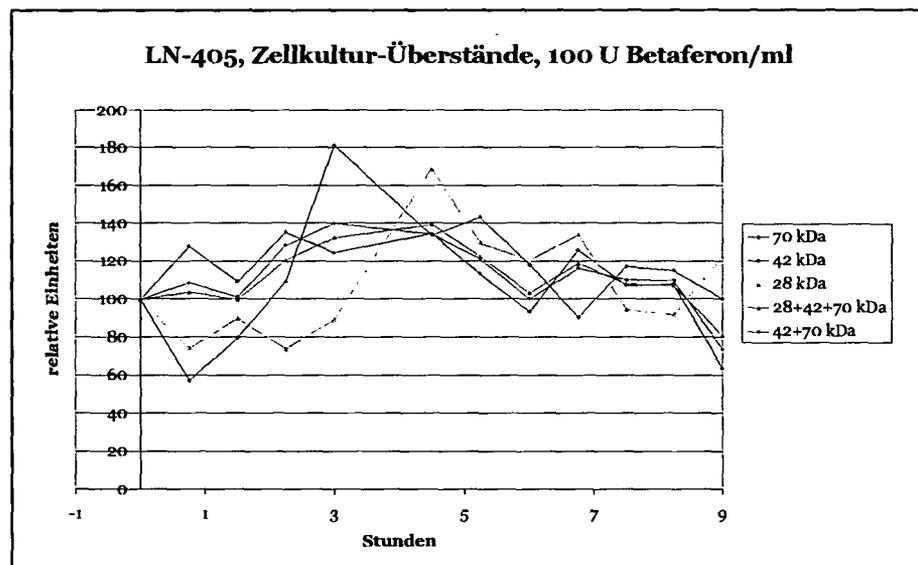


Abb. 1.24 Relative Änderung der ApoE-Sekretion von LN-405-Zellen bei Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium (Zellkultur-Überstände)

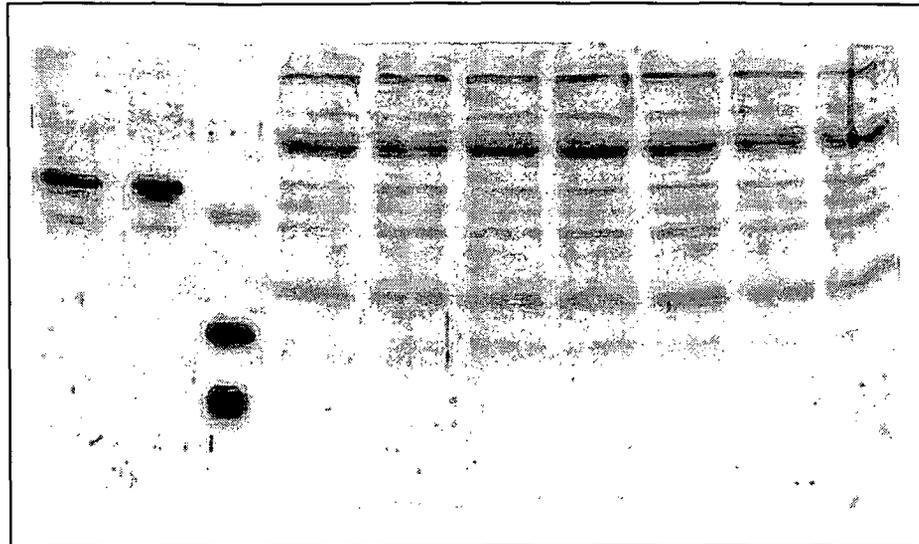


### 1.3.3 Stimulation von GOS-3 Zellen mit Betaferon®

#### *Stimulation mit 1 000 U Betaferon® pro ml Medium*

Die Stimulierung von Gos-3-Zellen mit einer Betaferon®-Konzentration von 1 000 U/ml Medium wurde in insgesamt 5 Versuchsreihen untersucht, wobei lediglich drei Experimente eine Abschätzung hinsichtlich des Zeitpunkts und des Ausmaßes der Steigerung der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion zuließen. Das im Vergleich zur Zell-Linie LN-405 etwas veränderte Bandenmuster für Zellkultur-Überstände und Zell-Proteine ist auf den Abbildungen 1.25 und 1.26 erkennbar. Aufgrund der nicht völlig übereinstimmenden Resultate werden die Ergebnisse hier nicht tabellarisch, sondern in Form von Diagrammen präsentiert (siehe Abb. 1.27 bis 1.32). Vor allem gestaltete sich die Beurteilung der ApoE-Synthese anhand der resolvatisierten Zellproteine bei diesen drei Versuchsreihen schwierig.

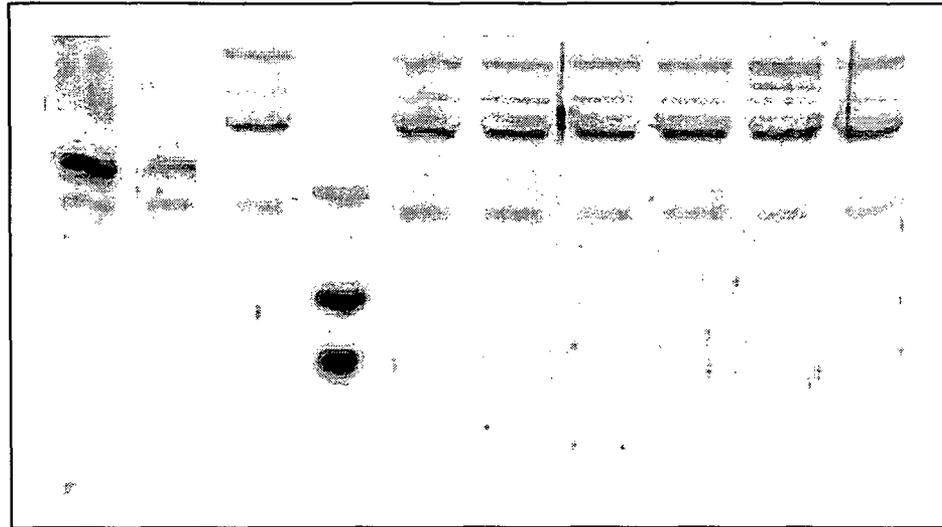
Abb. 1.25 ApoE-Western Blot der resolvatisierten Zell-Proteine von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über 4 Stunden (Probennahme ca. alle 45 Minuten)



Pro Lane wurden 5 µg Protein aufgetragen

Lane 1	ApoE-Standard, 0,750 ng
Lane 2	ApoE-Standard, 0,375 ng
Lane 3	Marker; von oben nach unten: 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa und 14,3 kDa
Lane 4	Unstimulierte Kontrolle
Lane 5	Zell-Proteine, Stimulation, 60 min
Lane 6	Zell-Proteine, Stimulation, 90 min
Lane 7	Zell-Proteine, Stimulation, 120 min
Lane 8	Zell-Proteine, Stimulation, 150 min
Lane 9	Zell-Proteine, Stimulation, 195 min
Lane 10	Zell-Proteine, Stimulation, 240 min

Abb. 1.26 ApoE-Western Blot der Zellkultur-Überstände von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium über 4 Stunden (Probennahme ca. alle 45 Minuten)



Pro Lane wurden 5 µg Protein aufgetragen

Lane 1	ApoE-Standard, 0,750 ng
Lane 2	ApoE-Standard, 0,375 ng
Lane 3	Marker; von oben nach unten: 45 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa und 14,3 kDa
Lane 4	Unstimulierte Kontrolle
Lane 5	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 60 min
Lane 6	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 90 min
Lane 7	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 120 min
Lane 8	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 150 min
Lane 9	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 195 min
Lane 10	Zellkultur-Überstände, Stimulation, 240 min

Abb. 1.27 Relative Änderung der ApoE-Synthese von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (resolvatisierte Zell-Proteine); Versuch 1

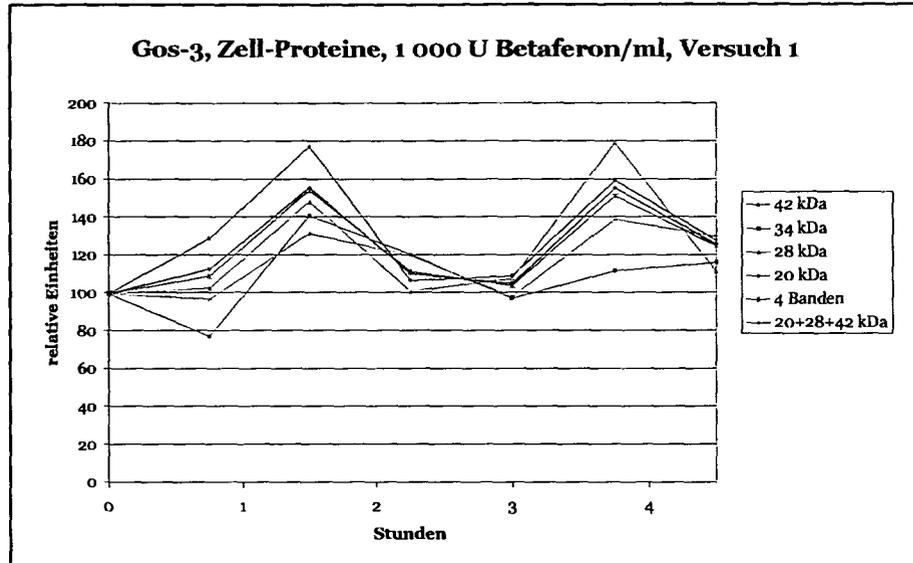


Abb. 1.28 Relative Änderung der ApoE-Sekretion von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (Zellkultur-Überstände); Versuch 1

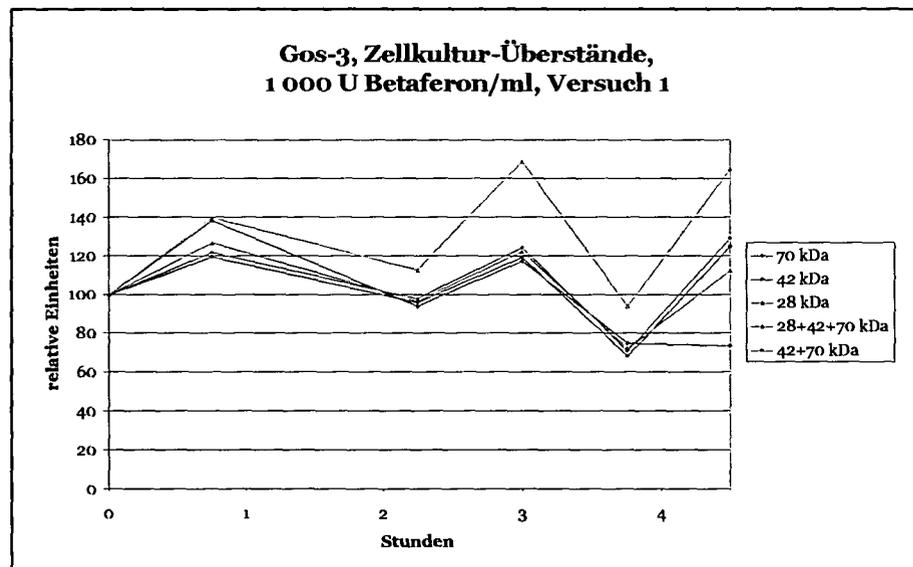


Abb. 1.29 Relative Änderung der ApoE-Synthese von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (resolvatisierte Zell-Proteine); Versuch 2

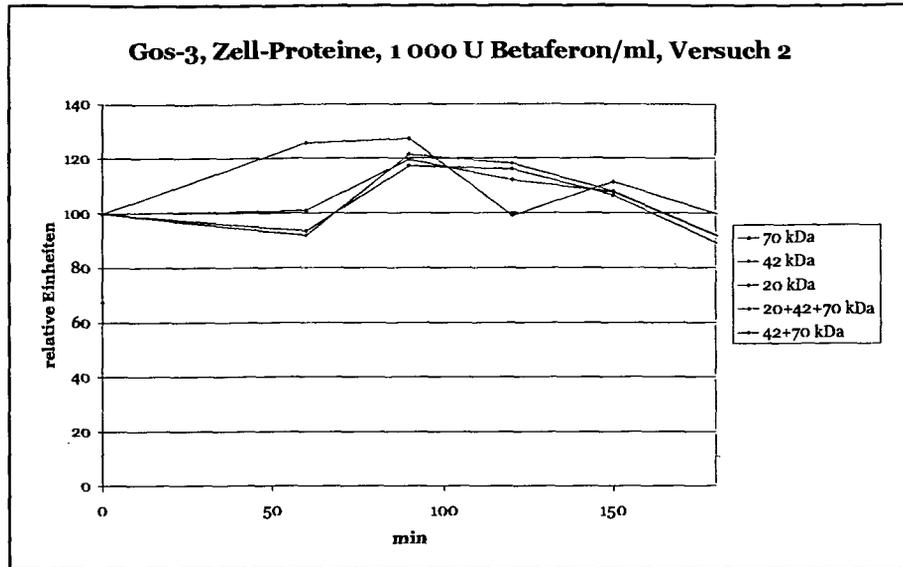


Abb. 1.30 Relative Änderung der ApoE-Sekretion von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (Zellkultur-Überstände); Versuch 2

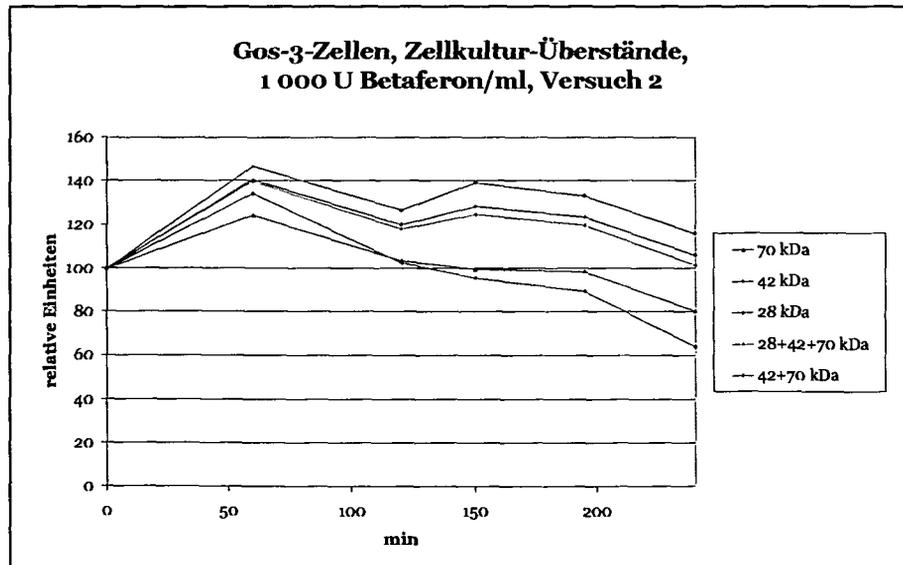


Abb. 1.31 Relative Änderung der ApoE-Synthese von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (resolvatisierte Zell-Proteine); Versuch 3

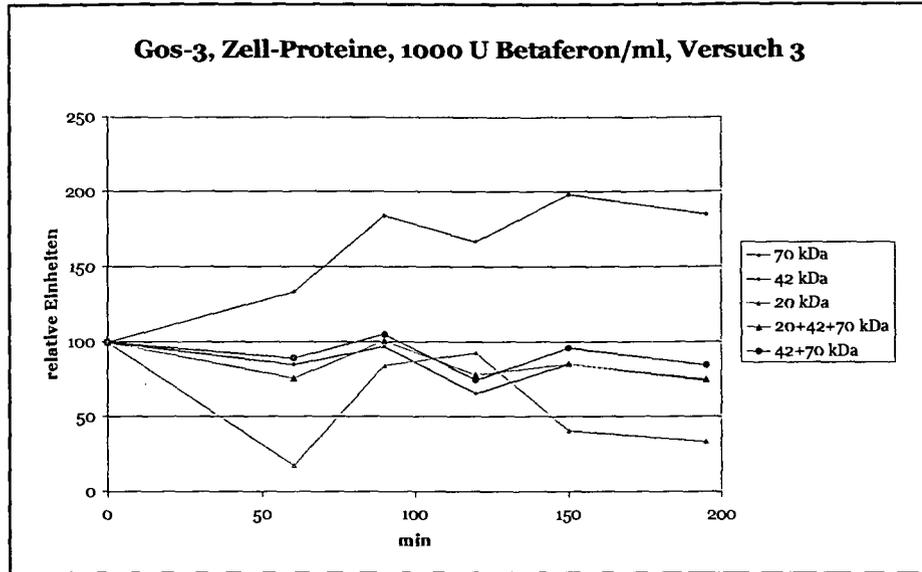
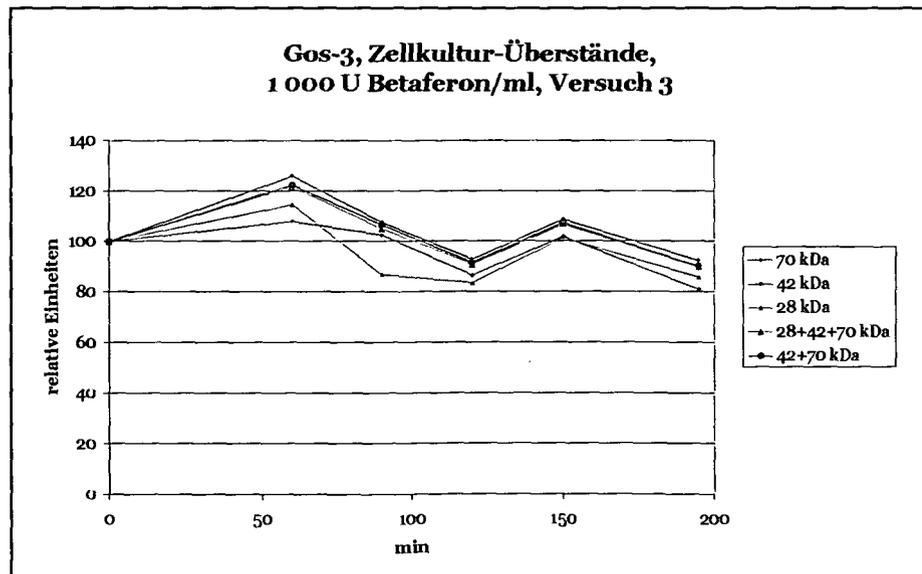


Abb. 1.32 Relative Änderung der ApoE-Sekretion von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium (Zellkultur-Überstände); Versuch 3



Die ApoE-Synthese der Gos-3-Zellen stieg bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium nur schwach auf 120 bis 150 % des Ausgangswerts (siehe Abb. 1.27 und 1.29). Dieser Anstieg erfolgte in den ersten ein bis zwei Stunden nach Beginn der Stimulation. Die ApoE-Sekretion der Gos-3-Zellen wurde durch Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium geringfügig verstärkt und erreichte nach rund einer Stunde 120 bis 140 % des Ausgangswerts.

