

# Expression von CNTFR $\alpha$ in humanem Muskel- und Nervengewebe

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Ursula Ragoß

aus

Jülich

Berichter: Herr Professor  
Dr. med. J. Weis

Herr Universitätsprofessor  
Dr. rer. nat. Dr. med. habil. H. Korr

Tag der mündlichen Prüfung: 28. August 2000

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Das Konzept der neurotrophen Faktoren	1
1.2 Ciliary neurotrophic factor (CNTF) und sein Rezeptor	3
1.3 Klinische Aspekte	7
1.4 in situ-Hybridisierung	10
1.5 Problemstellung der Studie	13
<b>2 Material und Methoden</b>	15
2.1 Sonde	15
2.1.1 Protokoll zur Sondenherstellung	17
2.2 Dot Blots	17
2.2.1 Dot Blot-Protokoll zur Bestimmung der Konzentration der Sonde	18
2.2.2 Dot Blot-Protokoll zur Bestimmung der Spezifität der Sonde	18
2.3. Vorbereitung der Objektträger	19
2.4 Gewebe: Auswahl und Aufarbeitung	19
2.5 Durchführung der in situ-Hybridisierung	20
<b>3 Ergebnisse</b>	23
3.1 in vitro-Transkription: Konzentration und Spezifität der Sonde	23
3.2 in situ-Hybridisierung	24
3.2.1 Muskelgewebe	24
3.2.2 Periphere Nerven	27
3.3.3 Sonstige markierte Zellen/Gewebe	27
<b>4 Diskussion</b>	29
4.1 Expression in Skelettmuskulatur	29
4.2 Expression in peripheren Nerven	29
4.3 Expression in anderen Zelltypen	29
4.4 Neurotrophe Faktoren in normaler und denervierter Skelettmuskulatur	30
4.5 Ausblick	32
<b>5 Zusammenfassung</b>	34
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	36

---

## **1 Einleitung**

### **1.1 Das Konzept der neurotrophen Faktoren**

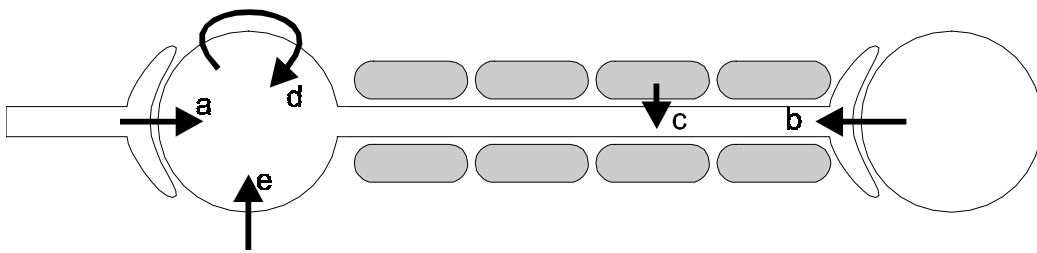
Die Zellen des Nervensystems sind hochspezialisiert. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen des Organismus sind Nervenzellen nahezu unersetzlich. Gehen Neurone zugrunde, so gehen Funktionen verloren. In gewissem Umfang können diese durch andere Neurone übernommen werden, häufig sind die Schäden jedoch irreversibel.

Seit langem ist bekannt, daß während der Embryonalentwicklung des Nervensystems ein Überschuß an Nervenzellen gebildet wird. Während der weiteren Entwicklung geht ein Teil der Neurone wieder zugrunde. Es wurde postuliert, daß zu innervierendes Gewebe Überlebensfaktoren für die innervierenden Neurone bildet, wodurch dieser natürliche Nervenzelltod limitiert wird (Purves, 1986; Oppenheim, 1991). So läßt sich auch erklären, wie der Organismus Neuron und Zielgewebe zusammenbringt. Die sich entwickelnden Neurone konkurrieren um begrenzte Mengen eines vom Zielgewebe gebildeten spezifischen Stoffes, der ihre Überlebensfähigkeit verbessert. Die Neurone, die nicht rechtzeitig ihr Zielgewebe finden, unterliegen dem programmierten Zelltod (Burek und Oppenheim, 1996; Korsching, 1993).

Mit NGF (nerve growth factor) wurde 1954 der erste neurotrophe Faktor entdeckt (Levi-Montalcini et al., 1954). Untersuchungen zeigten, daß dieses Protein das Überleben, das Wachstum von Zellfortsätzen und die Neurotransmitterproduktion der Sympathicusneurone des peripheren Nervensystems (PNS) reguliert. NGF wird von Zielzellen gebildet und von Sympathicusneuronen spezifisch gebunden und internalisiert. Zusammen mit dem Rezeptormolekül wird es zum Zellkörper transportiert, wo der Faktor seine Wirkung entfaltet.

Zunächst wurde angenommen, daß andere neurotrophe Faktoren ähnlich funktionieren. Es entstand die klassische Vorstellung von verschiedenen, voneinander unabhängigen retrograden Botenstoffen, die in bestimmten Zielgebieten gebildet werden und daher nur auf bestimmte Neuronentypen wirken könnten. Tatsächlich gibt es eine ganze Molekülgruppe, auf die dieses Konzept teilweise zutrifft. Zu dieser Familie der sog. Neurotrophine gehören: nerve growth factor, NGF (Levi-Montalcini, 1987), Neurotrophin-3 und -4/5, NT-3, NT-4/5 und brain derived neurotrophic factor, BDNF (Leibrock et al., 1989; Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990; Berkemeier et al., 1991; Halböök et al., 1991).

Die vielfältigen Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet haben gezeigt, daß Wachstum und Differenzierung von Nervenzellen durch zahlreiche weitere Faktoren beeinflusst werden. So ist nicht nur ein Einfluß von zu innervierenden bzw. innervierten Zellen (also der beschriebene retrograde Mechanismus) denkbar. Auch Einflüsse von afferenten Zellen (anterograder Mechanismus), der umhüllenden Gliazellen (lokaler trophischer Einfluß) oder ein auto- bzw. parakriner Mechanismus (die Nervenzelle produziert selbst für sich und benachbarte Neurone Wachstums- und Differenzierungsfaktoren) sind möglich.



*Abb.1: Schematische Darstellung möglicher Quellen trophischer Faktoren (a: afferentes Neuron, b: innervierte Zelle, c: umhüllende Gliazellen, d: autokriner Mechanismus, e: endo-/parakriner Mechanismus). Modifiziert nach (Korsching, 1993).*

Zudem wirken die bekannten neurotrophen Faktoren längst nicht so spezifisch wie ursprünglich angenommen. Ein einzelnes Neuron kann auf verschiedene Faktoren reagieren, und ein einzelner Faktor beeinflusst diverse Neuronpopulationen. Auf der molekularen Ebene hängen diese Wirkungen sowohl vom Vorhandensein der Faktoren als auch von der Verfügbarkeit des Faktors für die Nervenzelle ab. Dazu muß der Faktor die Zelle erreichen können. Außerdem müssen ein Rezeptor sowie ein intrazellulärer Signalweg für die Vermittlung seiner Wirkung vorhanden sein. Die Expression der einzelnen Komponenten ist nicht nur vom Zelltyp, sondern auch von dessen Entwicklungsphase abhängig - zum räumlichen Aspekt kommt also ein zeitlicher. Es wird vermutet, daß Wirkungsabfolgen verschiedener Faktoren nötig sind, die zur korrekten Differenzierung und Erhaltung der Zellgruppen führen. Im einzelnen sind diese Verhältnisse noch nicht geklärt.

In den letzten Jahren wurden außer den klassischen Neurotrophen (s.o.) eine Reihe anderer Moleküle mit neuropoetischer Wirkung entdeckt. Diese Proteine sind mit den bisher gefundenen Molekülen mit neurotropher Wirkung nicht verwandt, weisen aber Ähnlichkeiten mit bekannten Zytokinen auf. Daher werden sie als neuropoetische Zytokine oder Neurozytokine bezeichnet (Bazan, 1990a; Bazan, 1990b; Bazan, 1991; Patterson, 1992; Korsching, 1993; Unsicker et al., 1992a).

Hierzu gehören: ciliary neurotrophic factor (CNTF), Interleukin-6 (IL-6), Cardiotrophin-1 (CT-1), leukemia inhibitory factor (LIF) und Oncostatin M (OSM).

Nach der ursprünglichen Definition sind Zytokine für die Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems und anderen Zellen des Organismus verantwortlich. Zudem sind für einige Zytokine Wirkungen auf Neurone (Patterson, 1992; Martinou et al., 1992; Hughes et al., 1993; Yamamori et al., 1989; Cheema et al., 1994; Ip, 1998) und hämatopoetische Zellen (Patterson, 1992) sowie auf die Expression entzündungsassoziierter Proteine (Schooltink et al., 1992; Baumann et al., 1993) bekannt. Umgekehrt fand sich ein neurotropher Effekt für Erythropoetin, einen bekannten hämatopoetischen Faktor (Campana et al., 1998). Die Sequenzen der Gene für die o.g. Zytokine sind in den bisher untersuchten Säugetierspezies hochkonserviert. Ein von einer Spezies produzierter Faktor kann also auf Zellen anderer Arten wirken. Zwischen den neurotrophen Zytokinen gibt es nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Gemeinsamkeiten (Patterson, 1992; Satoh et al., 1988; Hama et al., 1991; Kushima und Hatanaka, 1992). Die Rezeptoren für diese Stoffe sind mittlerweile bekannt; sie bestehen aus mehreren z. T. identischen Untereinheiten (Bazan, 1990b; Gearing et al., 1992; Liu et al., 1992; Stahl und Yancopoulos, 1993; Stahl et al., 1993; Murakami et al., 1993).

## 1.2 Ciliary neurotrophic factor (CNTF) und seine Rezeptoren

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) wurde nach seiner Wirkung auf die Neurone des Ganglion ciliare von Hühnerembryonen benannt (Adler et al., 1979; Barbin et al., 1984; Manthorpe et al., 1985; Unsicker et al., 1992b; Nishi, 1994). Die Ganglienzellen gehören zum parasymphatischen Nervensystem und innervieren Iris, Choroidea und Ziliarkörper. Diese Ganglien wurden schon lange für experimentelle Studien benutzt, da sie der Präparation leicht zugänglich sind und vergleichsweise viele Neurone (mehrere tausend) besitzen. Während der zweiten Entwicklungswoche des Hühnerembryos geht etwa die Hälfte der Neurone zugrunde. Auf der Suche nach dem trophischen Agens, das die andere Hälfte der Zellen überleben läßt, wurde CNTF entdeckt. Explantierte Neurone ließen sich unter basalen Bedingungen nur 24 h kultivieren. Zusammen mit verschiedenen Gewebsextrakten - nicht nur aus dem natürlichen Zielgewebe - überlebten sie und zeigten ein Wachstum von Fortsätzen (Neuriten). Isolierung und Sequenzierung des neurotrophen Faktors gelangen, und seit Anfang der neunziger Jahre kann CNTF gentechnisch erzeugt werden (Stöckli et al., 1989; Lin et al., 1989). Das menschliche CNTF-Gen konnte auf Chromosom 11 lokalisiert werden (Giovannini et al., 1993; Yokoji et al., 1995).

In vivo wird CNTF in verschiedenen Zelltypen und Regionen gebildet. Eine der reichsten Quellen sind die Hüllen der peripheren Nerven. Die Schwannschen Zellen produzieren große Mengen an CNTF (Stöckli et al., 1989; Sendtner et al., 1992b; Friedman et al., 1992; Rende et al., 1992). Auch im ZNS wird CNTF gebildet; dort sind aktivierte Astrozyten die Hauptproduzenten (Stöckli et al., 1991; Ip und Yancopoulos, 1992). CNTF-Protein und CNTFmRNA konnten in vielen ZNS-Abschnitten detektiert werden (Sendtner et al., 1994a).

Während der Embryonalentwicklung der Neurone konnte nur eine minimale CNTF-Bildung nachgewiesen werden. Auf diese scheint CNTF also wenig Einfluß zu haben. Hierfür spricht auch, daß sich Mäuse, denen das CNTF-Gen fehlt, prä- und postnatal zunächst völlig normal entwickeln (Masu et al., 1993). Die CNTF-Expression nimmt postpartal zu, hierbei gibt es zwischen den Gewebetypen deutliche Unterschiede.

CNTF kann viele neuronale Zelltypen beeinflussen, außer den o.g. cholinergen Ganglienzellen (Barbin et al., 1984) u.a. Spinalganglienzellen (Skaper und Varon, 1986), Motoneurone (Sendtner et al., 1990; Arakawa et al., 1990), verschiedene Neuronentypen des autonomen Nervensystems (Rao et al., 1990) und hippocampale Neurone (Ip et al., 1991). Applikation von CNTF verhindert das programmierte Absterben von motorischen Vorderhornzellen der Maus in vivo während der Entwicklung (Wewetzer et al., 1990; Oppenheim et al., 1991). Er hemmt die retrograde Degeneration von motorischen Vorderhornzellen (Sendtner et al., 1990) und von ZNS-Neuronen (Hagg et al., 1992; Clatterbuck et al., 1993; Hagg und Varon, 1993) nach Durchtrennung der zugehörigen Axone. CNTF induziert zudem das Aussprossen von Kollateralen motorischer Nervenfasern aus den distalen Axonabschnitten und unmittelbar an den motorischen Endplatten (Gurney et al., 1992; Kwon und Gurney, 1994). An kultivierten Motoneuronen induziert exogen appliziertes CNTF ein Neuritenwachstum und verbessert die Überlebensfähigkeit (Oppenheim et al., 1991).

Aber auch auf nichtneuronale Zellen wirkt CNTF. Es trägt zur Astrozytendifferenzierung (Hughes et al., 1988) und -aktivierung (Hudgins und Levison, 1998) bei. Reaktive Astrozyten wiederum exprimieren vermehrt CNTF (Lee et al., 1998). CNTF induziert entzündliche Reaktionen in Leberzellen (Dittrich et al., 1994; Schooltink et al., 1992). Es gibt auch Hinweise auf einen direkten trophischen Effekt an Muskelfasern, also eine Wirkung direkt am Muskel ohne Vermittlung des Nervensystems (Forger et al., 1993; Helgren et al., 1994).

CNTF verfügt über keine hydrophobe Signalsequenz, die normalerweise die Ausschleusung eines Proteins aus der produzierenden Zelle vermittelt (Stöckli et al., 1989). Dies weist darauf hin, daß es sich bei CNTF um einen in den produzierenden Zellen bevorrateten Stoff für den Fall einer Läsion handelt. Bei Schädigungen von Schwannzellen und Astrozyten könnte freiwerdendes CNTF dann eine Wirkung z. B. auf regenerierende Nervenfasern entfalten (Sendtner et al., 1992b). Andererseits könnte auch ein bisher unbekannter Exkretionsmechanismus vorliegen.

Die Tertiärstruktur von CNTF ähnelt der Konfiguration von LIF, OSM, CT-1 und IL-6. So schien es wahrscheinlich, daß auch die Rezeptor- und Signalmechanismen ähnlich sein könnten. Tatsächlich haben diese Moleküle ähnliche, z.T. identische Rezeptoruntereinheiten (Bazan, 1990b; Gearing et al., 1992; Liu et al., 1992; Stahl und Yancopoulos, 1993; Stahl et al., 1993; Murakami et al., 1993).

