Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

Auswirkungen niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Entstehung und den Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen im experimentellen Modell

- Vorhaben 3608S03008

Auftragnehmer: Johannes Gutenberg-Universität Mainz Institut für Physiologische Chemie und Pathochemie

M. P. Liebl C. Behl A. M. Clement

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.



Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-95/14

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN: urn:nbn:de:0221-2014090311650

Salzgitter, September 2014

Autoren

Dr. rer. nat. Martina P. Liebl

Institut für Pathobiochemie Universitätsmedizin Johannes Gutenberg-Universität Mainz Duesbergweg 6 55128 Mainz liebl@uni-mainz.de

Prof. Dr. rer. nat. Christian Behl

Institut für Pathobiochemie Universitätsmedizin Johannes Gutenberg-Universität Mainz Duesbergweg 6 55128 Mainz

Tel: 06131-3925890 Fax: 06131-3925792 cbehl@uni-mainz.de

Dr. rer. nat. Albrecht M. Clement

Institut für Pathobiochemie Universitätsmedizin Johannes Gutenberg-Universität Mainz Duesbergweg 6 55128 Mainz Tel: 06131-3925793

Fax: 06131-3925793 clement@uni-mainz.de

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung / Summary	5
1.	Einleitung und Aufgabenstellung	7
1.1.	Niederfrequente Magnetfelder als Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen	7
1.2.	Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	8
1.2.1.	Ätiologie der sporadischen ALS und LF-MF	9
1.2.2.	SOD1-vermittelte ALS	10
1.3.	Ätiologie des Morbus Alzheimer	11
1.3.1.	Magnetfeldexposition und Alzheimer Demenz	12
1.3.2.	Pathologie und mögliche Krankheitsmechanismen der Alzheimer Demenz	12
1.4.	Zielsetzung und Vorgehen	13
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Tiermodelle der ALS und der Alzheimer Demenz	15
2.2.	Untersuchung des Lernverhaltens	16
2.3.	Gewebeextraktion zur Herstellung von Gesamtlysaten	16
2.4.	Differentielle Fraktionierung von Gewebelysaten	17
2.5.	Denaturierende und native Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	17
2.6.	Western Blot	17
2.7.	Nachweis von Carbonylen	18
2.8.	Qualitativer Nachweis der Glutathionspiegel	18
2.9.	Qualitativer Nachweis der Dismutaseaktivität	18
2.10.	Quantitative Bestimmung der Dismutaseaktivität	19
2.11.	Nachweis von Aß-Peptiden im ELISA	19
2.12.	Isolierung von mRNA aus dem Rückenmark und Herstellung von cDNA	19
2.13.	RT-qPCR zur Bestimmung der mRNA von hSOD1 und mSOD1	20
2.14.	Bestimmung der Transkriptionsspiegel von Chaperonen mit dem Qiagen Heat Shock Array Kit	20
2.15.	Immunfluoreszenzfärbung von Geweben aus dem Rückenmark	20
2.16.	Immunfluoreszenzfärbung von Gehirnschnitten	21
2.17.	Kongorot-Färbung von Gehirnschnitten	21
2.18.	Statistische Auswertung	21
2.19.	Aufbau der Spulen und Exposition	22

3.	Ergebnisse	24
3.1.	Körpertemperatur	24
3.2.	Einfluss niederfrequenter Magnetfelder auf den Krankheitsverlauf bei Mausmodellen der ALS	25
3.2.1.	SOD1-Spiegel und Dismutaseaktivität	25
3.2.2.	Spiegel von ALS-Kandidaten Genen	28
3.2.3.	Proteinaggregation im Rückenmark SOD1 transgener Tiere	30
3.2.4.	Expressionsanalyse von Genen, die die Proteostase beeinflussen	33
3.2.5.	Proteinspiegel von Hitzeschockproteinen in SOD1 transgenen Mäusen	34
3.2.6.	Analyse von autophagierelevanten Proteinen	36
3.2.7.	Kennzeichen oxidativer Schädigung in SOD1 transgenen Tieren	38
3.2.8.	Analyse der Glutathionspiegel	39
3.2.9.	Gliale Aktivierung	40
3.2.10.	Einfluß von LF-MF auf das Überleben SOD1 transgener Mäuse	42
3.3.	LF-MF Exposition von APP23 Mäusen	46
3.3.1.	Untersuchung der APP-Spiegel	46
3.3.2.	Analyse der löslichen APP-Spaltprodukte	47
3.3.3.	Quantitative Analyse der Aß-Spiegel	48
3.3.4.	Analyse der amyloiden Plaques im Cortex und Hippocampus	49
3.3.5.	Tau und Phospho-Tau Spiegel in APP23 Tieren	53
3.3.6.	Analyse der Proteinspiegel der Chaperone Hsp110 und Hsp90	54
3.3.7.	Analyse autophagierelevante Proteine	56
3.3.8.	Untersuchungen zur glialen Aktivierung	57
3.3.9.	LF-MF und das Lernverhalten von APP23 Tieren	59
4.	Diskussion	62
4.1.	Auswahl der Mausmodelle und methodische Aspekte	62
4.2.	LF-MF Exposition und ALS	64
4.3.	Modelle der Alzheimer Demenz und Exposition mit LF-MF	65
4.4.	Einfluss von LF-MF auf krankheitsrelevante zelluläre Prozesse	66
4.5.	Schlussfolgerungen und Ausblick	68
5.	Referenzen	69

Zusammenfassung

Die Ursache Entstehung altersabhängigen neurodegenerativen für von Erkrankungen wir der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) oder der Alzheimer Demenz sind weitestgehend unbekannt. Eine Reihe von epidemiologischen Studien deutet darauf hin, dass die Exposition mit niederfrequenten Magnetfeldern (LF-MF) einen möglichen Risikofaktor darstellt, der den Ausbruch beider Krankheit begünstigt. Allerdings ist bisher vollkommen unbekannt, ob und wenn ja auf welche zellulären Prozesse die Exposition mit LF-MF Einfluss nehmen könnte. Mit Hilfe von transgenen Mauslinien, die Modelle für die ALS und die Alzheimer Demenz darstellen, wurde in dieser Studie untersucht, ob die kontinuierlich Exposition mit LF-MF (50 Hz, 1 mT) die Pathogenese der Krankheiten beeinflusst. Transgene Mauslinien, die zwei unterschiedliche mutante Varianten der Cu/Zn-Superoxiddismutase exprimieren (SOD1 G85R und SOD1 G93A), stellen Modelle der ALS dar, die das altersabhängige, progressive Auftreten der Krankheit und mehrere pathologische Kennzeichen der menschlichen Erkrankung entwickeln. Diese Tiere wurden mindestens acht Monate bis zum Erreichen des Endstadiums der Krankheit exponiert. Die Analyse des Krankheitsverlaufs, der Zeitpunkt des Auftretens der Krankheit und das Alter beim Erreichen des Endstadiums der Krankheit waren unabhängig von der Exposition. Die Analyse von krankheitsrelevanten zellulären Prozessen wie der glialen Aktivierung, die Erhaltung der Proteinhomöostase und der oxidative Status des Gewebes, zeigten in den Mauslinien keine einheitliche Veränderung.

Transgene APP23-Mäuse, die die Schwedische Doppelmutante des Amyloiden Vorläuferproteins (APP) exprimieren, stellen ein Modell der Alzheimer Demenz dar, das durch eine fortschreitenden Beeinträchtigung des Lernverhaltens und die Bildung von amyloiden Plaques charakterisiert ist. Nach einer Exposition von mindestens 16 Monaten zeigten die Tiere im Alter von 18 Monaten keine Beeinträchtigung des Lernverhaltens gegenüber scheinexponierten Tieren. Die APP-Spiegel, dessen Metabolite, die gliale Aktivierung und die Spiegel von Proteinen zur Erhaltung der Proteinhomöostase waren im Cortex und Hippocampus der transgenen Tiere ebenfalls unabhängig von der Exposition. Zusammenfassend wurden in dieser Studie keine Hinweise gefunden, die darauf hindeuten, das die Exposition mit LF-MF den Krankheitsverlauf der ALS und der Alzheimer Demenz negativ beeinflussen.

Summary

The etiology of late-onset neurodegenerative diseases like amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or Alzheimer's dementia is largely unknown. Epidemiological studies indicate that the occupational or residential exposure with low-frequency magnetic fields (LF-MF) might be a potential risk factor for developing these detrimental diseases. It is, however, undiscovered if and how LF-MF might interfere with cellular processes and thereby initiating disease or at least ameliorate its progression. By using transgenic mouse lines representing models for ALS and Alzheimer's dementia we investigated if the long-term exposure with LF-MF (50 Hz, 1 mT) alters the disease course and the appearance of pathological hallmarks. In this study we used two transgenic mouse lines expressing the SOD1 G85R and the SOD1 G93A which develop a late onset, progressive motor neuron degeneration and many pathological hallmarks comparable to human disease. Despite a long term exposure of SOD1 G85R and SOD1 G93A mice for about ten month and eight month, respectively, the age of onset of disease, the disease course and age of endstage were not altered compared to sham exposed animals. Disease relevant processes like the activation of glia cells, the levels of proteins contributing to maintain protein homeostasis, and the oxidative status of the affected Tissues were not consistently altered in both mouse lines.

The APP23 mouse line expressing the Swedish double mutation of APP represents a model of Alzheimer's dementia that is characterized by the progressive decline of learning and memory and the formation of amyloid plaques. The long term exposure over about 16 month with LF-MF showed no detectable aggravation of learning deficits when animals were analyzed at 18 month of age. In addition, the levels of APP and its fragments, glial activation, and levels of proteins involved in maintaining protein homeostasis were not consistently altered in the cortex and the hippocampus of male and female APP23 mice. In summary, our study indicates that the exposure with LF-MF did not interfere with molecular pathways responsible for motor neuron degeneration in ALS or the loss of brain function in Alzheimer's dementia in the genetic models analyzed.

1. Einleitung und Aufgabenstellung

1.1. Niederfrequente Magnetfelder als Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen

Die rasante technische Entwicklung unseres gesamten Lebens führt zu einer schnellen Zunahme von Quellen niederfrequenter magnetischer Felder (*low frequency magnetic field*; LF-MF) im Arbeitsumfeld, der medizinischen Diagnostik und insbesondere im alltäglichen Leben. Epidemiologische Studien sowie gezielte Untersuchungen an Tieren oder mit Zellkulturen haben bisher keine eindeutigen Belege geliefert, ob die Exposition mit LF-MF Konsequenzen für die Entwicklung eines Menschen hat oder gegebenenfalls für die Entstehung von Erkrankungen verantwortlich ist. Aus diesem Grund geht die Weltgesundheitsorganisation (WHO) in ihren "Environmental Health Criteria 238" von einer möglichen, aber nicht belegten, Gesundheitsgefährdung bei einer lang andauernden Exposition durch diese Felder aus (WHO, 2007). Obwohl bisher nicht bekannt ist, ob und wie sich LF-MF auf zelluläre Prozesse auswirken könnten, ist es in Anbetracht der gestiegenen Lebenserwartung möglich, dass selbst kleine Einflüsse die Häufigkeit von altersassoziierten Erkrankungen negativ beeinflussen.

Die Ursachen von altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) oder Morbus Alzheimer sind häufig unbekannt. Nur bis zu maximal 10% aller Fälle sind bei beiden Krankheiten vererbt und haben eine eindeutige familiäre Ursache. Als mögliche Risikofaktoren für den sporadischen Ausbruch der Krankheiten gelten eine genetische Prädisposition, Veränderungen des Nervensystems auf Grund des Alterns sowie vor allem Umwelteinflüsse (Migliore and Coppede, 2008). Die Identifizierung dieser Faktoren ist von besonderem Interesse, da eine Verringerung der Fallzahlen im Besonderen persönliches Leid lindert, aber auch die sozioökonomische Herausforderungen der Gesellschaft reduzieren würde. Als kritische Umweltfaktoren könnten die Arbeitsbedingungen und die Lebensweise gelten. In diesem Zusammenhang wurden auch LF-MF als mögliche (Mit-)Auslöser für ALS und die Alzheimer Demenz genannt. Dieser Befund war durchaus spezifisch, da andere neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson bisher nicht mit der Exposition mit LF-MF in Verbindung gebracht wurden.