#### *Stimulation mit 100 U Betaferon® pro ml Medium*

Die Stimulation von Gos-3-Zellen mit einer Betaferon®-Konzentration von 100 U/ml Medium wurde in insgesamt vier Versuchsreihen untersucht, wobei im allgemeinen ein deutlicherer Anstieg der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion zu beobachten war als bei einer Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium. Die Resultate der einzelnen Versuchsreihen sind aus der Tabelle in Abb. 1.33 ersichtlich, die dazugehörenden Mittelwerte und Standardabweichungen finden sich in Abb. 1.34.

Die ApoE-Synthese der Gos-3-Zellen stieg bei einer Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium ein bis zwei Stunden nach Beginn der Stimulation auf durchschnittlich 200 % des Ausgangswerts (siehe Abb. 1.35 und 1.37). Die ApoE-Sekretion der Gos-3-Zellen wurde durch die Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium nach rund einer Stunde auf durchschnittlich 160 % des Ausgangswerts angehoben.

Typische Stimulationskurven für die ApoE-Synthese und die ApoE-Sekretion finden sich in den Abbildungen 1.35 bis 1.38.

Abb. 1.33 Relative Steigerung der ApoE-Synthese und der ApoE-Sekretion bei Stimulation von Gos-3-Zellen mit 100 U Betaferon®/ml Medium

Exp.Nr.	min	Probe	70 kDa	42 kDa	28 kDa	20 kDa	3 Banden	(42 + 70) kDa
1	60	ZP	101,31	105,58		116,77	106,49	104,32
1	90	ZP	119,98	104,92		163,99	118,86	109,35
1	120	<b>ZP</b>	124,82	119,10		162,65	<b>128,07</b>	<b>120,79</b>
1	150	ZP	90,36	101,60		122,62	102,53	98,29
1	195	ZP	107,21	111,89		165,68	120,11	110,51
1	240	ZP	103,68	129,60		143,06	125,64	121,97
1	60	S	83,55	125,39	363,61		<b>137,64</b>	<b>118,42</b>
1	90	S	91,49	116,80	164,72		116,67	112,59
1	120	S	81,28	97,36	166,11		100,28	94,69
1	150	S	87,38	114,40	189,17		116,11	109,90
1	195	S	94,47	118,02	191,94		120,20	114,10
1	240	S	43,97	133,44	218,33		126,36	118,54
2	60	ZP	98,69	290,29		105,18	164,52	202,14
2	90	<b>ZP</b>	148,72	289,62		160,55	<b>199,87</b>	<b>224,80</b>
2	120	ZP	177,41	250,06		153,94	192,31	216,63
2	150	ZP	123,90	276,12		113,69	170,24	206,09
2	195	ZP	146,95	242,63		108,27	163,56	198,61
2	240	ZP	103,54	193,97		129,37	143,44	152,37
2	60	S	126,03	134,50	149,26		<b>134,02</b>	<b>132,63</b>
2	90	S	81,74	106,19	120,59		102,44	100,78
2	120	S	128,76	124,12	169,85		128,88	125,15
2	150	S	95,46	126,36	138,24		121,08	119,52
2	195	S	95,16	127,85	182,60		125,79	120,61
2	240	S	65,09	107,97	76,23		96,62	98,48
3	60	ZP						
3	90	<b>ZP</b>	273,99	185,44		203,92	<b>200,34</b>	<b>199,44</b>
3	120	ZP	262,84	162,79		230,79	189,12	178,61
3	150	ZP	281,76	148,86		283,17	192,71	169,87
3	195	ZP	231,93	135,18		283,17	177,22	150,48
3	240	ZP	81,25	79,38		75,56	78,84	79,67
3	60	S	46,96	172,02	260,54		<b>178,01</b>	<b>173,63</b>
3	90	S	43,59	63,30	106,80		69,26	67,27
3	120	S	129,67	113,90	206,12		112,42	107,44
3	150	S	34,89	201,86	587,76		<b>227,00</b>	<b>207,84</b>
3	195	S	19,46	81,81	178,23		83,40	78,36
3	240	S		40,37	52,38		40,07	39,41
4	60	<b>ZP</b>	538,89	360,77		267,09	<b>347,36</b>	<b>386,77</b>
4	90	ZP	270,09	143,61		122,74	149,12	162,07
4	120	ZP						
4	150	ZP	185,04	182,62		143,84	170,08	182,97
4	195	<b>ZP</b>	712,82	451,72		399,75	<b>460,17</b>	<b>489,83</b>
4	240	ZP	112,39	97,22		68,23	89,16	99,44
4	60	S	59,68	100,86	100,31		92,96	92,40
4	90	S	127,19	209,95	326,42		<b>202,29</b>	<b>192,95</b>
4	120	S	83,87	140,27	131,13		128,86	128,69
4	150	S	140,21		142,14		36,74	28,80
4	195	S	165,67	168,99	153,46		167,27	168,31
4	240	S	70,74	98,66	119,81		94,81	92,92

ZP  
S

Zell-Proteine  
Supernatants/Zellkultur-Überstände

Anmerkung: fettgedruckt sind jene Werte, die Zur Ermittlung des Mittelwerts herangezogen wurden

Abb. .1.34 Durchschnittliche Steigerung der ApoE-Synthese und der ApoE-Sekretion bei Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium

	3 Banden	(42 + 70) kDa
<b>MW (ZP):</b>	<b>218,91</b>	<b>232,95</b>
<b>SD (ZP):</b>	<b>± 92,12</b>	<b>± 111,70</b>
(60 bis 120 min)		
<b>MW (S):</b>	<b>162,99</b>	<b>154,41</b>
<b>SD (S):</b>	<b>± 32,93</b>	<b>± 34,76</b>
(60 bis 90 min)		

ZP  
S

Zell-Proteine  
Supernatants/Zellkultur-Überstände

Abb. 1.35 Relative Änderung der ApoE-Synthese von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium (resolvatisierte Zell-Proteine); Versuch 1

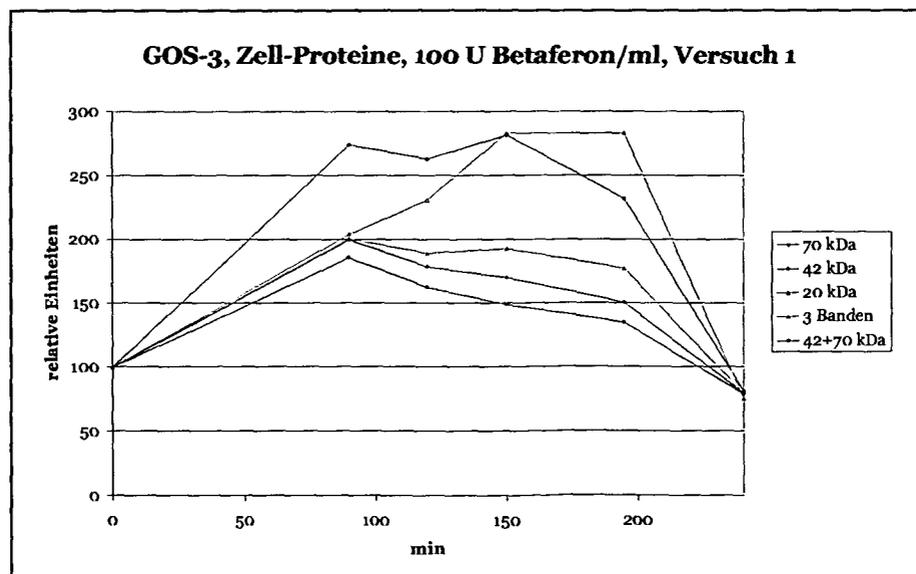


Abb. 1.36 Relative Änderung der ApoE-Sekretion von Gos-3-Zellen bei Stimu-  
lation mit 100 U Betaferon®/ml Medium (Zellkultur-Überstände);  
Versuch 1

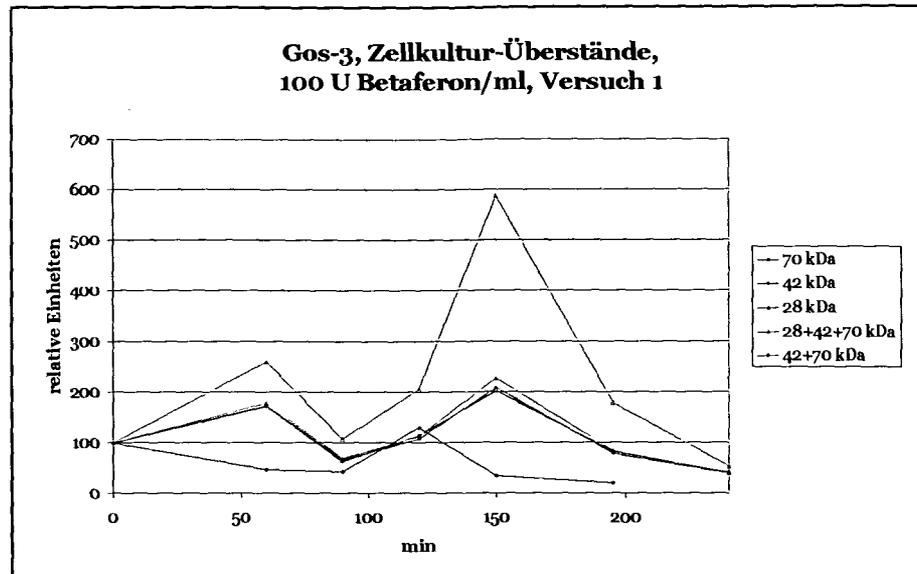


Abb. 1.37 Relative Änderung der ApoE-Synthese von Gos-3-Zellen bei Stimu-  
lation mit 100 U Betaferon®/ml Medium (resolvatisierte Zell-Pro-  
teine); Versuch 2

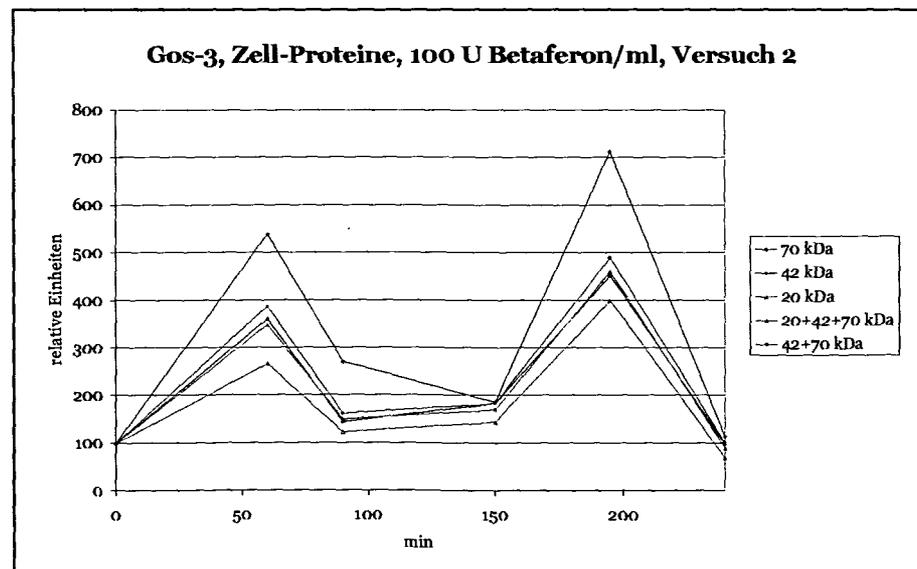
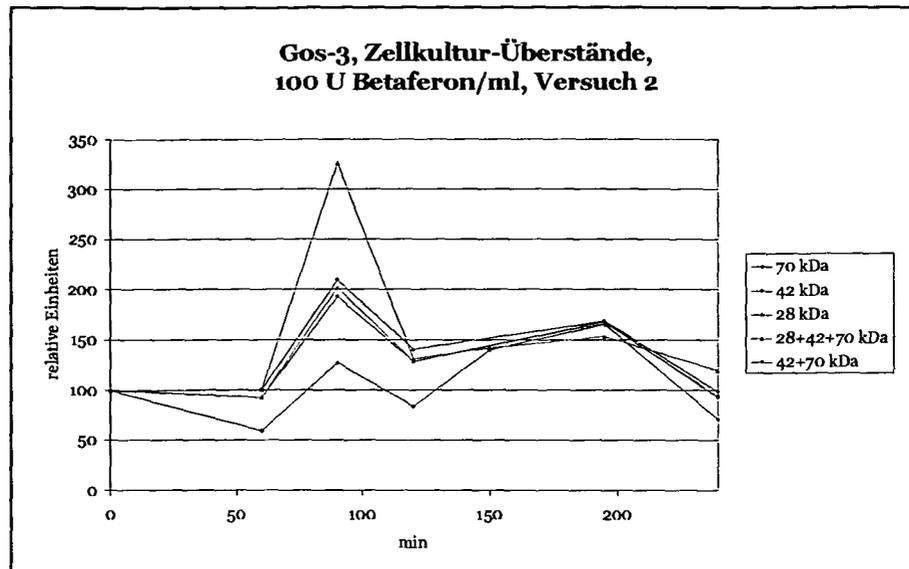


Abb. 1.38 Relative Änderung der ApoE-Sekretion von Gos-3-Zellen bei Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium (Zellkultur-Überstände); Versuch 2



Bei den Gos-3 Zellen wurde ähnlich wie bei den LN-405-Zellen der bei den RT-PCR-Experimenten gefundenen Trend durch den Western Blot auf der Proteinebene bestätigt. Bei kleineren Betaferon®-Konzentrationen (hier bei 100 U/ml Medium) war eine ausgeprägtere Wirkung auf die ApoE-Synthese und die ApoE-Sekretion zu beobachten als bei 1 000 U Betaferon®/ml Medium (negative Dosis-Wirkungs-Beziehung).

## 2. Liquor-Serum-Datenbank

### 2.1 Übersicht

Jenen Patienten, die sich in der Ambulanz der Universitätsklinik für Neurologie einer Lumbalpunktion unterziehen mußten und die sich mit einer Teilnahme an dieser Studie einverstanden erklärt hatten wurden zusätzlich kleine

Mengen an Vollblut und Liquor abgenommen, um diese in der Liquor-Serum-Datenbank des Forschungslabors der Universitätsklinik für Neurologie sammeln und archivieren zu können. Die betreffenden Personen und deren Liquor- und Vollblut-Proben wurden wie folgt klassifiziert:

- Neurologisch gesunde Individuen (Kontroll-Gruppe, n = 58),
- Multiple Sklerose-Patienten (n = 52),
- Neurologische Patienten exklusive MS-Patienten (n = 50).

Von allen Personen/Patienten wurde die ApoE-Konzentration im Liquor mittels ELISA bestimmt. Dieser Wert sowie relevante anamnestische bzw. klinische Daten und andere routinemäßig erhobene Labor-Parameter wurden in einer Liquor-Serum-Datenbank erfaßt und archiviert. Die gesammelten Datensätze (siehe Methodik und Materialien, Abschnitt 1.4) können zur Beantwortung der unterschiedlichen Fragen herangezogen werden.