*Tabelle 1: Rezeptorkomponenten neurotrophischer Zytokine. In allen vier Rezeptorsystemen ist gp130 die signaltransduzierende membranständige Komponente. OSM bindet an die gp130-, LIF an die LIF-R-Komponente des Heterodimers (Rose-John und Heinrich, 1994).*

Faktor	1. Rezeptor-komponente	2. Rezeptor-Komponente	3. Rezeptor-komponente
CNTF	gp130	LIF-R	(s)CNTF-R
IL-6	gp130	gp130	(s)IL-6-R
OSM	gp130	LIF-R	-
LIF	gp130	LIF-R	-

Der CNTF-Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten (Davis et al., 1991; Davis und Yancopoulos, 1993; Davis et al., 1993b). Zwei davon sind membrangebunden: gp130 und LIF-Rezeptor  $\beta$  (LIFR $\beta$ ). Die spezifische ligandenbildende Untereinheit CNTF-Rezeptor  $\alpha$  (CNTFR $\alpha$ ) kann sowohl membrangebunden als auch löslich vorliegen (Davis et al., 1993a). Das Molekül verfügt nicht über eine transmembranöse Domäne, sondern ist mittels einer GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Bindung in der Zelloberfläche verankert (Davis et al., 1991). Diese Kontaktstelle ist durch Phospholipase C spaltbar. Das Prinzip eines solchen löslichen Rezeptors ist nicht neu (Rose-John und Heinrich, 1994), überraschend war aber der daraus resultierende Effekt. Üblicherweise inhibieren lösliche Rezeptoren die Wirkung des Liganden, indem sie die Konzentration des freien Liganden verringern. Der Komplex aus CNTF und seiner spezifischen Rezeptoruntereinheit ist hingegen biologisch aktiv und ermöglicht CNTF-vermittelte Wirkungen an nicht CNTF-responsiven Zellen (Davis et al., 1993a).

Durch den Komplex CNTF/CNTFR $\alpha$  können Zellen, die LIF-Rezeptoren tragen, aktiviert werden. CNTF bindet erst an CNTFR $\alpha$ , assoziiert sich dann mit gp 130 und schließlich mit LIFR $\beta$ . Die intrazelluläre Signalkaskade wird dann durch Aktivierung zyttoplasmatischer Tyrosinkinase (sog. Jak-Tyk Kinasen) in Gang gesetzt (Stahl und Yancopoulos, 1994; Bonni et al., 1993). Das menschliche Gen für CNTFR $\alpha$  konnte auf Chromosom 9 lokalisiert werden (Donaldson et al., 1993).

Wie für den Rezeptor eines neurotrophischen Faktors erwartet, wurden CNTFR $\alpha$ -Transkripte vor allem innerhalb des Nervensystems gefunden (Kirsch und Hofmann, 1994; Ip et al., 1993; MacLennan et al., 1994; MacLennan et al., 1996; Kordower et al., 1997; Lee et al., 1997; Ip et al., 1993). Außerdem wurde eine Expression in quergestreifter Muskulatur festgestellt (Ip et al., 1993). Dies ließ eine unerwartete Rolle von CNTF im Muskelstoffwechsel vermuten, die sich in einem direkten trophischen Effekt auf denervierte Muskulatur von Ratten manifestiert (Helgren et al., 1994; Forger et al., 1993).

Das Ausmaß der Expression von CNTFR $\alpha$  bei Ratten ist durch Axonschädigung beeinflussbar. Durchtrennung des Ischiasnervs führte zu verstärkter Expression von CNTFR $\alpha$  sowohl im Rückenmark (Mata et al., 1993) als auch in Fasern der quergestreiften Muskulatur (Davis et al., 1993a; Helgren et al., 1994). Der retrograde axonale Transport von CNTF ist bei Ratten nach Läsion eines peripheren Nerven verstärkt (Curtis et al., 1993). Auch durch Aktivität/Belastung und Verletzungen auf Ebene der Skelettmuskulatur (Guillet et al., 1998) sowie durch das Alter der Versuchstiere (Guillet et al., 1999) wird der Grad der CNTFR $\alpha$ -Expression beeinflusst.

Nach Denervation von Skelettmuskulatur von Hühnern fand sich hingegen interessanterweise eine geringere Expression von CNTFR $\alpha$  im Muskel im Vergleich zu innervierter Muskulatur (Ip et al., 1996).

An humanem Material konnte gezeigt werden, daß die CNTFR $\alpha$ -Expression bei chronischer neurogener Muskelatrophie durch Denervation aufgrund peripherer Neuropathien und aufgrund von Motoneuron-Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) gesteigert wird (Weis et al., 1998). Es gibt also speziestypische Unterschiede in der Regulation der CNTFR $\alpha$ -Expression. Der freie Rezeptor könnte beim Menschen und anderen Säugern die Reinnervation der Muskelfasern beeinflussen, u.a. indem er zusammen mit CNTF auch auf Zellen wirkt, die keinen membranständigen CNTFR $\alpha$  aufweisen (Ip und Yancopoulos, 1992).

Mäuse, denen das Gen für CNTF fehlt, weisen postpartal nur geringe motorische Defizite auf. Die Entwicklung des Nervensystems scheint also auch ohne CNTF zu funktionieren. In der weiteren Entwicklung dieser sog. CNTF-„knockout“-Mäuse zeigt sich jedoch eine Degeneration der motorischen Vorderhornzellen des Rückenmarks und damit einhergehend ein Kraftverlust (Masu et al., 1993). Wird zusätzlich das Gen für LIF ausgeschaltet, werden die Motoneurone erheblich früher und weitreichender geschädigt (Sendtner et al., 1996). Mäuse, deren CNTFR $\alpha$ -Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde, sterben kurz nach der Geburt (DeChiara et al., 1995). Diese Ergebnisse zeigen, daß CNTFR $\alpha$  für die normale Entwicklung des Nervensystems wichtiger ist als CNTF. Möglicherweise existiert sogar ein weiterer, bisher unbekannter Ligand für den CNTF-Rezeptor (Ip und Yancopoulos, 1996).

### 1.3 Klinische Aspekte

Das Konzept der trophischen Interaktion von Zielzelle/-gewebe und Neuron impliziert therapeutische Ansätze. Das therapeutische Potential erstreckt sich auf eine Vielzahl neurologischer Störungen, darunter traumatische Prozesse, neurodegenerative Erkrankungen und Muskelerkrankungen. Die Applikation eines neurotrophen Faktors könnte die Überlebensfähigkeit der betroffenen Neurone verbessern.

Die bisher erwähnten Studien weisen auf eine wichtige Rolle von CNTF und CNTFR $\alpha$  für den Erhalt der Funktion der Motoneurone und für die axonale Regeneration hin. Diese Wirkungen wurden bereits teilweise experimentell überprüft. Nach Durchtrennen eines peripheren Nerven folgt häufig die Degeneration zahlreicher zugehöriger Neurone. Lokal appliziertes CNTF verhinderte diesen Zelltod (Sendtner et al., 1990; Clatterbuck et al., 1993; Hagg et al., 1992; Hagg und Varon, 1993). Im Fall der Motoneurone wird so die Reinnervation des denervierten Muskels verbessert. Von besonderer Bedeutung ist die Entdeckung, daß CNTF bei hereditären Motoneuron-Erkrankungen der Maus, die als Tiermodell spinaler Muskelatrophien und der amyotrophen Lateralsklerose gelten, die Degeneration der Motoneurone hemmt (Sendtner et al., 1992a; Helgren et al., 1992; Holmlund et al., 1992; Mitsumoto et al., 1994; Sendtner et al., 1997). So wurde die Möglichkeit diskutiert (Sendtner et al., 1992a; Sendtner et al., 1994b; Lindsay, 1994) und in klinischen Studien überprüft (Anonymous, 1995; Anonymous, 1996), CNTF zur Therapie bei einer menschlichen Motoneuronenerkrankung einzusetzen: der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS).

Die ALS ist eine progressive degenerative Erkrankung des 1. (kortikalen) und 2. (spinalen) Motoneurons unklarer Ätiologie. Sie manifestiert sich meist zwischen dem 40. und 65. Lebensjahr mit asymmetrischen Paresen, Muskelatrophie, Spastik, Krämpfen und Faszikulationen. Die Prognose ist schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur ca. 20%. Eine kurative Behandlung gibt es bisher nicht.

In den Motoneuronen (Duberley et al., 1995) und in der Muskulatur (Weis et al., 1998) von ALS-Patienten wurde eine erhöhte Transkriptionsrate von CNTFR $\alpha$  festgestellt. Im Urin zeigte sich entsprechend eine erhöhte Ausscheidung von CNTFR $\alpha$  (Weis et al., 1998). Die Steigerung der Rezeptorexpression könnte als Kompensationsmechanismus auf eine sinkende Verfügbarkeit von CNTF interpretiert werden.

Die klinischen Prüfungen zeigten tatsächlich bei einigen ALS-Patienten eine subjektive Befundverbesserung nach CNTF-Gabe (Brookes et al., 1993). Diese Wirkung wurde aber durch erhebliche systemische Nebenwirkungen, sog. zytokinartige Effekte wie Fieber (Shapiro et al., 1993) und Gewichtsverlust, erkaufte. Die Nebenwirkungen sind u. U. durch die gewählte Applikationsform (subkutane Injektionen, also systemische Applikation) mitbedingt. Die Plasmahalbwertszeit von systemisch gegebenem CNTF beträgt nur weniger als 3 Minuten (Dittrich et al., 1994). Nach Assoziation mit sCNTFR $\alpha$  (s = soluble: löslich) und  $\alpha$ 2-Makroglobulin (Liebl und Koo, 1993) wird der Großteil des systemisch verabreichten CNTF in der Leber aufgenommen und führt dort zur Induktion von Akute-Phase-Proteinen, also einer Entzündungsreaktion mit entsprechenden Symptomen (Schooltink et al., 1992; Dittrich et al., 1994). Systemische Gabe führte insgesamt zu einem Verlust an Muskelmasse (Espat et al., 1996). Zwar wird die Proteinsynthese stimuliert, insgesamt überwiegen aber Gewebeabbau und Gewichtsverlust (Martin et al., 1996).

Neuere Studien zeigen, daß neurotrophe Faktoren bzw. neuropoetische Zytokine in anderen Applikationsformen - z.B. bei intrathekaler Gabe - durchaus bei Erkrankungen der Motoneurone eingesetzt werden können (Aebischer et al., 1996; Gravel et al., 1997; Tan et al., 1996; Haase et al., 1998; Déglon et al., 1996; Penn et al., 1997).

Mittlerweile gibt es auch Hinweise auf die Wirksamkeit von CNTF bei anderen Erkrankungen. CNTF ist als trophischer Faktor für Neurone des Striatums im Tierversuch gegen künstlich erzeugte Chorea Huntington wirksam (Emerich et al., 1997). Die Chorea Huntington ist eine autosomal

dominant erbliche Erkrankung des extrapyramidalen Systems, die sich meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr manifestiert. Symptome sind u. a. Hyperkinesen und eine allgemeine Hypotonie der Muskulatur. Verbunden ist die Krankheit mit einer progressiven Demenz. Eine wirksame Therapie existiert bislang nicht. Der Gendefekt für diese Erkrankung hingegen ist bekannt, die Erkrankungswahrscheinlichkeit für Verwandte Erkrankter kann bestimmt werden. Eine somatische Gentherapie für solche Patienten erscheint vorstellbar. Durch die Frühdiagnose und die dadurch ermöglichte Therapie der noch vitalen Neurone vor Krankheitsausbruch ließe sich die Funktionsdauer der striatalen Neurone möglicherweise verlängern.

Der Morbus Parkinson stellt eine weitere neurodegenerative Erkrankung des extrapyramidalen Systems dar. Infolge Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra entfällt bei dieser Erkrankung ein Teil der Hemmung auf cholinerge Neurone im Corpus striatum. Die sog. Schüttellähmung ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters; sie kommt bei ca. 1 % der über 60jährigen vor. Es gibt verschiedene Ursachen des M. Parkinson. Außer der häufigsten idiopathischen Form sind auch toxische, traumatische, postinfektiöse und ischämische Ätiologien bekannt. Eine Heilung ist nicht möglich. Durch medikamentöse Behandlung und neurochirurgische Interventionen kann die Symptomatik jedoch erheblich gebessert werden. Auch für diese Erkrankung gibt es Therapieansätze mittels neurotropher Faktoren wie z.B. CNTF (Hagg und Varon, 1993; Sariola et al., 1994).

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß die durch Therapie mit neurotrophen Molekülen verbesserte Überlebensfähigkeit der Neurone den Krankheitsverlauf mildern könnte, selbst wenn in der jeweiligen Pathogenese der Erkrankung das Fehlen des eingesetzten Moleküls selbst keine Rolle spielt (Lindsay et al., 1993).

Ein weiteres Einsatzgebiet neurotropher Moleküle sind Nervenschädigungen. Nach Durchtrennung einer Nervenfasern degeneriert der gesamte distale Anteil des Axons (Wallersches Gesetz). Auch im proximalen Nervenstumpf ist innerhalb der ersten Tage nach Durchtrennung eine Schädigung von Axonen erkennbar. Liegt der Läsionsort nahe am Rückenmark bzw. den Spinalganglien, degeneriert das gesamte Neuron einschließlich des Perikaryons. Bleiben die Perikarya erhalten, ist schon wenige Tage nach der Läsion ein Aussprossen regenerierender Nervenfasern innerhalb des proximalen Stumpfes und aus dem Stumpfe heraus zu beobachten. Diese Axone können denervierte Muskelfasern reinnervieren und damit ausgefallene Funktionen wiederherstellen. Nervenschädi-

gungen können eine Vielzahl von Ursachen haben. Neben der oben geschilderten traumatischen Genese sind toxische Läsionen (Alkohol, Medikamente), Entzündungen und die diabetische Neuropathie wichtig. Die meisten Neuropathien sind durch eine wiederholte De- und Regeneration von Nervenfasern gekennzeichnet. Von einer verbesserten Regenerationsfähigkeit der Nervenfasern durch neurotrophe Faktoren verspricht man sich therapeutische Effekte bei Neuropathien (Sahenk et al., 1994; Apfel und Kessler, 1995). Kombinationstherapien verschiedener neurotropher Moleküle stellen dabei einen besonders interessanten Ansatz dar (Thoenen et al., 1993; Mitsumoto et al., 1994; Mitsumoto und Olney, 1996).

Auch für Antagonisten bzw. Inhibitoren der Faktoren bzw. Rezeptoren sind Anwendungsgebiete vorstellbar. CNTFR $\alpha$  wird auf manchen Tumorzellpopulationen exprimiert (Douglas et al., 1997; Weis et al., 1999, in Druck). Durch Hemmung der CNTF-Wirkung könnte der daraus evtl. resultierende proliferationsfördernde Effekt gehemmt werden.

Es existiert also eine große Zahl möglicher therapeutischer Anwendungsgebiete für neurotrophe Moleküle. Vor einer klinischen Anwendung sind allerdings eine Reihe von Aspekten zu bedenken. Abzuklären wären u.a.:

- pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften
- physiologische Wirkungen und Interaktionen
- Haupt- und Nebenwirkungen bei Patienten
- für die jeweilige Anwendung optimierte Applikationsformen
- Effekte von Mono- und Kombinationstherapien von neurotrophen Faktoren

Wichtig zum Verständnis der Haupt- und Nebenwirkungen eines neurotrophen Faktors ist auch die Kenntnis des Expressionsmusters seines Rezeptors. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der spezifischen Komponente des Rezeptors für CNTF an humanem Muskel- und Nervengewebe mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung untersucht.

#### **1.4 In situ-Hybridisierung**

Mit der Methode der *in situ*-Hybridisierung (Pardue und Gall, 1969; John et al., 1969) können spezifische Nukleinsäuresequenzen - RNA oder DNA - in morphologisch erhaltenen Chromosomen, Zellen oder Gewebeschnitten detektiert werden. Im Gegensatz zu Nukleinsäureanalyse durch eine Southern- oder Northern-Blot-Hybridisierung wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischen Präparat (*in situ*) sichtbar.

Die wichtigsten Arbeitsschritte sind in Abb. 2 dargestellt.