Initiale Hinweise, die einen Zusammenhang von Exposition mit LF-MF und der Alzheimer Demenz oder ALS herstellen, stammen von epidemiologischen Studien. Diese Untersuchungen sind sehr heterogen, weil die Erhebung der Daten auf Grund mehrerer Gesichtspunkte eine besondere Herausforderung darstellt (Roosli, 2008; Kheifets et al., 2009) und folgende Fragen aufwirft: (i) Sind prospektive Fall-Kontroll-Studien, bei denen Patienten während des gesamten Krankheitsverlaufs begleitet werden, genauso aussagekräftig wie Populationsstudien, bei denen die Daten retrospektiv und zum Teil durch Befragung von Angehörigen erhoben werden? (ii) Ist die Diagnose, die bei der Alzheimer Demenz und ALS sehr aufwendig ist, immer eindeutig gestellt? (iii) Ist die Dosis der Exposition durch Arbeitsplatz-Beschreibungen ausreichend charakterisiert? Besonders aus diesen Gründen sind kontrollierte Studien an den entsprechenden Krankheitsmodellen der beiden Krankheiten notwendig, da in diesen eine homogene Population von Tieren untersucht wird und die Rahmenbedingungen sehr genau kontrolliert werden können.

1.2. Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Die ALS ist nach klassischer Sicht eine neurodegenerative Erkrankung, bei der die primären Motorneurone des motorischen Cortex und des Hirnstamms und die sekundären Motorneurone im Rückenmark absterben. Dies führt zu einer progressiven Atrophie der willkürlichen Muskulatur und zu einer fortschreitenden Lähmung der Patienten. Die Betroffenen versterben durchschnittlich zwei bis fünf Jahre nach der Diagnose an Ateminsuffizienz, wobei eine effiziente kausale Behandlung der Krankheit bis heute nicht zur Verfügung steht. Die Identifizierung von Genen, die familiäre Formen der ALS auslösen oder genetische Risikofaktoren der ALS darstellen, und die Untersuchung der Gewebepathologie können Hinweise liefern, welche zellulären Prozessen an der Entstehung der Krankheit und deren Fortschreiten beteiligt sind. Bis heute sind Mutationen in 28 Genloci identifiziert worden, wobei nicht bei allen geklärt ist, ob die mutierten Proteine durch den Verlust einer Eigenschaft oder durch die Entwicklung einer neuen schädlichen Eigenschaft entsprechenden toxisch wirken. Die Proteine üben Funktionen den verschiedensten zellulären Vorgängen wie dem RNA-Metabolismus (z.B. TDP-43 und FUS), der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase (Proteostase) (z.B. Ubiquilin 2 und Optineurin), der oxidativen Abwehr (z.B. SOD1) oder der Dynamik des Zytoskeletts (z.B. Profilin 1 und Peripherin) aus (ALSoD Database, Kings College London, Institute of Psychiatry; www. http://alsod.iop.kcl.ac.uk/). Pathologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass neben der Störung der Proteinhomöostase, was durch das Auftreten von Proteinaggregaten gekennzeichnet ist, auch die Funktion von Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats gestört sind (Nassif et al., 2010) und Gliazellen eine Rolle beim Fortschreiten der Krankheit spielen (Clement et al., 2003; Boillee et al., 2006a; Boillee et al., 2006b). Einen besonderen Stellenwert bei der Untersuchung der Krankheitsmechanismen nimmt die Untersuchung von experimentellen Säugermodellen der SOD1-vermitelten ALS ein (siehe 1.2.2.), weil Mutationen im Gen der SOD1 die häufigste Ursache für familiäre ALS darstellen.

1.2.1. Ätiologie der sporadischen ALS und LF-MF

Die Ursachen der sporadischen ALS, die mehr als 90% aller Patienten betrifft, sind bisher ungeklärt. Man geht heute davon aus, dass eine Kombination von genetischer Prädisposition, der Alterung und zeitlich oder/und qualitativ akkumulierender Umwelteinflüsse für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich sind (Al-Chalabi and Hardiman, 2013). Einer dieser Faktoren könnte die Exposition mit LF-MF sein, was in der Tat in mehreren epidemiologischen Studien auch so beschrieben wurde (Park et al., 2005; Roosli et al., 2007). Obwohl diese Untersuchungen insgesamt sehr heterogen sind (siehe 1.1.), besaßen Menschen, deren berufsbedingte Exposition mit LF-MF besonders hoch ist, ein höheres Risiko an ALS zu erkranken als entsprechende Kontrollgruppen. In anderen Studien konnten sowohl eine arbeitsbedingte Exposition wie auch die Nähe zu Hochspannungsleitungen nicht mit ALS assoziiert werden (Huss et al., 2009; Parlett et al., 2011). Allerdings bestätigen drei systematische Literaturanalysen eine Assoziation von ALS und der berufsbedingten Exposition mit niederfrequenten elektromagnetischen Feldern (Sutedja et al., 2009; Zhou et al., 2012; Vergara et al., 2013).

Selbst wenn die Exposition mit LF-MF ein Risiko darstellen könnte an ALS zu erkranken, ist bisher nicht bekannt, wie die Felder das Gewebe schädigen, welche zellulären und molekularen Prozesse beeinflusst werden und warum die Felder gerade zu einer spezifischen Schädigung der Motorneurone führen. Bisher liegen nur sehr wenige Studien vor, die den Einfluss von LF-MF auf zelluläre oder Tiermodelle neurodegenerativer Erkrankungen untersuchen (siehe 1.2.2. und 1.3.2.). Eine Reihe von Studien mit nicht-neuronalen Zellen belegt, dass LF-MF einen Einfluss unter

anderem auf die antioxidative Abwehr, die intrazelluläre Stressantwort und auf die Genexpression haben. Allerdings lässt sich bis heute kein einheitliches Bild zeichnen, da die Untersuchungen mit unterschiedlichen Zellkultursystemen und unter verschiedenen Expositionsbedingungen durchgeführt wurden und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse beschrieben wurden (Clement and Behl, 2009).

1.2.2. SOD1-vermittelte ALS

Das erste Gen, das mit ALS assoziiert wurde, kodiert für die Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD1) und repräsentiert 20% der familiären Fälle (Rosen et al., 1993). Inzwischen sind mehr als 170 Punktmutationen bekannt, die zum Ausbruch der Krankheit führen und in der Regel dominant vererbt werden (www. http://alsod.iop.kcl.ac.uk/). SOD1 wird in allen Körperzellen exprimiert und ist eine Komponente der antioxidativen Abwehr. In einer Dismutasereaktion werden Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgesetzt, das anschließend durch Katalase entgiftet wird. Da manche ALS-auslösende mutante SOD1-Proteine Dismutaseaktivität besitzen (z.B. SOD1 G93A) (Borchelt et al., 1994) und die systemische Deletion des sod1-Gens keine ALS-ähnliche Krankheit in Mäusen auslöst (Reaume et al., 1996), geht man davon aus, dass die mutanten Proteine eine oder mehrere toxische Eigenschaften erlangen. Transgene Mäuse, die mutante SOD1 überexprimieren, entwickeln eine ALS-ähnliche Krankheit, die zum Absterben der Motorneurone und nachfolgend zur vollständigen Paralyse der Tiere führt. Die Untersuchung von diesen Tiermodellen und zellulären Modellen, die mutante Varianten der humanen SOD1 überexprimieren, deuten darauf hin, dass die Proteostase und der axonale Transport gestört sind, Motorneurone durch Exzitotoxizität geschädigt werden, die Funktion der Mitochondrien eingeschränkt und die antioxidative Abwehr vermindert ist. Außerdem beeinflusst die Expression mutanter SOD1 in Astrozyten, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen den Krankheitsverlauf (Clement et al., 2003; Boillee et al., 2006a), so dass man von einer nicht-zellautonomen Toxizität ausgeht. Ein prominentes pathologisches Kennzeichen der Krankheit ist das Auftreten von intrazellulären Proteinaggregaten. Studien, die unter anderem in unserem Labor durchgeführt wurden, deuten aber darauf hin, dass fehlgefaltete, aber lösliche mutante SOD1 die toxische Form des Proteins repräsentiert (Witan et al., 2008; Witan et al., 2009; Brotherton et al., 2012; Weichert et al., 2014).

Transgene Mäuse, die mutante SOD1 Varianten überexprimieren, wurden bisher in einer Studie LF-MF ausgesetzt (Poulletier de Gannes et al., 2009). Die Autoren exponierten jeweils 7 Tiere mit 100 μT oder 1000 μT (je 50 Hz) für 2 Stunden an 5 Tagen pro Woche. Die Exposition wurde über 7 Wochen durchgeführt, wobei scheinexponierte Tiere eine Überlebensdauer von 140 Tagen aufwiesen. Die Autoren konnten unter diesen Bedingungen keinen Einfluss der Magnetfeldexposition auf die motorischen Fähigkeiten und das Überleben der Tiere feststellen (Poulletier de Gannes et al., 2009).

1.3. Ätiologie des Morbus Alzheimer

Die Alzheimer Demenz ist die häufigste Form der Demenzerkrankungen des alternden Menschen und es wird auf Grund der demographischen Entwicklung erwartet, dass sich der Bedarf an Pflegeplätzen für Alzheimer Patienten zwischen 2010 und 2050 insgesamt verdreifacht (World Alzheimer Report 2013). Im Gegensatz zur ALS stellt die Alzheimer Demenz eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung dar, bei der ein fortschreitender Abbau der kognitiven Fähigkeiten über Jahrzehnte zu beobachten ist und Nervenzellen des Cortex und des Limbischen Systems betroffen sind. Die erste Phase der Krankheit ist durch Beeinträchtigungen des Kurzzeitgedächtnisses charakterisiert. Im weiteren Verlauf führt die neuronale Degeneration zu Einschränkungen des Langzeitgedächtnisses, des Denkvermögens und der Orientierungsfähigkeit bis hin zum hochgradigen geistigen Abbau und dem Verlust der eigenen Persönlichkeit. Es gilt als gesichert, dass das Alter den größten Risikofaktor darstellt. Die Inzidenz der Krankheit steigt von der Altersgruppe der 65- bis 74 jährigen um mehr als das Vierfache auf 231 Fälle pro 1000 Personen im Alter von über 85 Jahren (Hebert et al., 2001). Allerdings sind die Ursachen der Krankheit für den größten Teil der Fälle bis heute unklar. Es wird davon ausgegangen, dass, möglicherweise abgesehen von den vererbten Fällen, eine Kombination von mehreren Faktoren die Erkrankung auslöst. Außerdem scheint gesichert, dass bereits mehrere Jahrzehnte vor den ersten Symptomen des mild cognitive impairment (MCI) pathologische Prozesse ablaufen, für deren Diagnose bisher aber keine standardisierten Verhaltenstests oder gesicherten Biomarker zur Verfügung stehen.

1.3.1. Magnetfeldexposition und Alzheimer Demenz

Ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Alzheimer Demenz und der Exposition mit LF-MF wird seit über 15 Jahren diskutiert. In einer Reihe von neueren Fall-Kontroll- und Kohortenstudien wird ein direkter Zusammenhang zwischen arbeitsbedingter Exposition mit LF-MF und dem Risiko, an der Alzheimer Demenz zu erkranken, beschrieben (Park et al., 2005; Davanipour et al., 2007; Roosli et al., 2007). Eine große Kohortenstudie belegt, dass auch die Lage des Wohnraums und die Wohndauer in der Nähe von Hochspannungsleitungen in Zusammenhang mit dem Auftreten der Alzheimer Erkrankung stehen (Huss et al., 2009). Damit wurde zum ersten Mal eine Verbindung zwischen der Exposition mit LF-MF und einer neurodegenerativen Erkrankung außerhalb des Arbeitsplatzes hergestellt. Mehrere Meta-Analysen, die unterschiedliche Kriterien für die Auswahl der Studien herangezogen haben, kommen zu dem Schluss, dass Personen, die einer arbeitsbedingten Exposition mit LF-MF ausgesetzt sind, ein erhöhtes Risiko tragen an der Alzheimer Demenz zu erkranken (Garcia et al., 2008; Vergara et al., 2013). Obwohl eine Reihe von epidemiologischen Untersuchungen auf einen Effekt von LF-MF hindeutet, ist bisher vollkommen unklar, auf welche Weise die Felder die Erkrankung auslösen oder den Krankheitsverlauf beeinflussen könnten (Übersicht in (Maes and Verschaeve, 2012; Mattsson and Simko, 2012).