Eine am Forschungslabor zuvor durchgeführte kleine Studie zeigte, daß die ApoE-Konzentration im Liquor bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant verringert ist <sup>177</sup> (siehe Abschnitt 2.2). Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Dissertation anhand der erheblich größeren Datenmengen in der Liquor-Serum-Datenbank überprüft. Antworten auf folgende Fragen wurden gesucht:

- Ist die ApoE-Konzentration im Liquor bei Männern und Frauen unterschiedlich?
- Ist die ApoE-Konzentration im Liquor bei jüngeren ( $\leq 40$  Jahre) und älteren ( $> 40$  Jahre) Personen unterschiedlich?
- Ist die ApoE-Konzentration im Liquor bei älteren Patienten unterschiedlich, wenn die Werte neurologisch gesunder Individuen mit denen von neurologischen Patienten verglichen werden?

## **2.2 ApoE-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten und gesunden Personen**

### **2.2.1 Ziel der Studie**

Es gibt Hinweise, daß der ApoE-Metabolismus bei MS-Patienten anders abläuft als bei gesunden Personen. Demyelinisierungsprozesse und/oder die fortgesetzte Remyelinisierung oder auch autoimmune Entzündungsmechanismen könnten dafür verantwortlich sein <sup>45,180</sup>. Das ApoE-Allel  $\epsilon 4$  erhöht bei MS-Patienten die Wahrscheinlichkeit für einen schlechteren klinischen Krankheitsverlauf im Vergleich zu MS-Patienten mit anderen Allelen <sup>31</sup>. Da der ApoE-Genotyp den Krankheitsverlauf der MS zu beeinflussen scheint und der ApoE-Metabolismus Entzündungsprozesse, Autoimmunreaktionen und die Remyelinisierung verändern kann, haben wir versucht, folgende Fragen zu klären:

- Unterscheiden sich die ApoE-Konzentrationen in Liquor und Serum von MS-Patienten von denen gesunder Personen?
- Beeinflußt der ApoE-Genotyp die Konzentrationen von ApoE in Liquor und Serum von MS-Patienten und/oder gesunden Personen?
- Unterscheiden sich die ApoE-Konzentrationen in Liquor und Serum von MS-Patienten mit akuten neurologischen Exazerbationen von denen die in Phasen der Remission auftreten?

### **2.2.2 Patientenkollektive und methodische Vorgangsweise**

Achtundzwanzig gesunde Personen (17 Frauen, Alter Median 28 Jahre; 11 Männer, Alter Median 33 Jahre) und 24 Patienten mit klinisch gesicherter schubförmiger MS (15 Frauen, Alter Median 33 Jahre; 9 Männer, Alter Median 37 Jahre; Expanded Disability Status [EDSS] Score Median 2,5, Bereich 1 – 5; 14 Patienten mit akuten neurologischen Exazerbationen, 10 Patienten in der Remissionsphase) wurden untersucht. Alle Personen wurden umfassend neurologisch untersucht, zusätzlich wurden der EDSS-Score ermittelt und eine Lumbalpunktion durchgeführt (die Kontrollwerte für die ApoE-Konzentration

im Liquor wurden von Kopfschmerzpatienten erhoben, die alle einen EDSS-Score von 0 aufwiesen und bei denen eine Subarachnoidalblutung bzw. eine Meningitis durch eine unauffällige Zytologie und/oder Zellzahl-Bestimmung und die Abwesenheit von Erythrophagen im Liquorbefund ausgeschlossen werden konnten). Die Routine-Parameter im Liquor (Zell-Zahl, Zytologie, Gesamt-Protein, Albumin, Albumin-Index, Immunglobuline, Immunglobulin-Index) wurden ermittelt und die ApoE-Konzentrationen in Liquor und Serum wurden mit dem ApoE-ELISA (linearer Bereich von 1 bis 800 ng/ml,  $R=0,97$ ) gemessen. Zusätzlich wurde noch bei allen Patienten/Personen der ApoE-Genotyp anhand einer Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Methode festgestellt.

Zur statistischen Analyse wurden Mann-Whitney Rang-Summen-Tests verwendet (ApoE-Konzentrationen in Serum und Liquor waren nicht normalverteilt). Da die Verwendung eines ApoE-Index gemäß neueren Erkenntnissen nicht erforderlich ist <sup>45</sup>, wurde kein ApoE-Index errechnet, sondern die ApoE-Rohdaten für die statistischen Berechnungen verwendet.

### 2.2.3 Ergebnisse

Die ApoE-Genotyp-Verteilung bei den MS-Patienten (18 von 24 Patienten  $\epsilon 3/3$ ) und bei den gesunden Kontrollpersonen (23 von 28 Personen  $\epsilon 3/3$ ) war vergleichbar mit einer bei größeren österreichischen Kollektiven ermittelten Genotypverteilung <sup>43</sup>. Die wichtigsten anderen Ergebnisse sind aus der Abb. 2.1 ersichtlich.

MS-Patienten haben ungeachtet ihres ApoE-Genotyps eine signifikant niedrigere ApoE-Konzentration im Liquor als gesunde Kontrollpersonen von ähnlichem Alter. Bei der ApoE-Konzentration im Plasma konnte ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden. Ebenso wurden keine Unterschiede in der ApoE-Konzentration in Liquor und/oder Serum zwischen MS-Patienten mit akuten neurologischen Exazerbationen und MS-Patienten in der Remissionsphase beobachtet.

Abb. 2.1 ApoE-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten und gesunden Kontroll-Personen

	MS Patienten n = 24		Kontroll-Personen n = 28		Mann-Whitney Z P			
	ApoE Liquor [mg/dl]	0.31 ± 0.10		0.40 ± 0.14		-2,113	0.035	
ApoE Serum [mg/dl]	4.51 ± 1.30		4.45 ± 1.66		-0.753	0.452		
	MS Patienten ε 3/3 n = 18	MS Patienten ε non3/3 n = 6	Mann-Whitney Z P		Kontroll-Personen ε 3/3 n = 23	Kontroll-Personen ε non3/3 n = 5	Mann-Whitney Z P	
	ApoE Liquor [mg/dl]	0.30 ± 0.11	0.36 ± 0.07	-1.369	0.177	0.37 ± 0.10	0.51 ± 0.25	-1.201
ApoE Serum [mg/dl]	4.41 ± 1.09	4.84 ± 1.88	-0.200	0.871	4.42 ± 1.68	4.62 ± 1.75	-0.030	1.000
	MS Patienten Akute neurol. Exazerbat. n = 14		MS Patienten Remissionsphase n = 10		Mann-Whitney Z P			
	ApoE Liquor [mg/dl]	0.30 ± 0.09		0.33 ± 0.12		-0.557	0.585	
ApoE Serum [mg/dl]	4.36 ± 1.16		4.73 ± 1.50		-0.878	0.403		

### 2.3 Untersuchung der ApoE-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis bei drei Gruppen: Multiple Sklerose-Patienten, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und neurologisch gesunden Personen

#### 2.3.1 Ziele der Studie

Die zu testenden Hypothesen wurden bereits in Abschnitt 2.1 kurz angesprochen. Es sollte an einem größeren Kollektiv untersucht werden, ob sich die ApoE-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten (n = 52), Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (n = 50) und an neurologisch gesunden Personen (n = 58) voneinander unterscheiden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob bei diesen Kollektiven geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der ApoE-Konzentration im Liquor bestehen. Innerhalb jeder Gruppe

wurde geprüft, ob die ApoE-Konzentration im Liquor altersabhängig ist. In Verbindung mit dieser Fragestellung wurde auch die Hypothese überprüft, ob sich in der Altersgruppe > 40 Jahre die drei Kollektive hinsichtlich der ApoE-Konzentrationen im Liquor voneinander unterscheiden.

### 2.3.2 Kollektive und methodische Vorgangsweise

Es wurden insgesamt 160 Personen in diese Studie einbezogen, davon waren 58 (neurologisch) gesunde Personen (Kontroll-Gruppe, 37 Frauen, 21 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 40 Jahren, 52 MS-Patienten (MS, 32 Frauen, 20 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 39 Jahren und 50 an anderen neurologischen Erkrankungen leidende Personen (AN, 19 Frauen, 31 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 48 Jahren. In den Abbildungen 2.2 bis 2.4 sind die Parameter der deskriptiven Statistik aufgelistet.

Abb. 2.2 Kontroll-Gruppe, ApoE-Konzentrationen im Liquor

<b>n</b>	<b>Gruppe</b>		<b>Alter [Jahre]</b>	<b>ApoE-Li [mg/dl]</b>
<b>58</b>	<b>Kontroll-Gruppe (gesamt)</b>	<b>MW</b>	<b>39,57</b>	<b>0,40</b>
		<b>STW</b>	<b>± 15,10</b>	<b>± 0,16</b>
<b>37</b>	<b>Frauen</b>	<b>MW</b>	<b>40,16</b>	<b>0,41</b>
		<b>STW</b>	<b>± 15,03</b>	<b>± 0,17</b>
<b>21</b>	<b>Männer</b>	<b>MW</b>	<b>38,54</b>	<b>0,38</b>
		<b>STW</b>	<b>± 15,56</b>	<b>± 0,14</b>

Abb. 2.3 MS-Patienten, ApoE-Konzentrationen im Liquor

<b>n</b>	<b>Gruppe</b>		<b>Alter [Jahre]</b>	<b>ApoE-Li [mg/dl]</b>
<b>52</b>	<b>MS (gesamt)</b>	<b>MW</b>	<b>39,05</b>	<b>0,35</b>
		<b>STW</b>	<b>± 9,70</b>	<b>± 0,35</b>
<b>32</b>	<b>Frauen</b>	<b>MW</b>	<b>38,41</b>	<b>0,35</b>
		<b>STW</b>	<b>± 9,65</b>	<b>± 0,15</b>
<b>20</b>	<b>Männer</b>	<b>MW</b>	<b>40,07</b>	<b>0,34</b>
		<b>STW</b>	<b>± 9,95</b>	<b>± 0,18</b>

Abb. 2.4 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, ApoE-Konzentration im Liquor

n	Gruppe		Alter [Jahre]	ApoE-Li [mg/dl]
50	AN (gesamt)	MW	48,00	0,36
		STW	± 15,49	± 0,29
19	sn, f	MW	48,17	0,38
		STW	± 16,15	± 0,25
31	sn, m	MW	47,89	0,36
		STW	± 15,35	± 0,31

Da die Werte der ApoE-Konzentration im Liquor normalverteilt waren und drei Gruppen zu vergleichen waren, wurde zur statistischen Analyse die one way analysis of variance (ANOVA) eingesetzt.

### 2.3.3 Überprüfung der Hypothesen

a) *Unterschieden sich die ApoE-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten (MS), von an anderen neurologischen Erkrankungen leidenden Patienten (AN) und von gesunden Personen (Kontroll-Gruppe) voneinander?*

Bei diesem Gruppenvergleich wurde zur Testung der Hypothese, wie oben erwähnt, die ANOVA herangezogen. Zur Berechnung waren nur drei Parameter für jede Gruppe nötig: die Anzahl der Individuen, der Mittelwert der zu testenden Variablen (ApoE-Konzentration im Liquor) und die zugehörige Standardabweichung. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind aus Abb. 2.5 zu entnehmen.

Abb. 2.5 Statistischer Vergleich der ApoE-Konzentrationen [mg/dl] von drei Gruppen

Kontroll-Gruppe n = 58	MS n = 52	AN n = 50
0,40 ± 0,16	0,35 ± 0,35	0,36 ± 0,29
F = 0,53	<b>P = 0,593</b>	<b><u>nicht signifikant</u></b>

b) *Unterscheidet sich die ApoE-Konzentration im Liquor der drei Gruppen, wenn man diesen Vergleich für Männer und Frauen gesondert durchführt?*

Führte man den oben beschriebenen Vergleich mittels ANOVA für Männer und Frauen getrennt durch, ergaben sich die in den Abbildungen 2.6 und 2.7 angeführten statistischen Kennzahlen.

Abb. 2.6 Statistischer Vergleich der ApoE-Konzentrationen [mg/dl] von Männern in den drei Gruppen

Kontroll-Gruppe Männer n = 21	MS Männer n = 20	AN Männer n = 31
0,38 ± 0,14	0,34 ± 0,18	0,36 ± 0,31
F = 0,14	<b>P = 0,866</b>	<b><u>nicht signifikant</u></b>

Abb.2.7 Statistischer Vergleich der ApoE-Konzentrationen von Frauen in den drei Gruppen

<b>Kontroll-Gruppe Frauen n = 37</b>	<b>MS Frauen n = 32</b>	<b>AN Frauen n = 19</b>
0,41 ± 0,17	0,35 ± 0,15	0,38 ± 0,25
F = 0,91	P = 0,407	<b><u>nicht signifikant</u></b>

Weder in der Gruppen der Männer, noch in der Gruppe der Frauen konnte im Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied in den ApoE-Konzentrationen im Liquor nachgewiesen werden.

c) *Unterschieden sich innerhalb jeder Gruppe die ApoE-Konzentrationen im Liquor von jüngeren (≤ 40 Jahre) und älteren (> 40 Jahre) Personen?*

Zur Beantwortung dieser Frage mußten drei Vergleiche mit je zwei Patienten- bzw. Personen-Gruppen durchgeführt werden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung (ANOVA, bei nur 2 Kollektiven gleichbedeutend mit einem t-Test) sind aus den Abbildungen 2.8 bis 2.10 ersichtlich.

Abb. 2.8 Statistischer Vergleich zwischen jüngeren und älteren Personen in der Kontroll-Gruppe hinsichtlich der ApoE-Konzentration [mg/dl] im Liquor

<b>Kontrollgruppe</b>	
<b>≤ 40 Jahre n = 34</b>	<b>&gt; 40 Jahre n = 24</b>
0,37 ± 0,15	0,45 ± 0,16
F = 3,71	P = 0,059
	<b><u>nicht signifikant</u></b>

Abb. 2.9 Statistischer Vergleich zwischen jüngeren und älteren Patienten in der Gruppe der MS-Patienten hinsichtlich der ApoE-Konzentrationen [mg/dl] im Liquor

MS	
≤ 40 Jahre n = 26	> 40 Jahre n = 26
0,36 ± 0,18	0,33 ± 0,14
F = 0,44	P = 0,510
<b><u>nicht signifikant</u></b>	

Abb. 2.10 Statistischer Vergleich zwischen jüngeren und älteren Patienten in der Gruppe der Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen hinsichtlich der ApoE-Konzentration [mg/dl] im Liquor

AN	
≤ 40 Jahre n = 18	> 40 Jahre n = 32
0,34 ± 0,19	0,38 ± 0,33
F = 0,22	P = 0,641
<b><u>nicht signifikant</u></b>	

In der Kontroll-Gruppe der gesunden Personen weist der niedrige P-Wert darauf hin, daß der Altersvergleich an der Signifikanzgrenze lag. Ältere Personen wiesen einen tendenziell höheren ApoE-Wert im Liquor auf als die jüngeren. Weder bei den MS-Patienten noch bei den Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen konnte ein solcher Trend festgestellt werden.

d) Unterscheiden sich die ApoE-Konzentrationen im Liquor, wenn man ältere Patienten/Personen aus den drei Gruppen untereinander vergleicht?

Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind in Abb. 2.11 zu finden.

Abb. 2.11 Statistischer Vergleich der ApoE-Konzentrationen [mg/dl] im Liquor von älteren Patienten/Personen der drei Gruppen

Kontroll-Gruppe > 40 Jahre n = 24	MS > 40 Jahre n = 26	AN > 40 Jahre n = 32
0,45 ± 0,16	0,33 ± 0,14	0,38 ± 0,33
F = 1,60	P = 0,209	<u>nicht signifikant</u>

Demnach konnte auch bei Patienten/Personen, die älter als 40 Jahre alt waren, kein signifikanter Unterschied der ApoE-Konzentrationen im Liquor zwischen den drei Gruppen gefunden werden.

## DISKUSSION

Neben dem methodischen Teil enthält diese Dissertation zwei auf den ersten Blick unabhängige kleine Studien, die sich aber beide mit MS-spezifischen Themen beschäftigen. Einerseits wurde anhand von Zellkultur-Experimenten die Wirkung von Interferon- $\beta$ -1b (IFN- $\beta$ -1b) auf humane Astrozyten untersucht, wobei bei der Interpretation der Ergebnisse stets zu berücksichtigen ist, daß Tumorzell-Linien verwendet wurden und daß bei der IFN- $\beta$ -1b-Behandlung von MS-Patienten die IFN-Wirkung wohl nur selten direkt an den Zellpopulationen des ZNS erfolgt, sondern bei intakter Blut-Hirn-Liquor-Schranke eher peripher an den T-Lymphozyten in den Lymphknoten stattfindet <sup>112</sup>. Aus den Effekten der Inkubation der beiden astrozytären Zell-Linien mit IFN- $\beta$ -1b können lediglich Vermutungen über die Wirkungsweise des IFN- $\beta$ -1b in aktiven MS-Läsionen, in deren Umgebung die Funktion der Blut-Hirn-Liquor-Schranke gestört ist, angestellt werden <sup>89,90</sup>. Andererseits wurde die ApoE-Konzentration im Liquor von MS-Patienten bestimmt und mit derjenigen von gesunden Kontroll-Personen oder von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen verglichen. Hier konnten keine Informationen über die IFN- $\beta$ -1b-Wirkung gewonnen werden, da lediglich zwei MS-Patienten unter einer immunmodulatorischen Prophylaxe mit IFN in der Liquor-Serum-Datenbank erfaßt waren und Lumbalpunktionen (oder gar Hirnbiopsien) bei Patienten ohne deutliche klinische Verschlechterungen ethisch nicht vertretbar wären. Veränderungen der ApoE-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten gegenüber Kontroll-Personen können nur Teilaspekte der verschiedenen an der MS beteiligten pathologischen Mechanismen und Reparaturmechanismen beleuchten <sup>88-90,95-97,155-157,165,166</sup>.