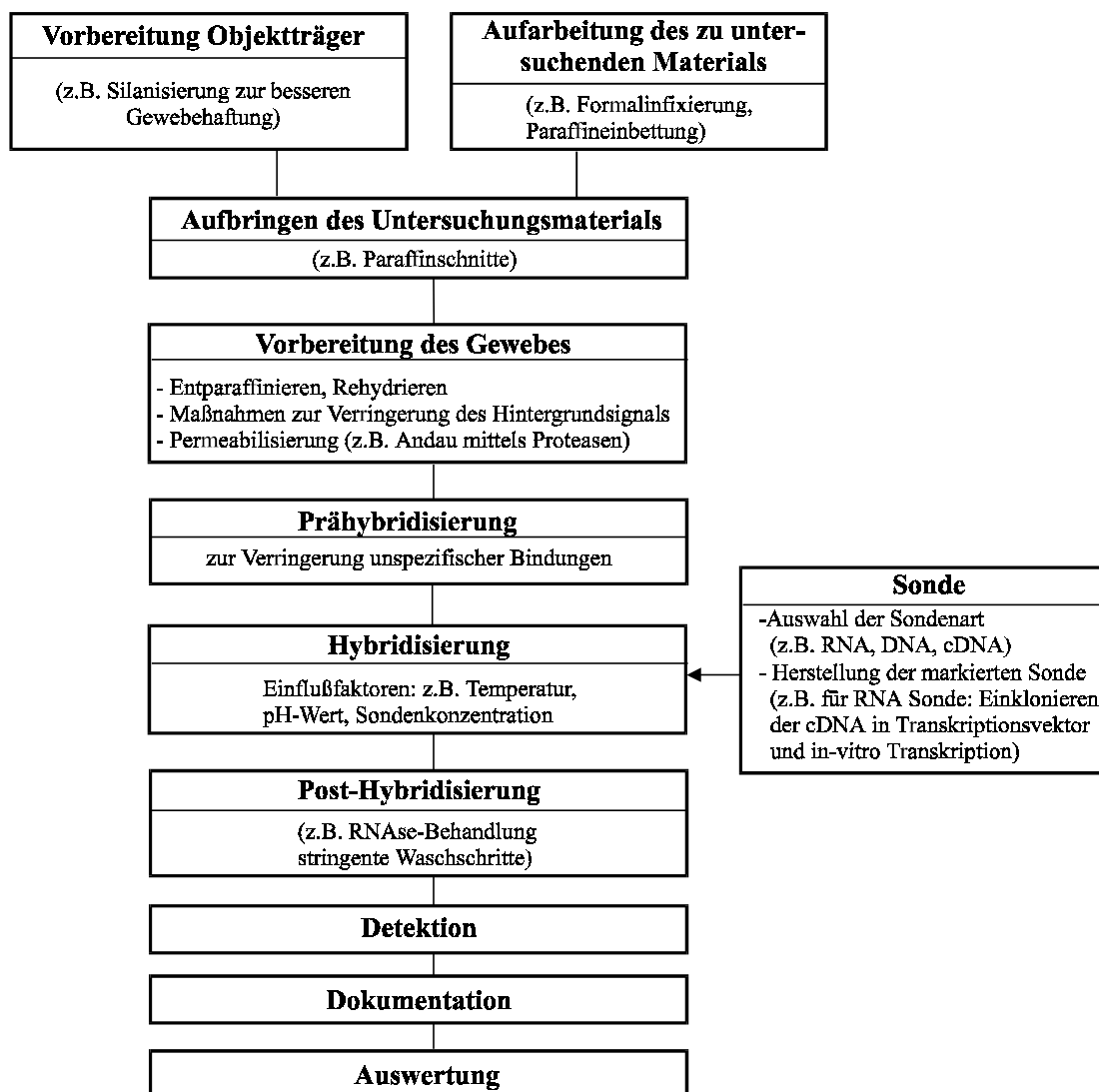


Abb. 2: Ablaufschema in situ-Hybridisierung. Modifiziert nach Boehringer Mannheim: *Nonradioactive in situ-Hybridization Application Manual, Second Edition*.

Eine zur gesuchten Zielsequenz komplementäre Sonde wird markiert. Die einzelsträngig vorliegende Sonde kann sich dann an die komplementäre einzelsträngig vorliegende Nukleinsäuresequenz des biologischen Präparates anlagern (hybridisieren). Das neugebildete doppelsträngige Molekül läßt sich aufgrund seiner Markierung nachweisen. Die Nachweismethode hängt von der Markierung der Sonde ab.

Bei bekannter Zielsequenz kann in vitro eine komplementäre markierte Sonde hergestellt werden. Lange Zeit konnten diese Sonden nur radioaktiv markiert werden. Dadurch gestaltete sich die Detektion sehr zeitaufwendig. Zudem war die Technik zunächst auf Sequenzen beschränkt, die mit konventionellen biochemischen Methoden isoliert werden konnten. Die Weiterentwicklung der

molekularbiologischen Methoden und nichtradioaktive Labelingmethoden ermöglichten eine einfachere Verfahrensweise. Erst hierdurch wurde eine breite Anwendung möglich.

Es gibt zwei Arten der nichtradioaktiven Hybridisierung. Zum einen ist es möglich, das detektierbare Molekül (=Reporter) direkt an die Sonde zu binden, so daß Hybride direkt nach der Hybridisierung detektiert werden können. Zum anderen kann in die Sonde ein Molekül eingeführt werden, daß dann nach der Hybridisierung mittels immunhistochemischer Methoden detektiert werden kann. Mittels dieser indirekten Methode werden Probleme umgangen, die durch Instabilität der Sonden-Reporter-Bindung oder durch Interferenz des Reporters mit der Hybridisierungsreaktion entstehen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Boehringer Mannheim entwickelte indirekte Methode angewendet (Kessler, 1990; Mühlegger et al., 1990). Hierbei wird Digoxigenin (DIG) als von spezifischen Antikörpern detektierbarer Reporter verwendet. Die DIG Methode basiert auf einem aus *Digitalis purpurea/lanata* isolierten Steroid. Diese Pflanzen sind die einzige bekannte natürliche Quelle von Digoxigenin. Der anti-DIG Antikörper bindet daher an kein anderes biologisches Material.

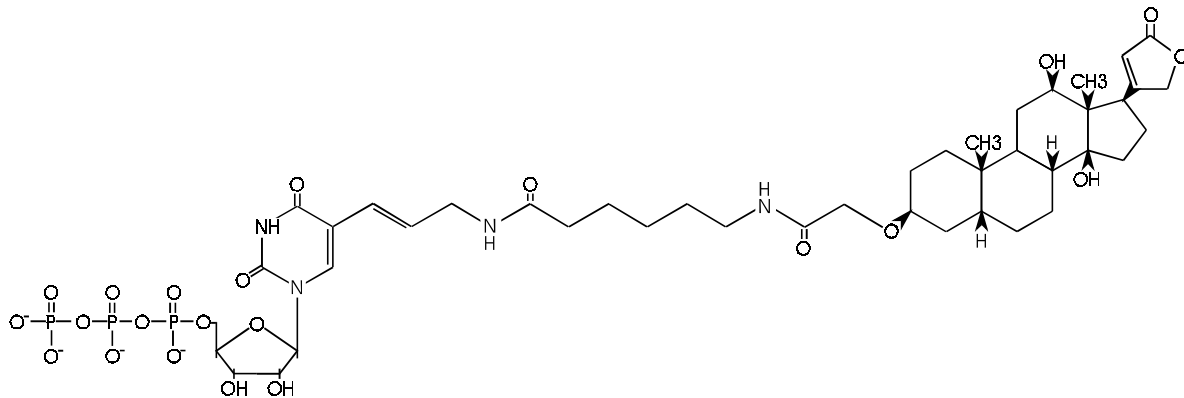


Abbildung 3: Digoxigenin-UTP, nach Boehringer Mannheim: *Nonradioactive in situ Hybridization Application Manual, Second Edition*. Die als Pfeilspitzen dargestellten Bindungen im rechten Abbildungsteil beschreiben die sterische Anordnung der einzelnen Gruppen (Ausrichtung nach oben).

Digoxigenin wird an der C-5 Position von Uridinnukleotiden mittels eines elf Kohlenstoffatome enthaltenden Armes eingebaut. Diese Dig-markierten Nukleotide können nun mit einer definierten Densität in Nukleinsäuresonden eingeführt werden. Dies ist sowohl mit DNA-/RNA-Polymerasen als auch mit Terminaler Transferase möglich.

Die Detektion DIG-markierter Sonden erfolgt mittels hochaffiner Antikörper. Diese können entweder direkt mit einem Enzym gekoppelt vorliegen oder in einer zweiten Reaktion mit einem enzymkonjugierten Sekundärantikörper gekoppelt werden.

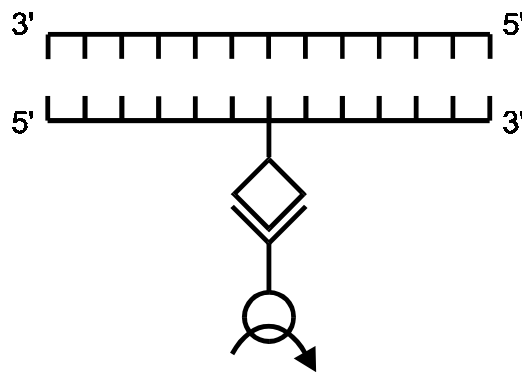


Abb.4: Die gesuchte Nukleinsäuresequenz liegt einzelsträngig vor (3'-5'). Als Sonde wird eine komplementäre Sequenz erzeugt (5'-3'), diese ist mit Digoxigenin markiert (D). Ein spezifischer Antikörper (Y) kann an Digoxigenin binden. Das angekoppelte Enzym (O) katalysiert eine Farb-reaktion (A), wodurch die Zielsequenz indirekt sichtbar wird.

Die Stabilität der Hybride spielt eine entscheidende Rolle für die Sensitivität des Versuchs. Diese nimmt in der Reihenfolge RNA-RNA, DNA-RNA, DNA-DNA ab (Wetmur et al., 1981).

### 1.5 Problemstellung der Studie

Aufgrund der bisher bekanntgewordenen Effekte erscheinen weitere Untersuchungen der Wirkung von CNTF auf Überleben und Differenzierung neuronaler Zellen notwendig. Dabei ist wegen der möglichen therapeutisch-pharmakologischen Implikationen die Erforschung der Interaktion von CNTF mit seinem Rezeptor von besonderer Bedeutung. Ungeklärt sind bisher sowohl die Verteilung des Rezeptors beim Menschen als auch die Änderungen seiner Produktion bei verschiedenen Beeinträchtigungen des Organismus.

Aus Untersuchungen an tierischem Gewebe ist schon länger bekannt, daß quergestreifte Muskulatur CNTFR $\alpha$  bildet. Nach Denervation kommt es bei Ratten und Menschen zu einer vermehrten (Davis et al., 1993a), bei Hühnern zu einer geringeren Produktion (Ip et al., 1996). Für diese quantitativen Analysen mußte die Gewebestruktur zerstört werden, um den RNA- bzw. Proteingehalt zu bestimmen. An humanem Material wurde bisher nur eine Studie durchgeführt (Weis et al., 1998). Dort wurde nachgewiesen, daß das Ausmaß der CNTFR $\alpha$ -Expression durch den Innervationsstatus der Muskelfasern reguliert wird. Im denervierten Muskel fand sich eine im Vergleich zum Normalfall achtfach erhöhte CNTFR $\alpha$ -mRNA-Menge. In der vorliegenden Arbeit soll die Frage, welche

Zellen im normalen und denervierten Muskel für die Rezeptorsynthese verantwortlich sind, mit Hilfe der in situ-Hybridisierung beantwortet werden.

Nervengewebe ist ein Hauptsyntheseort von CNTF. Auch CNTFR $\alpha$ -mRNA konnte in peripheren Nerven detektiert werden (Ip et al., 1993). Aufgrund der vergleichsweise geringen Transkriptionsrate konnte/n der/die verantwortliche/n Zelltyp/en noch nicht identifiziert werden (Kirsch et al., 1998). Um innerhalb des intakten Gewebes (in situ) den genauen Ort der CNTFR $\alpha$ -Synthese zu lokalisieren, wurde für die vorliegende Arbeit eine Markierung der spezifischen messenger-RNA durchgeführt.

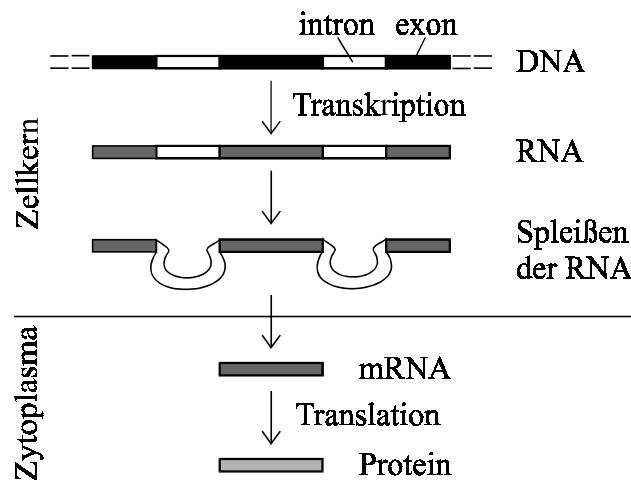


Abb.5: Informationstransfer von DNA zum Protein. Die nichtkodierenden Abschnitte (Introns) werden nach der Transkription entfernt, die mRNA setzt sich aus den translatierten Exons zusammen.

Verwendet wurden für die RNA-RNA-in situ-Hybridisierung Muskelbiopsien von Patienten mit neurogener Muskelatrophie unterschiedlicher Genese sowie Biopsien peripherer Nerven.

Folgende Fragestellungen sollen mit der vorliegenden Arbeit beantwortet werden.

- In welchen Zellen der Gewebe wird CNTFR $\alpha$  gebildet?
- Beruht die gesteigerte Expression des spezifischen CNTF-Rezeptors allein auf einer Expression in den Muskelfasern oder sind andere Strukturen verantwortlich bzw. beteiligt?
- Lassen sich qualitative und/oder quantitative Unterschiede bei verschiedenen Erkrankungen bzw. Erkrankungsstadien erkennen?
- Gibt es an humanem Material Hinweise auf eine Rezeptorsynthese im Nerven?

## 2 Material und Methoden

Es wurde eine RNA-RNA in situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten von vierzehn Muskel- und neun Nervenbiopsien durchgeführt. Durch die eingesetzte RNA-Sonde wurde ein 400 bp Abschnitt von CNTFR $\alpha$ -mRNA markiert. Die Detektion erfolgte mittels an Alkalische Phosphatase konjugierter anti-DIG-Antikörper.

RNA ist dem Angriff von ubiquitär vorkommenden RNAsen ausgesetzt. Um den Verlust an Zielsequenzen und Sonde möglichst gering zu halten, müssen Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Um eine Kontamination von Lösungen mit RNAsen auszuschließen, wurde nur DEPC-vorbehandeltes H<sub>2</sub>O bidest. verwendet. Hierzu wurde dd H<sub>2</sub>O mit 9,1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt, gut geschüttelt und mindestens 24 h bei Raumtemperatur stehen-gelassen. DEPC zerstört RNAsen. Durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 120° C wird DEPC in CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O gespalten. Alle verwendeten Glasmaterialien wurden vor Gebrauch für mindestens 2 h auf 180° C erhitzt.

### 2.1 Sonde

Zur Herstellung der Sonde wurde ein Pst-Xma1 Fragment der in pSPT 18 inklonierten cDNA von CNTFR $\alpha$  eingesetzt. Mittels in vitro-Transkription (Boehringer Mannheim RNA labeling Kit) wurde die gelabelte Sonde erzeugt.