1.3.2. Pathologie und mögliche Krankheitsmechanismen der Alzheimer Demenz

Die auffälligsten pathologischen Veränderungen der Gehirne von familiären und sporadischen Alzheimerpatienten sind der prominente Verlust an Nervenzellen in den betroffenen Gehirnbereichen, das Auftreten von amyloiden Plagues Extrazellularraum und neurofibrillären Ablagerungen innerhalb von Neuronen. Amyloide Plaques bestehen größtenteils aus Aß-Fragmenten, die aus dem Amyloiden Vorläuferprotein (APP) entstehen. Mutationen des app-Gens, die zu einer erhöhten Menge an Aß-Fragmenten führen, lösen familiäre Formen der Alzheimer Demenz aus, was darauf hindeutet, dass die Bildung der Aß-Fragmente eine Rolle bei der Entstehung der Krankheit spielt. Allerdings ist bis heute unklar, wie und an welcher Stelle die Aß-Fragmente in den Pathomechanismus der Krankheit einwirken. Es gilt heute als gesichert, dass die Aß-Fragmente in aggregierter Form, die Aß-Plaques, ein spätes, möglicherweise sekundäres Kennzeichen der Krankheit sind und nicht kausal für die Schädigung der Nervenzellen verantwortlich sind.

Die intrazellulären neurofibrillären Ablagerungen setzen sich aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zusammen. Tau ist ein neuronales Mikrotubuli-Protein, das deren Dynamik beeinflusst und bei mehreren assoziiertes neurodegenerativen Erkrankungen aggregiert vorkommt. Ähnlich wie bei den Aß-Fragmenten ist es unklar, ob monomere, oligomere oder polymere Tau-Proteine in Verbindung mit posttranslationalen Modifikationen die Toxizität verursachen (Lasagna-Reeves et al., 2012). Obwohl bisher nicht abschließend geklärt ist, wie das Zusammenspiel zwischen Aß-Herstellung und Tau-Pathologie die Neurotoxizität verursacht (Ittner and Gotz, 2011), sind das Auftreten von Aß-Plaques und hyperphosphoryliertem Tau Kennzeichen der Erkrankung in einem Mausmodell, das in dieser Studie Verwendung findet (Sturchler-Pierrat et al., 1997).

Neben dem Auftreten von Aß-Peptiden und den neurofibrillären Ablagerungen sind die Aktivierung von Mikrogliazellen, den immunkompetenten Zellen des Nervensystems, und deren konzentriertes Auftreten um senile Plaques ein pathologisches Kennzeichen (Lucin and Wyss-Coray, 2009). Mikrogliazellen scheinen bereits bei der frühen Entwicklung der Krankheit durch die Aktivierung des sogenannten NLRP3-Inflammosoms durch Aß-Peptide und die darauffolgenden proinflammatorischen Prozesse einen entscheidenden Beitrag zum Fortschreiten der Krankheit zu leisten (Heneka et al., 2013). Daneben sind das Auftreten von oxidativem Stress (Behl, 2005) und eine gestörte Proteinhomöostase in den betroffenen Geweben beschrieben, wobei insbesondere eine Beeinträchtigung der Autophagie einen primären Grund für das Absterben der Nervenzellen darstellen könnte (Nixon et al., 2005; Pimplikar et al., 2010).

1.4. Zielsetzung und Vorgehen

Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass die Exposition mit LF-MF einen Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer Demenz und der Amyotrophen Lateralsklerose darstellt. Bisher liegen aber keine gesicherten experimentellen Daten vor, die den Einfluss von LF-MF eindeutig belegen und mögliche molekulare Mechanismen der Krankheitsentstehung aufzeigen. In der vorliegenden Studie wurde daher untersucht, ob eine lang andauernde Exposition mit LF-MF den Krankheitsverlauf in anerkannten und vielfach verwendeten Tiermodellen der Amyotrophen Lateralsklerose und der Alzheimer Demenz beeinflusst.

Transgene Mäuse, die die dismutaseinaktive mutante SOD1-Variante SOD1 GBSR, und solche, die die dismutaseaktive Variante SOD1 G93A überexprimieren, wurden ab ca. der achten Lebenswoche in einem LF-MF (50 Hz, 1 mT), das durch Merritt-Spulen erzeugt wurde, gehalten. Die Kontrollgruppe stand in baugleichen Gestellen, bei denen die Wicklung der Spulen nach der Hälfte der Windungen umgelenkt wurde. Alle Tiere wurden einmal pro Woche gewogen, um einen möglichen Einfluss des Magnetfeldes auf das Körperwachstum zu untersuchen. Für die Mausmodelle der ALS ist ein Gewichtsverlust bei adulten Tieren ein Kennzeichen für den phänotypischen Beginn der Krankheit. Die Tiere wurden so lange im Magnetfeld exponiert oder scheinexponiert, bis sie das Endstadium der Krankheit erreicht hatten, so dass der Beginn und die Dauer der Krankheit, sowie das Lebensalter der Tiere genau bestimmt werden konnten. Danach wurden die betroffenen Gewebe mit biochemischen, histologischen und molekularbiologischen Methoden untersucht und Einfluss der Magnetfelder auf möglicher die Dismutaseaktivität, Proteinhomöostase, den oxidativen Status der Zellen, die gliale Aktivierung und Signaltransduktionswege beleuchtet.

Transgene Mäuse, die die schwedische Doppelmutante des humanen APP unter Kontrolle des Maus-Thy1 Promotors überexprimieren, entwickeln ab einem Alter von sechs Monaten fortschreitend Plaques, um die herum aktivierte Gliazellen auftreten. Zusätzlich sind diese Tiere in ihrer Lernfähigkeit gegenüber Wildtyp-Tieren deutlich eingeschränkt (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Im Gegensatz zu den transgenen SOD1 Linien ist die Lebenserwartung der APP23-Tiere nicht grundlegend beeinträchtigt. Die Tiere wurden in einem Alter von 18 Monaten in einen Lerntest eingesetzt. Die Untersuchung der Lernfähigkeit dieser Tiere ist ein Maß für die funktionelle Schädigung des Gehirns, wie sie auch vergleichbar beim Menschen auftritt, und kann zunächst unabhängig von den molekularen Ursachen der Krankheit betrachtet werden. Nach der Verhaltensanalyse wurden der Hippocampus und der Cortex der Tiere präpariert und die Spiegel und die Prozessierung von APP quantitativ untersucht. Daneben wurden die gliale Aktivierung und Proteine, die an der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase beteiligt sind, mit biochemischen und histologischen Methoden analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodelle der ALS und der Alzheimer Demenz

Alle Tiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin Mainz unter den vorgeschriebenen tierschutzrechtlichen Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten jederzeit Zugang zu Standardfutter und Wasser. Den Mäusen standen Röhrchen und Tücher zum Nestbau zur Verfügung. Alle Bestandteile des Käfigs und der Wasserflaschen waren frei von Metall, so dass diese keine Veränderung des Magnetfeldes verursachten.

Transgene Mäuse, die SOD1 G85R exprimieren, wurden von Prof. Don Cleveland (University of California, San Diego, USA) zur Verfügung gestellt (Bruijn et al., 1997). SOD1 G93A transgene Mäuse stammten ursprünglich aus der Zucht von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) (Gurney et al., 1994). Die APP23 Mauslinie wurde von Dr. Matthias Staufenbiel von der Firma Novartis (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Alle Mauslinien wurden heterozygot gehalten. Alle Tiere wurden nach dem Absetzen und der Genotypisierung wöchentlich gewogen, um die Entwicklung zu verfolgen. Die Mausmodelle der ALS entwickeln eine progressive neurodegenerative Erkrankung. Der phänotypische Beginn der Krankheit wurde als der Verlust des Maximalgewichts um 10% definiert. Das Endstadium der Krankheit galt als erreicht, wenn sich das Tier innerhalb von zehn Sekunden, nachdem es auf die Seite gelegt worden war, nicht mehr aufrichten konnte. Zur Gewinnung von Geweben für die biochemischen Analysen wurden die Tiere mit Isofluran (Forene; Abbott) betäubt und getötet. Gehirn-, Rückenmark- und Lebergewebe wurden den Mäusen entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Bestimmung der Körpertemperatur wurden jeweils fünf Tiere der SOD1^{G93A} Linie aus der Exposition und der Scheinexposition mit einem subkutanen Transponder (BioMedic Data Systems) im Nackenbereich versehen. Die Käfige waren an vergleichbaren Stellen innerhalb der Spulen der jeweiligen Expositionsbedingungen platziert. Die Temperaturen wurden wöchentlich und stets zur gleichen Tageszeit aufgezeichnet.

Um Rückenmarkgewebe für histologischen Untersuchungen zu präparieren, wurden Tiere mit Isofluran (Forene; Abbott) betäubt und mit 4% Paraformaldehyd in PBS (pH

7,5) perfundiert. Zur Herstellung von Gewebeschnitten des Gehirns wurden die Tiere betäubt, dekapitiert und das vollständige Gehirn entnommen. Eine Hemisphäre wurde für biochemische Untersuchungen eingefroren, die zweite Hemisphäre wurde mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert.

2.2. Untersuchung des Lernverhaltens

Um das Lernverhalten der APP23-Tiere zu untersuchen wurde ein Morris-watermaze Test durchgeführt. In diesem Experiment sollten Mäuse eine versenkte Plattform, die ihnen Sicherheit bietet, in einem runden Wasserbecken, um das vier Landmarken angebracht sind, finden (siehe Abb. 31). Zur oreintierung wurde das Becken in Quadranten eingeteilt. Zunächst wurden die Mäuse an die Umgebung und das Wasserbecken gewöhnt, wobei die Plattform für die Tiere sichtbar war. Daraufhin wurde die Plattform an gleicher Stelle unter der Wasseroberfläche positioniert, so dass sie für die schwimmenden Mäuse nicht sichtbar war, die Tiere aber immer noch auf ihr stehen konnten. Die Tiere wurden an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils viermal an unterschiedlichen Stellen in den Behälter eingesetzt und das Suchen nach der Plattform aufgezeichnet. Falls die Tiere die Plattform nach 60 Sekunden nicht fanden, wurden sie zur Plattform geleitet. Am siebten Tag, dem sogenannten probe trial, wurden die Tiere in das Becken gesetzt, wobei die Plattform entfernt wurde. Die Experimente wurden nach den angegebenen Parametern mit der EthoVision Software von Noldus ausgewertet. Die Mäuse wurden vor dem Experiment kodiert, so dass der Experimentator verblindet war.

2.3. Gewebeextraktion zur Herstellung von Gesamtlysaten

Zur Bestimmung der Gesamtmenge eines Proteins wurden die entsprechenden Gewebe entnommen und 2 bis 3 mm³ mit 500 µl Lysispuffer (62,5 mM Tris-HCL; 10% (w/v) Saccharose; 2% (w/v) SDS; pH 6,8) mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren (beide Roche) versetzt. Die Gewebe wurden bei 4°C mit einem 1 ml-Glashomogenisator homogenisiert und die Zellen anschließend auf Eis mit einem Sonifizierstab (Kontes) aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Assay (Pierce) bestimmt.

2.4. Differentielle Fraktionierung von Gewebelysaten

Gewebestücke von 2-3 mm³ wurden zunächst in einem hypotonischen Puffer (10 mM HEPES; 10 mM NaCl; 5 mM NaHCO₃; 5 mM EDTA; 1 mM KH₂PO₄; 1 mM CaCl₂; MgCl₂; pH 7,2 mit Proteaseinhibitoren) wie oben beschrieben homogenisiert und aufgeschlossen. Die Lysate ruhten 10 min auf Eis. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay bestimmt. Für die weitere Fraktionierung wurde die Proteinkonzentration aller Lysate durch das Auffüllen mit hypotonischem Puffer auf eine Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl eingestellt und ein Aliquot dieses Gesamtlysats für die nachfolgende Analyse zurückgehalten. Zur Anreicherung der unlöslichen Fraktion wurde das Gesamtlysat zunächst mit 6500 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen (lösliche Fraktion, S1) und das Pellet zweimal in hypotonischem Puffer gewaschen und danach in einem Triton X-100- und NP-40-haltigem Puffer (10 mM Tris-Base; 200 mM Saccharose; 1 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100; 1% NP-49; pH 7,4 mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Nach einer zehnminütigen Ruhezeit auf Eis wurde der Extrakt mit 4000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal gewaschen und in diesem Puffer aufgenommen (unlösliche Fraktion, P2). Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Assay bestimmt.