## 1. Optimierung der Methoden

### 1.1 ApoE-ELISA

Zur Messung der Konzentration des ApoE in Serum- und Liquor-Proben wurde ein ELISA-Verfahren ausgewählt, das wie alle Methoden dieser Art einfach durchzuführen ist und durch die spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zuverlässige Meßwerte liefert. Bei gewissenhafter Optimierung des Versuchs-ablaufs (siehe Abschnitt 1.1.1 und Methodik und Materialien, Abschnitt 3.3), fällt zusätzlich zu den genannten Vorteilen auch der große lineare Bereich (1 bis 800 ng ApoE) und die gute Reproduzierbarkeit des Sandwich-ELISA auf.

Durch die Verwendung erwerbbarer Antikörper und eines häufig eingesetzten Enzymkonjugats konnte der Sandwich-ELISA genau nach Bedarf und Verfügbarkeit der Reagenzien zusammengestellt werden. Das Enzym Alkalische Phosphatase enthaltende Enzymkonjugat ermöglichte einen im Bereich der kolorimetrischen Detektion sehr empfindlichen Nachweis, weswegen zur Signalerzeugung radioaktive Substanzen nicht eingesetzt werden mußten. Obwohl der ELISA relativ zeitaufwendig war und ein hohes Maß an Routine erforderte konnte auf spezielle Geräte oder unübliche Reagenzien verzichtet werden. Der Sandwich-ELISA erfordert im Vergleich zu anderen Methoden wie etwa der Immuno-Nephelometrie (lediglich 30 Minuten pro Versuch), kein besonderes Gerät und ist somit wesentlich weniger kostspielig. Anderen Literaturangaben zufolge können auch immunfluorometrische Methoden zur Messung der Konzentration des ApoE in Serum und Liquor eingesetzt werden, obwohl auch bei diesem Verfahren ein spezielles Meßgerät erforderlich ist, das jedoch für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen nicht zur Verfügung stand. Eine Entscheidung hinsichtlich der Analysen-Methode für ApoE wird nach Maßgabe der Ausstattung und der Personal-Ressourcen des jeweiligen Labors getroffen werden.

### 1.1.1 Faktoren, die die Meßgenauigkeit des ApoE-ELISA beeinflussen

Als besonders wichtig für das Gelingen des ApoE-ELISA haben sich mehrere Faktoren erwiesen. Die Konzentration und die Art des für das Blocking verwendeten Proteins müssen sorgfältig optimiert werden, um die spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zu ermöglichen. Im Falle des hier verwendeten ApoE-ELISA ist das relativ preisgünstige BSA (Konzentration von 1 % in 1x PBS) zum Absättigen der unspezifischen Bindungen durchaus ausreichend.

Um die Kosten zu minimieren sollte die Konzentration der Antikörper-Lösungen so niedrig wie möglich liegen, da diese nicht wiedergewonnen und erneut zur Analyse eingesetzt werden können. Wünschenswert ist, daß die Konzentrationen der Antikörper-Lösungen so niedrig gewählt werden, daß gerade noch eine spezifische und quantitative Wechselwirkung mit dem zu analysierenden ApoE gesichert ist.

Auch die Verdünnung der Standard- und Proben-Lösungen muß mit Bedacht gewählt werden. Die zur Detektion des Signals verwendeten Spektrophotometer besitzen nur einen eingeschränkten Bereich, in dem linear gemessen werden kann. Die aus der Umsetzung des Substrats resultierenden Absorptionswerte sollten in einem optimalen Bereich liegen. Zu geringe Meßwerte unterschieden sich zu wenig vom Blindwert der Analysen-Lösung, zu große Meßwerte (je nach Gerät > 1,5 - 3,0 Absorbtionseinheiten) können nicht zu einer verlässlichen Quantifizierung herangezogen werden, da sie außerhalb des linearen Meßbereichs des Photometers liegen.

Sowohl die Antikörper- als auch die ApoE-Standard-Lösungen enthalten 1% BSA, um die geringen Protein-Konzentrationen zuverlässig in Lösung zu halten und somit eine genaue Quantifizierung der Probelösungen zu ermöglichen.

Zur Messung der ApoE-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen und resolvierten Zell-Proteinen ist der ApoE-Sandwich-ELISA jedoch zu wenig sensitiv. Zur Messung derartig geringer ApoE-Konzentrationen müssen die Proben-Lösungen also entweder konzentriert oder aber ein anderes Meßverfahren etabliert werden. Zur Konzentrierung von Lösungen müssen spezielle

Säulchen eingesetzt werden, die durch das zu erwartende hohe Probenaufkommen ein nicht zu unterschätzender Kostenfaktor sind. Die Etablierung eines ApoE-Western Blot unter Verwendung bereits vorhandener Antikörper und geeigneter Elektrophorese- und Blotting-Apparaturen hat sich unter den gegebenen Umständen als bessere Lösung erwiesen (siehe Abschnitt 1.3).

## **1.2 RT-PCR zur semiquantitativen Analyse der ApoE-mRNA**

Zur Messung der ApoE-mRNA-Menge wurde ein Verfahren ausgewählt, das als wesentlichen Schritt eine RT-PCR enthält (siehe Abschnitt 4.1.1). Durch die exponentielle Vervielfältigung eines Teils der fraglichen mRNA sind solche Methoden wesentlich sensitiver als Methoden, die die mRNA-Menge direkt messen wie beispielsweise der Northern Blot (siehe Methoden und Materialien, Abschnitt 4.1.2). Bei geeigneten Voraussetzungen können mit RT-PCR-Verfahren auch absolute mRNA-Mengen bestimmt werden. Moderne Verfahren wie die Real Time-PCR machen darüber hinaus die densitometrische Auswertung der einzelnen Banden eines Agarose-Gels überflüssig, da die absolute Menge der bzw. mehrerer PCR-Produkte zeitgleich durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Primer bestimmt werden kann.

Ungewöhnliche Methoden wie beispielsweise der RNA Hybridization Assay können ebenfalls zur absoluten Quantifizierung eingesetzt werden und bieten durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Sonden zusätzlich den Vorteil der eindeutigen Identifizierung des gewünschten Gens bzw. Genabschnitts. Die Detektion erfolgt bei Verwendung radioaktiv markierter Sonden durch Szintillationszählung (siehe Methoden und Materialien, Abschnitt 4.1.2). Da am Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie kein geeigneter Counter zur Verfügung stand und zusätzlich bereits Erfahrung im Umgang mit PCR-Methoden vorhanden war, wurde die Entscheidung zugunsten der Verwendung einer RT-PCR-Methode gefällt.

Um die Veränderungen der ApoE-Expression bei Stimulation mit IFN- $\beta$  feststellen zu können, war eine semiquantitative Methode ausreichend. Um jedoch eine zuverlässige Quantifizierung der PCR-Produkte zu erzielen, mußten alle

Schritte der RT-PCR sorgfältig optimiert werden; insbesondere mußte sichergestellt werden, daß die Messung dann erfolgte, wenn die Amplifizierung aller Fragmente in der exponentiellen Phase erfolgte.

#### 1.2.1 Faktoren, die die Meßgenauigkeit der RT-PCR beeinflussen

Als interner Standard für die semiquantitative Quantifizierung wurden zwei konstitutiv exprimierte Gene, nämlich GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ein Schlüsselenzym der Glykolyse) und  $\beta$ -Actin (ein Bestandteil des Zytoskeletts) verwendet, um erkennen zu können, ob die Stimulation mit IFN- $\beta$  bezüglich beider interner Standards dieselben Effekte auf die ApoE-Expression aufweist.

Ebenso wichtig für das Gelingen der ApoE-RT-PCR ist die Auswahl der Primer. Obgleich der schon länger im Forschungslabor (zur Genotypisierung) eingesetzte ApoE-Primer ein relativ GC-reiches 217 bp langes Fragment amplifiziert, waren die Ergebnisse zuverlässiger als bei Anwendung eines speziell für den Einsatz in der RT-PCR vorgesehenen Primer-Paars. Bei Zugabe von 5 % DMSO zum Ansatz konnte die Annealing Temperatur auf 65 °C angehoben und somit die Spezifität der Primer-cDNA-Wechselwirkung verbessert werden. Diese Modifikationen zeigten auch keine negativen Auswirkungen auf die Amplifikation der beiden als interne Standards verwendeten Housekeeping-Gene.

Neben einer sterilen Arbeitsweise ist auch die Handhabung der RNA im Verlauf der Isolierung, Reinigung und Verarbeitung der Proben für ein zuverlässiges Meßergebnis wichtig. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hat sich auch das sorgfältige „Aufschmelzen“ der RNA- und cDNA-Proben erwiesen, bevor sie im nächsten Analyseschritt eingesetzt werden. Andernfalls ergab sich durch die nicht homogene Probenlösung ein vom wahren Wert unterschiedliches Resultat. Auch ergaben sich verfälschte Meßwerte, wenn die RNA-Fällung nicht in vertikal positionierten Eppendorf-Gefäßen durchgeführt wurde und deswegen nicht die gesamte RNA-Menge bei der Rehydratisierung gelöst werden konnte.

Die Genauigkeit der Meßergebnisse wird auch durch die Modalitäten der densitometrischen Analyse beeinflusst. So kann man beispielsweise durch die Verwendung breiterer Kämme bei der Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte den relativen Meßfehler verringern, weil größere Mengen der Proben-Lösung aufgetragen werden können.

Die unterschiedliche Länge der PCR-Produkte des zu messenden ApoE-Gens und der beiden als interne Standards eingesetzten Gene GAPDH und  $\beta$ -Actin macht eine Normierung des gemessenen densitometrischen Signals erforderlich (jedes Fragment lagert je nach Länge mehr oder weniger Ethidiumbromid ein), um eine korrekte Quantifizierung der ApoE-mRNA zu ermöglichen. Erst nach dieser Normierung können die Signale für jedes PCR-Produkt zueinander in Beziehung gesetzt und die relative Menge der ApoE-mRNA bestimmt werden.

### 1.3 ApoE-Western Blot

Zur Messung geringer ApoE-Konzentrationen, die mit dem ELISA nicht erfaßt werden können, wurde ein ApoE-Western Blot mit Chemilumineszenz-Detektion etabliert. Der geringe apparative Aufwand und die Verwendung gebräuchlicher Reagenzien verursachen nur geringe Kosten.

Der ApoE-Western Blot wurde zur Erfassung von Veränderungen der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion bei IFN- $\beta$ -Stimulation eingesetzt. Werden die ApoE-Konzentrationen in mit IFN- $\beta$  stimulierten Zellkulturen mit denen unstimulierter Kontrollen verglichen, so kann die relative Veränderung der ApoE-Synthese ermittelt werden.

Die Optimierung der Western Blot-Methode war nicht einfach, weil die verschiedenen zur Verfügung stehenden Antikörper unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden mußten, um eine spezifische Wechselwirkung miteinander und dem ApoE der Proben-Lösung zu gewährleisten. Im folgenden Abschnitt werden diejenigen Faktoren näher erläutert, die sich bei der semiquantitativen ApoE-Messung als wichtig erwiesen haben.

### 1.3.1 Faktoren, die die semiquantitative Messung mittels ApoE-Western Blot beeinflussen

Um Veränderungen der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion überhaupt nachweisen zu können, muß der Zeitraum, in dem die Probennahmen erfolgen, korrekt gewählt werden. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die ApoE-Synthese (und wahrscheinlich auch dessen Sekretion) durch Stimulation mit IFN- $\beta$  lediglich innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne von rund ein bis drei Stunden gesteigert wird. Danach konnten die Intervalle zwischen den einzelnen Meßpunkten verringert werden, um die Maxima der Synthese bzw. der Sekretion näher einzugrenzen.

Im Laufe der Optimierung des Western Blots wurde die kolorimetrische Detektion (BCIP/TNBT), um die Sensitivität zu steigern, durch eine auf Chemilumineszenz basierende Nachweismethode ersetzt. Daher mußten auch die Auftragsmengen bei der SDS-PAGE drastisch vermindert werden; anstelle von typischerweise 50 bis 80  $\mu\text{g}$  pro Lane wurden jetzt nur mehr 10 bis 20  $\mu\text{g}$  aufgetragen. Wurde die SDS-PAGE bei geringer Spannung von 80 V durchgeführt, so resultierte eine bessere Auftrennung der einzelnen Banden als bei 120 V, wenngleich dann Elektrophoresezeiten von rund eineinhalb Stunden in Kauf genommen werden mußten.

Wurde beim Blocking hingegen BSA anstelle des teuren Trockenmilchpulvers eingesetzt, so wurde das durch die unspezifische Bindung der Antikörper bewirkte störende Hintergrundsignal in gleicher Weise reduziert.

Obwohl verschiedene monoklonale ApoE-Antikörper getestet wurden, so erbrachte die Verwendung des polyklonalen ApoE-Antikörpers die besten Ergebnisse. Dieser konnte auch stark (1:10 000) verdünnt werden; im Gegensatz dazu mußte das HRP-Konjugat beim Chemilumineszenz-Nachweis in relativ großer Konzentration (1:2 000) eingesetzt werden –wiewohl nach den Angaben des Herstellers gerade bei dieser Nachweismethode wesentliche Kosteneinsparungen durch große Verdünnungen möglich sein sollten.

Die Quantifizierung der ApoE-Mengen pro Lane erwies sich als nicht ganz einfach. Durch Dimerisierung und Fragmentierung (während der Lagerung des ApoE-Standards) bzw. nicht vollständig synthetisierte Proteinanteile im Falle

der resolvatisierten Zell-Proteine wurden stets mehrere Banden nachgewiesen. So wurde schließlich eine Summe der in allen Proben vorhandenen Hauptbanden zur Ermittlung der (relativen) Mengen des ApoE herangezogen und damit konnte die Veränderung der ApoE-Synthese und der ApoE-Sekretion unter Stimulationsbedingungen gemessen werden.

## **2. *In vitro*-Experimente und Zellkultur**

### **2.1 Wirkungsweise der Interferone**

#### **2.1.1 Interferonwirkung in gesunden Personen und bei MS-Patienten**

Interferone (IFNs) der Klassen I ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\omega$ ) und II ( $\gamma$ ) werden auch im gesunden Körper produziert und sind an der Regulation des Immunsystems beteiligt (siehe auch Einleitung, Abschnitte 2.9 und 2.10). IFNs der Klasse I wirken entzündungshemmend und antiproliferativ, während IFN- $\gamma$  eher eine Steigerung der Immunantwort auslöst<sup>125</sup>. Das Zusammenwirken der IFNs und anderer Zytokine wie beispielsweise der Interleukine und deren mengenmäßige Anteile in einer gegebenen Situation steuern viele Reaktionen des Immunsystems. Dominieren CD4<sup>+</sup>/Th1-Lymphozyten und deren entzündungsfördernde Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12), so wird die Entzündung propagiert und die Immunantwort in Richtung einer zytotoxischen Wirkung (durch CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten) geleitet. Die Anwesenheit entzündungshemmender Zytokine wie IL-1, IL-4 und IL-10 bewirkt die Differenzierung der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten zu TH2-Lymphozyten und in weiterer Folge eine Abschwächung der Immunantwort (Antikörperbildung und Komplement-Anlagerung),<sup>89,90</sup>. Die Entstehung der charakteristischen MS-Läsionen dürfte durch verschiedene pathogenetische Mechanismen ausgelöst werden, die ein jeweils unterschiedliches Ausmaß der Schädigung von Myelin, Axonen und der Oligodendrozyten aufweisen. Im Zusammenhang damit zeigt sich auch eine verschieden stark ausgeprägte Entzündungs- bzw. Immunreaktion<sup>90,95,158</sup>.

IFN- $\beta$  wird seit 1993 in der Therapie der klinisch schubförmig verlaufenden MS eingesetzt <sup>89,112,114,115</sup>, seit 1998 auch bei der sekundär progredienten Verlaufsform <sup>109</sup>. Seit dem Jahr 1997 wurden erste Studien zum Einsatz von IFN- $\beta$  zur Behandlung eines ersten Demyelinisierungs-Ereignisses noch vor der eindeutigen Diagnose MS durchgeführt <sup>159,160</sup>, wobei dieser therapeutische Einsatz positiv beurteilt wurde.