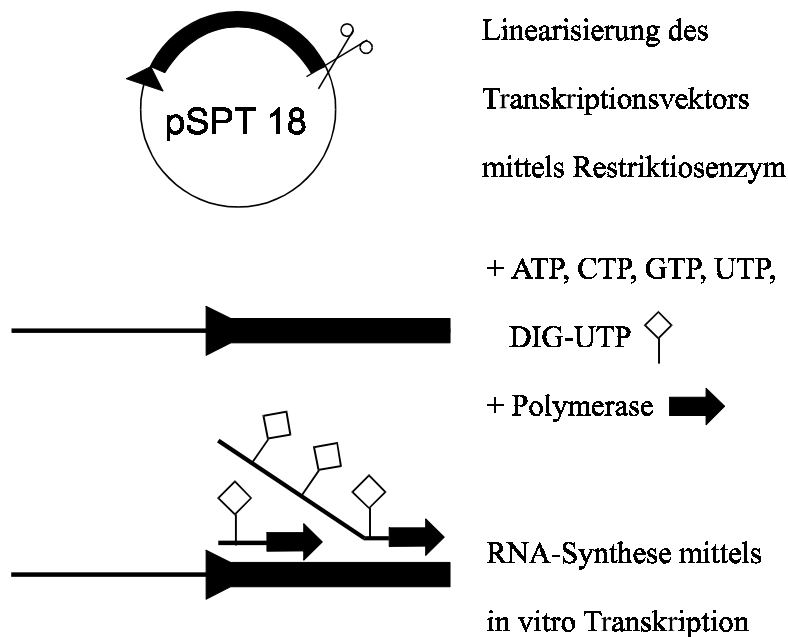


Abb. 6: Ablaufschema der in vitro Transkription nach Boehringer Mannheim, DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), Best.Nr. 1175025

cDNA ist ein zur gesuchten mRNA komplementäres (complimentary) doppelsträngiges Molekül. Man erhält es durch reverse Transkription der bekannten mRNA, wobei zunächst ein einzelsträngiges „Gegenstück“ zum einzelsträngigen mRNA-Molekül resultiert. Mittels DNA Polymerase wird der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Der erhaltene DNA-Abschnitt entspricht der Abfolge von kodierenden Exons.

Das zu transkribierende cDNA-Fragment wurde in den Transkriptionsvektor des Plasmids pSPT 18 zwischen die Promotoren SP6 und T7 inkloniert (Pst/Xma1).

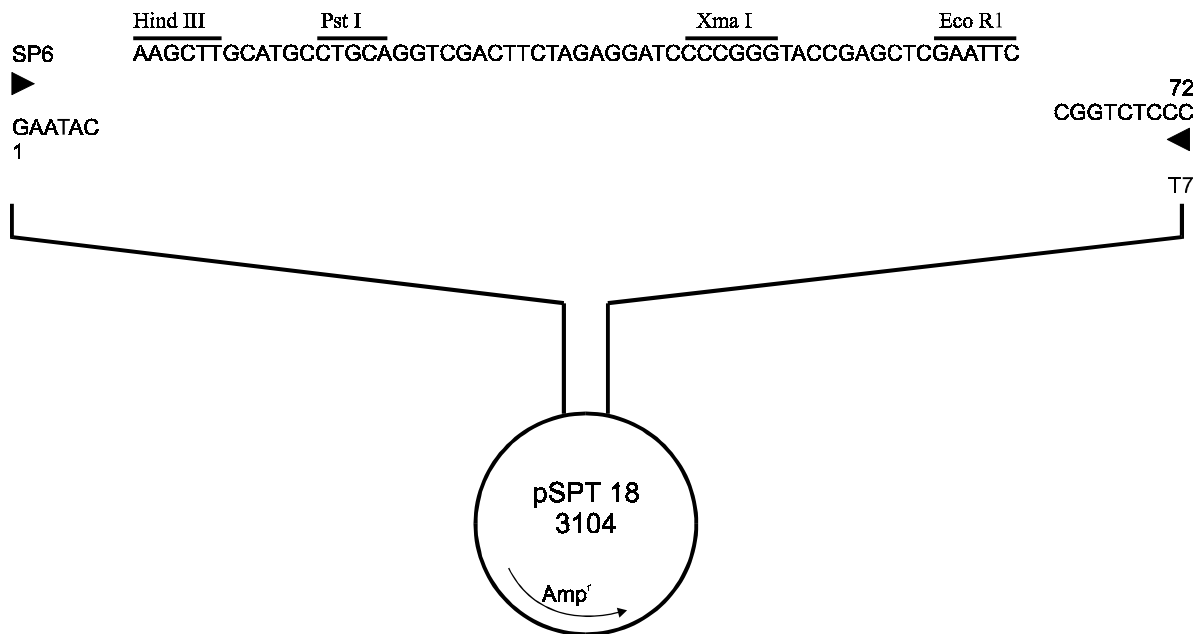


Abb.7: Plasmid pSPT 18. Im Transkriptionsvektor sind die Angriffsstellen der verwendeten Restriktionsenzyme gezeigt.

Das erhaltene Plasmid wurde in Bakterien eingeführt (Transformation von Epicurian coli XL 1-Blue, Fa. Stratagene). Die transfizierten Bakterien wurden kultiviert. Bei den ablaufenden Zellteilungen wird auch das Plasmid repliziert. Hierdurch erreicht man eine erhebliche Materialvermehrung.

Das isolierte, gereinigte Plasmid (Aufarbeitung mittels Quiagen Prep Kit, Fa. Quiagen, Hilden) wurde in zwei Ansätzen (a) und (b) mittels (a) Asp 718 und (b) Hind III linearisiert. Die Transkription mit der RNA-Polymerase SP6 in Ansatz (a) ergibt sense-Transkripte, die Transkription mit der RNA-Polymerase T7 in Ansatz (b) ergibt antisense-Transkripte. Die antisense-Transkripte sind komplementär zur mRNA und wurden als Sonde eingesetzt, die sense-Transkripte dienten als Negativkontrolle.

### 2.1.1 Protokoll zur Sondenherstellung

1  $\mu$ g cDNA wurden mittels Asp718 (Boehringer Mannheim, Best.Nr. 814245) bzw. HindIII (Boehringer Mannheim Best.Nr. 656313) linearisiert. Für einen 20  $\mu$ l Ansatz wurden 1  $\mu$ g der cDNA und 5 u Asp718 bzw. 5 u HindIII eingesetzt. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation wurde die linearisierte DNA gereinigt. Hierdurch wird nicht nur eine Kontamination der Sonde mit Restriktionsenzymen vermieden, sondern auch ausgeschlossen, daß die in der Präparation des Plasmids eingesetzte RNase die Transkription stört. Das erhaltene Pellet wurde in 2  $\mu$ l 10x Transkriptionspuffer (aus Boehringer Mannheim DIG RNA Labeling Kit, Best.Nr. 1175025) und 11  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O gelöst. 2  $\mu$ l NTP Labeling Mix (1l konzentrierter Labeling Mix enthält 10 mmol ATP, 10 mmol CTP, 10 mmol GTP, 6,5 mmol UTP und 3,5 mmol DIG-UTP; pH 7,5), 1  $\mu$ l RNase Inhibitor (20 u) und 2  $\mu$ l der entsprechenden Polymerase (SP6 oder T7) wurden hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Die markierte RNA wurde mit 2,5  $\mu$ l 4 M LiCl und 75  $\mu$ l kaltem Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert. Der Ansatz wurde dann bei 12000 g zentrifugiert, das Pellet mit 40  $\mu$ l kaltem Ethanol gewaschen, nach erneutem Zentrifugieren getrocknet und in DEPC-behandeltem ddH<sub>2</sub>O gelöst. Unter Standardbedingungen werden ca. 10  $\mu$ g DIG-markierte RNA pro  $\mu$ g eingesetzter DNA transkribiert. Jedes 20. Nukleotid der synthetisierten RNA ist ein DIG-UTP. Dies stellt aus sterischen Gründen die optimale Labelingdichte dar, denn die Größe des später angelagerten Antikörper-Konjugates überdeckt etwa 20 Nukleotide.

### 2.2 Dot Blots

Die Effizienz der Labelingreaktion und damit die Konzentration der eingesetzten Sonde sowie die Spezifität der Sonde wurden durch getrennte Dot Blots überprüft. Diese Dot Blots sind Enzym-Immunoassays. Die Quantifizierung erfolgt durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion.

Um die Konzentration der Sonde zu bestimmen, wurde die transkribierte RNA in mehreren Verdünnungsstufen direkt auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Die RNA wurde durch Backen an die Nylonmembran fixiert. Nach Inkubation mit dem an Alkalische Phosphatase gekoppelten Digoxigenin-Antikörper erfolgt die kolorimetrische Detektion. In der durch Alkalische Phosphatase katalysierten Farbreaktion mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumsalz (NBT) entsteht ein wasserunlöslicher blauer Niederschlag, der die Hybridmoleküle sichtbar macht. Der Vergleich der Farbintensitäten mit der Verdünnungsreihe einer markierten Kontroll-RNA bekannter Konzentration läßt das direkte Ablesen der Transkriptionseffizienz zu.

Die in situ-Hybridisierung liefert nur dann verwertbare Ergebnisse, wenn sichergestellt ist, daß die eingesetzte Sonde tatsächlich nur die Zielsequenz erkennt. Um die Spezifität der Sonde zu überprüfen, werden verschiedene unmarkierte Nukleinsäureabschnitte aufgetragen und an die Membran fixiert. Nach Hybridisierung der DIG-markierten RNA-Sonde an die Ziel-Nukleinsäuren erfolgt analog die Detektion mittels anti-DIG und BCIP/NBT.

### **2.2.1 Dot-Blot-Protokoll zur Bestimmung der Konzentration der Sonde**

Alle Schritte fanden, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur statt.

Je eine Verdünnungsreihe der erzeugten RNA-Sonden (sense/antisense) wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran (Fa. Amersham) in Dots von je 1  $\mu$ l aufgetropft. Zum Vergleich wurde eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration einer markierten Kontroll-RNA (DIG RNA Labeling Kit, vial 5) eingesetzt. Die Nukleinsäuren wurden durch dreißigminütiges Backen bei 120° C an die Membran fixiert. Nach einem kurzen Waschschrift (Waschpuffer: 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween 20) wurde die Membran für 30 min in Blockierungslösung inkubiert (1% Blocking-Reagens in 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH 7,5). Im anschließenden Schritt erfolgte die Koppelung des anti-DIG-Antikörpers an die mit DIG markierte Sonde. Hierzu wurde der Antikörper im Verhältnis 1:5000 mit Blockierungslösung verdünnt und die Membran darin für 30 min inkubiert. In den sich anschließenden Waschschriften (2x15 min in Waschpuffer) wurden überschüssige Antikörper entfernt. Eine kurze Inkubation in Substratpuffer (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 9,5) schloß sich an. Die Farbreaktion erfolgte in einer Lösung aus 0,3375 mg/ml NBT und 0,175 mg/ml BCIP in Substratpuffer. Die Farbentwicklung muß im Dunkeln stattfinden, das Inkubationsgefäß sollte dabei möglichst wenig bewegt werden. Bei den Dots hoher Konzentration ist eine Präzipitatbildung schon nach wenigen Minuten zu beobachten, bei den höheren Verdünnungsstufen wird eine ausreichende Farbintensität erst nach einigen Stunden erreicht.

### **2.2.2 Dot-Blot-Protokoll zur Bestimmung der Spezifität der Sonde**

Das zur in vitro-Transkription eingesetzte Plasmid wurde in drei verschiedenen Ansätzen geschnitten: Mit HindIII wurde es linearisiert, mit PST1 und SmaI wurde das CNTFR $\alpha$ -Insert herausgeschnitten, und mit HindIII und Eco-R1 wurde das Insert samt Teilstücken des Vektors, die teilweise mittranskribiert wurden, aus dem Plasmid getrennt. Die Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente mittels des Sephaglas Band PrepKit (Fa. Pharmacia) extrahiert. Die verschiedenen Fragmente (Plasmid, Plasmid ohne Insert, Plasmid ohne Insert und ohne insertbenachbarte Region, Insert) sowie eine weitere Kontrolle (human genomic DNA) wur-

den zunächst denaturiert und dann in 1  $\mu$ l Dots auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Die Nukleinsäuren wurden zunächst durch 30 min Backen bei 120° C an die Membran fixiert und dann bei 50° C für zwei Stunden prähybridisiert (Hybridisierungspuffer: Formamid 50% v/v, 5xSSC, Blocking Reagens 2% w/v, N-Lauroylsarkosin 0,1% w/v, SDS 0,2% w/v, RNasefrei). Für die Hybridisierung wurden 0,1 ng Sonde pro  $\mu$ l Hybridisierungsmix verwendet. Die Membran wurde in dieser Lösung über Nacht bei 50° C inkubiert. Es folgten intensive Waschschriffe ( 2x5 min in 2x SSC, SDS 0,1 %; 2x15 min bei 68° C in 0,1x SSC, SDS 0,1%). Die weitere Detektion erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Dot Blot.

### 2.3 Vorbereitung der Objektträger

Die verwendeten Objektträger wurden vor Gebrauch silanisiert. Hierdurch soll eine bessere Haftung des Materials an den Objektträger erzielt werden. Der Gewebeverlust während der vielen Reagenzienwechsel im Rahmen der Hybridisierung wäre sonst erheblich. Die Objektträger werden für die Silanisierung in inerte Halterungen verbracht und so in die folgenden Lösungen eingestellt:

- Azeton 5 min zur Reinigung, anschließend Trocknung (10 min, 50° C)
- 6 % Triethoxysilylpropylamin in Aceton, 5 min
- 2 x 5 min Azeton
- 2 x 5 min dd H<sub>2</sub>O

Durch das anschließende Backen zur RNAseninaktivierung wird die Silanisierung nicht beeinträchtigt.

### 2.4 Gewebe: Auswahl und Aufarbeitung

Es wurden Paraffinschnitte von 15 Muskel- und 9 Nervenbiopsien untersucht. Die verwendeten Gewebe waren den Patienten nach Einwilligung zu diagnostischen Zwecken entnommen und im Institut für Neuropathologie der RWTH Aachen untersucht worden. Aus den von Mai 1994 bis Juni 1995 eingegangenen Muskelbiopsien wurden 15 Fälle (Alter 39-79 Jahre, Durchschnittsalter 63,4 Jahre, 9 männlich, 6 weiblich) nach Stellung der Diagnose „neurogene Muskelatrophie“ ausgewählt. Diese Diagnose gründete sich auf Paraffinschnitte, Semidünnschnitte sowie histochemische Untersuchungen. Um den Grad der Atrophie weiter zu charakterisieren, wurden die Muskelfaserkaliber der ausgewählten Fälle morphometrisch erfaßt. Die Nervenbiopsien wurden im Juni und Juli 1996 konsekutiv gesammelt (Alter 61 bis 75 Jahre, Durchschnittsalter 67,9 Jahre, 4 männlich, fünf weiblich).

Die Fixierung des Materials erfolgte mit 4% Formaldehyd über mind. 4 Stunden, woran sich eine automatisierte Entwässerung und Paraffineinbettung anschloß. In das verwendete Mikrotom wurde eine neue Einmalmesser Klinge eingespannt. Es wurde mit Mundschutz und Handschuhen gearbeitet. Die angefertigten Schnitte wurden zunächst mit einem neuen, gespülten Pinsel in ein Streckbad (DEPC-behandeltes ddH<sub>2</sub>O) überführt und auf die RNAsereien Objektträger überführt. Die abgetropften Objektträger wurden für mind. 24 h im Brutschrank bei 37° C getrocknet und bis zur Verwendung staubfrei gelagert.