2.5. Denaturierende und native Polyacraylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die Proteinproben, die durch die denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt werden sollten, wurden mit SDS-haltigem vierfach Ladepuffer (200 mM Tris-HCl, 40 % (v/v) Glyzerin, 4% (w/v) SDS, 0,02 % Bromphenolblau, 20 % ß-Mercaptoethanol) versetzt und bei 99 °C für 5 min inkubiert. Bei der Durchführung von nativen PAGE-Gelen zur Bestimmung der Dismutaseaktivität wurden die gleichen Puffer ohne SDS und ß-Mercaptoethanol zum Gießen der Gele und zur Probenaufarbeitung eingesetzt.

2.6. Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteinproben durch die SDS-PAGE wurden die Proben auf einen Nitrozellulosemembran übertragen. Nach Blockierung freier Bindestellen (4% (w/v) fettfreies Milchpulver; 0,5% (v/v) Tween-20 in PBS) wurde die Membran mit primären Antikörpern inkubiert (Anhang 1). Diese wurden durch Speziesspezifische sekundäre Antikörper nachgewiesen, an die Peroxidase kovalent gekoppelt ist. Die Western Blots wurden mit einer LAS3000 (Fuji) oder einer

FusionSL (Peqlab) dokumentiert und anschließend densitometrisch ausgewertet (AIDA Software, Raytest).

2.7. Nachweis von Carbonylen

Der Nachweis von Proteincarbonylen wurde wie bei Witan und Kollegen beschrieben durchgeführt (Witan et a., 2008): ca 3 mm³ Rückenmark wurden wie unter 2.3. beschrieben in 300 μl Puffer (5 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 10 μM Phenothiazin; pH 7,4 mit Proteaseinhibitoren) homogenisiert und sonifiziert. Ein Aliquot des Homogenats wurde zu gleichen Teilen mit Lysispuffer (62,5 μM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 10% (w/v) Saccharose; 2% (w/v) SDS; pH 7,4; mit Proteaseinhibitoren) versetzt und auf Eis für 10 min lysiert. Durch die Zugabe von 2,5-Dinitrophenylhydrazin (DNPH; 10 mM in 1 N HCl) werden cabonylierte Proteine derivatisiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 M Tris-Base gestoppt. Die Proben wurden danach für die denaturierende SDS-PAGE vorbereitet und die derivatisierten Proteine im Western Blot mit einem Antikörper gegen DNP (Molecular Probes) detektiert. Zur Normierung wurde in einem zweiten Gel das Haushaltsprotein Tubulin nachgewiesen.

2.8. Qualitativer Nachweis der Glutathionspiegel

Die Messung des gesamten Glutathion-Gehaltes (GSH + GSSG) sowie des oxidierten Glutathions (GSSG) im Gewebe erfolgte mit dem *Glutathion Assay Kit* von Abnova (#KA0792) nach den Anweisungen des Herstellers.

2.9. Qualitativer Nachweis der Dismutaseaktivität

Rückenmarkgewebe wurde in einem hypotonen Puffer wie unter 2.4. homogenisiert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Nach der Auftrennung von 5 μ g Protein durch native PAGE wurden die Gele in der Aktivierungslösung (50 mM K₃PO₄; 75 μ g/ml NBT; 33 μ g/ml Riboflavin; 3,2 μ l/ml TEMED) für 25 min inkubiert. Danach wurden die Gele eingescannt. Als Standard diente SOD1 aus humanen Erythrozyten (Sigma Aldrich, S9636). Der Nachweis der Dismutaseaktivität in einem nativen Gel wird als Zymographie bezeichnet.

2.10. Quantitative Bestimmung der Dismutaseaktivität

Die quantitative Bestimmung der SOD1 Aktivität erfolgte mit dem WST-Assay Kit (Dojindo Molecular Technologies) gemäß den Angaben der Hersteller. WST steht für "water soluble tetrazolium", das eine photometrische Bestimmung der Proben ermöglicht. Rückenmarkgewebe wurde in hypotonischem Puffer wie unter 2.4. beschrieben homogenisiert und sonifiziert. Die Lysate wurden bei 100.000 g für 30 min und 4 °C geklärt und die Proteinkonzentration des Überstandes mittels eines BCA-Assays ermittelt. Für den Test wurden Verdünnungen zwischen 0,1 und 1,0 μg/μl Gesamtprotein hergestellt und 20 μl dieser Verdünnungen in den WST-Assay eingesetzt. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Als Standard diente Erythrozyten (Sigma SOD1 aus humanen Aldrich, S9636), unterschiedlichen Endkonzentrationen von 200 Units/ml bis 0,1 Units/ml verwendet wurde. Ein Leerwert, der keine SOD1 enthielt, diente als Kontrolle und wurde von allen Messwerten abgezogen.

2.11. Nachweis von Aß-Peptiden im ELISA

Cortex- oder Hippocampusgewebe wurden in PBS homogenisiert und die Zellen mittels eines Sonifizierstabs aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 20 min bei 16.000 g geklärt und der Proteingehalt des Überstandes bestimmt. Zur Bestimmung des Aß(40)-Spiegels wurden zwischen 0,5 µg und 2 µg Gesamtprotein eingesetzt, zur Bestimmung der Aß(42)-Spiegels 1 µg bis 4 µg. Zum Nachweis von löslichen Aß(40) und Aß(42) Peptiden wurden der jeweiligen ELISA-Kits von Life Technologies nach den Herstellerangaben eingesetzt. Der Test beruht auf der Verwendung von Antikörpern, die die beiden APP-Fragmente spezifisch erkennen.

2.12. Isolierung von mRNA aus dem Rückenmark und Herstellung von cDNA

Die RNA aus dem Rückenmark von Mäusen wurde mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Cat. 74804) den Angaben des Herstellers entsprechend isoliert. Der Gewebeaufschluss erfolgte, indem ein komplettes Rückenmark im noch gefrorenen Zustand zunächst mit einem Skalpell in vier bis fünf Stücke zerkleinert und in 1 ml des im Kit enthaltenen, phenolhaltigen Qiazol Lysis Reagenz aufgenommen wurde. Das Gewebe wurde sofort bei Raumtemperatur mit einem Ultra-Thurrax (T9, IDA-Werke) homogenisiert. Die Güte der aufgereinigten RNA wurde stichprobenartig mit

dem Bioanalyzer 2001 (Agilent) bewertet. Zum Umschreiben der aufgereinigten RNA wurde der SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix für qRT-PCR (Life Technologies) verwendet und den Angaben des Herstellers entsprechend eingesetzt.

2.13. RT-qPCR zur Bestimmung der mRNA von hSOD1 und mSOD1

Für die RT-PCR Reaktion wurden 500 ng RNA eingesetzt. Die resultierende cDNA wurde 1:2 verdünnt und 1 µl dieser Verdünnung für die RT-qPCR eingesetzt. Dazu wurden 19 µl des Mastermix aus Primern (Anhang 2) und des SYBR-Green Gemisches (SensiMix & Fluorescin Kit; Bioline) gegeben. Die Reaktion wurde mit einem iCycler (BioRad) durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen wurde gegen die mRNA-Spiegel von Housekeeping-Genen abgeglichen.

2.14. Bestimmung der Transkriptionsspiegel von Chaperonen mit dem Qiagen Heat Shock Array Kit

dem Heat Shock Array Kit wurden die Expressionslevel von Hitzeschockproteinen und Chaperonen sowie fünf Housekeeping-Genen bestimmt. Die Vertiefungen der Array-Platte waren mit lyophilisierten forward und reverse Primern je eines Gens bestückt. Durch Zugabe von 0,5 µl cDNA (1 µg RNA pro RT-Reaktion), 12,5 µl SensiMix™ SYBR & Fluorescein Kit (Bioline) und 12 µl RNasefreiem Wasser pro Vertiefung erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Level. Da stets 96 Vertiefungen mit demselben Gemisch versehen wurden, konnte ein Mastermix aus der cDNA, dem SYBR & Fluorescein Kit und Wasser hergestellt werden. Als Housekeeping-Gene waren Primer für beta-Aktin. Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), Hsp90ab1, beta-Glucuronidase (GUSB) und beta-2-microglobulin (B2M) auf jeder Array-Platte enthalten.

2.15. Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten aus dem Rückenmark

Der lumbale Bereich des Rückenmarks einer perfundierten Maus wurde entnommen und in 30% Saccharose in PBS gegeben bis sich das Gewebe absetzte. Im Anschluss wurde das Gewebe in Einbettmedium (Jung) eingefroren und 15 µm dicke Schnitte angefertigt (Leica Cryostat). Freischwimmende Schnitte wurden in TBS gewaschen, für 1 h blockiert (150 mM NaCl; 7,7 mM Tris-HCl; 2% BSA; 0,3% Triton X-100; pH 7,5) und mit primären Antikörpern (Anhang 3) oder Tomatenlektin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte mit

speziesspezifischen sekundären Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren (Anhang 3). Wurde der Nachweis der primären Antikörper mit biotinylierten Sekundärantikörpern durchgeführt, wurden die Schnitte nach der Blockierung mit Streptavidinlösung, nachfolgend mit Biotinlösung und anschließend mit den primären Antikörpern inkubiert. Der Nachweis dieser Antikörper erfolgte durch die Inkubation mit biotinylierten sekundären Antikörpern, die dann wiederum durch Streptavidin, an das der Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 gekoppelt war, nachgewiesen wurden.

2.16. Immunfluoreszenzfärbung von Gehirnschnitten

Die in 4% PFA fixierten Gewebe wurden zunächst in 30% (w/v) Saccharose in PBS gegeben, bis sich die Gewebe absetzten. Anschließend wurden die Gewebe in Einbettmedium eingefroren. Schnitte von 10 µm wurden auf Objektträgern getrocknet und bis zur Färbung bei 4 °C gelagert. Die Färbung wurde vergleichbar mit der für die freischwimmenden Gewebe durchgeführt. Alle Färbungen wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 710) durchgeführt.

2.17. Kongorot-Färbung von Gehirnschnitten

Die PFA-fixierten Gewebe wurden in Einbettmedium eingebettet und 10 μM dicke Schnitte präpariert. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger übertragen, getrocknet und bis zur Färbung bei 4 °C gelagert. Die Schnitte wurden zunächst mit Hämatoxilin (Sigma) vorgefärbt, um die Hintergrundstrukturen sichtbar zu machen. Anschließend entfernte man das überflüssige Hämatoxilin in mehreren Waschschritten und inkubierte die Schnitte für etwa 2 h in einer Kongorot-Lösung (0,2 % (w/v) Kongorot; 80 % (v/v) Ethanol). Überschüssiges Kongorot wurde mit 80% Ethanol abgewaschen und die Schnitte getrocknet. Die Schnitte wurden mit einem Mikroskop (Zeiss) aufgenommen und die Bilder digital zusammengesetzt. Zur Auswertung wurden die Bilder in Falschfarben dargestellt und die Plaques im Hippocampus und dem Cortex von zwei Personen unabhängigen gezählt, die verblindet waren.

2.18. Statistische Auswertung

Die Daten wurden auf ihre Normalverteilung getestet und entsprechend mit einem t-Test oder einem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Zum Vergleich der Überlebensalter und der Alter zu Krankheitsbeginn bei den SOD1 transgenen Tiere wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und die Daten mit einem Log-Rank-Test verglichen. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS (IBM Software) verwendet. Die statistische Auswertung wurde unter Anleitung des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) durchgeführt.