IFN- $\beta$  reduziert die Häufigkeit der Schübe und scheint auch den Fortschritt der MS zu verlangsamen. IFN- $\beta$  hemmt die Proliferation der T-Lymphozyten und reduziert die Antigen-Präsentation, daneben wird die Expression der entzündungsfördernden Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zugunsten der entzündungshemmenden Zytokine wie beispielsweise IL-10 verringert, wodurch die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in Th2-Lymphozyten begünstigt wird. Durch die Verringerung der Immunantwort und der Entzündungsprozesse wird die lokale Störung der Blut-Hirn-Liquor-Schranke im Bereich der aktiven Läsionen wieder verbessert und der Übertritt von Immunzellen und Antikörpern in das ZNS erschwert.

### 2.1.2 Interferonwirkung in vitro

Die Inkubation verschiedener Zellpopulationen mit IFNs bewirkt zum einen Unterschiede in der Synthese verschiedener Proteine, daneben wurden in einigen Fällen auch direkte Schädigungen der Zellen durch IFN- $\gamma$  beobachtet. In primären Zell-Kulturen zeigen sich im Vergleich zu (Tumor-)Zell-Linien bisweilen andere Auswirkungen. Einige Beispiele der IFN- $\beta$ -Wirkung in Zellpopulationen des ZNS und in peripheren mononukleären Zellen werden in den beiden folgenden Absätzen kurz erläutert.

In primären astrozytären Zell-Kulturen der Maus bewirkt IFN- $\beta$  eine starke Steigerung der Produktion von Nerve Growth Factor NGF <sup>85</sup>. In astrozytären Zell-Kulturen von Mensch und Maus bewirkt IFN- $\beta$  eine Steigerung der ApoE-Sekretion, während IFN- $\gamma$  eine Hemmung hervorruft <sup>68,69,72</sup>. Aufgrund seiner mitogenen Eigenschaften fördert IFN- $\gamma$  die Proliferation in Zellkulturen von

humanen Astrozyten<sup>103</sup>. In gemischten Zell-Kulturen bestehend aus neuronalen Zellen und Gliazellen (Maus) scheint IFN- $\gamma$  sogar neuronale Zellen direkt zu schädigen<sup>120</sup>.

In Zell-Kulturen von mononukleären Zellen, die aus dem peripheren Blut isoliert wurden, wirken sowohl IFN- $\beta$  als auch IFN- $\gamma$  hemmend auf die ApoE-Expression, wobei IFN- $\gamma$  auch die ApoE-Sekretion dosisabhängig senkt (unabhängig davon, ob auch IFN- $\beta$  im Ansatz vorhanden ist). Es scheint sogar ein gewisser synergistischer Effekt in Anwesenheit beider Zytokine zu bestehen<sup>33</sup>.

## **2.2 RT-PCR-Experimente - Modifikation der ApoE-Expression durch IFN- $\beta$**

### **2.2.1 Theoretische Aspekte**

ApoE wird im Nervensystem von Astrozyten, Oligodendrozyten und (zu einem geringeren Prozentsatz) von anderen nicht-neuronalen Zellelementen wie Monozyten/Makrophagen und der Mikroglia sezerniert und spielt eine bedeutende Rolle bei der Umverteilung von Lipiden während der neuronalen Entwicklungsphase sowie bei der Regeneration von peripheren Nerven<sup>50</sup>. Nach einer Verletzung des ZNS oder im Verlauf von entzündlichen Prozessen werden Astrozyten aktiviert und proliferieren. Die so entstehende „Gliararbe“ behindert sowohl die neuronale Regeneration als auch die Remyelinisierung während der Remissionsphasen der MS. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, daß auch neuronale Zellpopulationen unter gewissen Bedingungen ApoE produzieren können, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als die nicht-neuronalen Zellen im ZNS.

Die ApoE-Expression und/oder die ApoE-Synthese werden/wird gewebsspezifisch reguliert. Neben hormonellen Faktoren und der Verfügbarkeit von Cholesterin(-estern) beeinflussen vor allem im Nervensystem auch Zytokine und Wachstumsfaktoren die Expression von ApoE-mRNA. Offenbar ist auch *in vitro* die ApoE-Synthese vom Alter der Astrozyten abhängig; junge Astrozyten produzieren mehr ApoE als ältere. Serumentzug oder sehr geringe Konzentrationen von Serum im Medium können allerdings eine artifiziell niedrigere

ApoE-Synthese bewirken. Es muß vor allem für Zellkultur-Experimente mit Zell-Populationen des ZNS sorgfältig abgewogen werden, ob und wieviel Serum im Medium enthalten ist; einerseits ist ein gewisser Serumanteil für das Wachstum der Zellen erforderlich, andererseits sollten im physiologischen Normalzustand des ZNS keine Serumbestandteile vorhanden sein, denn diese würden auf eine Störung der Blut-Hirn-Liquor-Schranke hinweisen. In manchen Studien wurden die Astrozyten vor einer Stimulation mit Zytokinen oder Interferonen durch ein starkes Absenken des Serumanteils im Medium (auf 0,5 %) in eine Art Ruhezustand (quiescent astrocytes) versetzt <sup>161</sup>. Ob dieses Vorgehen im speziellen Falle der Stimulation mit IFN- $\beta$  Vorteile bringt oder aber den natürlichen Bedingungen *in vivo* besser entspricht, muß noch durch weitere Experimente geklärt werden.

Die unausgesetzte oder zumindest anhaltende Aktivierung der Astrozyten wie z.B. im Falle neurodegenerativer Erkrankungen wie der MS, könnte dazu führen, daß die optimalen ApoE-Konzentrationen durch die Astrozyten nicht mehr aufrechterhalten werden können. Da die ApoE-Syntheseleistung von Astrozyten besonders für MS-Patienten in der Remissionsphase wichtig erscheint, wurde in Zellkultur-Experimenten untersucht, ob die IFN- $\beta$ -Gabe die ApoE-Synthese oder ApoE-Sekretion verändert.

Stimulationsexperimente mit IFN- $\beta$  an astrozytären Zellen *in vitro*, die auf mRNA-Ebene die ApoE-Expression und die ApoE-Sekretion auf Proteinebene untersuchen, wurden durchgeführt, um Aufschluß über eine eventuelle Beeinflussung der Transkriptionsrate des ApoE-Gens und der Sekretion des Genprodukts zu erhalten. Die Stimulation mit IFN- $\beta$  (Betaferon®, Schering) wurde mit Konzentrationen zwischen 10 und 1 000 U Betaferon®/ml Medium durchgeführt, um herauszufinden, ob die Änderung der ApoE-Expression dosisabhängig erfolgt und zu welchem Zeitpunkt eine maximale Antwort auf die IFN- $\beta$ -Gabe erfolgt.

Würde die ApoE-Expression und in weiterer Folge auch die ApoE-Sekretion durch IFN- $\beta$  gesteigert werden, so könnte dies im Sinne einer durch erhöhte ApoE-Konzentrationen verbesserten Rückbildung der Plaques während der Remissionsphasen der MS gedeutet werden. Die Remyelinisierung der MS-

Läsionen erfolgt in unterschiedlichem Ausmaß je nach dem vorherrschenden pathogenetischen Mechanismus<sup>88,95,96,99</sup>. In der frühen Phase der MS und in den Läsionen der Muster I und II (im Bereich der Blutgefäße lokalisierte, scharf umgrenzte Läsionen mit starker Immunreaktion und durch primär vorhandene Entzündungsprozesse ausgelöste Demyelinisierung) ist meist eine extensive Remyelinisierung festzustellen, die im MRI als sogenannte „shadow plaques“ erkennbar sind. Die Pathogenese der Läsionen der Muster I und II ist zusätzlich durch die Anwesenheit von Auto-Antikörpern, die gegen Antigene auf der Oberfläche der Myelinscheiden oder der Oligodendrozyten gerichtet sind, gekennzeichnet<sup>89,99,100,156</sup>. Die schlecht begrenzten Läsionen der Muster III und IV (bei denen auch die umgebende, normal erscheinende weiße Substanz in Mitleidenschaft gezogen ist) sind durch primäre Degeneration der Oligodendrozyten mit sekundär ausgelöster Entzündungsreaktion gekennzeichnet und weisen eine nur schwache Remyelinisierung auf<sup>95,96</sup>. Die Art und Weise der Entstehung der charakteristischen Plaques variiert also von Patient zu Patient, die verschiedenen Läsionen eines Patienten sind jedoch immer einem Muster zuzuordnen. Daher dürfte also eine Verbesserung der Remyelinisierung durch eine gesteigerte Synthese von ApoE nur bei Läsionen der Muster I und II möglich sein, während in Läsionen der Muster III und IV durch die Degeneration der Oligodendrozyten und die Erschöpfung des Oligodendrozytenvorläufer-Pools vermutlich keine Besserung der Situation zu erwarten ist<sup>95,96,162-164,166</sup>.

### 2.2.2 LN-405-Zellen

Die Inkubation mit Betaferon® veranlaßt die LN-405-Zellen zur Steigerung der ApoE-Expression, wobei der maximale Effekt bereits nach 15 bis 30 Minuten beobachtet wird. Bei der größten Betaferon®-Konzentration von 1 000 U/Medium wird die ApoE-Expression auf ca. 400 % des Ausgangswerts (je nachdem, ob GAPDH oder  $\beta$ -Actin als interner Standard verwendet wird) angehoben. Bei 100 U Betaferon®/ml Medium erreicht die Steigerung immerhin noch mehr als 300 %. Bei Inkubation der Zellen mit einer Konzentration von 10 U Betaferon®/ml Medium erfolgt eine deutlich geringere Zunahme der ApoE-Expression auf ca. 200 %.

Wird die Betaferon®-Konzentration noch weiter auf 1 U/ml Medium gesenkt, so kann keine Veränderung/Steigerung der ApoE-Expression festgestellt werden; diese Betaferon®-Konzentration liegt also bereits unterhalb der Wirkungsschwelle für diese Zell-Linie. Im Bereich von 10 bis 1 000 U Betaferon®/ml Medium kann eine strenge Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt werden.

### 2.2.3 Gos-3-Zellen

Die Inkubation mit Betaferon® veranlaßt auch die Gos-3-Zellen zur Steigerung der ApoE-Expression, wobei der maximale Effekt ebenfalls bereits nach 15 bis 30 Minuten beobachtet wird. Die Änderung der ApoE-Expression durch verschiedene Betaferon®-Konzentrationen gestaltet sich jedoch deutlich anders als bei den oben beschriebenen LN-405-Zellen. Bei Stimulation mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium resultiert eine Steigerung der ApoE-Expression auf ca. 350 % des Ausgangswerts, bei Inkubation mit 100 U/ml Medium hingegen wird eine Steigerung auf ca. 500 % beobachtet. Einen noch größeren Anstieg auf ca. 600 % wird durch eine Konzentration von 10 U Betaferon®/ml Medium hervorgerufen.

Bei Inkubation mit 1 U Betaferon®/ml Medium zeigt sich kein eindeutiger Trend in der ApoE-Expression, die Meßwerte scheinen zufällig verteilt zu sein; diese geringe Konzentration ruft also keine Veränderung der ApoE-Expression hervor. Bei Konzentrationen von 10 bis 1 000 U Betaferon®/ml Medium ist also überraschenderweise eine umgekehrte Dosis-Wirkungs-Beziehung festzustellen, wenngleich sich bei Verwendung von  $\beta$ -Actin als Referenz die maximale Steigerung der Apo-Expression bei 100 U manifestiert.

### 2.2.4 Diskussion der Ergebnisse

LN-405-Zellen zeigen die stärkste Antwort auf eine Betaferon®-Stimulation bei einer Konzentration von 1 000 U pro ml Medium (ApoE-Expression steigt auf rund 400 % des Ausgangswerts), allerdings wird auch bei 100 U ein Anstieg der ApoE-Expression in derselben Größenordnung (auf 300 %) beobachtet. Bei Stimulation mit nur 10 U Betaferon®/ml Medium ist die Steigerung

der ApoE-Expression allerdings geringer (auf rund 200 %). Diese Dosisabhängigkeit der ApoE-Expression in Antwort auf Induktion mit Betaferon® steht in auffallendem Gegensatz zu der umgekehrten Dosisabhängigkeit bei Gos-3-Zellen, die bei geringeren Betaferon®-Konzentrationen größere Steigerungen in der ApoE-Expression zeigen. Wahrscheinlich ist dieser Effekt durch die Eigenart der beiden aus Tumorzellen etablierten Zell-Linien bedingt. Die Zell-Linie Gos-3 wurden aus einem Astro-Oligodendrogliom (Grad II/III) einer 55-jährigen Frau etabliert; im Vergleich zu der Zell-Linie LN-405 (etabliert aus dem Astrozytom (Grad IV) einer 62-jährigen Frau) könnten diese Zellen eventuell eine größere Ähnlichkeit zum Metabolismus eines „normalen“ Astrozyten aufweisen.

Möglicherweise hat auch der ApoE-Genotyp der beiden Zell-Linien einen Einfluß auf die Modifikation der ApoE-Expression bei Stimulation mit Betaferon®. Ob der Genotyp allerdings eine Umkehrung der Tendenz der Dosis-Wirkungs-Beziehung bewirken kann, müssen weitere Untersuchungen aufklären. Plausibler erscheint eine Beeinflussung des Ausmaßes der Steigerung der ApoE-Expression. Auch unter dem Gesichtspunkt des ApoE-Polymorphismus spiegeln Gos-3-Zellen aufgrund ihres ApoE-Genotyps  $\epsilon_3/\epsilon_3$  sozusagen eher physiologische Verhältnisse wider als LN-405 Zellen des ApoE-Genotyps  $\epsilon_3/\epsilon_2$ . Die Verteilung der ApoE-Genotypen wurde in verschiedenen Populationen ermittelt und weist stets einen Anteil von rund 60% des Genotyps  $\epsilon_3/\epsilon_3$  auf, gefolgt von den Genotypen  $\epsilon_4/\epsilon_3$  und  $\epsilon_3/\epsilon_2$  mit rund 20% und 10%, die mit großem Abstand seltensten Genotypen sind  $\epsilon_4/\epsilon_2$ ,  $\epsilon_4/\epsilon_4$  und  $\epsilon_2/\epsilon_2$  <sup>2,23</sup>. Die große Häufigkeit des Allels  $\epsilon_3$  deutet darauf hin, daß es dem Individuum offenbar besondere Vorteile hinsichtlich der allgemeinen „Fitness“ verschafft. In diesem Sinne können Gos-3-Zellen mit dem Genotyp  $\epsilon_3/\epsilon_3$  als Beispiel für die IFN-Wirkung herangezogen werden, da die Mehrheit der Bevölkerung diesen Genotyp und weitere 30 % zumindest ein Allel  $\epsilon_3$  aufweisen.

Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, daß bei Trägern des ApoE Allels  $\epsilon_4$  eine größere Wahrscheinlichkeit für einen aggressiveren klinischen Verlauf der MS bestehen könnte (höherer EDSS-Score, höhere Schubrate). Eine stärkere Gewebeschädigung, nicht nur demyelinisierende sondern auch

axonale Degenerationen sowie weniger effiziente Reparaturmechanismen könnten dafür verantwortlich sein, wie einzelne MRT-Untersuchungen gezeigt haben<sup>35,167</sup>. Klinische Studien zum Thema ApoE-Polymorphismus bei MS ergaben divergierende Resultate, was die möglichen Auswirkungen des ApoE Allels  $\epsilon 4$  auf die Aktivität der MS betrifft<sup>35,168,169</sup>.

Jüngste Untersuchungsergebnisse über den immunmodulatorischen Einfluß des ApoE auf systemische Entzündungsprozesse im ZNS lassen isoform-spezifische Unterschiede in der Immunregulation vermuten<sup>170</sup>. Im Tierversuch zeigten Mäuse mit dem humanen ApoE  $\epsilon 4$  höhere Konzentrationen der entzündungsfördernden Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 im peripheren Kreislauf und im ZNS als Mäuse mit dem humanen ApoE  $\epsilon 3$ . ApoE  $\epsilon 4$ -Mäuse wiesen eine länger anhaltende Entzündungsreaktion im ZNS nach einer Injektion von LPS (Tiermodell für induzierte Entzündungsvorgänge) als ApoE  $\epsilon 4$ -Mäuse auf. Ein kleines Peptid, ApoE<sub>133-149</sub>, das wichtige Bereiche der Rezeptorbindungs-Region enthält, verringerte bei intravenöser Verabreichung im Tierversuch die Konzentrationen der beiden erwähnten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 im peripheren Kreislauf und im ZNS<sup>170</sup>. Offenbar behielt ApoE<sub>133-149</sub> die entzündungshemmenden Eigenschaften des intakten ApoE und konnte durch seine geringe Größe die Blut-Hirn-Liquor-Schranke passieren. Möglicherweise ergeben sich aus diesen Untersuchungsergebnissen Strategien für die Behandlung der MS beim Menschen.