## 2.5 Durchführung der in situ-Hybridisierung

Um den Ablauf der in situ-Hybridisierung zu erläutern, erscheint es zweckmäßig, das Protokoll zunächst stichwortartig aufzulisten. Erklärungen zu den einzelnen Punkten folgen im Anschluß.

Schritt	Bezeichnung	Zeit/Temperatur
1	Xylol	2 x 5 min
2	Absteigende Alkoholreihe: 100%, 100%, 100%, 90%, 70%, 50%	je 5 min
3	DEPC-H <sub>2</sub> O: 2 x spülen	
4	Proteinase-K-Puffer: 0.1 M Tris, pH 8.0, 0.05 M EDTA	5 min, 37°C
5	Proteinase K in Puffer (4 µg/ml)	30 min, 37°C
6	DEPC-H <sub>2</sub> O: spülen	
7	4% Paraformaldehyd in PBS	20 min, RT
8	DEPC-H <sub>2</sub> O: spülen	
9	Triethanolamin-Lsg. (0.1 M, pH 8.0): spülen	
10	Essigsäureanhydrid in TEA (0.25%)	10 min, RT
11	DEPC-H <sub>2</sub> O: 2 x spülen	
12	Prähybridisierung (Hybridisierungsmix: 50% Formamid, 0.3 M NaCl, 0.02 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA, 1 x Denhardts, 10% Dextran-sulfat. 500 µg/ml tRNA)	4 h, 50°C
13	4 x SSC	1 min
14	Hybridisierung (1 ng Sonde/µl Hybridisierungsmix) (40 µl/Schnitt, Deckgläser)	über Nacht, 50°C
15	4 x SSC in Küvette (Deckgläser ab)	10 min
16	4 x SSC	15 min, RT
17	2 x SSC	5 min

18	RNAse A-Puffer: 0.01 M Tris (pH 8.0), 0.001 M EDTA, 0.5 M NaCl	5 min, 37°C
19	RNAse A in Puffer (20 µg/ml)	30 min, 37°C
20	2 x SSC	3 x 20 min, 50°C
21	0,1 x SSC	3 x 20 min, 50 °C
22	0,1 x SSC	5 min, RT
23	TBS	5 min, RT
24	Block-Lösung: 2 % Normal Goat Serum, 0.15 % Triton X-100 in TBS	30 min, RT
25	Anti-Digoxigenin/Alkalische Phosphatase-Konjugat in TBS / 1 % Normal Goat Serum	2 h, RT
26	TBS: spülen	2 x 10 min
27	Substrat-Puffer: 0.1 M Tris pH 9.5, 0,1 M NaCl, 0.05 M MgCl <sub>2</sub>	2 min, RT
28	Detektion: 450 µl Nitroblau-Tetrazolium (75 mg/ml), 350 µl Brom- chlorindolylphosphat (50 mg/ml), in Substratpuffer	0.5 - 2 h
29	Stop-Puffer: 0.1 M Tris pH 7.5, 0.01 M EDTA	5 min
30	Aquatex: eindeckeln	

Nach der Rehydrierung des Materials (1-3) wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet. Die weiteren Lösungen konnten dann aufpipettiert und mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden. Hierdurch verringerte sich der Verbrauch an Reagenzien erheblich. Das Verfahren ist zudem materialschonend. Um Verdunstung der Reagenzien und damit Eintrocknung des Gewebes zu umgehen, erfolgten die meisten Versuchsschritte in einer feuchten Kammer. Die Detektion mittels NBT/BCIP erfolgte allerdings in einer Küvette, um Partikelniederschläge auf dem Gewebe zu vermeiden.

### Erläuterungen zu den Protokollschritten

- (1)-(3) Entfernen des Paraffins, Rehydrierung des Gewebes
- (5) Freilegen der Ziel-RNA durch Andau von Proteinen
- (7) Nachfixieren der mRNA im Gewebe
- (10) Acetylieren: Essigsäureanhydrid inaktiviert endogene alkalische Phosphatase. Diese könnte sonst die abschließende Detektion verfälschen.

- (12) Verringerung unspezifischer Bindungen
- (14) Zusammensetzung des Hybridisierungsmixes und Hybridisierungstemperatur müssen für die jeweilige Sonde optimiert werden. Formamid- und Salzgehalt sowie die Temperatur beeinflussen den Denaturierungsgrad von Nukleinsäuren und damit sowohl die Zugänglichkeit der Zielsequenz als auch die Stabilität der Hybride. Dextransulfat ist in wäßrigen Lösungen stark hydriert. Hierdurch erhöht sich die Sondenkonzentration. Die überschichteten Schnitte werden mit RNasefreien Deckgläsern bedeckt und mit Fixogum (Fa. Marabu) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht in einer feuchten Kammer im Brutschrank.
- (15) Abschwimmen des Deckglases, der zähflüssige Hybridisierungsmix wird schonend abgewaschen
- (19) Verringerung des Hintergrundsignals - ungebundene (einsträngige) Sonde wird gespalten
- (20)-(21) Verringerung des Hintergrundsignals - stringente Waschschrte
- (25) Digoxigenin-Detektion: Die Farbentwicklung muß im Dunkeln stattfinden und dauert in Abhängigkeit von der Menge vorhandener Zielsequenz Minuten bis Stunden.
- (30) Der entstandene Farbstoff ist wasserunlöslich, aber löslich in unpolaren Lösungsmitteln. Das Eindecken erfolgt daher mit Aquatex.

Die Präparate wurden anschließend fotografiert und bei Raumtemperatur gelagert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 In vitro-Transkription: Konzentration und Spezifität der Sonde

Die **Konzentrationen** der RNA-Sonden für Positiv- und Negativkontrollen (antisense bzw. sense) betragen jeweils 100 ng/ $\mu$ l, beide Labelingreaktionen verliefen also gleich effizient.

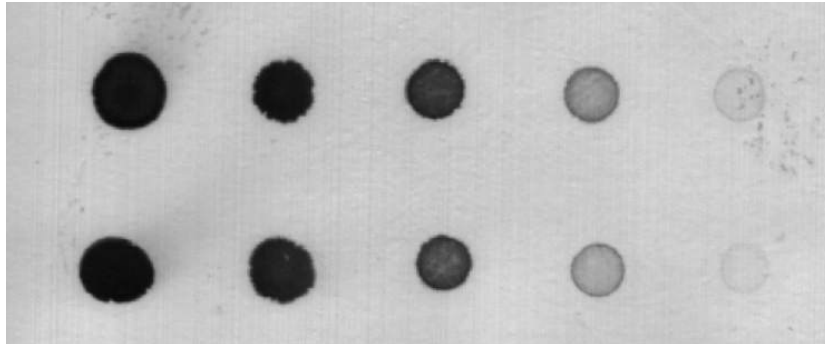


Abb. 8: Aufgetragen wurden 1  $\mu$ l Dots gleicher Verdünnungsstufen von sense- (obere Reihe) bzw. antisense-RNA-Sonde (untere Reihe). Die Konzentrationen wurden durch Vergleich der Farbreaktion mit der an einer ebenfalls aufgetragenen markierten Kontroll-RNA abgelesen (nicht dargestellt).

Die Konzentrationsbestimmung der RNA stellt nur eine indirekte Methode dar, denn die Farbreaktion ist nur von der aufgetragenen Menge an Digoxigenin abhängig, nicht aber von der Art oder Länge der markierten Sequenz. Der zweite Dot Blot demonstriert die angestrebte Spezifität der Sonde.

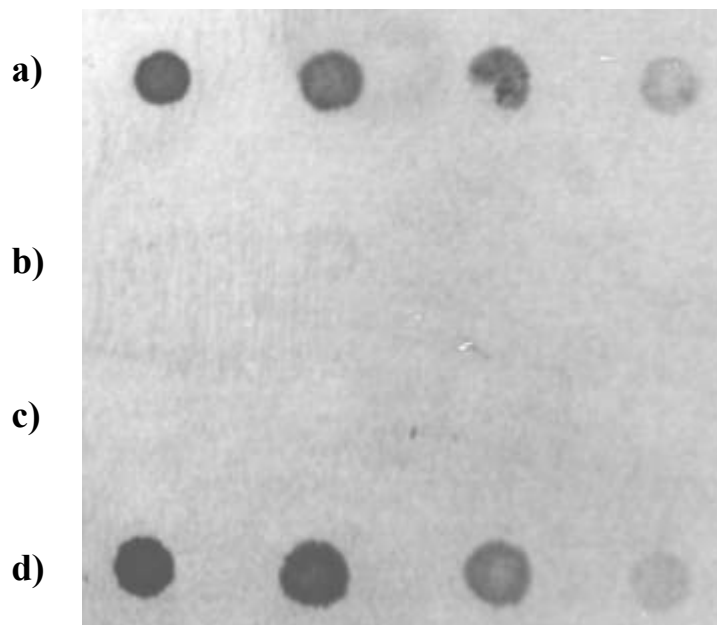


Abb. 9: Aufgetragen wurden Verdünnungsreihen bekannter DNA-Sequenzen (beginnend mit ca. 100 ng/ $\mu$ l, Verdünnungsschritte 1:10).

a: linearisiertes Plasmid einschließlich inkloniertem CNTFR $\alpha$ -Abschnitt (insert)

b: linearisiertes Plasmid ohne insert und ohne insertbenachbarte Region

c: human genomic DNA

d: isoliertes Insert.

Farbreaktionen, die durch den Nachweis der angelagerten markierten Sequenz bedingt sind, finden sich nur bei a und d. Die RNA-Sonde markiert den komplementären Strang der einzelsträngig vorliegenden DNA. Es kam zu keiner unspezifischen Anlagerung bei b oder c.

## 3.2 In situ-Hybridisierung

### 3.2.1 Muskelgewebe

Durch Inkubation mit CNTFR $\alpha$ -antisense Sonde wurden insbesondere die zellkernnahen Regionen von Muskelfasern (perinukleäre Regionen) markiert. Gefärbt wurden sowohl histopathologisch unveränderte als auch atrophische Muskelfasern. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Grad der Atrophie und der Signalintensität hergestellt werden. Auch innerhalb der Schnitte von neurogenen Muskelatrophien waren unauffällig geformte und atrophische Fasern nicht durchgehend verschieden stark markiert. In den beiden untersuchten Fällen chronischer neurogener Muskelatrophie bei V.a. Motoneuronerkrankung/spinale Muskelatrophie (Abb. 13 und 14) zeigte sich eine deutlich stärkere Markierung der stark atrophischen Fasern im Vergleich zum übrigen Gewebe.

Einige der markierten Muskelfasern wiesen zentrale Kerne auf. Diese Veränderung (normalerweise sind Skelettmuskelfaserkerne randständig) weist auf Regeneration bzw. Reinnervation hin. Auch in dieser Situation wird also weiterhin CNTFR $\alpha$  transkribiert.

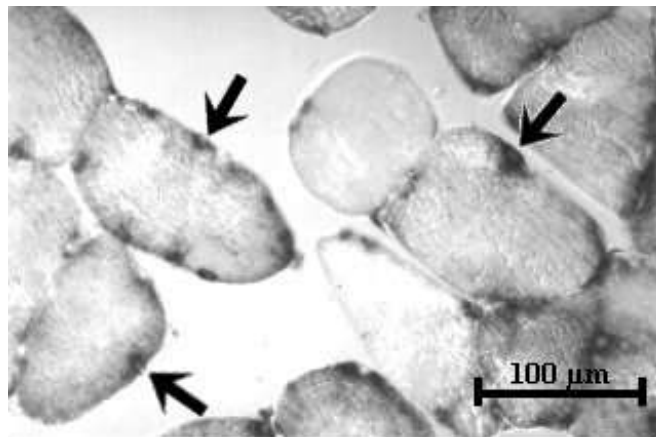


Abb. 10: Beginnende neurogene Muskelatrophie. Pfeile: perinukleäre Anfärbung in mehreren Muskelfasern. Skelettmuskulatur im Querschnitt, 51jähriger Mann. Paraffinschnitt, in situ-Hybridisierung.

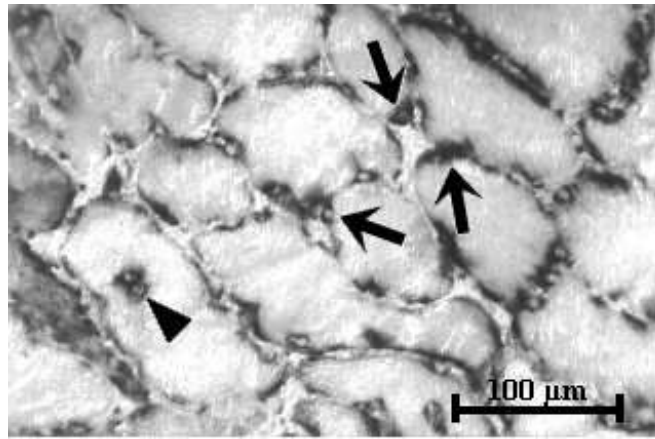


Abb. 11: Neurogene Muskelatrophie bei fortgeschrittener Vaskulitis (Panarteriitis nodosa). Pfeile: perinukleäre Anfärbung in mehreren Muskelfasern. Pfeilkopf: Anfärbung in der Umgebung zentralständiger Muskelfaserkerne. *M. tibialis anterior* im Querschnitt, 68jähriger Mann. Paraffinschnitt, *in situ*-Hybridisierung.

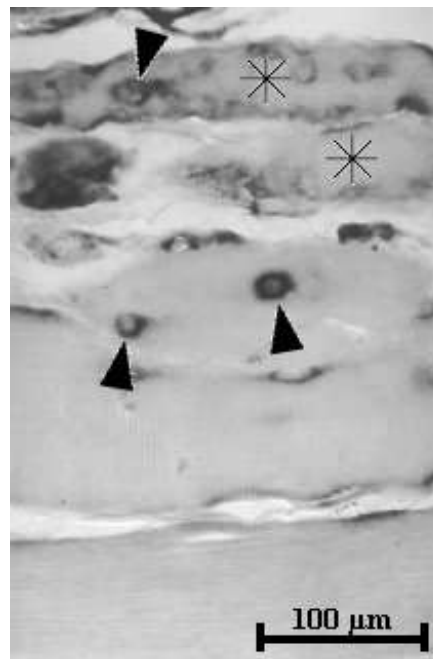


Abb.12: Neurogene Muskelatrophie bei Mikroangiopathie. Pfeilköpfe: Färbung um zentralständige Kerne.  $\square$ : Atrophische Muskelfasern. *M. peroneus* im Längsschnitt, 79jähriger Mann. Paraffinschnitt, *in situ*-Hybridisierung.

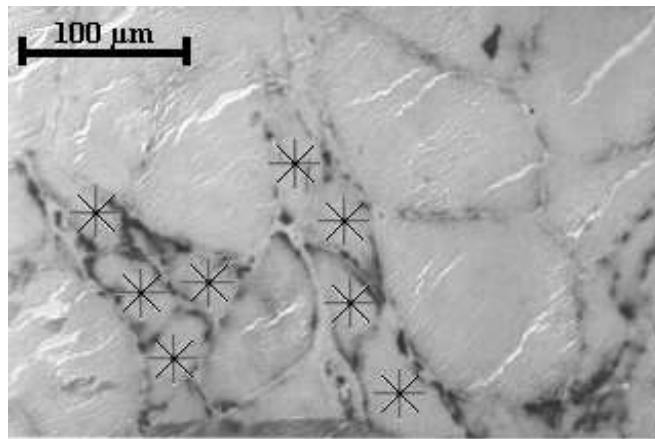


Abb.13: Chronisch progressive neurogene Muskelatrophie, V.a. Motoneuronenerkrankung (ALS). Vor allem die mit \* gekennzeichneten teilatrophischen und atrophischen Muskelfasern sind sub-sarkolemmal angefärbt. M. triceps surae im Querschnitt, 69jährige Frau. Paraffinschnitt, in situ-Hybridisierung.