2.19. Aufbau der Spulen und Exposition

Die Expositionsmodule wurden nach den Angaben von Merritt (Merritt et al., 1983) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Helmut Reber (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsmedizin Mainz) angefertigt. Dazu wurden je zwei Spulen mit 26 Windungen und 11 Windungen aus einem aus fünf Litzen bestehendem Kupferkabel mit einem Querschnitt von 16 mm² um ein Kunststoffgestell gewickelt (Abb. 1) und in Reihe geschaltet. Bei den Modulen, in denen die Tiere scheinexponiert wurden, wurde jede Spule nach der Hälfte der Wicklungen umgelenkt, so dass sich die entstehenden Magnetfelder aufhoben. Die zu- und abführenden Kabel wurden ineinander verdreht. SO dass sich die Magnetfelder aufhoben. Wechselstromquelle diente das IP20 Netzteil von Bürger Elekronik (Reutlingen). Die elektrischen Felder wurden mit Aluminiumfolie abgeschirmt. In jedem Modul standen drei Ebenen zur Verfügung, auf denen in einem definierten Bereich Käfige abgestellt wurden. Die Homogenität des Magnetfeldes wurde in allen Modulen an fünf Messpunken je Ebene mit einem Teslameter (EMF-822 von Lutron Electronic Enterprise, Taipei, Taiwan; Koshava 4 von Wuntronic, München) bestimmt (Abb. 1), regelmäßig überprüft und dokumentiert (Anhang 4). Da die Magnetfelder in den Tierhaltungsraum streuten, wurden die Module für die Scheinexposition durch PowerShield-Platten der Firma Systron (Schwabach) abgeschirmt.

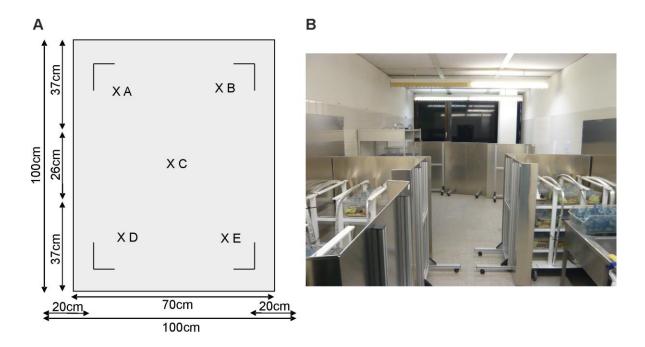


Abb. 1: Aufbau der Module. (A) Die Module wurden nach den Angaben von Merritt aufgebaut, wobei die Tiere auf drei Ebenen abgestellt werden konnten. Vier Spulen, die in Reihe geschaltet wurden, erzeugten ein homogenes Magnetfeld innerhalb der Markierungen. Bei den Modulen für die Scheinexposition wurde die Wicklung nach der Hälfte der Windungen umgekehrt. An den Punkten A bis E wurden auf allen Ebenen die Feldstärken regelmäßig überprüft. (B) Die Module wurden innerhalb der Tierhaltungsanlage aufgebaut. Die Streustrahlung wurde durch Metallplatten abgeschirmt, so dass die Tiere unter Scheinexpositionsbedingungen gehalten werden konnten.

3. Ergebnisse

3.1. Körpertemperatur

Ein kritischer Punkt bei der Exposition von Versuchstieren mit LF-MF ist die Wärme, die bei der Herstellung von Magnetfeldern durch Spulen erzeugt wird. Der Tierhaltungsraum war klimatisiert. Die hier verwendeten Spulen der Exposition waren handwarm, wobei die Spulen der Scheinexpositionsmodule deutlich kühler waren. Um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede in der Pathologie oder dem Krankheitsverlauf durch thermische Effekte verursacht werden, wurde der Verlauf der Körpertemperatur transgener SOD1 G93A Mäuse in der jeweiligen Exposition durch subkutan implantierte Transponder aufgezeichnet. Im Beobachtungszeitraum bis zum phänotypischen Beginn der Krankheit war die Körpertemperatur der exponierten im Vergleich zu den scheinexponierten Tieren nicht grundlegend verändert (Abb. 2).

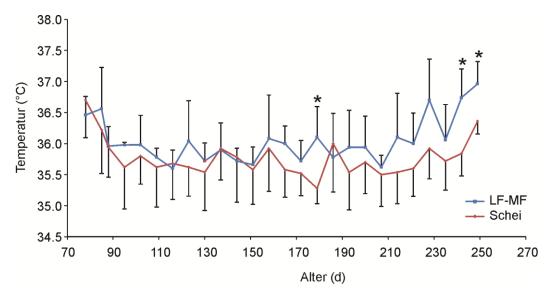


Abb. 2: Körpertemperaturmessung bei SOD1^{G93A} transgenen Mäusen. Je fünf SOD1^{G93A} transgene Mäuse, die unter Expositions- bzw. Scheinexpositionsbedingungen gehalten wurden, wurden Transponder im Nackenbereich subkutan implantiert. Die Käfige wurden an den korrespondierenden Stellen der Expositions- bzw Scheinexpositionsmodulen plaziert. Die Temperatur wurde einmal pro Woche abgelesen. Vor dem phänotypischen Beginn der Krankheit, der bei einem 10%igen Verlust des Maximalgewichts bestimmt wurde, war die Körpertemperatur unter beiden Bedingungen vergleichbar. Die Mittelwerte der Temperaturen werden bis zum Versterben des ersten Tieres gezeigt. (Mittelwerte +/-SEM; t-Test)

3.2. Einfluss niederfrequenter Magnetfelder auf den Krankheitsverlauf bei Mausmodellen der ALS

Zur Untersuchung ob LF-MF den Krankheitsverlauf der ALS beeinflussen, wurden zwei Mauslinien, die humane SOD1^{G85R} oder SOD1^{G93A} überexprimieren, eingesetzt. Beide mutanten Proteine lösen ALS beim Menschen aus, obwohl sie unterschiedliche Dismutaseaktivitäten aufweisen. SOD1^{G93A} ist eine Wildtyp-ähnliche Mutante, die trotz der Punktmutation eine vergleichbare Dismutaseaktivität wie SOD1^{WT} aufweist. SOD1^{G85R} dagegen zeigt eine verminderte Kupferbeladung, was zu einer verminderten Dismutaseaktivität führt. SOD1^{G85R} ist zudem durch ein relativ starkes Aggregationspotential charakterisiert. Im Gegensatz zu normalen Tieren, die ca. zwei Jahre alt werden, überleben die SOD1 transgenen Mauslinien im Mittel zehn Monate (SOD1^{G93A}) oder ein Jahr (SOD1^{G85R}) und stellen somit Mausmodelle dar, die die Krankheit sehr spät entwickeln. Falls LF-MF einen generellen Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausüben, wären Veränderungen in beiden Mauslinien zu erwarten.

3.2.1. SOD1-Spiegel und Dismutaseaktivität

Die Toxizität mutanter SOD1 Varianten in transgenen Mäusen ist abhängig von deren Proteinspiegel (Wong et al., 1995). Wenn die Exposition mit LF-MF die SOD1 Expression verändern würde, könnte dies auch den Krankheitsverlauf beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Transkription und die Proteinspiegel der SOD1 in Rückenmarkgewebe von Tieren im Endstadium quantitativ bestimmt. Die mRNA-Spiegel und die Proteinspiegel von SOD1 sind bei den transgenen Tieren unabhängig von der Exposition (Abb.3). Auch die mRNA-Spiegel der endogenen Maus-SOD1 waren unverändert (Abb. 3).

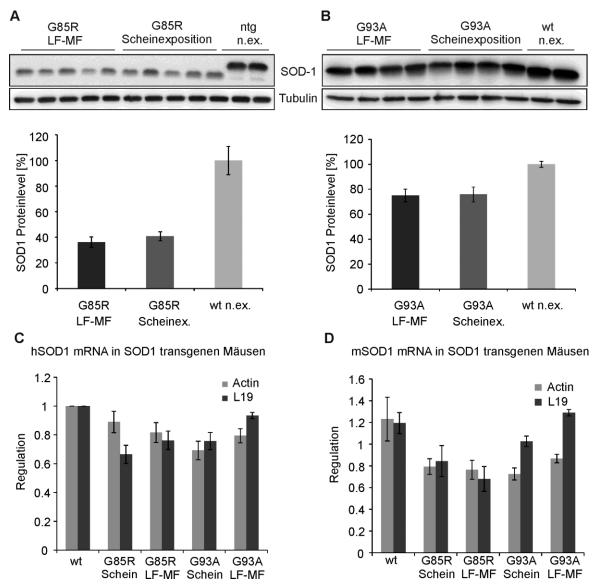


Abb. 3: Bestimmung der SOD1-Spiegel. (A, B) Gesamtysate von Rückenmarkgewebe von Tieren im Endstadium wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und danach auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Transgene SOD1 wurde durch humanspezifische SOD1 Antikörper detektiert und die Banden densitometrisch ausgewertet. (A) SOD1 Geste läuft im SDS-PAGE Gel schneller als SOD1 WT (wt) und langsamer als endogene Maus SOD1. Im unteren Teil ist die densitometrische Auswertung dargestellt (n=5 für Exposition und Scheinexposition) (B) SOD1 Geste und SOD1 laufen im SDS-PAGE Gel ähnlich weit. Die densitometrische Auswertung zeigte expositionsunabhängige Proteinspiegel (n=5 für Exposition und Scheinexposition). (wt n. ex.: SOD1 Tieren in SOD1 (mSOD1, D) wurden durch quantitative real-time PCR bestimmt. Die Werte wurden jeweils gegen die Expression der Kontrollgene Aktin und L19 abgeglichen. Die Regulation der Expression der hSOD1 wurde auf die SOD1 Tiere normalisiert (C). die Regulation der endogenen mSOD1 auf die Expression der mSOD1 in nicht-transgenen Tieren (D) (jeweils n=4, +/- SEM, t-Test der jeweiligen Paare nicht signifikant).

Neben der Proteinmenge stellt die Dismutaseaktivität der SOD1 ein Kriterium dar, das durch LF-MF verändert werden könnte. In bestimmten neuronalen Geweben wurde bereits eine gesteigerte SOD1-Aktivität nach Exposition mit LF-MF beschrieben, wobei die Expression der Superoxiddismutasen nicht verändert war

(Jelenkovic et al., 2006; Falone et al., 2008). Demgegenüber wurde dieser Effekt in Zellkulturmodellen nicht beobachtet. In der vorliegenden Studie war die qualitative und quantitative Analyse der Dismutaseaktivität von Rückenmarkextrakten in SOD1^{G93A} Tieren nach der Exposition mit LF-MF nicht verändert (Abb. 4). SOD1^{G93A} ist eine dismutaseaktive Mutante, so dass die Aktivität der humanen transgenen SOD1 im Aktivitätsgel (Zymographie) dargestellt werden kann (Abb. 4A).

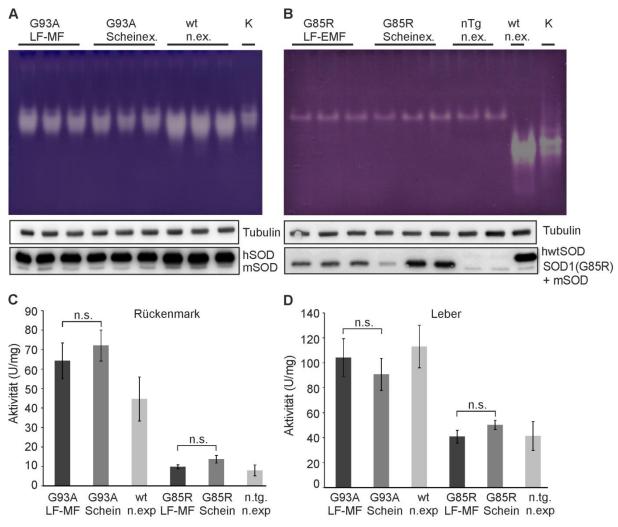


Abb 4: SOD1-Aktivität wird durch LF-MF nicht verändert. (A, B) Rückenmarkextrakte (5 μg Protein) von männlichen Tieren im Endstadium der Krankheit wurden durch native Gelelekrophorese aufgetrennt und die Dismutaseaktivität durch Zymographie dargestellt. Die hellen Stellen repräsentieren die Orte, an denen die Bildung des Formazan durch dismutaseaktive SOD1 verhindert wurde. Als Kontrolle (K) diente kommerzielle humane SOD1. Die gleichmäßige Beladung der nativen Gele wurde durch den Nachweis von Tubulin und SOD1 durch Western Blots nach Auftrennung der Extrakte durch separate SDS-PAGE kontrolliert. (C,D) Rückenmark- (C) und Leberextrakte (D) wurden in einen WST-Assay zur quantitativen Bestimmung der Dismutaseaktivität eingesetzt. Die Aktivitäten der SOD1^{G93A} Gewebe wurden mit denen von SOD1^{WT} überexprimierenden Tieren verglichen. Die Dismutaseaktivität von SOD1^{G85R} Tieren war zu denen nicht-transgener Wildtyptiere nicht verändert. (n=4 für SOD1 mutante Tiere; n=3 für SOD1^{WT} und nicht-transgene Tiere; +/- SEM, t-Test).