Es wurde gezeigt, daß Apo E die Freisetzung gliärer pro-inflammatorischer Zytokine *in vitro* reduziert, wobei ApoE 4 weniger effizient wirkt als ApoE 3<sup>171,172</sup>. Auch außerhalb des Nervensystems kann ApoE entzündliche Reaktionen durch Wechselwirkung mit einem spezifischen Rezeptor modulieren; die hochaffine Bindung von ApoE an den LRP/a 2 Makroglobulin-Rezeptor löst eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalkaskade aus, die immunkompetente Zellen wie Makrophagen und Mikroglia-Zellen veranlaßt, beispielsweise weniger TNF- $\alpha$  und IL-6 auszuschütten<sup>173,174</sup>.

## 2.3 ApoE-Western Blot – Modifikation der ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion durch IFN- $\beta$

### 2.3.1 Theoretische Aspekte

Wenn die ApoE-Konzentrationen in Zellkultur-Überständen und den resolvierten Zell-Proteinen der Astrozyten die Steigerung der ApoE-Expression in Antwort auf Stimulation mit Betaferon® reflektieren, so kann ein positiver Effekt der IFN- $\beta$ -Therapie bei MS-Patienten in der ausreichenden Versorgung mit der Läsionen mit ApoE liegen, die eine gewisse Remyelinisierung während der Remissionsphase gewährleistet. Auch wenn IFN- $\beta$  gemäß einigen Studien keine direkten Effekte aus Astrozyten zu haben scheint, so kann durch dessen immuno-modulatorische Effekte die Zytokinausschüttung der Astrozyten verändert werden<sup>175</sup>. Beispielsweise führt IFN- $\beta$  zu einer massiven Ausschüttung von Nerve Growth Factor, der seinerseits die Proliferation von Oligodendrozyten anregt, denen die entscheidende Rolle bei der Remyelinisierung in der MS zugeschrieben wird. Auch eine durch IFN- $\beta$  gesteigerte ApoE-Synthese der Astrozyten könnte zur Rückbildung der MS-typischen Läsionen und zur Förderung der Remyelinisierung beitragen. Für diese Funktion der Astrozyten spricht unter anderem auch die in einigen Studien gemachte Beobachtung, daß Astrozyten offenbar erst eine gesteigerte ApoE-Sekretion aufweisen, wenn sich in der Umgebung große Mengen an Myelinabfallprodukten angehäuft haben<sup>74</sup>.

### 2.3.2 LN-405-Zellen

Bei der Stimulation von LN-405-Zellen mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium resultiert eine Steigerung der ApoE-Synthese auf rund 300 % des Ausgangswerts (ermittelt anhand der Veränderung der ApoE-Menge in den resolvierten Zell-Proteinen) nach rund einer Stunde (mit einem zweiten, etwas kleineren Maximum nach 2,5 Stunden). Auch die Veränderung der ApoE-Sekretion zeigt ein ähnliches Muster.

Werden die Zellen mit 100 U Betaferon®/ml Medium stimuliert, so werden wesentlich geringere Effekte beobachtet. Die ApoE-Synthese steigt schon nach einer Stunde auf rund 130 % des Ausgangswerts an, während sich die ApoE-Sekretion offenbar erst nach 2 bis 3 Stunden auf denselben Wert erhöht. Diese geringe Veränderung kann allerdings mit dem Western Blot nicht ebenso zuverlässig erfaßt werden wie Unterschiede im Bereich von 100 % oder mehr.

### 2.3.3 Gos-3-Zellen

Die Effekte einer Stimulation von Gos-3-Zellen mit 1 000 U Betaferon®/ml Medium sind auffällig gering. Die ApoE-Synthese der Gos-3-Zellen steigt nur schwach auf 120 bis 150 % des Ausgangswerts an, dieser Anstieg erfolgt in den ersten ein bis 2 Stunden nach Induktionsbeginn. Die ApoE-Sekretion der Gos-3-Zellen wird durch Induktion mit 1000 U Betaferon®/ml Medium gering verstärkt und nach ca. einer Stunde auf 120 bis 140 % des Ausgangswerts angehoben.

Bei der Stimulation der Gos-3-Zellen mit 100 U Betaferon®/ml Medium hingegen sind etwas deutlichere Auswirkungen zu beobachten. Die ApoE-Synthese steigt ein bis zwei Stunden nach Induktionsbeginn auf durchschnittlich 200 % des Ausgangswerts an. Die ApoE-Sekretion der Gos-3-Zellen wird durch Stimulation mit 100 U Betaferon®/ml Medium nach rund einer Stunde auf durchschnittlich 160 % des Ausgangswerts gesteigert.

### 2.3.4 Diskussion der Ergebnisse

Bei beiden astrozytären Zell-Linien wird durch den Western Blot die in den RT-PCR-Experimenten festgestellte Tendenz bestätigt. Größere Betaferon®-Konzentrationen zeigen bei den LN-405-Zellen größere Steigerungen bei allen untersuchten Parametern (ApoE-Expression, ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion), wohingegen bei Gos-3-Zellen nur bei geringeren Konzentrationen die ausgeprägtesten Auswirkungen verzeichnet werden können. Nicht in allen Experimenten konnte eine genaue Übereinstimmung bzw. ein strenges Auf-

einanderfolgen der Maxima in ApoE-Synthese und ApoE-Sekretion festgestellt werden. Eine gesteigerte Sekretion ohne vorheriges Ansteigen der Synthese kann durch posttranslationale Mechanismen erklärt werden wie z.B. die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem ApoE<sup>57,61</sup>.

## 2.4 Schlußbetrachtungen

Gos-3-Zellen, die dem physiologischen Zustand der Astrozyten *in vivo* vermutlich ähnlicher sind als die weniger differenzierten LN-405-Zellen, zeigen nach meinen Ergebnissen meßbare Reaktionen auf geringere Betaferon®-Konzentrationen. Ein solches Verhalten als Reaktion auf geringe Zytokin-Mengen mag für Stütz-Zellen von Vorteil sein, da diese ja auf eine rasche Reaktion auf Veränderungen in der Signaltransduktion angewiesen sind. Die deutlichen Effekte auf verschiedenen Ebenen der Protein-Stoffwechsels auf minimale Veränderungen im Transmitter-Stoffwechsel, ermöglichen eine adäquate und rasche Reaktion der Zelle auf innere und äußere Reize. Diese Hypothese muß allerdings in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden, um detailliertere Aussagen über die Wechselwirkungen von Zytokinen und Zellen des Gehirns bzw. Rückenmarks gewinnen zu können.

Maligne Zellen, die gerade durch den Verlust von Regulationsmechanismen unablässig proliferieren, haben vielleicht auch diese Feinabstimmung der raschen Antwort auf geringe Konzentrationen an Botenstoffen eingebüßt. Die entdifferenzierteren LN-405-Zellen zeigen dieser Hypothese entsprechend bei größeren Betaferon®-Konzentrationen eine ausgeprägte Antwort auf den Ebenen der mRNA-Expression, der Protein-Translation und der Protein-Sekretion.

Ob Untersuchungen an primären Zellkulturen von Tieren oder aber an humanen Zell-Linien die physiologischen Verhältnisse in gesunden humanen Astrozyten widerspiegeln, ist unklar. Einerseits sind Experimente an tierischen Zellen und deren Ergebnisse wahrscheinlich nicht problemlos und ohne weitere zusätzliche Untersuchungen am Menschen auf humane Verhältnisse umzulegen, da der Metabolismus von tierischen Zellen zum Teil wesentliche

Unterschiede zum physiologischen Umsatz in den entsprechenden gesunden humanen Zellen aufweist. Andererseits muß betont werden, daß auch maligne humane Zellen Unterschiede im Metabolismus zu gesunden Zellen aufweisen. Welches System also bessere Aussagen über physiologisch relevante Vorgänge in humanen Zellen ermöglicht, sollte anhand spezifischer Fragestellungen ermittelt werden.

Es kann aber noch eine zweite Deutung für die gegenläufige Dosis-Wirkungs-Beziehung bei Stimulation mit Betaferon® in den beiden astrozytären Zell-Linien versucht werden. Die beiden Zell-Linien haben einen jeweils unterschiedlichen ApoE-Genotyp, der möglicherweise Einfluß auf die Regulation der Expression der mRNA oder deren unterschiedlicher Stabilität ausübt und/oder sich auch bezüglich der Synthese und Expression des ApoE unterscheidet. Gos-3-Zellen haben den ApoE-Genotyp  $\epsilon 3/3$  und sind die weniger entarteten Zellen, weswegen spekuliert werden darf, daß die hier beobachtete Gegenläufigkeit von Betaferon®-Dosis und Steigerung von ApoE-Expression und ApoE-Synthese das physiologische Verhalten von humanen Astrozyten reflektiert. LN-405-Zellen haben den vielleicht weniger neuroprotektiv wirksamen Genotyp  $\epsilon 3/2$  und zeigen auch erst bei großen Betaferon®-Konzentrationen eine deutliche Reaktion bezüglich ihrer ApoE-Expression und ApoE-Synthese. Diese nur an wenigen Indizien festgemachten Annahmen sollten noch an anderen Zell-Linien verschiedenen Genotyps überprüft werden, wie es ja auch unter Verwendung der beiden neuronalen Zelllinien SH-SY5Y (ApoE  $\epsilon 3/3$ ) und Kelly (ApoE  $\epsilon 4/3$ ) geplant war.

### **3. Liquor-Serum-Datenbank**

#### **3.1 Pilotstudie**

##### **3.1.1 Theoretische Aspekte**

Bei vielen entzündlichen Erkrankungen des ZNS sind erhöhte ApoE-Konzentrationen im Liquor zu beobachten<sup>46</sup>. Bei MS-Patienten hingegen ist die Konzentration von ApoE im Liquor erniedrigt, die Serumkonzentration hingegen erhöht und die intrathekale Synthese vermindert<sup>37,108,176</sup>. In der Remissionsphase ist jedoch der ApoE-Index auf das bis zu Vierfache erhöht. Möglicherweise werden dadurch Remyelinisierungsprozesse (durch einen Mangel an Cholesterin zum Aufbau der Myelinmembran) beeinträchtigt, wodurch es zu irreversiblen klinischen Ausfällen und einem raschen Fortschreiten der MS kommen kann<sup>108</sup>. Zudem gibt es Anhaltspunkte, daß die ApoE-Expression je nach Genotyp unterschiedlich reguliert ist<sup>41,79</sup>.

##### **3.1.2 Diskussion der Ergebnisse**

Eine von uns am Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie durchgeführte kleine Studie zeigte in Übereinstimmung mit den oben angeführten Literaturstellen, daß MS-Patienten ungeachtet ihres ApoE-Genotyps eine signifikant niedrigere ApoE-Konzentration im Liquor haben als gesunde Kontrollpersonen von ähnlichem Alter und ähnlicher ApoE-Genotyp-Verteilung<sup>177</sup>. Bei der ApoE-Konzentration im Plasma konnte ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden. Ebenso wurden keine Unterschiede in der ApoE-Konzentration in Liquor und/oder Serum zwischen MS-Patienten im Schub (n = 14) und MS-Patienten in der Remissionsphase (n = 10) beobachtet. Die eingehendere Überprüfung der Signifikanz der beiden letzten Hypothesen, die ja bereits in der Literatur publiziert wurden, muß Studien an größeren Fallzahlen überlassen bleiben.

### **3.2 Studie über die ApoE-Konzentrationen im Liquor von drei Gruppen: MS-Patienten, Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und (neurologisch) gesunde (Kontroll-)Personen**

Es wurde anhand von größeren Patientengruppen untersucht, ob sich die ApoE-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten ( $n = 52$ ), Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen ( $n = 50$ ) und (neurologisch) gesunden Kontroll-Personen ( $n = 58$ ) unterscheiden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob bei diesen Gruppen geschlechtsspezifische Unterschiede in der ApoE-Konzentration im Liquor bestehen. Innerhalb jeder Gruppe wurde geprüft, ob das Alter einen Einfluß auf die ApoE-Konzentration im Liquor hat.

#### **3.2.1 Theoretische Aspekte**

Bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS ist die ApoE-Konzentration im Liquor in der Regel erhöht, während sie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der Demenz vom Alzheimer-Typ signifikant erniedrigt ist. Wenn eine deutliche/signifikante Abweichung der ApoE-Konzentration im Liquor nach oben oder nach unten bei MS-Patienten oder bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen festzustellen ist, so könnte sich daraus diagnostische oder sogar therapeutische Konsequenzen ergeben.

Eine Studie an insgesamt 160 Personen, die in der Ambulanz der Universitätsklinik für Neurologie lumbalpunktiert wurden, vergleicht die ApoE-Konzentration im Liquor bei den drei oben genannten Patienten-Gruppen; bei einigen Hypothesen wurde auch das Geschlecht und/oder das Alter der Patienten bzw. Personen berücksichtigt.

#### **3.2.2 Diskussion der Ergebnisse**

Die ApoE-Konzentrationen im Liquor waren bei MS-Patienten und bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen zwar niedriger als bei den Kontrollpersonen, dennoch waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant. Derselbe Vergleich wurde mit einem ähnlichen Ergebnis auch für Männer und Frauen durchgeführt. Daß die ApoE-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten und gesunden Personen nicht signifikant unterschiedlich

waren, kommt nach den ersten Ergebnissen eher überraschend. Die an den Studien teilnehmenden Individuen wurden in beiden Fällen aus Patienten der Ambulanz der Universitätsklinik für Neurologie rekrutiert, sodaß bei der Auswahl der Personen keine Einflußnahme auf die Inkludierung genommen werden konnte und nur die Bereitschaft der Patienten wesentlich war. Die Daten einzelner Personen wurden höchstens nachträglich aufgrund einer lückenhaften Dokumentation aus den Berechnungen herausgenommen

Innerhalb jeder Patienten-Gruppe wurde statistisch nachgewiesen, daß jüngere und ältere Personen keine signifikant unterschiedlichen ApoE-Konzentrationen im Liquor aufweisen. Diese Ähnlichkeit der ApoE-Werte im Liquor zwischen alt und jung erscheint plausibel, da jüngere Individuen durch die Reifung des Nervensystems generell zu eher höhere ApoE-Konzentrationen tendieren, während ältere Personen aufgrund von Reparaturprozessen höhere ApoE-Werte im Liquor zeigen können.

## LITERATUR-VERZEICHNIS

1. Brouwer D.A.J., van Doormaal J.J., und Muskiet F.A.J. (1996) Clinical chemistry of common apolipoprotein E isoforms. *J Chromatogr B* **678**: 23-41
2. Schlenck A., Bohnet K., Aguilon D., Lafaurie C., Siest G., und Visvikis S. (1. Apr. 1997) High Sensitivity of Laser-Induced Fluorescence Dedection in Capillary Gel Electrophoresis for Accurate Apolipoprotein E Genotyping. *Biotechniques* **4**: 736-742
3. Voet D. und Voet J.G. (1992) Biochemie. Verlag VCH 1. Auflage
4. Loeffler und Petrides (1990) Physiologische Chemie. Springer Verlag 4. Auflage 1988, 1. Korr. Nachdruck 1990
5. Lehninger A.L., Nelson D.L., und Cox M.M. (1998) Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag 2. Auflage
6. Snipes J.G., McGiure B.C., Norden J.J., und Freeman J.A (1. Feb. 1986) Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 1130-1134
7. Xu P.-T., Schmechel D., Qiu H.-L. *et. al.* (1999) Sialylated Human Apolipoprotein E (apoEs) Is Preferentially Associated with Neuron-Enriched Cultures from APOE Transgenic Mice. *Neurobiol Dis* **6**: 63-75
8. Feussner G., Dobmeyer J., Gröne H., Lohmer S., und Wohlfeil S. (1996) A 10bp Deletion in the Apolipoprotein  $\epsilon$  Gene Causing Apolipoprotein E Deficiency and Severe Type III Hyperlipoproteinemia. *Am J Hum Genet* **58**: 281-291
9. Heeren J., Weber W., und Beisiegel U. (1999) Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J of Cell Science* **112**: 349-359
10. Rensen P.C.N., Jong M.C., van Vark L.C. *et. al.* (24. Mar. 2000) Apolipoprotein E Is Resistant to Intracellular Degradation *in Vitro* and *in Vivo*. *J Biol Chem* **275**: 8564-8571
11. Al-Haideri M., Goldberg I.J., Galeano N.F. *et. al.* (1997) Heparan Sulfate Proteoglykan-Mediated Uptake of Apolipoprotein E-Triglyceride-Rich Lipoprotein Particles: A Major Pathway at Physiological Particle Concentrations. *Biochemistry* **36**: 12766-12772