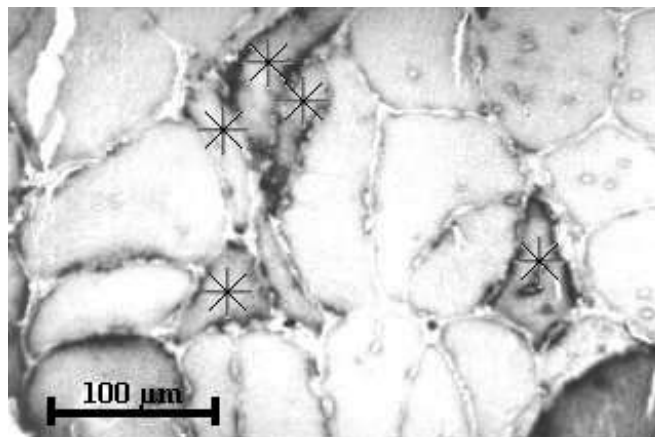


Abb.14: Ausgeprägte chronische neurogene Muskelatrophie, keine entzündliche Komponente, V.a. Motoneuronenerkrankung (ALS). Wiederum sind vor allem die mit \* gekennzeichneten teilatrophischen und atrophischen Muskelfasern angefärbt. Skelettmuskulatur im Querschnitt, 45jähriger Mann. Paraffinschnitt, in situ-Hybridisierung. 1 cm entspricht 45 µm.

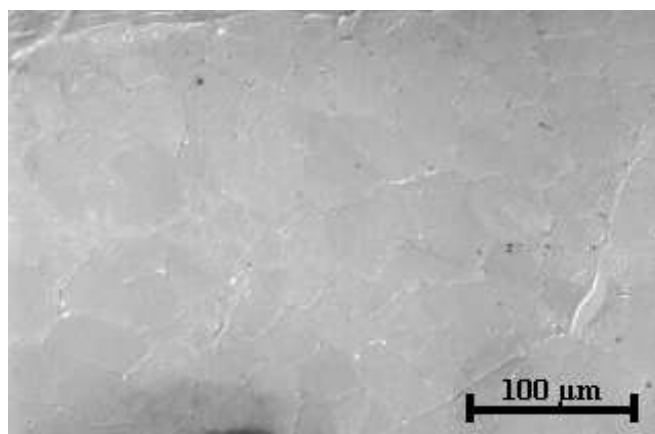


Abb.15: Typ-2-Muskelatrophie bei Psoriasis. M. triceps surae im Querschnitt, 44jährige Frau. Paraffinschnitt, Negativkontrolle, Hybridisierung mit sense-Sonde.

### 3.2.2 Periphere Nerven

Es fanden sich markierte Zellkörper innerhalb des Nervs, am ehesten entsprechend Schwannschen Zellen (Pfeile) und Gefäßwandzellen (Pfeilköpfe).

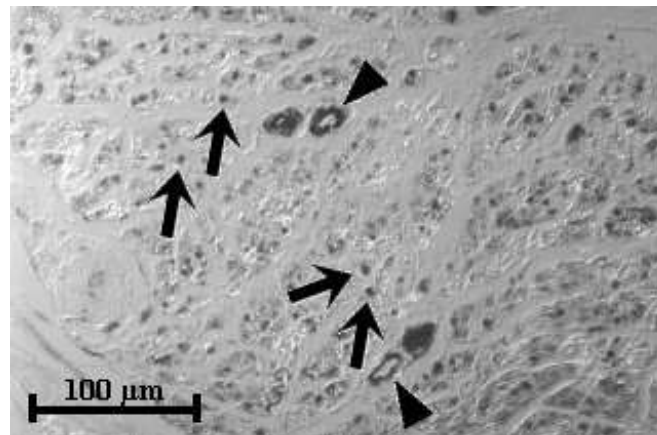


Abb.16: Neuropathie bei Panarteriitis nodosa. N. suralis im Querschnitt, 75jähriger Mann. Paraffinschnitt, in situ-Hybridisierung.

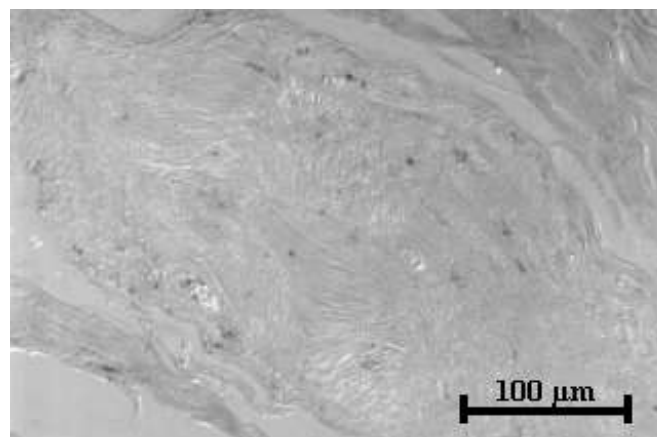


Abb.17: Neuropathie ohne entzündliche Komponente. N. suralis im Längsschnitt, 62jährige Frau. Paraffinschnitt, in situ-Hybridisierung.

### 3.3.3 Sonstige markierte Zellen/Gewebe

Insbesondere in Gewebe mit zusätzlichen entzündlichen Veränderungen (Vaskulitis, Panarteriitis nodosa) fanden sich Signale in Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen von Gefäßwänden. Auch Fibroblasten wurden z. T. markiert. Dies weist auf eine unerwartete Rolle von CNTFR $\alpha$  bei Entzündungsprozessen hin. Vorstellbar ist aber auch eine allgemeine Wirkung im Gefäßsystem.

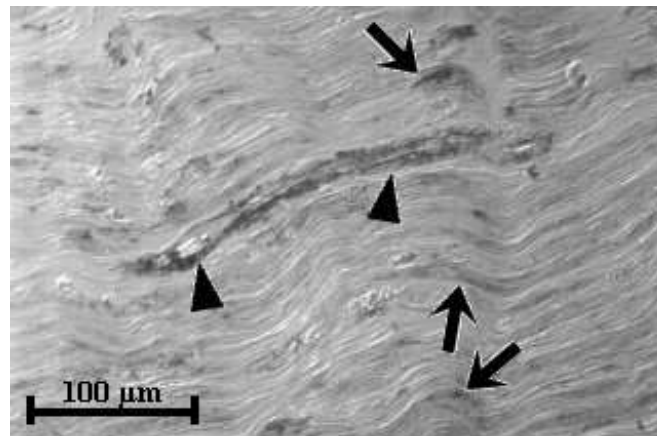


Abb.18: Neuropathie bei Panarteriitis nodosa. Schwannsche Zellen (Pfeile) und Endothelzellen (Pfeilköpfe) sind angefärbt. N. suralis im Längsschnitt, 75jähriger Mann. Paraffinschnitt, in situ-Hybridisierung.

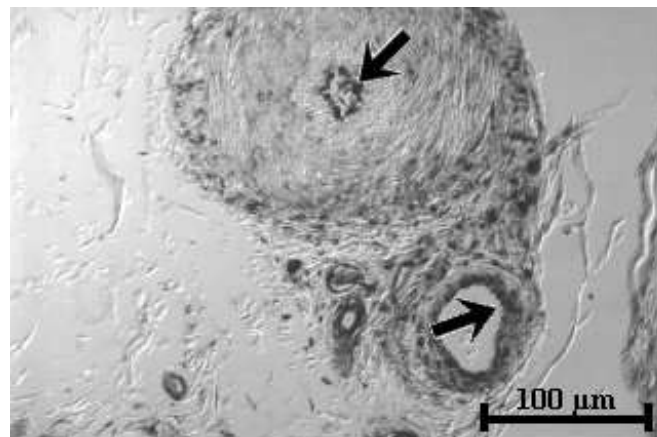


Abb.19: Neuropathie bei Mikroangiopathie. Anfärbung v.a. von Endothelzellen (Pfeile) und peri-vaskulären Zellen. N. suralis im Querschnitt, Detailvergrößerung Arterie/Vene, 73jähriger Mann. Paraffinschnitt, in situ-Hybridisierung.

## 4 Diskussion

Durch die vorliegende Untersuchung konnte erstmals an humanem Material (Muskel/Nerv) der Expressionsort der spezifischen Rezeptoruntereinheit des ciliary neurotrophic factor (CNTFR $\alpha$ ) in peripheren Nerven und der Muskulatur nachgewiesen werden.

### 4.1 Expression in Skelettmuskulatur

In allen untersuchten Muskeln konnten CNTFR $\alpha$ -Transkripte in den perinukleären Regionen der Skelettmuskelfaserkerne gefunden werden. Methodenbedingt sind nur dann semiquantitative Aussagen zum Grad der Expression möglich, wenn am gleichen Schnitt in möglichst nah beieinander liegenden Gewebeabschnitten deutliche Signalunterschiede erkennbar sind. Normal konfigurierte bzw. veränderte Muskelfasern waren in den untersuchten Muskelschnitten nicht durchgängig verschieden stark markiert. Die nachgewiesenen CNTFR $\alpha$ -Transskripte in normalen Muskelfasern könnten durch die im Normalfall vorhandene Menge an CNTFR $\alpha$ -mRNA bedingt sein. Denkbar wäre auch, daß eine vorliegende Nervenschädigung erst kurze Zeit zurückliegt, so daß sich die Gewebemorphologie noch nicht verändert zeigt.

In den beiden untersuchten Fällen chronischer neurogener Muskelatrophie mit V.a. Motoneuronenkrankung/spinale Muskelatrophie (Abb. 13 und 14) zeigt sich eine deutlich stärkere Markierung der atrophischen Fasern im Vergleich zum übrigen Gewebe. Die o.g. Vorbedingung zu semiquantitativen Aussagen ist hier erfüllt, es kann also gefolgert werden, daß die Denervierung zu einer gesteigerten CNTFR $\alpha$ -Expression in den atrophischen Abschnitten geführt hat.

### 4.2 Expression in peripheren Nerven

Aus vorherigen Studien an peripheren Nerven ist eine geringe Expression von CNTFR $\alpha$  bekannt (Ip et al., 1993). Die hierfür verantwortlichen Zellen konnten bislang nicht charakterisiert werden. Am hier untersuchten Material fanden sich Hinweise für eine Expression in Schwannschen Zellen und Gefäßwandzellen (Abb. 16 und 17).

### 4.3 Expression in anderen Zelltypen

Die Expression von CNTFR $\alpha$  in Skelettmuskelfasern und Schwannschen Zellen konnte aufgrund der bislang bekannten Ergebnisse erwartet werden, unerwartet hingegen fanden sich Hinweise für CNTFR $\alpha$ -Produktion in anderen Zelltypen. Insbesondere bei begleitenden entzündlichen Veränderungen wurden Gefäßendothelien, Fibroblasten und glatte Muskelzellen der Gefäßwände markiert. Diese Zellen sind also - wenn die RNA tatsächlich in Rezeptorprotein translatiert wird - CNTF-

responsiv oder dienen als Produktionsort für den löslichen Rezeptor. Insbesondere im Fall der Endothelzellen ist eine rasche Verteilung des sCNTFR $\alpha$  über den Blutstrom vorstellbar. Diese Ergebnisse weisen auf weitergehende physiologische und pathophysiologische Funktionen von CNTF bzw. einem Liganden für CNTFR $\alpha$  hin. Die beobachteten Nebenwirkungen von systemisch verabreichtem CNTF finden damit einen weiteren Erklärungsansatz. Außer der hepatischen Induktion einer Akute-Phase-Reaktion durch den Komplex von CNTF bzw. weiteren Liganden mit dem löslichen Rezeptor ist auch eine lokale Produktion von Mediatoren wie z.B. Pyrogenen direkt im Gefäßsystem denkbar. Die bei ALS-Patienten erhöhte Menge an zirkulierendem CNTFR $\alpha$  könnte ebenfalls einen Einfluß auf den Schweregrad der Nebenwirkungen haben.

#### **4.4 Neurotrophe Faktoren in normaler und denervierter Skelettmuskulatur**

Nach Denervation durch Nervenfaserdurchtrennung bei Ratten wird die Expression von CNTFR $\alpha$  in der Muskulatur gesteigert (Davis et al., 1993a). Nach Reinnervation entspricht die CNTFR $\alpha$ -Transskriptionsrate wieder dem Ausgangszustand (Helgren et al., 1994). Vor kurzem konnte an humanem Material gezeigt werden, daß die CNTFR $\alpha$ -Expression in der Muskulatur bei chronischer neurogener Atrophie aufgrund von peripheren Neuropathien bzw. ALS ebenfalls gesteigert wird (Weis et al., 1998). Bei diesen Erkrankungen ist die Denervation üblicherweise nicht vollständig. Häufig wird sie durch kollaterale Reinnervation und Hypertrophie der Muskelfasern teilweise kompensiert.

Bei Hühnern wird in innervierter Skelettmuskulatur eine CNTF-Rezeptorkomponente mit ca. 70%iger Homologie zur Nukleinsäuresequenz von CNTFR $\alpha$  bei Ratte bzw. Mensch gebildet. Die Expression dieser Rezeptorkomponente ist jedoch nach Denervation vermindert (Ip et al., 1996). Dies weist auf unterschiedliche Regulationsmechanismen und Bedeutungen der CNTFR $\alpha$ -Expression im Muskel bei verschiedenen Spezies hin.

Durch Denervation wird die Expression verschiedener Muskelfaserproteine beeinflusst, so z.B. von Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors (Eftimie et al., 1991), der muskelspezifischen Kinase (= MuSK) (Valenzuela et al., 1995), des sog. neural cell adhesion molecule (=N-CAM) (Covault und Sanes, 1985) sowie von myoD und myogenin (Eftimie et al., 1991; Weis, 1994). Bei Säugetieren scheint die gesteigerte CNTFR $\alpha$ -Expression Teil dieses Reaktionsprogramms der Muskelfasern auf Denervation zu sein.

Verschiedene neurotrophe Moleküle wie z.B. IGF-II (Glazner und Ishii, 1995), die Neurotrophine BDNF, NT-3 und NT-4 (Griesbeck et al., 1995) und GDNF (Trupp et al., 1995; Henderson et al., 1994) werden in der Skelettmuskulatur von Säugern exprimiert. In intakter Skelettmuskulatur wird LIF noch nicht exprimiert, nach Verletzung kann er jedoch die Regeneration der Skelettmuskelfasern fördern (Barnard et al., 1994). Die Reaktion der Muskelfasern von Säugetieren auf Denervation beinhaltet eine Steigerung der Expression von IGF-II und BDNF (Funakoshi et al., 1995). Neurotrophe Moleküle könnten an der Reinnervation der betroffenen Muskelabschnitte beteiligt sein, indem sie z.B. das Aussprossen von Axonkollateralen von benachbarten motorischen Endplatten fördern (Gurney et al., 1992; Ulenkate et al., 1994).

Ein Mangel an elektrischer Aktivität führt zu einer Senkung der NT-4-Expression (Funakoshi et al., 1995). Dies weist auf einen weitergehenden Einfluß von elektrischer Stimulation auf die Expression neurotropher Faktoren in der Skelettmuskulatur hin.

Bisher konnte noch kein vom Zielgewebe produziertes Molekül identifiziert werden, welches das Überleben der Motoneurone während der Entwicklung entsprechend der klassischen Vorstellung eines neurotrophen Faktors beeinflusst (Oppenheim, 1996). CNTF wird nicht von der Skelettmuskulatur selbst gebildet; innerhalb der neuromuskulären Achse wird es hauptsächlich in Schwannschen Zellen produziert (Sendtner et al., 1994a; Richardson, 1994). Da CNTF über keine hydrophobe Signalsequenz verfügt, wird es wahrscheinlich im Normalfall nicht sezerniert; eine Freisetzung erfolgt aber im Fall einer Nervenläsion (Sendtner et al., 1992b). Periphere Neuropathien mit primärer oder sekundärer Beeinträchtigung der Schwannschen Zellen könnten zu einer signifikanten Freisetzung von CNTF führen. Dieser könnte dann an freien oder zellassozierten CNTFR $\alpha$  binden.