Die Dismutaseaktivität der SOD1^{G85R} war dagegen in Zell- und Gewebeextrakten nicht nachweisbar (Borchelt et al., 1994; Witan et al., 2008), so dass durch die Zymographie die Aktivität der endogenen Maus-SOD1 dargestellt wurde (Abb. 4A, B). Die Bande der Maus-SOD1 lief dabei höher als humane SOD1 (Kontrolle, K). Die quantitative Bestimmung der Dismutaseaktivität von Gewebeextrakten des Rückenmarks und der Leber bestätigte, dass die Exposition mit LF-MF keinen Einfluss auf diese enzymatische Aktivität ausübt (Abb. 4C, D). Auch in peripheren Geweben wie der Leber wurde die Dismutaseaktivität nicht verändert.

3.2.2. Spiegel von ALS-Kandidaten Genen

Mutationen, die familiäre Formen der ALS auslösen, sind in mehreren Genen identifiziert worden (Andersen and Al-Chalabi, 2011). Falls LF-MF die Expression solcher Gene beeinflussen würde, könnte das auch einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der SOD1 transgenen Tiere verursachen. In dieser Studie wurden Optineurin (Maruyama et al., 2010) und TDP-43 (Sreedharan et al., 2008) untersucht. Optineurin ist ein Protein, das als Autophagie-Rezeptor an der Proteostase beteiligt ist (Korac et al., 2013).

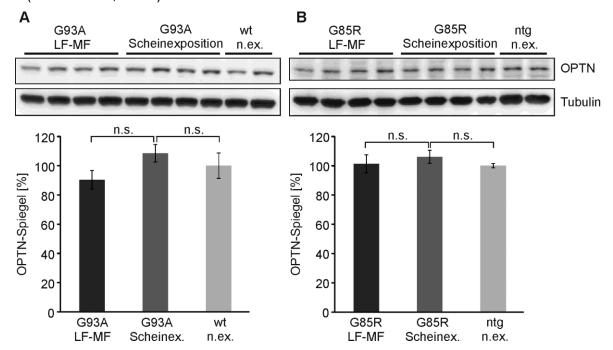


Abb. 5: Optineurin-Spiegel sind im Rückenmark nach Exposition mit LF-MF unverändert. Totallysate von Rückenmarkgewebe SOD1 transgener SOD1^{G93A} (A) und SOD1^{G85R} (B) Mäuse wurden auf 10% SDS-PAGE Gelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und spezifische Proteine nachgewiesen. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet, auf Tubulin abgeglichen und auf die Kontrollen normalisiert (A: wt n.ex.: SOD1^{WT} überexprimierende Tiere, nicht exponiert; B: ntg n.ex.: nicht transgene Tiere, nicht exponiert). (OPTN: Optineurin; n=8 bzw n=4 für Kontrollen; +/- SEM; t-Test)

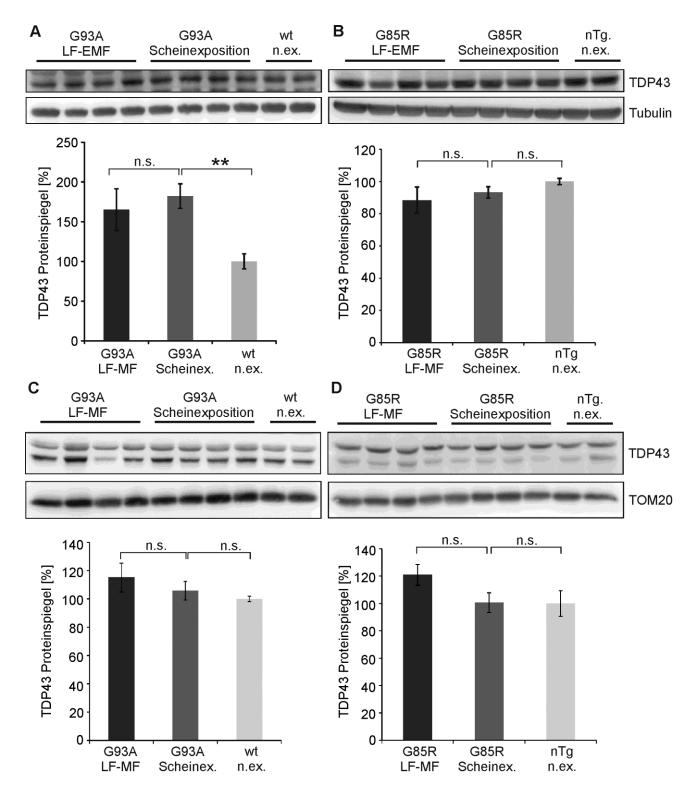


Abb. 6: TDP-43-Proteinspiegel sind im Rückenmark und in der Leber unabhängig von der Exposition. Gesamtlysate von Rückenmark- (A, B) und Lebergewebe (C, D) transgener SOD1 G93A (A, C) und SOD1 G85R (B, D) Mäuse wurden wie in Abb. 5 beschrieben analysiert. (A, B) Die TDP-43-Spiegel wurden auf Tubulin abgeglichen und relativ zu den Kontrollen (A: wt n.ex.: SOD1 WT überexprimierende Tiere, nicht exponiert; B: ntg n.ex.: nicht transgene Tiere, nicht exponiert) dargestellt. (n=8 bzw n=4 für Kontrollen; +/- SEM; t-Test). (C, D). Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mit dem mitochondrialen Protein TOM20 kontrolliert.

TDP-43 ist von besonderer Bedeutung, da das Auftreten von TDP-43 positiven Aggregaten ein generelles pathologisches Kennzeichen von sporadischen ALS Patienten ist (Neumann et al., 2006), obwohl keine Mutation in diesem Protein vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TDP-43 zu pathologischen Veränderungen in Mäusen führt (Swarup et al., 2011). Es gilt als wahrscheinlich, dass TDP-43, das ein DNA- und RNA-bindendes Protein ist, den RNA-Metabolismus reguliert und schon geringe Veränderungen in der Expression, bei dessen subzellulärer Lokalisation oder bei dessen Prozessierung den RNA-Metabolismus beeinträchtigen (Janssens and Van Broeckhoven, 2013). Mutationen im tdp-43 Gen sind für 5% der familiären ALS-Fälle verantwortlich. Die Proteinspiegel von Optineurin (Abb. 5) und TDP-43 (Abb. 6) im Rückenmark von kranken Tieren waren unabhängig von der Exposition mit LF-MF in SOD1 transgenen Tieren. Auch die TDP-43- Spiegel in der Leber waren unverändert (Abb. 6).

3.2.3. Proteinaggregation im Rückenmark SOD1 transgener Tiere

Das Auftreten von Proteinaggregaten ist ein pathologisches Kennzeichen der ALS. Ob die Anwesenheit dieser Aggregate kausal für das Absterben der Motorneurone und die Funktionsstörungen von Gliazellen verantwortlich ist, ist bisher umstritten. Es wird heute eher davon ausgegangen, dass das Vorhandensein von fehlgefalteten Proteinen, möglicherweise von löslichen Oligomeren, initiale Zellschädigungen verursacht. Trotzdem ist das Auftreten von Aggregaten ein Kennzeichen der Krankheit und gewissermaßen ein Maß für die Menge an fehlgefalteten Proteinen und die Kapazität der Zelle, unter diesen Bedingungen die Proteostase aufrecht zu erhalten. Triton X-100-resistente Aggregate wurden durch eine differentielle Extraktion und durch Zentrifugationsschritte angereichert. Die quantitative Auswertung der Western Blots zeigte eine mutantenabhängige Anreicherung von SOD1, p62, Ubiquitin und Hsp25 in SOD1 G85R (Abb. 7A) und SOD1 G93A transgenen Tieren (Abb. 8A). Allerdings war die Verteilung der Proteine unabhängig von der Exposition mit LF-MF (Abb. 7 und Abb 8).

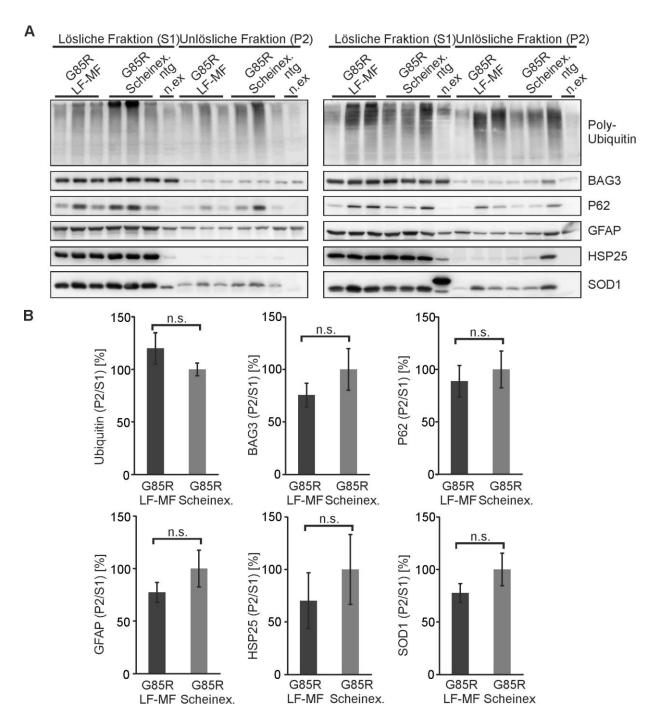


Abb 7: Analyse von aggregatangereicherten Fraktionen aus dem Rückenmark mutanter SOD1^{G85R}-Mäuse. Eine Triton X-100-resistente Fraktion (P2), in der Proteinaggregate angereichert sind, wurde aus Rückenmarkgewebe von SOD1 transgenen Tieren im Endstadium der Erkrankung gewonnen. Die lösliche (S1) und die aggregatangereicherte Fraktion (P2) wurden mit Western Blot analysiert (A), die Proteinspiegel quantitativ bestimmt und deren Verhältnis dargestellt (B). Die Western Blots in (A) stammen von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Tieren. Die Auswertung wurde für alle Tiere eines Genotyps (Männchen und Weibchen) und Bedingungen durchgeführt. Die Verhältnisse unter Scheinexpositionsbedingungen wurden 100% gesetzt. (n=6; +/- SEM; t-Test).

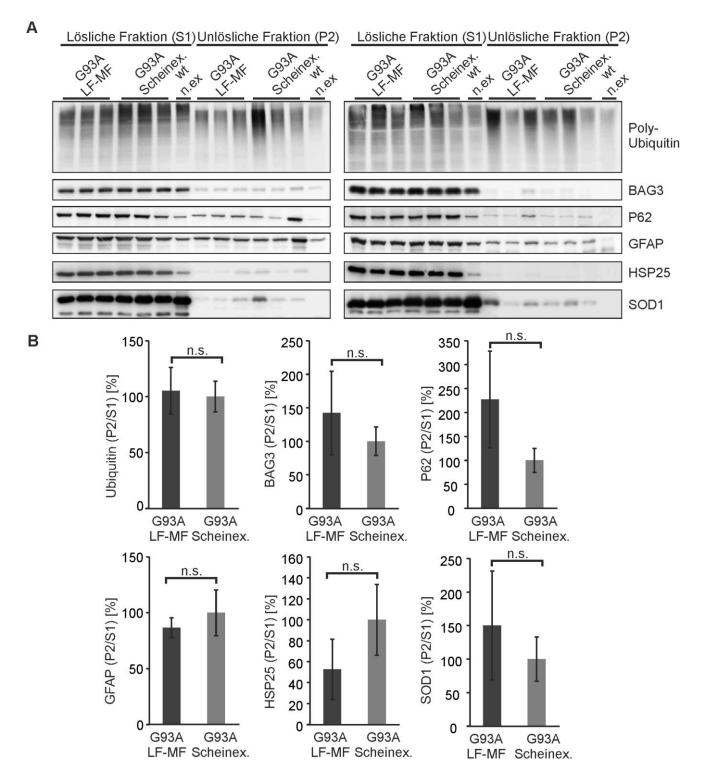


Abb 8: Analyse von aggregatangereicherten Fraktionen aus dem Rückenmark mutanter SOD1 G93A-Mäuse. Eine Triton X-100-resistente Fraktion (P2), in der Proteinaggregate angereichert sind, wurde aus Rückenmarkgewebe von SOD1 transgenen Tieren im Endstadium gewonnen. Die lösliche (S1) und die aggregatangereicherte Fraktion (P2) wurden mit Western Blot analysiert (A), die Proteinspiegel quantitativ bestimmt und deren Verhältnis dargestellt (B). Die Western Blots in (A) stammen von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Tieren. Die Auswertung wurde für alle Tiere eines Genotyps (Männchen und Weibchen) und Bedingungen durchgeführt. Die Verhältnisse unter Scheinexpositionsbedingungen wurden 100% gesetzt. (n=6; +/- SEM; t-Test).