12. Schmitt M. und Grand-Perret T. (1999) Regulated turnover of a cell surface-associated pool of newly synthesized apolipoprotein E in HepG2 cells. *J Lipid Res* **40**: 39-49
13. Ji Z.-S., Fazio S., Lee Y.-L., und Mahley R.W. (28. Jan. 1994) Secretion-Capture Role for Apolipoprotein E in Remnant Lipoprotein Metabolism Involving Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J Biol Chem* **269**: 2764-2772
14. Lucas M. und Mazzone T. (7. June 1996) Cell Surface Proteoglykans Modulate Net Synthesis and Secretion of Macrophage Apolipoprotein E. *J Biol Chem* **271**: 13454-13460
15. Huang Y., von Eckardstein A., Wu S., und Assmann G. (1995) Effects of the Apolipoprotein E Polymorphism on Uptake and Transfer of Cell-derived Cholesterol in Plasma. *J Clin Invest* **96**: 2693-2701
16. Regli F. und Mumenthaler M. (1996) Basiswissen Neurologie. Georg Thieme Verlag 1. Auflage
17. Boyles J.K., Zoellner C.D., Anderson L.J. et al. (1. Mar. 1989) A Role for Apolipoprotein E, Apolipoprotein A-I, and Low Density Lipoprotein Receptors in Cholesterol Transport during Regeneration and Remyelination of the Rat Sciatic Nerve. *J Clin Invest* **83**: 1015-1031
18. Poirier J., Bertrand P., Kogan S, Gauthier S., Davignon J., und Bouthillier D. (18. Sept. 1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**: 697-699
19. Rebeck G.W., Reiter J.S., und Strickland D.K. (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* **11**: 575-580
20. Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D.E. et al. (1993) Apolipoprotein E: High Avidity Binding to  $\beta$ -Amyloid and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer's Disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **269**: 1977-1981
21. Welsh-Bohmer K.A., Gearing M., Saunders A.M., Roses A.D., und Mirra S. (1997) Apolipoprotein E Genotypes in a Neuropathological Series from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Ann Neurol* **42**: 319-325
22. Gouras G.K., Relkin N.R., Sweeny D., Munoz D.G., Mackenzie I.R., und Gandy S. (1997) Increased Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 in epilepsy with senile plaques. *Ann Neurol* **41**: 402-404

23. Schiefermeier M., Kollegger H., Madl C. *et. al.* (2000) The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease. *Brain* **123**: 585-590
24. Schiefermeier M., Kollegger H., Madl C. *et. al.* (2000) Apolipoprotein E Polymorphism: Survival and Neurological Outcome after Cardiopulmonary Resuscitation. *Stroke* **31**: 2068-2073
25. Schiefermeier M., Kollegger H., Schwarz C. *et. al.* (1999) Apolipoprotein E Polymorphism and Neurological Outcome after Cardiopulmonary Resuscitation. *Crit Care Med* **27**: A66
26. Teasdale G.M., Nicoll J.A.R., Murray G., und Fiddes M. (1997) Association of Apolipoprotein E Polymorphism with Outcome after Head Injury. *Lancet* **357**: 1069-1071
27. Sorbi S., Nacmias B., und Piacentini S (1995) ApoE as a prognostic factor for post-traumatic coma. *Nature Med* **1**: 852 [comment]
28. Nicoll J.A.R., Roberts G.W., und Graham D.I. (1995) Apolipoprotein E  $\epsilon 4$  allele is associated with deposition of amyloid  $\beta$ -protein following head injury. *Nature Med* **1**: 135-137
29. Jordan B.D., Relkin N.R., Ravdin L.D., Jacobs A.R., Bennett A., und Gandy S. (1997) Apolipoprotein E  $\epsilon 4$  is associated with chronic traumatic brain injury in boxing. *JAMA* **278**: 136-140
30. Schwarz C. (1999) Apolipoprotein E-Genotypen und Multiple Sklerose. Diplomarbeit, Technische Universität Wien 58-79
31. Fazekas F., Strasser-Fuchs S., Kollegger H. *et. al.* (2001) Apolipoprotein E  $\epsilon 4$  is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurology* **57**: 853-857
32. Kollegger H., Schiefermeier M., Schwarz C., Kornek B., Bachner M., und Deecke L. (2000) Apolipoprotein E genotypes and the vulnerability of the human brain in Alzheimer's and Wilson's disease, multiple sclerosis and hypoxic brain damage after cardiac arrest. *J Neurol* **247/Suppl. 3**: IV 11
33. O'Toole D. und Love W.C. (2002) Interferon- $\beta$ -1b and interferon- $\gamma$  have similar inhibitory effects on apolipoprotein-E production in the monocyte/macrophage. *Mult Scler* **8**: 124-129
34. Chapman J., Sylantiev C., Nisipeanu P., und Korczyn A.D. (1999) Preliminary observations on APOE epsilon4 allele and progression of disability in multiple sclerosis. *Arch Neurol* **56**: 1484-1487

35. Evangelou N., Jackson M., Beeson D., und Palace J. (1999) Association of the APOE epsilon4 allele with disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67** : 203-205
36. Oliveri R.L., Cittadella R., Sibilgia G. *et. al.* (1999) Apo-E and risk of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* **100**: 290-295
37. Gaillard O., Gervais A., Meillet D. *et. al.* (1998) Apolipoprotein E and multiple sclerosis: a biochemical and genetic investigation. *J Neurol Sci* **158** : 180-186
38. Weatherby S.J., Mann C.L.A., Fryer A.A. *et. al.* (2000) No association between Apo-E  $\epsilon$ 4 allele and outcome and susceptibility in primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **68**: 532
39. Ferri C., Sciacca F.L., und Veglia F. (1999) Apo-E epsilon 2-4 and -491 polymorphisms are not associated with MS. *Neurology* **53**: 888-889
40. Rubinsztein D.C., Hanlon C.S., Irving R.M. *et. al.* (1994) ApoE genotypes in multiple sclerosis, Parkinson's disease, schwannomas and late-onset Alzheimer's disease. *Mol Cell Probes* **8**: 519-525
41. Siest G., Pillot T., Régis-Bailly A. *et. al.* (1995) Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* **41** : 1068-1086
42. Greenberg S.M. und Bradley T.H. (1997) Cerebral amyloid angiopathy and apolipoprotein E: Bad news for the good allele? *Ann Neurol* **41**: 701-702 [editorial]
43. Schmidt R., Schmidt H., Fazekas F. *et. al.* (1997) Apolipoprotein E Polymorphism and Silent Microangiopathy-Related Cerebral Damage. Results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* **28**: 951-956
44. Couderc R., Matieux F., Bailleul S., Fenelon G., Mary R., und Fermanian J. (1993) Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* **24**: 661-664
45. Carlsson J., Armstrong V.W., Reiber H., Felgenhauer K., und Seidel D. (1991) Clinical relevance of the quantification of apolipoprotein E in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* **196**: 167-176
46. Yamauchi K., Tozuka M., Nakabayashi T. *et. al.* (1999) Apolipoprotein E in Cerebrospinal Fluid: Relation to Phenotype and Plasma Apolipoprotein E Concentrations. *Clin Chem* **45**: 497-504
47. Rifai N., Christenson R.H., Gelman B.B., und Silverman L.M. (1987) Changes in cerebrospinal fluid IgG and Apolipoprotein E indices in patients with multiple sclerosis during demyelination and remyelination. *Clin Chem* **33**: 1155-1157

48. Blennow K., Hasse C., und Fredman P. (1994) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **5**: 2534-2536
49. Lehtimäki T., Pirttilä T., Metha P.D., Wisniewski H.M., Frey H., und Nikkari T. (1995) Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on apoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum Genet* **95**: 39-42
50. Garcia M.A., Vázquez J., Giménez C., Valdivieso F., und Zafra F. (1. Dec. 1996) Transcription Factor AP-2 Regulates Human Apolipoprotein E Gene Expression in Astrocytoma Cells. *J Neurosci* **16**: 7550-7556
51. Srivastava R.A. (1996) Regulation of the apolipoprotein E by dietary lipids occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Mol Cell Biochem* **155**: 153-162
52. Srivastava R.A., Srivastava N., Averna M. et al. (1997) Estrogen Up-regulates Apolipoprotein E (ApoE) Gene Expression by Increasing ApoE mRNA in the Translating Pool via the Estrogen Receptor  $\alpha$ -mediated pathway. *J Biol Chem* **272**: 33360-33366
53. Smith J.D., Melian A., Leff T, und Breslow J.L. (1988) Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. *J Biol Chem* **263**: 8300-8308
54. Ogbonna G., Theriault A., und Adeli K. (1993) Hormonal Regulation of human apolipoprotein E gene expression in HepG2 cells. *Int J Biochem* **25**: 635-640
55. Kayden H.J., Maschio F., und Traber M.G. (1985) The secretion of apolipoprotein E by human monocyte derived macrophages. *Arch Biochem Biophys* **239**: 388-395
56. Mazzone T., Basheeruddin K., und Pouos C. (1989) Regulation of macrophage LDL receptor and apolipoprotein E gene expression by cholesterol. *J Lipid Res* **30**: 1055-1064
57. Mazzone T. und Basheeruddin K. (1991) Dissociated regulation of macrophage LDL receptor and apolipoprotein E expression by sterol. *J Lipid Res* **32**: 507-514
58. Basheeruddin K., Rechteris C., und Mazzone T. (1992) Transcriptional and post-transcriptional control of apolipoprotein E gene expression in differentiating human monocytes. *J Biol Chem* **267**: 1219-1224
59. Basheeruddin K., Rechteris C., und Mazzone T. (1994) Evaluation of the role of Ap1-like proteins in the enhanced apolipoprotein E gene transcription accompanying phorbol ester induced macrophage differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1218**: 235-241

60. Basu S.K., Brown M.S., Ho Y.K, und Goldstein J.L. (1981) Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7545-7549
61. Brand K., Mackman N., und Curtiss L.K. (1993) Interferon- $\gamma$  Inhibits Macrophage Apolipoprotein E Production by Posttranslational Mechanisms. *J Clin Invest* **91**: 2031-2039
62. Mistry M.J., Clay M.A., Kelly M.E., Steiner M.A., und Harmony J.A.K. (1995) Apolipoprotein E restricts interleukin-dependent T lymphocyte proliferation at the G1A/G1B boundary. *Cell Immunol* **160**: 14-23
63. Pepe M.G. und Curtiss L.K. (1986) Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J Immunol* **163**: 3716-3723
64. Garner B., Baoutina A., Dean R.T, und Jessup W. (1997) Regulation of serum-induced lipid accumulation im human monocyte-derived macrophages by interferon- $\gamma$ . Correlations with apolipoprotein E production, lipoprotein lipase activity and LDL receptor related protein expression. *Atherosclerosis* **128**: 47-58
65. Zhang M.Y. und Lin R.C. (1994) Oxidative-modified and acetylated low-density lipoproteins differ in their effects on cholesterol synthesis and stimulate synthesis of apolipoprotein E in rat peritoneal macrophages by different mechanisms. *Metabolism* **43**: 1523-1530
66. Cader A.A., Steinberg F.M., Mazzone T., und Chait A. (1997) Mechanism of enhanced macrophage ApoE secretion by oxidized LDL. *J Lipid Res* **38**: 981-991
67. Cullen P., Cignarella A., Brennhausen B, Mohr S., Assmann G., und von Eckardstein A. (1998) Phenotype-dependent Differences in Apolipoprotein E Metabolism and in Cholesterol Homeostasis in Human Monocyte-derived Macrophages. *J Clin Invest* **101**: 1670-1677
68. Baskin F., Smith G.M., Fosmire J.A., und Rosenberg R.N. (1997) Altered Apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures. *J Neurol Sci* **148**: 15-18
69. Mouchel Y., Lefrancois T., Fages C, und Tardy M. (1995) Apolipoprotein E gene expression in astrocytes: developmental pattern and regulation. *Neuroreport* **7**: 205-208
70. Krul E.S. und Tang J. (1992) Secretion of Apolipoprotein E by an Astrocytoma Cell Line. *J Neurosci Res* **32**: 227-238

71. Soulié C., Mitchell V., Dupont-Wallois L. *et. al.* (1999) Synthesis of apolipoprotein E (ApoE) mRNA by human neuronal-type SK N SH-SY5Y cells and its regulation by nerve growth factor and ApoE. *Neurosci Lett* **265**: 147-150
72. Oropeza L.R., Wekerle H., und Werb Z. (1987) Expression of Apolipoprotein E by mouse brain astrocytes and its modulation by interferon- $\gamma$ . *Brain Res* **410** : 45-51
73. Zarow C. und Victoroff J. (1997) Increased Apolipoprotein mRNA in the Hippocampus in Alzheimer Disease and in Rats after Entorhinal Cortex Lesioning. *Exp Neurol* **149**: 79-86
74. Schauwecker P.E., Cogen J.P., Jiang T., Cheng H.W., Collier T.J., und McNeill T.H. (1998) Differential Regulation of Astrocytic mRNAs in the Rat Striatum after Lesions of the Cortex or Substantia Nigra. *Exp Neurol* **149**: 87-96
75. Page K.J., Hollister R.D., und Hyman B.T. (1998) Dissociation of apolipoprotein and apolipoprotein receptor in response to lesions in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* **85**: 1161-1171
76. Ali S.M., Dunn E., Oostveen J.A, Hall E.D., und Carter D.B. (1996) Induction of Apolipoprotein E mRNA in the hippocampus of the gerbil after transient global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* **38**: 37-44
77. Stoll G., Mueller H.W., Trapp B.D., und Griffin J.W. (1989) Oligodendrocytes But Not Astrocytes Express Apolipoprotein E After Injury of Rat Optic Nerve. *Glia* **2**: 170-176
78. Caillet-Boudin M.-L., Dupont-Wallois L., Soulié C., und Delacourte A. (1998) Apolipoprotein E and Tau phosphorylation in human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* **250**: 83-86
79. Lambert J.-C., Pérez-Tur J., Dupire M.J. *et. al.* (1. Nov. 1997) Distortion of allelic expression of Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **6**: 2151-2154
80. Dupont-Wallois L., Soulié C., Sergeant N. *et. al.* (1997) ApoE Synthesis in Human Neuroblastoma Cells. *Neurobiol Dis* **4**: 356-364
81. Nakai M., Kawamata T., Taniguchi T., Maeda K., und Tanaka C. (1996) Expression of Apolipoprotein E mRNA in rat microglia. *Neurosci Lett* **211**: 41-44
82. Xu P., Schmechel D., Rothrock-Christian T. *et. al.* (1996) Human Apolipoprotein E2, E3, and E4 Isoform-Specific Transgenic Mice: Human-like Pattern of Glial and Neuronal Immunoreactivity in Central Nervous System Not Observed in Wild-Type Mice. *Neurobiol Dis* **3**: 229-245

83. Nathan B.P., Bellosta S., Sanan D.A., Weisgraber K.H., Mahley R.W., und Pitas R.E. (6. May 1994) Differential Effects of Apolipoproteins E3 and E4 on Neuronal Growth in Vitro. *Science* **264**: 850-852
84. Iqbal K. und Grundke-Iqbal I. (17. Jan. 1996) Molecular mechanism of Alzheimer's neurofibrillary degeneration and therapeutic intervention. *Ann N Y Acad Sci* **777**: 132-138
85. Martel C.L., Mackic J.B., Matsubara E. *et al.* (1997) Isoform-Specific Effects of Apolipoproteins E2, E3, and E4 on Cerebral Capillary Sequestration and Blood-Brain Barrier Transport of Circulation Alzheimer's Amyloid beta. *J Neurochem* **69**: 1995-2004
86. Goedert M. (1996) Tau Protein and the Neurofibrillary Pathology of Alzheimer's Disease. *N Y Acad Sci* : 121-153
87. Deng J., Rudick V., und Dory L. (1995) Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages. *J Lipid Res* **36**: 2129-2140
88. Lucchinetti C., Brück W., und Noseworthy J.H. (2001) Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment. *Curr Opin Neurol* **14**: 259-269
89. Noseworthy J.H., Lucchinetti C., Rodriguez M., und Weinshenker B.G. (2000) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* **343**: 938-952
90. Wingerchuk D.M., Lucchinetti C., und Noseworthy J.H. (1. Mar. 2001) Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Lab Invest* **81**: 263-281
91. Kesselring J. (1997) Multiple Sklerose. Verlag Kohlhammer 3. Auflage
92. Poser C.M. (1. Dec. 1994) The dissemination of multiple sclerosis: A Viking saga? A historical essay. *Ann Neurol* **33 [suppl. 2]**: 231-243
93. Kornek B. und Lassmann H. (1999) Axonal Pathology in Multiple Sclerosis. A Historical Note. *Brain Pathol* **9**: 651-656
94. Kalman B. und Lublin F.D. (1999) The genetics of multiple sclerosis. A review. *Biomed Pharmacother* **53**: 358-370
95. Lassmann H., Brück W., und Lucchinetti C. (1. Mar. 2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* **7**: 115-121
96. Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., und Lassmann H. (2000) Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Ann Neurol* **47**: 707-717