Während der Embryonalentwicklung kann eine Expression von CNTFR $\alpha$  nachgewiesen werden, obwohl die Expression von CNTF erst postpartal ein signifikantes Maß erreicht (Ip et al., 1993). CNTFR $\alpha$ -knockout-Mäuse sterben kurz nach der Geburt; sie besitzen erheblich weniger Motoneurone als gesunde Vergleichstiere (DeChiara et al., 1995). Andererseits weisen CNTF-knockout-Mäuse postpartal nur geringe Defizite auf; während der weiteren Entwicklung tritt nur ein geringer Verlust an Motoneuronen auf (Masu et al., 1993). Dieser scheinbare Widerspruch könnte durch einen bisher nicht identifizierten weiteren CNTFR $\alpha$ -Liganden erklärt werden. Möglicherweise hat auch freigesetzter CNTFR $\alpha$  selbst einen trophischen Einfluß auf die Motoneurone.

Die angesprochenen Untersuchungsergebnisse weisen auf mehrere mögliche Funktionen des bei neurogener Muskelatrophie von Muskelfasern gebildeten CNTFR $\alpha$  hin:

- Von der Zelloberfläche der Muskelfasern freigesetzter CNTFR $\alpha$  könnte trophische Effekte des von degenerierenden Schwannschen Zellen freigesetzten CNTF auf von ihrem Zielgewebe abgeschnittenen Neurone vermitteln. Diese Effekte könnten neben einer verbesserten Überlebensfähigkeit (Sendtner et al., 1990) auch eine Verbesserung des Neuritenwachstums und der Reinnervation beinhalten (Gurney et al., 1992; Ulenkate et al., 1994).
- Während der Reinnervation könnten CNTF und CNTFR $\alpha$  auch solche nichtneurale Zellen beeinflussen, die aufgrund des ihnen fehlenden CNTFR $\alpha$  üblicherweise nicht CNTF-responsiv sind, wohl aber LIF-Rezeptoren besitzen.
- Eine gesteigerte CNTFR $\alpha$ -Expression könnte auto- bzw. parakrine Effekte auf die Muskelfasern selbst ausüben, möglicherweise durch Vermittlung einer myotrophen Wirkung von CNTF (Forger et al., 1993; Helgren et al., 1994). Ein bislang nicht identifizierter CNTFR $\alpha$ -Ligand oder eine nicht rezeptorimmanente Eigenschaft des CNTFR $\alpha$  könnten hierbei involviert sein.

#### 4.5 Ausblick

Mit der vorliegenden Studie wurde u.a. gezeigt, daß eine CNTFR $\alpha$ -RNA-in situ-Hybridisierung an Archivmaterial möglich ist. Es werden keine besonderen Anforderungen an Fixierung und Einbettung des Materials gestellt. Die in situ-Hybridisierung ist allerdings eine aufwendige Methode. Zahlreiche Versuchsbedingungen wie z.B. Sondenart und -länge, Hybridisierungsbedingungen, Materialvorbereitung und Waschschriffe müssen für Sonde und Gewebe abgeglichen und optimiert werden.

Zur besseren Unterscheidung verschiedener Zelltypen und zusätzlichen Markierung sind Gegenfärbungen bzw. immunhistologische Untersuchungen interessant. Diese zusätzliche Information könnte in Zukunft durch Weiterverarbeitung hybridisierter Schnitte erzielt werden. Hierbei entstehende Probleme verschiedener Löslichkeiten und Interferenzen können durch Untersuchungen an Parallelschnitten vermieden werden.

Ein CNTF-Effekt auf Gefäße wurde bislang auch in vitro nicht untersucht; denkbar wären u.a. Einflüsse auf die Perfusion oder die Proliferation von Gefäßwandzellen. Ein interessanter Aspekt ist auch die Frage eines Einflusses auf die Permeabilität der Gefäßwand. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Blut-Hirn-Schranke, durch die der Stoffaustausch mit dem ZNS einer Kontrolle unterliegt. Als Substrat der normalerweise selektiv durchlässigen Schranke werden

Kapillarendothel und perivaskuläre Gliastrukturen angesehen. Im Rahmen z.B. von Fieber, Hypoxie und Einwirkung von Bakterientoxinen sowie in vielen Tumoren des Hirnparenchyms ist die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke erhöht. Bei Schädigung der Gefäßintegrität durch z.B. Hypoxie oder bei atypischer Gefäßstruktur (Tumorgefäße) ist eine solche Leckage rein mechanisch erklärbar. Eine möglicherweise rezeptorvermittelte Permeabilitätserhöhung der Gefäßwand im Rahmen fieberhafter oder toxinvermittelter Prozesse ließe sich durch Applikation von rezeptorblockierenden Antikörpern evtl. verhindern.

Zu untersuchen bleibt auch, ob noch weitere humane Zell- und Gewebetypen CNTFR $\alpha$  exprimieren. Hierzu steht neben den bereits eingesetzten quantitativen Verfahren nun auch die in situ-Hybridisierung zur genauen Lokalisation zur Verfügung.

## 5 Zusammenfassung

Das Wissen über die Bedingungen und Substanzen, die Entwicklung, Differenzierung und den Erhalt des Nervensystems fördern, also „neurotroph“ wirken, hat in den letzten Jahrzehnten enorm zugenommen. Ausgehend von der Entdeckung und Charakterisierung des nerve growth factor- (NGF-) Moleküls in den fünfziger Jahren wurde eine Vielzahl anderer Substanzen identifiziert. Mittlerweile sind mehrere Molekül- und Rezeptorfamilien bekannt, die in die Regulation von Zellzahl, Zelltyp, Zellziel und Zellerhalt des Nervensystems eingreifen. Das Zusammenwirken unzähliger Einflußfaktoren auf Überleben, Differenzierung und Verteilung von Zelltypen ist noch nicht entschlüsselt. Zwar gibt es eine Fülle von in vitro- und in vivo-Daten bezüglich der Wirkungen einzelner Stoffe auf diverse Zelltypen; die physiologischen Funktionen und das Zusammenspiel der Effekte können jedoch bisher nur erahnt werden. Genauere Kenntnisse sind jedoch unerlässlich, um erwünschte Wirkungen therapeutisch nutzen zu können.

Ein Molekül mit neurotropher Wirkung ist der ciliary neurotrophic factor (CNTF). Er scheint eine Rolle beim Erhalt und der Regenerationsfähigkeit des Nervensystems zu spielen. So beeinflusst CNTF die Überlebensfähigkeit von Vorderhornzellen des motorischen Systems und die Regeneration peripherer Nerven. Hieraus ergibt sich ein breites mögliches klinisches Einsatzgebiet. Denkbar sind Therapien neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems oder Verabreichung bei Schädigungen der peripheren Nerven mit daraus folgender Muskelatrophie. Trotz ermutigender Ergebnisse aus Zellkultur und Tierversuchen verliefen die ersten klinischen Studien enttäuschend. Aufgrund systemischer Nebenwirkungen zeigte sich bei den therapierten ALS-Patienten insgesamt eine Befundverschlechterung. Bei genauerer Kenntnis des Wirkmechanismus von CNTF sowie daraus folgenden modifizierten Applikationsformen könnte dieses Molekül dennoch nutzbringend angewandt werden. Unerlässlich für das Verständnis der Wirkung und Funktion von CNTF in vivo ist die Analyse der Verteilung des spezifischen Rezeptors (CNTFR $\alpha$ ). Bisher vorliegende Analysen wurden insbesondere an Gewebe von Versuchstieren (Ratte, Maus, Huhn, Affe) und mit Methoden durchgeführt, die eine quantitative Bestimmung, aber keine Lokalisation erlaubten.

In der vorliegenden Arbeit wird der Ort der peripheren Expression der spezifischen Rezeptoruntereinheit in humanem Gewebe (Muskel und Nerv) bestimmt. Mittels der Methode der in situ-Hybridisierung konnte die transkribierte RNA am Paraffinschnitt lokalisiert werden. Es wurde eine 400 bp-RNA-Sonde eingesetzt, die durch in vitro-Transkription eines Pst-Xma1-Abschnittes der cDNA von CNTFR $\alpha$  erzeugt wurde.

In den untersuchten Muskelbiopsien konnten CNTFR $\alpha$ -Transkripte in den perinukleären Regionen der Skelettmuskelfasern nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen dem Grad der Atrophie und der Signalintensität konnte bei beginnender neurogener Muskelatrophie und bei begleitenden/ursächlichen entzündlichen Veränderungen nicht hergestellt werden. Die deutlich atrophischen Muskelfasern bei chronischer neurogener Muskelatrophie ohne inflammatorische Komponente (V. a. Motoneuronerkrankung/spinale Muskelatrophie) wiesen hingegen eine im Vergleich zum geringer neurogen veränderten Muskelgewebe des Materials eine stärkere Anfärbung auf.

Innerhalb der peripheren Nerven fanden sich diskrete Anfärbungen der Schwannschen Zellen. Aufgrund der rel. geringen Signalintensität erscheinen hier jedoch weitere Untersuchungen an Parallelschnitten und mittels Immunhistochemie erforderlich.

Insbesondere in Material mit entzündlichen Veränderungen konnten CNTFR $\alpha$ -Transkripte in Endothelzellen, glatten Muskelzellen der Gefäßwände und Fibroblasten nachgewiesen werden.

Durch die Etablierung eines nichtradioaktiven Verfahrens an Routinematerial ohne besondere Vorbedingungen an Fixierungs- und Einbettungsabläufe ist die Untersuchung und Überprüfung der Rezeptorproduktion auch an Archivmaterial möglich. Diese Möglichkeit des Nachweises der Expression von CNTFR $\alpha$  auf zellulärer Ebene ermöglicht eine Untersuchung der Rezeptorverteilung in verschiedenen Phasen pathologischer Prozesse.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adler R, Landa K, Manthorpe M, Varon S (1979) Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204: 1434-1436.
2. Aebischer P, Schluep M, Déglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE (1996) Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2: 696-9.
3. Anonymous (1995) The pharmacokinetics of subcutaneously administered recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to parameters of the acute-phase response. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group. *Clin Neuropharmacol* 18: 500-14.
4. Anonymous (1996) A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group. *Neurology* 46: 1244-9.
5. Apfel SC, Kessler JA (1995) Neurotrophic factors in the therapy of peripheral neuropathy. *Baillieres Clin Neurol* 4: 593-606.
6. Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* 10: 3507-15.
7. Barbin G, Manthorpe M, Varon S (1984) Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 43: 1468-78.
8. Barnard W, Gower J, Brown M, Murphy M, Austin L (1994) Leukemia inhibitory factor (LIF) infusion stimulates skeletal muscle regeneration after injury: Injured muscle expresses LIF mRNA. *J Neurol Sci* 123: 108-13.
9. Baumann H, Ziegler SF, Mosley B, Morella KK, Pajovic S, Gearing DP (1993) Reconstitution of the response to leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in hepatoma cells. *J Biol Chem* 268: 8414-7.
10. Bazan J (1990a) Haematopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11: 350-354.
11. Bazan J (1990b) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6934-6938.

12. Bazan JF (1991) Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7: 197-208.
13. Berkemeier L, Winslow J, Kaplan D, Nikolics K, Goeddel D, Rosenthal A (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7: 857-866.
14. Bonni A, Frank DA, Schindler C, Greenberg ME (1993) Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science* 262: 1575-9.
15. Brookes B, Sanjak M, Mitsumoto H, Szirony K, Neville H, Ringel S, Brinkmann J, Pestronk A, Florence J, Cedarbaum J, Charatan M, Stambler N, Wittes J, Brittain E (1993) Recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients: dose selection strategy in phase I-II safety, tolerability and pharmacokinetic studies. *Can J Neurol Sci* 20 (Suppl. 4): 83.
16. Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6: 427-46.
17. Campana WM, Misasi R, O'Brien JS (1998) Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med* 1: 235-41.
18. Cheema S, Richards L, Murphy M, Bartlett P (1994) Leukemia inhibitory factor rescues motoneurons from axotomy-induced cell death. *NeuroReport* 5: 980-992.
19. Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE (1993) Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2222-6.
20. Covault J, Sanes J (1985) Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4544-48.
21. Curtis R, Adryan KM, Zhu Y, Harkness PJ, Lindsay RM, DiStefano PS (1993) Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature* 365: 253-5.
22. Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, Chevalier S, Yancopoulos GD (1993a) Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259: 1736-9.
23. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD (1993b) LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260: 1805-8.

24. Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253: 59-63.
25. Davis S, Yancopoulos GD (1993) The molecular biology of the CNTF receptor. *Curr Opin Cell Biol* 5: 281-5.
26. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip N, Kato A, Yancopoulos G (1995) Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83: 313-22.
27. Déglon N, Heyd B, Tan SA, Joseph JM, Zurn AD, Aebischer P (1996) Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts. *Hum Gene Ther* 7: 2135-46.
28. Dittrich F, Thoenen H, Sendtner M (1994) Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol* 35: 151-63.
29. Donaldson DH, Britt DE, Jones C, Jackson CL, Patterson D (1993) Localization of the gene for the ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR) to human chromosome 9. *Genomics* 17: 782-4.
30. Douglas AM, Goss GA, Sutherland RL, Hilton DJ, Berndt MC, Nicola NA, Begley CG (1997) Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells. *Oncogene* 14: 661-9.
31. Duberley RM, Johnson IP, Anand P, Swash M, Martin J, Leigh PN, Zeman S (1995) Ciliary neurotrophic factor receptor expression in spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 129 Suppl: 109-13.
32. Eftimie R, Brenner H, Buonanno A (1991) Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1349-53.
33. Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P, Baetge EE, Kordower JH (1997) Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386: 395-9.
34. Espat NJ, Auffenberg T, Rosenberg JJ, Rogy M, Martin D, Fang CH, Hasselgren PO, Copeland EM, Moldawer LL (1996) Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response. *Am J Physiol* 271: R185-90.

35. Forger NG, Roberts SL, Wong V, reedlove SM (1993) Ciliary neurotrophic factor maintains motoneurons and their target muscles in developing rats. *J Neurosci* 13: 4720-6.
36. Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrissey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Ip N (1992) Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* 9: 295-305.
37. Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, Ibanez C (1995) Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268: 1495-99.
38. Gearing D, Comeau M, Friend D, Gimpel S, Thut C, McGourty J, Brasher K, King J, Gillis S, Mosley B, Ziegler S, Cosman D (1992) The IL-6 signal transducer, gp 130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255: 1434-1437.
39. Giovannini M, Romo AJ, Evans GA (1993) Chromosomal localization of the human ciliary neurotrophic factor gene (CNTF) to 11q12 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 63: 62-3.
40. Glazner G, Ishii D (1995) Insulinlike growth factor gene expression in rat muscle during reinnervation. *Muscle Nerve* 18: 1433-42.
41. Gravel C, Götz R, Lorrain A, Sendtner M (1997) Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor leads to long-term survival of axotomized motor neurons. *Nat Med* 3: 765-70.
42. Griesbeck O, Parsadanian A, Sendtner M, Thoenen H (1995) Expression of neurotrophins in skeletal muscle: Quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res* : 21-33.
43. Guillet C, Auguste P, Mayo W, Kreher P, Gascan H (1999) Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J Neurosci* 19: 1257-62.
44. Guillet C, Huchet Cadiou C, Gascan H, Leoty C (1998) Changes in CNTF receptor alpha expression in rat skeletal muscle during the recovery period after hindlimb suspension. *Acta Physiol Scand* 163: 273-8.
45. Gurney ME, Yamamoto H, Kwon Y (1992) Induction of motor neuron sprouting in vivo by ciliary neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 12: 3241-7.