3.2.4. Expressionsanalyse von Genen, die die Proteostase beeinflussen

Eine Veränderung der Expression von unterschiedlichen Hitzeschockproteinen und deren Proteinspiegel nach Exposition in LF-MF ist umstritten. Die abweichenden Ergebnisse bisheriger Studien könnten dadurch begründet sein, dass sowohl unterschiedliche Zelllinien als auch unterschiedliche Expositionsprotokolle Anwendung fanden. Eine gewisse Zell- bzw. Gewebespezifität der molekularen Reaktion auf LF-MF wurde im Modellorganismus *C. elegans* gezeigt (Miyakawa et al., 2001). Demgegenüber induzierte die Exposition mit LF-MF von bis zu 2 mT über sieben Tage und je 15 Stunden keine Veränderung der Hsp70 Expression in unterschiedlichen Gehirnbereichen (Villarini et al., 2013).

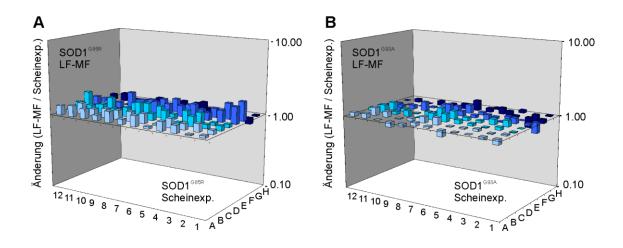


Abb 9: Expressionsanalyse von Genen, die an der Erhaltung der Proteinhomöostase beteiligt sind. Die Expressionsanalyse von Rückenmarkgewebe der SOD1^{G85R} (A) und SOD1^{G93A} (B) transgener Tiere wurde mit dem Qiagen Heat Shock Array Kit nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Qiagen Software. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression der Gene unter Expositionsbedingungen bezogen auf die Expression in der Scheinexposition. Unter Expositionsbedingungen ist die Expression maximal um den Faktor 1,6 reguliert. Die Belegung der Platten und eine tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse ist im Anhang 5 und Anhang 6 gezeigt.

Im Rahmen dieser Studie wurde mit Hilfe des *Qiagen Heat Shock Array Kit* die Expression von 84 Genen untersucht, die an der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase beteiligt sind. Dazu zählen die Mitglieder der klassischen Hitzeschockproteinfamilien Hsp70 und Hsp90, Mitglieder der Familie des Co-Chaperons Hsp40 (Dnaj-Familie), die sogenannten *small Hsps* und andere Gene, die an der Regulation u.a. der Proteinabbauwege beteiligt sind. Dazu gehören auch die Gene der Bag-Familie. Die quantitative Analyse zeigte bei der SOD1 G85R Linie eine expositionsabhängige, signifikant erhöhte Expression mancher Gene, wie z.B.

Dnajc15 (Abb. 9; Anhang 5). Die Regulation dieser Gene konnte allerdings bei der Analyse der SOD1^{G93A} Linie nicht bestätigt werden (Abb. 9; Anhang 6). Es ist zu beachten, dass die Expression aller signifikant veränderten Gene maximal 1,6-fach verändert war, was vergleichsweise eine sehr geringe Veränderung der mRNA-Spiegel darstellt.

3.2.5. Proteinspiegel von Hitzeschockproteinen in SOD1 transgenen Mäusen

Neben der Expression wurden die Proteinspiegel ausgewählter Hitzeschockproteine in Gesamtlysaten von Rückenmark- und Lebergewebe analysiert. Dabei waren die Spiegel von Hsp70, Hsp90 und Hsp25 in beiden transgenen Mauslinien unverändert (Anhang 7). Die Hsp110 Spiegel waren dagegen schwach, aber signifikant in exponierten Tieren der Linie SOD1^{G93A} im Vergleich zu scheinexponierten Tieren erniedrigt. Die Hsp110-Proteinspiegel im Rückenmark der SOD1^{G85R} Tiere waren allerdings unverändert (Abb. 10A). Die Analyse von Gewebe aus der Leber von beiden Mauslinien zeigte eine signifikante Erhöhung der Hsp110 Proteinspiegel nach Exposition mit LF-MF gegenüber nicht exponierten Tieren des gleichen Genotyps (Abb. 10B).

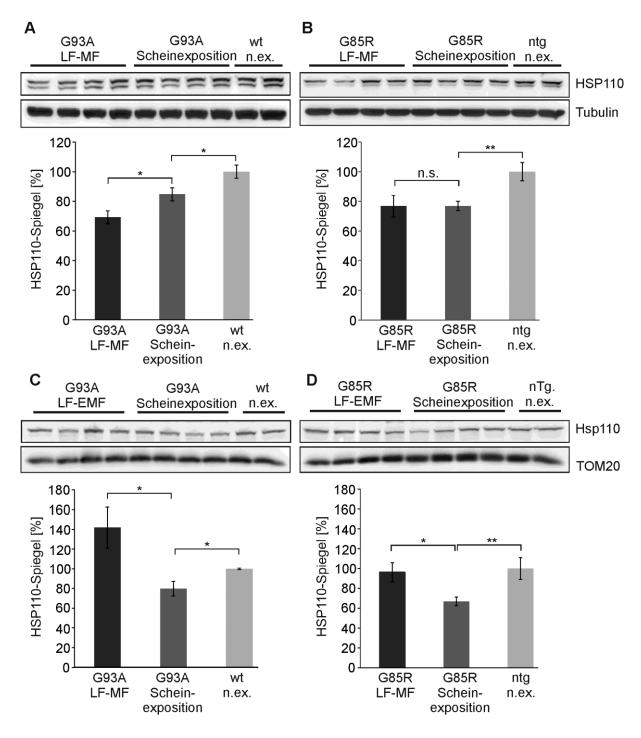


Abb. 10: Analyse der Proteinspiegel von Hsp110 im Rückenmark und der Leber in Abhängigkeit der Exposition mit LF-MF. (A - D) Gesamtlysate aus dem Rückenmark (A, B) und der Leber (C, D) wurden auf SDS-PAGE Gelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert, die Signale aufgenommen und densitometrisch ausgewertet. Die Hsp110 Werte wurden auf die Spiegel von Tubulin (Rückenmark: A, B) oder TOM20 (Leber: C, D) normalisiert und im Fall der SOD1^{G93A} Tiere auf die Werte nichtexponierter SOD1^{WT}-überexprimierender Tieren (wt. n.ex) bezogen (A, C). Die Werte der SOD1^{G85R} Tiere wurden auf nicht-exponierte C57/B6 Mäuse (ntg. n.ex.) bezogen (B, D). (n=8; +/- SEM; t-Test).

3.2.6. Analyse von autophagierelevanten Proteinen

Neben den Chaperonen, die die dreidimensionale Struktur von Proteinen stabilisieren, spielen Proteine, die die Proteinabbauwege regulieren, eine wichtige Funktion zur Erhaltung der Proteostase. Ein zentraler Weg zum Abbau von fehlgefalteten Proteinen, Proteinaggregaten und fehlerhaften Organellen ist die Autophagie, die im Verlauf der ALS, aber auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, gestört ist (Wong and Cuervo, 2010). Die Akkumulation des Autophagierezeptors p62 ist ein Kennzeichen für einen veränderten autophagischen Flux. In beiden transgenen SOD1-Mauslinien wurde zwar eine erhöhte Menge gegenüber den Kontrollgeweben detektiert, die Expositionsbedingunngen haben diesen Wert aber nicht beeinflußt (Abb 11A, B).

Bag3 ist ein Protein, das in Verbindung mit Hsp70 fehlgefaltete Proteine erkennt und dem autophagischen Proteinabbau zuführt (Gamerdinger et al., 2011a). Es konnte gezeigt werden, dass mutante Formen der SOD1 Bag3-vermittelt über die Autophagie abgebaut werden (Gamerdinger et al., 2011b). Die Expression von Bag3 war unabhängig von der Exposition mit LF-MF (Abb. 11C, D)

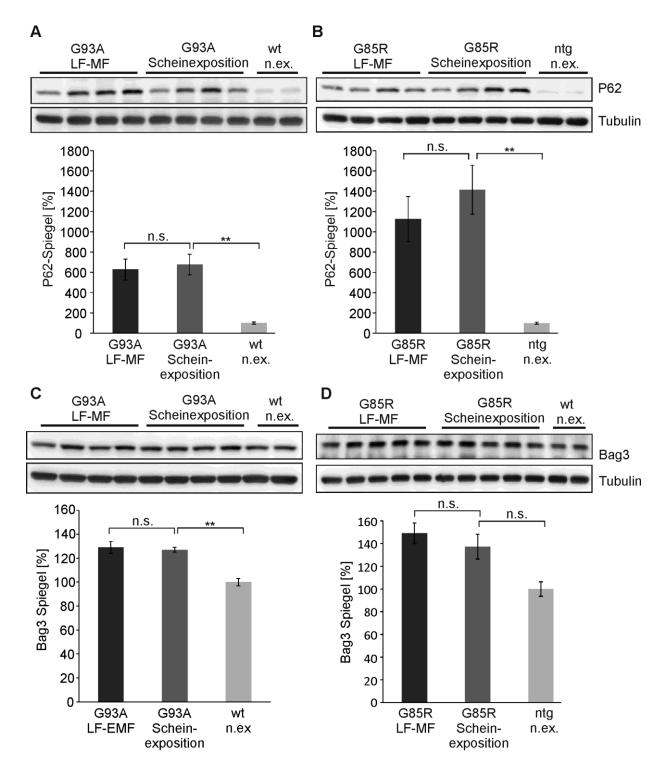


Abb. 11: Die Expression von autophagieassoziierten Proteinen ist unabhängig von der Exposition mit LF-MF. Gesamtlysate von Rückenmarkgewebe von SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Without von SOD1 Werte der SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Werte der SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Werte der SOD1 Werte der SOD1 Gesamtlysate von SOD1 Werte der SOD1 Werte der

3.2.7. Kennzeichen oxidativer Schädigung in SOD1 transgenen Tieren

Untersuchungen mit Zelllinien zeigten, dass die Exposition möglicherweise einen Einfluss auf den oxidativen Status einer Zelle ausübt. Dies betrifft die Proteinmenge antioxidativer Enzyme wie auch die Funktion von Antioxidantien wie des Glutathion (Consales et al., 2012; Martinez-Samano et al., 2012). Im Verlauf der ALS ist das Auftreten von oxidativen Schädigungen ein pathologisches Kennzeichen. Eine Hypothese der Krankheitsentstehung geht sogar davon aus, dass die oxidativer Stress einer der kausalen Gründe für den Ausbruch der Erkrankung ist (Barber et al., 2006; D'Amico et al., 2013). In diesem Zusammenhang wurden in dieser Studie die Entstehung von carbonylierten Proteinen (Abb. 12) und krankheitsrelevante kovalente Dimerisierung von mutanter SOD1 (Abb. 13) als Kennzeichen oxidativer Schädigungen untersucht. In beiden Fällen führte die Exposition mit LF-MF zu keiner Veränderung.