97. Vanderlugt C.L. und Miller S.D. (1. Feb. 2002) Epitope Spreading in Immune-Mediated Diseases: Implications for Immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* **2**: 85-95
98. Vladimirova O., O'Connor J., Cahill A., Alder H., Butunoi C., und Kalman B. (1998) Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Mult Scler* **4**: 413-418
99. Reindl M., Linington C., Brehm U. *et. al.* (1999) Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* **122**: 2047-2056
100. Egg R., Reindl M., Deisenhammer F., Linington C., und Berger T. (2001) Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis. *Mult Scler* **7**: 285-289
101. Goebels N., Hofstetter H., Schmidt S., Brunner C., Wekerle H., und Hohlfeld R. (2000) Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects. Epitope spreading versus clonal persistence. *Brain* **123**: 508-518
102. DiProspero N.A., Meiners S., und Geller H.M. (1. Dec. 1997) Inflammatory Cytokines Interact to Modulate Extracellular Matrix and Astrocytic Support of Neurite Outgrowth. *Exp Neurol* **148**: 628-639
103. Popko B. und Baerwald K.D. (1999) Oligodendroglial Response to the Immune Cytokine Interferon Gamma. *Neurochem Res* **24**: 331-338
104. Kurzke J.F. (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* **33**: 1444-1452
105. Kollegger H. (1999) Was ist und was mißt der EDSS-Score. *neue horizonte* **105**: 2-3
106. Poser C.M., Paty D.W., Scheinberg L.C. *et. al.* (1. Mar. 1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* **13**: 227-231
107. McDonald W.I., Compston A., Edan G. *et. al.* (2001) Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* **50**: 121-127
108. Gervais A., Gaillard O., Plassart E., Reboul J., Fontaine B., und Schuller E. (1. Jan. 1998) Apolipoprotein E polymorphism in multiple sclerosis. *Ann Clin Biochem* **35**: 135-136

109. European Study Group on interferon-beta-1b in secondary progressive MS (1998) Placebo-controlled Multicentre Randomised Trial of Interferon  $\beta$ -1b in Treatment of Secondary Progressive Multiple Sclerosis. European Study Group on interferon-beta-1b in secondary progressive MS. *Lancet* **352**: 1491-1497
110. Panitch H.S. (1992) Interferons in Multiple Sclerosis. *Drugs* **44**: 946-962
111. Noseworthy J.H. (2003) Management of multiple sclerosis: current trials and future options. *Curr Opin Neurol* **16**: 289-297
112. Arnason B.G.W. (1999) Treatment of multiple sclerosis with interferon  $\beta$ . *Biomed Pharmacother* **53**: 344-350
113. Filippini G., Munari L., Incorvaia B. et al. (15. Feb. 2003) Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet* **361** : 545-552
114. Rudick R.A., Cohen J.A., Weinstock-Guttman B., Kinkel R.P., und Ransohoff R.M. (27. Nov. 1997) Management of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* **337**: 1604-1611
115. Arnason B.G.W. (1. Apr. 1993) Interferon beta in multiple sclerosis. *Neurology* **43**: 641-643
116. Satoh J., Paty D.W., und Kim S.U. (1996) Counteracting Effect of IFN- $\beta$  on IFN- $\gamma$ -induced Proliferation of Human Astrocytes in Culture. *Mult Scler* **1**: 279-287
117. Merrill J.E. und Benveniste E.N. (1996) Cytokines in Inflammatory Brain Lesions: helpful and harmful. **19**: 331-338
118. Galboiz Y. und Miller A. (2002) Immunological indicators of disease activity and prognosis in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* **15**: 233-237
119. Baerwald K.D. und Popko B. (1998) Developing and Mature Oligodendrocytes Respond Differently to the Immune Cytokine Interferon-Gamma. *J Neurosci Res* **52**: 230-239
120. Jeohn G., Kong L., Wilson B., Hudson P., und Hong J. (1998) Synergistic Neurotoxic Effects of Combined Treatments with Cytokines in Murine Primary Mixed Neuron / Glia Cultures. *J Neuroimmunol* **85**: 1-10
121. Seger R. und Krebs E.G. (1995) The MAPK Signaling Cascade. *FASEB J* **9**: 726-735
122. Tournier C., Pomerance M., Gavaret J.M., und Pierre M. (1994) MAP Kinase Cascade in Astrocytes. *Glia* **10**: 81-88

123. Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., und Greenberg M.E. (1995) Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331
124. Schindler C. und Darnell J.E.Jr. (1995) Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The JAK/STAT Pathway. *Ann Rev Biochem* **64**: 161-651
125. Karp C.L., Biron C.A., und Irani D.N. (1. Jan. 2000) Interferon  $\beta$  in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? *Immunology Today* **21**: 24-28
126. Rudick R.A., Ransohoff R.M., Pepler R., VandenBrug Mependorp S., Lehmann P., und Alam J. (1996) Interferon Beta Induces Interleukin-10 Expression: Relevance to Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* **40**: 618-627
127. Huang Y.-M., Hussien Y., Jin Y.-P., Söderstrom M., und Link H. (Multiple sclerosis: deficient *in vitro* responses of blood mononuclear cells to IFN- $\beta$ . *Acta Neurol Scand* **104**: 249-256
128. Jansen M. und Reinhard J.F.Jr. (1999) Interferon response heterogeneity: activation of a pro-inflammatory response by interferon  $\alpha$  and  $\beta$ . A possible basis for diverse responses to interferon  $\beta$  in MS. *J Leukocyte Biol* **65**: 439-443
129. Kozovska M.E., Hong J., Zang Y.C.Q. *et. al.* (1999) Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* **53**: 1692-1697
130. Freshney R.I. (1994) Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Verlag Wiley-Liss Third Edition
131. Garcia V., Fiol C., Hurtado I., Pinto X., Argimon J.M., und Castineiras M.J. (1994) An enzyme-linked immunosorbent assay method to measure human Apolipoprotein E levels using commercially available reagents: effects of apolipoprotein E polymorphism on serum apolipoprotein E concentration. *Anal Biochem* **223**: 212-217
132. Krul E.S. und Cole T.G. (1996) Quantification of Apolipoprotein E. *Meth Enzymol* **263**: 170-187
133. Kee P., Bais R., Sobacki S.K., Branford S., Rye K.-A., und Barter P.J. (1996) Indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma apolipoprotein E. *Ann Clin Biochem* **33**: 119-126
134. Krassnoff P., Pisani T., und Long S. (1996) Quantitative Assay for the Determination of ApoE in Serum and Plasma. *Journal of Clinical Ligand Assay* **19**: 172-176

135. Gérard H.C., Wang G.F., Balin B.J., Schuhmacher H.R., und Hudson A.P. (1. Jan. 1999) Frequency of apolipoprotein E (APOE) allele types in patients with *Chlamydia*-associated arthritis and other arthritides. *Microbial Pathogenesis* **26**: 35-43
136. Grassi G., Zentilin L., Tafuro S. *et. al.* (1994) A rapid procedure for the quantitation of low abundance RNAs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **22**: 4547-4549
137. Growdon W.B., Cheung B.S., Hyman B.T., und Rebeck G.W. (Lack of allelic imbalance in APOE  $\epsilon$ 3/4 brain mRNA expression in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **272**: 83-86
138. Dobmeyer J.M., Rexin M., Dobmeyer T.S., Klein S.A., Rossol R., und Feussner G. (1998) Quantitation of apolipoprotein  $\epsilon$  gene expression by competitive polymerase chain reaction in a patient with familial apolipoprotein E deficiency. *Clin Chim Acta* **274**: 119-137
139. Siebert P.D. und Larrick J.W. (1993) PCR MIMICS: Competitive DNA Fragments for Use as Internal Standards in Quantitative PCR. *Biotechniques* **14**: 244-249
140. Förster E. (1994) An Improved General Method to Generate Internal Standards for Competitive PCR. *Biotechniques* **16**: 18-20
141. Wang A.M., Doyle M.V., und Mark D.F. (1. Dec. 1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9717-9721
142. Bouaboula M., Legoux P., Pességué P. *et. al.* (25. Oct. 1992) Standardization of mRNA Titration Using a Polymerase Chain Reaction Method Involving Co-amplification with a Multispecific Internal Control. *J Biol Chem* **267**: 21830-21838
143. Panduro A., Lin-Lee Y.-C., Chan L., und Shafritz D.A. (1990) Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Apolipoprotein E, A-I, and A-II Gene Expression in Normal Rat Liver and during Several Pathophysiological States. *Biochemistry* **29**: 8430-8435
144. Siebert P.D. und Larrick J.W. (1992) Competitive PCR. *Nature* **359**: 557-558
145. Becker-Andre M. und Hahlbrock K. (1989) Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Research* **17**: 9437-9446
146. Henco K. und Heibey M. (1990) Quantitative PCR: the determination of template copy numbers by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *Nucleic Acids Research* **18**: 6733-6734

147. Poirier J., Hess M., May P.C., und Finch C.E. (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Mol Brain Res* **11**: 97-106
148. Wang A.M. (1989) Quantitation of mRNA by PCR ... *Biochemistry* **86**: 9717-9721
149. Lee J.J. und Costlow N.A. (1987) A Molecular Titration Assay to Measure Transcript Prevalence Levels. *Meth Enzymol* **152**: 633-648
150. Srivastava R.A., Pflieger B.A., und Schonfeld G. (1991) Expression of LDL receptor, apolipoprotein B, apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-IV mRNA in various mouse organs as determined by a novel RNA-excess solution hybridization assay. *Biochim Biophys Acta* **1090**: 95-101
151. Pape H.E., Marotti K.R., und Melchior G.W. (1990) An improved method for precise quantitation of cellular and tissue apolipoprotein A-I mRNA levels by use of an internal standard. *J Lipid Res* **31**: 727-733
152. Williams D.L., Newman T.C., Shelness G.S., und Gordon D.A. (1986) Measurement of apolipoprotein mRNA by DNA-excess solution hybridization with single stranded probes. *Meth Enzymol* **128**: 671-689
153. Chomczynski P. und Sacchi N. (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159
154. Quantitative PCR Protocols. (1999) herausgegeben von Kochanowski B. und Reischl U. Verlag Humana Press 1. Auflage
155. Lucchinetti C., Noseworthy J.H., und Rodriguez M. (1997) Promotion of endogenous remyelination in Multiple Sclerosis. *Mult Scler* **3**: 71-75
156. Berger T., Rubner P., Schautzer F. et. al. (10. July 2003) Antimyelin Antibodies as a Predictor of Clinically Definite Multiple Sclerosis after a First Demyelinating Event. *N Engl J Med* **349**: 139-145
157. Kornek B., Storch M.K., Weissert R. et. al. (1. July 2000) Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis. A Comparative Study of Axonal Injury in Active, Inactive, and Remyelinated Lesions. *Am J Pathol* **157**: 267-276
158. Kerschensteiner M., Gallmeier E., Behrens L. et. al. (1. Mar. 1999) Activated Human T cells, B Cells, and Monocytes Produce Brain-derived Neurotrophic Factor In Vitro and in Inflammatory Brain Lesions: A Neuroprotective Role of Inflammation? *J Exp Med* **189**: 865-870
159. Jacobs L.D., Beck R.W., Simon J.H. et. al. (28. Sept. 2000) Intramuscular Interferon Beta -1a Therapy Initiated During a First Demyelinating Event in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* **343**: 898-904

160. Comi G., Filippi M., Barkhof F. *et. al.* (19. May 2001) Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* **357**: 1576-1582
161. Rubio N. (1997) Interferon- $\gamma$  induces the expression of immediate early genes *c-fos* and *c-jun* in astrocytes. *Immunology* **91**: 560-564
162. Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., und Lassmann H. (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* **122**: 2279-2295
163. Werring D.J., Brassat D., Droogan A.G. *et. al.* (2000) The pathogenesis of lesions and normal-appearing white matter changes in multiple sclerosis. A serial diffusion in MRI study. *Brain* **123**: 1667-1676
164. Chang A., Nishiyama A., Peterson J., Prineas J., und Trapp B.D. (1. Sept. 2000) NG2-Positive Oligodendrocyte Progenitor Cells in Adult Human Brain and Multiple Sclerosis Lesions. *J Neurosci* **20**: 6404-6412
165. Lovas G., Szilágyi N., Majtényi K, Palkovits M., und Komoly S. (2000) Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* **123**: 308-317
166. Bitsch A., Kuhlmann T., Da Costa C., Bunkowski S., Polak T., und Brück W. (2000) Tumour Necrosis Factor Alpha mRNA Expression in Early Multiple Sclerosis Lesions: Correlation With Demyelinating Activity and Oligodendrocyte Pathology. *Glia* **29**: 366-375
167. Fazekas F., Strasser-Fuchs S., Schmidt H. *et. al.* (2000) Apolipoprotein E genotype related differences in brain lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**: 25-28
168. Høgh P., Blinkenberg M., und Jorgensen O.S. (1998) Apolipoprotein E (APOE) and multiple sclerosis: impact of the epsilon4 allele on susceptibility, clinical type and progression rate [abstract]. *Eur J Neurol* **5 [suppl 3]**: 121
169. Weatherby S.J., Mann C.L., Davies M.B. *et. al.* (1. Feb. 2000) Polymorphisms of apolipoprotein E; outcome and susceptibility in multiple sclerosis. *Mult Scler* **6**: 32-36
170. Lynch J.R., Tang W., Wang H. *et. al.* (2003) ApoE genotype and an apoE-mimetic peptide modify the systemic and CNS inflammatory response. *J Biol Chem* [in press]
171. Laskowitz D.T., Thekdi A.D., Thekdi S.D. *et. al.* (1. Jan. 2001) Downregulation of Microglial Activation by Apolipoprotein E and ApoE-Mimetic Peptides. *Exp Neurol* **167**: 74-85

172. Barger S.W. und Harmon A.D. (28. Aug. 1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* **388**: 878-881
173. Misra U.K., Adlahka C.L., Gawdi G., McMillian M.K., Pizzo S.V., und Laskowitz D.T. (2001) Apolipoprotein E and mimetic peptide initiate a calcium-dependent signaling response in macrophages. *J Leukocyte Biol* **70**: 677-683
174. Misra U.K., Chu C.T., Gawdi G., und Pizzo S.V. (1994) The relationship between low density lipoprotein-related protein/alpha 2-macroglobulin (alpha 2M) receptors and the newly described alpha 2M signaling receptor. *J Biol Chem* **269**: 18303-18306
175. Boutros T., Croze E., und Yong V.W. (1997) Interferon-beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *J Neurochem* **69**: 939-946
176. Gaillard O., Gervais A., Meillet D., Delattre J., Lyon-Caen O., und Schuller E. (1. Mar. 1996) Apolipoprotein E intrathecal synthesis is decreased in multiple sclerosis patients. *Ann Clin Biochem* **33**: 148-150
177. Schwarz C., Bachner M., Schiefermeier M., und Kollegger H. (2002) Intrathecal apolipoprotein E production is reduced in multiple sclerosis. *Laeknabladid, The Icelandic Medical Journal* **43**: 41 (P09)
178. Felgenhauer K. und Beuche W. (1999) Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. 12-19
179. Thomas D. (1998) Labor und Diagnose. 1341-1345
180. Gelman B.B., Rifai N., Christenson R.H., und Silverman L.M. (1988) Cerebrospinal and plasma apolipoproteins in patients with multiple sclerosis. *Ann Clin Lab Sci* **18**: 46-52

**Angaben zur Person**

---

**Geboren am:** 01.07. 1973 in Wien  
**Staatsangehörigkeit:** Österreich  
**Familienstand:** ledig  
**Adresse:** Gölsdorfasse 2/1/13, 1010 Wien  
**e-mail:** claudia.schwarz@univie.ac.at  
**Telefon:** 0676/610 45 75

**Ausbildung**

---

1999- Doktoratsstudium der technischen Wissenschaften  
1991 – 1999 Studium der Technischen Chemie an der Technischen Universität Wien, Studienzweig Biotechnologie, Biochemie und Lebensmittelchemie an der Technischen Universität in Wien  
1983 - 1991 AHS des Instituts Sacré-Coeur in Wien  
Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

**Berufserfahrungen**

---

2001 – 2003 Projekt „Über den Einfluß von Interferonen auf die Sekretion von Apolipoprotein E und die Regulation der mitogen-aktivierten Protein-kinasen“, finanziert vom Jubiläumsfonds der Oesterreichischen Nationalbank, durchgeführt am Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie, Universität Wien (AKH Wien)  
2000 - 2001 Vertragsassistent im Forschungslabor der Universitätsklinik für Neurologie  
1993 – 1996 Diverse Ferrialpraktika im In- und Ausland

**Weitere Qualifikationen**

---

**Sprachen:** Englisch verhandlungsfähig in Wort und Schrift  
Französisch fließend in Wort und Schrift  
**EDV:** MS Office (Word, Excel, Outlook, PowerPoint),  
Adobe Acrobat, Internet (Datenrecherche, email, etc.),  
SigmaPlot, NIH Image u.a.  
**Fachliches:** RT-PCR, Western Blot, ELISA, Zellkultur von neuronalen und astrozytären Zellen, HPLC; Kurs: Scientific Writing Course (Verfassung von Publikationen in der Wissenschaft)

**Interessen**

---

Literatur, Musik, Reisen, Tanzen, Reiten (Teilnahme an und Mitarbeit bei Organisation und Durchführung von internationalen Turnieren)