46. Haase G, Pettmann B, Vigne E, Castelnau Ptakhine L, Schmalbruch H, Kahn A (1998) Adenovirus-mediated transfer of the neurotrophin-3 gene into skeletal muscle of pmn mice: therapeutic effects and mechanisms of action. *J Neurol Sci* 160 Suppl 1: S97-105.
47. Hagg T, Quon D, Higaki J, Varon S (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron* 8: 145-58.
48. Hagg T, Varon S (1993) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6315-9.
49. Halböök F, Ibanez C, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6: 845-858.
50. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N, Hatanaka H (1991) Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal two-week-old rats in culture. *Neuroscience* 40: 445-452.
51. Helgren M, Friedman B, Kennedy M, Mulholland M, Messer A, Wong V, Lindsay R (1992) Ciliary neurotrophic factor delays motor impairments in the *Mnd* mouse, a genetic model of motor neuron disease. *Soc Neurosci Abstr* 18: 618.
52. Helgren ME, Squinto SP, Davis HL, Parry DJ, Boulton TG, Heck CS, Zhu Y, Yancopoulos GD, Lindsay RM, DiStefano PS (1994) Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76: 493-504.
53. Henderson C, Phillips H, Pollock R, Davies A, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen R et al. (1994) GDNF: A potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266: 1062-64.
54. Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde Y (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344: 339-341.
55. Holmlund T, Mitsumoto H, Greene T, Wong V, Cedarbaum J, Lindsay R (1992) The effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on spontaneously degenerating motor neurons in Wobbler mice. *Neurology* 42 (Suppl. 3): 369.
56. Hudgins SN, Levison SW (1998) Ciliary neurotrophic factor stimulates astroglial hypertrophy in vivo and in vitro. *Exp Neurol* 150: 171-82.

57. Hughes RA, Sendtner M, Thoenen H (1993) Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 36: 663-71.
58. Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M (1988) Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335: 70-3.
59. Ip FC, Fu AK, Tsim KW, Ip NY (1996) Differential expression of ciliary neurotrophic factor receptor in skeletal muscle of chick and rat after nerve injury. *J Neurochem* 67: 1607-12.
60. Ip NY (1998) The neurotrophins and neurotrophic cytokines: two families of growth factors acting on neural and hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* 840: 97-106.
61. Ip NY, Li YP, van de Stadt I, Panayotatos N, Alderson RF, Lindsay RM (1991) Ciliary neurotrophic factor enhances neuronal survival in embryonic rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 11: 3124-34.
62. Ip NY, McClain J, Barrezueta NX, Aldrich TH, Pan L, Li Y, Wiegand SJ, Friedman B, Davis S, Yancopoulos GD (1993) The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron* 10: 89-102.
63. Ip NY, Yancopoulos GD (1992) Ciliary neurotrophic factor and its receptor complex. *Prog Growth Factor Res* 4: 139-55.
64. Ip NY, Yancopoulos GD (1996) The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19: 491-515.
65. John H, Birnstiel M, Jones K (1969) RNA:DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-587.
66. Kessler C (1990) The digoxigenin system: principle and applications of the novel nonradioactive DNA labeling and detection system. *BioTechnology Int* : 183-194.
67. Kirsch M, Hofmann HD (1994) Expression of ciliary neurotrophic factor receptor mRNA and protein in the early postnatal and adult rat nervous system. *Neurosci Lett* 180: 163-6.
68. Kirsch M, Schneider T, Lee MY, Hofmann HD (1998) Lesion-induced changes in the expression of ciliary neurotrophic factor and its receptor in rat optic nerve. *Glia* 23: 239-48.
69. Kordower JH, Yaping C, MacLennan AJ (1997) Ciliary neurotrophic factor receptor alpha-immunoreactivity in the monkey central nervous system. *J Comp Neurol* 377: 365-80.

70. Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13: 2739-2748.
71. Kushima Y, Hatanaka H (1992) Interleukin-6 and leukemia inhibitory factor promote the survival of acetylcholinesterase-positive neurons in culture from embryonic rat spinal cord. *Neurosci Lett* 143: 110-114.
72. Kwon YW, Gurney ME (1994) Systemic injections of ciliary neurotrophic factor induce sprouting by adult motor neurons. *Neuroreport* 5: 789-92.
73. Lee MY, Deller T, Kirsch M, Frotscher M, Hofmann HD (1997) Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J Neurosci* 17: 1137-46.
74. Lee MY, Kim CJ, Shin SL, Moon SH, Chun MH (1998) Increased ciliary neurotrophic factor expression in reactive astrocytes following spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett* 255: 79-82.
75. Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde Y (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149-152.
76. Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162.
77. Levi-Montalcini R, Meyer H, Hamburger V (1954) In vitro experiments on the effects of mouse sarcoma 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* 14: 49-57.
78. Liebl DJ, Koo PH (1993) Comparative binding of neurotrophins (NT-3, CNTF and NGF) and various cytokines to alpha 2-macroglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1255-61.
79. Lin LF, Mismar D, Lile JD, Armes LG, Butler ET III, Vannice JL, Collins F (1989) Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246: 1023-5.
80. Lindsay R, Altar C, Cedarbaum J, Hyman C, Wiegand S (1993) The therapeutic potential of neurotrophic factors in the treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 124: 103-118.

81. Lindsay RM (1994) Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 15: 249-51.
82. Liu J, Modrell B, Aruffo A, Marken J, Taga T, Yasakuwa K, Murakami M, Kishimoto T, Shoyab M (1992) Interleukin-6 signal transducer gp 130 mediates oncostatin M signaling. *J Biol Chem* 267: 16763-16766.
83. MacLennan AJ, Gaskin AA, Lado DC (1994) CNTF receptor alpha mRNA expression in rodent cell lines and developing rat. *Brain Res Mol Brain Res* 25: 251-6.
84. MacLennan AJ, Vinson EN, Marks L, McLaurin DL, Pfeifer M, Lee N (1996) Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system. *J Neurosci* 16: 621-30.
85. Maisonpierre P, Belluscio L, Squinto S, Ip N, Furth M, Lindsay R, Yancopoulos G (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247: 1446-1451.
86. Manthorpe M, Davis GE, Varon S (1985) Purified proteins acting on cultured chick embryo ciliary ganglion neurons. *Fed Proc* 44: 2753-9.
87. Martin D, Merkel E, Tucker KK, McManaman JL, Albert D, Relton J, Russell DA (1996) Cachectic effect of ciliary neurotrophic factor on innervated skeletal muscle. *Am J Physiol* 271: R1422-8.
88. Martinou J, Martinou I, Kato A (1992) Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes the survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro. *Neuron* 8: 737-744.
89. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365: 27-32.
90. Mata M, Jin CF, Fink DJ (1993) Axotomy increases CNTF receptor mRNA in rat spinal cord. *Brain Res* 610: 162-5.
91. Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM (1994) Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 265: 1107-10.
92. Mitsumoto H, Olney R (1996) Drug combination treatment in patients with ALS: current status and future directions. *Neurology* 47: S103-S107.

93. Mühlegger K, Baatz H, Böhm S, von der Eltz H, Höltke H, Kessler C (1990) Synthesis and use of new digoxigenin-labeled nucleotides in nonradioactive labeling and detection of nucleic acids. *Nucleosides & Nucleotides* 8: 1161-1163.
94. Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T (1993) IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260: 1808-10.
95. Nishi R (1994) Target-derived molecules that influence the development of neurons in the avian ciliary ganglion. *J Neurobiol* 25: 612-619.
96. Oppenheim R (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.
97. Oppenheim R (1996) Neurotrophic survival molecules for motoneurons: An embarrassment of riches. *Neuron* 17: 195-97.
98. Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251: 1616-8.
99. Pardue M, Gall J (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 64: 600-604.
100. Patterson PH (1992) The emerging neuropoietic cytokine family: first CDF/LIF, CNTF and IL-6; next ONC, MGF, GCSF? *Curr Opin Neurobiol* 2: 94-7.
101. Penn RD, Kroin JS, York MM, Cedarbaum JM (1997) Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery* 40: 94-9; discussion 99-100.
102. Purves D (1986) The trophic theory of neural connections. *Trends Neurosci* 9: 486-489.
103. Rao MS, Landis SC, Patterson PH (1990) The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cell conditioned medium is different from the cholinergic factors in sciatic nerve and spinal cord. *Dev Biol* 139: 65-74.
104. Rende M, Muir D, Ruoslahti E, Hagg T, Varon S, Manthorpe M (1992) Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* 5: 25-32.
105. Richardson PM (1994) Ciliary neurotrophic factor: a review. *Pharmacol Ther* 63: 187-98.
106. Rose-John S, Heinrich P (1994) Soluble growth factor and cytokine receptors: generation and biological function. *Biochem J* 300: 281-290.

107. Sahenk Z, Seharaseyon J, Mendell JR (1994) CNTF potentiates peripheral nerve regeneration. *Brain Res* 655: 246-50.
108. Sariola H, Sainio K, Arumäe U, Saarma M (1994) Neurotrophins and ciliary neurotrophic factor: their biology and pathology. *Ann Med* 26: 355-63.
109. Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y (1988) Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol* 8: 3546-3549.
110. Schooltink H, Stoyan T, Roeb E, Heinrich PC, Rose-John S (1992) Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. *FEBS Lett* 314: 280-4.
111. Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, Thoenen H (1994a) Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 25: 1436-53.
112. Sendtner M, Dittrich F, Hughes RA, Thoenen H (1994b) Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci* 124 Suppl: 77-83.
113. Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Escary JL, Masu Y, Carroll P, Wolf E, Brem G, Brület P, Thoenen H (1996) Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol* 6: 686-94.
114. Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Thoenen H (1997) Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17: 6999-7006
115. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345: 440-1.
116. Sendtner M, Schmalbruch H, Stöckli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H (1992a) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 358: 502-4.
117. Sendtner M, Stöckli KA, Thoenen H (1992b) Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol* 118: 139-48.
118. Shapiro L, Zhang XX, Rupp RG, Wolff SM, Dinarello CA (1993) Ciliary neurotrophic factor is an endogenous pyrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8614-8.

119. Skaper SD, Varon S (1986) Age-dependent control of dorsal root ganglion neuron survival by macromolecular and low-molecular-weight trophic agents and substratum-bound laminins. *Brain Res* 389: 39-46.
120. Stahl N, Davis S, Wong V, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD (1993) Cross-linking identifies leukemia inhibitory factor-binding protein as a ciliary neurotrophic factor receptor component. *J Biol Chem* 268: 7628-31.
121. Stahl N, Yancopoulos G (1993) The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell* 74: 587-590.
122. Stahl N, Yancopoulos GD (1994) The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J Neurobiol* 25: 1454-66.
123. Stöckli KA, Lillien LE, Näher-Noé M, Breitfeld G, Hughes RA, Raff MC, Thoenen H, Sendtner M (1991) Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 115: 447-59.
124. Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, Lindholm D, Thoenen H (1989) Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342: 920-3.
125. Tan SA, Déglon N, Zurn AD, Baetge EE, Bamber B, Kato AC, Aebischer P (1996) Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. *Cell Transplant* 5: 577-87.
126. Thoenen H, Hughes RA, Sendtner M (1993) Towards a comprehensive understanding of the trophic support of motoneurons. *C R Acad Sci III* 316: 1158-63.
127. Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez C (1995) Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* 130: 137-48.
128. Ulenkate HJ, Kaal EC, Gispen WH, Jennekens FG (1994) Ciliary neurotrophic factor improves muscle fibre reinnervation after facial nerve crush in young rats. *Acta Neuropathol (Berl)* 88: 558-64.
129. Unsicker K, Grothe C, Westermann R, Wewetzer K (1992a) Cytokines in neural regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2: 671-678.

130. Unsicker K, Reichert-Preibsch H, Wewetzer K (1992b) Stimulation of neuron survival by basic FGF and CNTF is a direct effect and not mediated by non-neuronal cells: evidence from single cell cultures. *Dev Brain Res* 65: 285-288.
131. Valenzuela D, Stitt T, DiStefano P, Rojas E, Mattsson K, Compton D, Nunez L, Park J, Stark J, Gies D et al.(1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: Expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 15: 573-84.
132. Weis J (1994) Jun, Fos, MyoD1, and myogenin proteins are increased in skeletal muscle fiber nuclei after denervation. *Acta Neuropathol* 87: 63-70.
133. Weis J, Lie DC, Ragoss U, Züchner SL, Schröder JM, Karpati G, Farruggella T, Stahl N, Yancopoulos GD, DiStefano PS (1998) Increased expression of CNTF receptor alpha in denervated human skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 850-7.
134. Wetmur J, Ruyechan W, Douthart R (1981) Denaturation and renaturation of *Penicillium chrysogenum* mycophage double-stranded ribonucleic acid in tetraalkyl-ammonium salt solutions. *Biochemistry* 20: 2999-3002.
135. Wewetzer K, MacDonald JR, Collins F, Unsicker K (1990) CNTF rescues motoneurons from ontogenetic cell death in-vivo, but not in-vitro. *Neuroreport* 1: 203-6.
136. Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, Korsching S, Fann M, Patterson P (1989) The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 246: 1412-1416.
137. Yokoji H, Ariyama T, Takahashi R, Inazawa J, Misawa H, Deguchi T (1995) cDNA cloning and chromosomal localization of the human ciliary neurotrophic factor gene. *Neurosci Lett* 185: 175-8.

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von August 1995 bis April 1997 am Institut für Neuropathologie der RWTH Aachen. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. med. Joachim Weis für die Themenstellung und die Einführung in das Arbeitsfeld. Seine wertvollen Anregungen, die engagierte Betreuung in jeder Phase des Projektes und der freundschaftliche Umgang innerhalb der Arbeitsgruppe haben diese Arbeit Realität werden lassen,

Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr für die Übernahme des Koreferats sowie für die nachhaltige Förderung insbesondere in der Abschlußphase der Arbeit,

sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie der RWTH Aachen, insbesondere Wiltrud Heil und Astrid Knischewski, für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung und die fröhliche Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich allen danken, deren Liebe, Freundschaft und vorbehaltlose Unterstützung mich in den Jahren als Studentin und Doktorandin in Aachen begleitet haben – insbesondere meinen Eltern, ohne deren sicheres Vertrauen ein Gelingen der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für seine Hilfsbereitschaft und Geduld während des Entstehungsprozesses der Arbeit bin ich Michael Arndt zutiefst dankbar.

# Ursula Ragoß

## Lebenslauf

Geburtsdatum	8. August 1972
Geburtsort	Jülich
1978 - 1981	Grundschule Köln-Holweide
1981 - 1982	Grundschule Wiehl (Oberbergischer Kreis)
1982 - 1991	<b>Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Wiehl</b>
10/1991 - 08/1994	<b>RWTH Aachen</b> Ärztliche Vorprüfung im September 1993 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im August 1994
08/1994 - 07/1995	<b>University of Aberdeen, Schottland</b> Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes und des Deutschen Akademischen Austauschdienstes Teilnahme am Curriculum des 4. Studienjahres
08/1995 - 08/1997	<b>RWTH Aachen</b> Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 1997 1. PJ-Tertial in der Anästhesie (Krankenhaus Maria Hilf, Mönchengladbach)
08/1997 - 05/1998	<b>Humboldt-Universität zu Berlin</b> 2. PJ-Tertial in der Chirurgie, 3. PJ-Tertial in der Inneren Medizin beides am Carl-Thiem-Klinikum Cottbus Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Mai 1998
07/1998– 01/2000	<b>Ärztin im Praktikum,</b> Kardiologische Abteilung, Herzzentrum Cottbus
seit 05/2000	<b>Assistenzärztin</b> Med. Klinik II, Karl-Olga-Krankenhaus Stuttgart