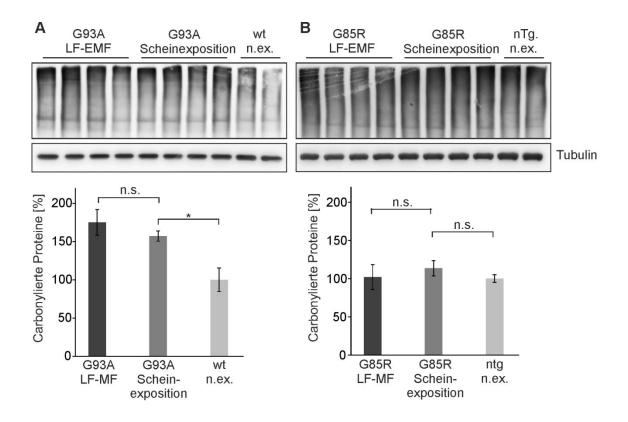


Abb. 12: Das Auftreten von Proteincarbonylen ist von der Exposition unabhängig. Carbonylierte Proteine in Rückenmarkextrakten kranker SOD1^{G93A} (A) und SOD1^{G85R} (B) Weibchen wurden mit 2,5-Dinitrophenylhydrazin (DNP) derivatisiert und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen DNP nachgewiesen. Die Ladekontrolle wurde mit Tubulin durchgeführt. Die Exposition hatte keinen Einfluss auf die Spiegel carbonylierter Proteine. (n=8; +/- SEM; t-Test)

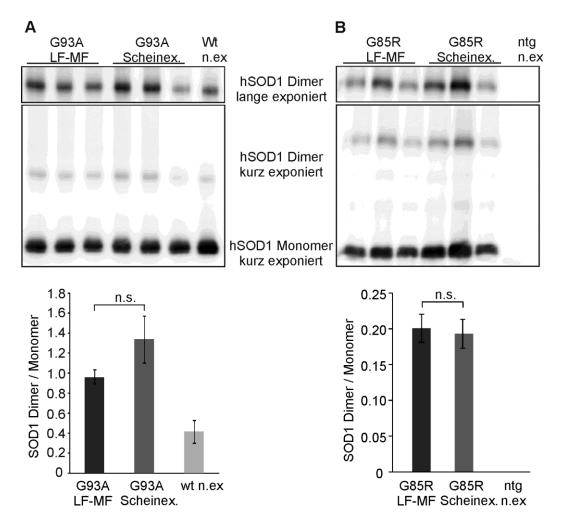


Abb. 13: Analyse von kovalent verbundenen SOD1 Dimeren. Extrakte von Rückenmarkgeweben von Tieren im Endstadium und Kontrollen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und SOD1 mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Um die Dimer-Banden deutlicher zu sehen, wurden die Western Blots länger belichtet (oberer Teil). Zur Darstellung der densitometrische Auswertung der Western Blots wurden die Verhältnisse von SOD1-Dimeren zu Monomeren gebildet. Die Bildung von SOD1-Dimeren ist in SOD1 G93A (A) und SOD1 G85R (B) Tieren gegenüber den Kontrollen nicht signifikant erhöht (n=6; +/-SEM, t-Test).

3.2.8. Analyse der Glutathionspiegel

Eines der zentralen zellulären Systeme, die vor freien Radikalen schützen, ist das Glutathionsystem. Glutathion ist aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein aufgebaut. Die freie Thiolgruppe kann Elektronen auf Radikale übertragen und sie so unschädlich machen. In bisherigen Studien wurden verminderte Spiegel von Glutathion nach Exposition beschrieben (Jelenkovic et al., 2005). Auch eine akute Exposition mit LF-MF induzierte eine Verringerung von Glutathionspiegeln im Gehirn von Ratten. (Martinez-Samano et al., 2012). In den Analysen der

Rückenmarkgewebe von kranken SOD1 transgenen Tieren konnten wir keinen signifikanten Unterschied der Glutathionspiegel feststellen (Abb. 14).

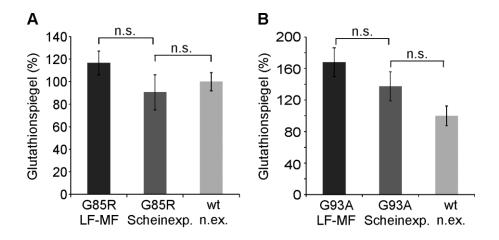


Abb. 14: Analyse der Glutathionspiegel im Rückenmark transgener SOD1 Mäuse. Die Glutathionspiegel von Rückenmarklysaten männlicher SOD1^{G85R} (A) und SOD1^{G93A} (B) Tiere im Endstadium der Krankheit wurden wie in Material und Methoden beschrieben bestimmt. Die Spiegel waren unabhängig von der Exposition (n=5; n=3 für wt; +/- SEM; t-Test)

3.2.9. Gliale Aktivierung

Die Aktivierung von Gliazellen ist ein pathologisches Kennzeichen der ALS. Darüber hinaus zeigen eine Reihe von Experimenten mit transgenen SOD1 Mäusen, dass Gliazellen nicht nur wegen des Zelltods der Neurone sekundär aktiviert werden, sondern vielmehr einen maßgeblichen Einfluss auf den Verlauf der ALS ausüben (Clement et al., 2003; Yamanaka et al., 2008). Transplantationsexperimente mit Astrozyten-Vorläuferzellen zeigten, dass SOD1-mutante Gliazellen wildtypische Motorneurone schädigen und gesunde Gliazellen SOD1-mutante Neurone schützen (Lepore et al., 2008; Papadeas et al., 2011). Der Grad der glialen Aktivierung wurde durch die Proteinspiegel des astrozytären Zytoskelettproteins *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und des Proteins IBA, das nur von aktivierten Mikroglia exprimiert wird, biochemisch und immunhistochemisch untersucht. In beiden Mauslinien zeigte sich eine verstärkte Expression von GFAP (Abb. 15) und IBA (Abb. 16) gegenüber den Kontrolltieren, die Expression war aber unabhängig von der Exposition mit LF-MF.

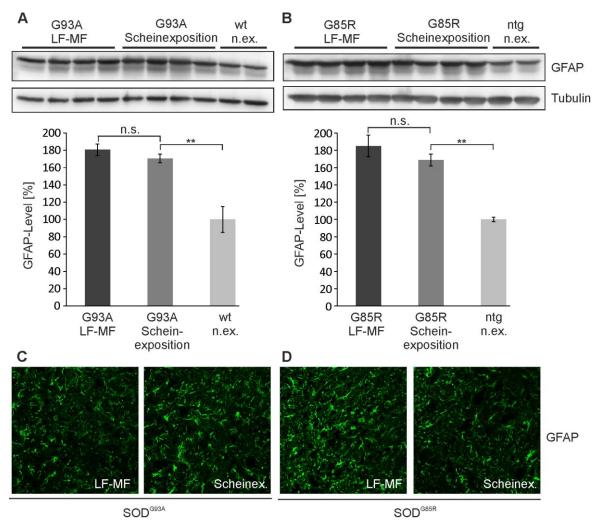


Abb. 15: Analyse der Expressionsspiegel von GFAP. (A, B) Gesamtlysate von Rückenmarkgewebe von SOD1^{G93A} (A) und SOD1^{G85R} (B) Tieren im Endstadium wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und GFAP mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Spiegel von GFAP wurden auf die Spiegel von Tubulin normalisiert. Die Werte der mutanten Tiere wurden auf die Werte der Kontrolltiere (100 %) bezogen (n=8; +/- SEM; t-Test). (C und D) Querschnitte des Rückenmarks kranker SOD1^{G93A} (C) und SOD1^{G85R} (D) wurden mit Antikörpern, die spezifisch GFAP erkennen, gefärbt. Die konfokalen Bilder zeigen eine vergleichbare Aktivierung von Astrozyten in exponierten und scheinexponierten Geweben.

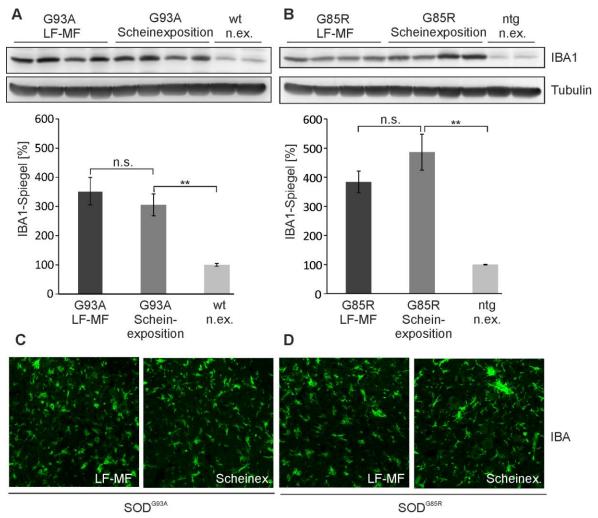


Abb. 16: Analyse der Expressionsspiegel von IBA. (A, B) Rückenmarkgewebe von SOD1^{G93A} (A) und SOD1^{G85R} (B) Tieren im Endstadium wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulosemembran übertragen und IBA mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die IBA-Spiegel wurden auf die Spiegel von Tubulin normalisiert. Die Werte der mutanten Tiere wurden auf die Werte der Kontrolltiere (100 %) bezogen (n=8; +/- SEM; t-Test). (C, D) Konfokale Bilder von Querschnitten des Rückenmarks kranker SOD1^{G93A} (C) und SOD1^{G85R} (D), die mit spezifischen Antikörpern gegen IBA angefärbt wurden. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied bei der Aktivierung von Mikroglia zwischen exponierten und scheinexponierten Geweben.

3.2.10. Einfluß von LF-MF auf das Überleben SOD1 transgener Mäuse

Die SOD1 transgenen Mauslinien sind dadurch charakterisiert, dass sie eine fortschreitende ALS-ähnliche Erkrankung entwickeln, wobei spezifisch Motorneurone geschädigt werden. Dies führt zu einem selektiven Verlust dieser Nervenzellen und letztendlich zum Endstadium der Krankheit. Die Dokumentation Krankheitsstadien ist eine Möglichkeit den Einfluss von LF-MF auf den Verlauf der ALS zu untersuchen, auch wenn die potentiell zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nicht bekannt sind. Ein objektives Kriterium. Krankheitszustand hinreichend gut beschreibt, ist die Entwicklung des Gewichts der Tiere (Liu et al., 2005). Transgene SOD1 Mäuse entwickelten sich unabhängig von der Exposition bis zu einem vergleichbaren Maximalgewicht, das bei Männchen im Vergleich zu Weibchen höher war (Abb 17 A, C). Auch das Gewicht zum Ende der Krankheit war unabhängig von der Exposition (Abb. 17B, D), was darauf hindeutet, dass die Exposition keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nahm.

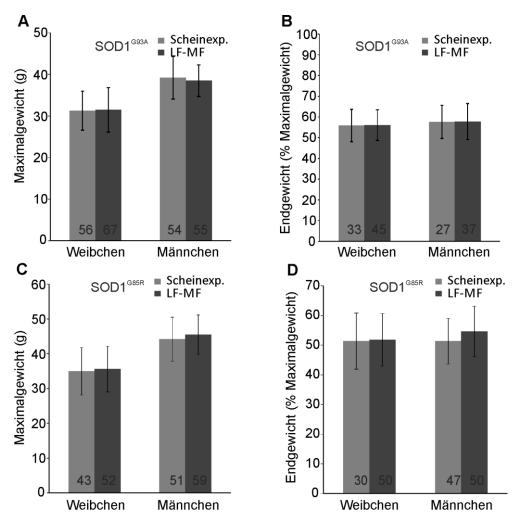


Abb. 17: Der Krankheitsverlauf ist gemessen an den Gewichtsdaten unabhängig von der Exposition. Transgene SOD1^{G85R} (A, B) und SOD1^{G93A} (C, D) Mäuse wurden im Alter von ca. acht Wochen in den Versuch eingebracht und entweder mit einem Magnetfeld von 1 mT exponiert oder scheinexponiert. Die Tiere wurden einmal pro Woche gewogen. Sowohl das Maximalgewicht (A, C) wie auch das Endgewicht der Tiere (B, D) waren unabhängig von der Exposition. Die Zahlen innerhalb der Balken geben die Anzahl der Individuen in der jeweiligen Gruppe wieder (+/- SEM; t-Test).

Der Beginn der Krankheit wurde zu dem Zeitpunkt definiert, zu dem ein Tier 10% des Maximalgewichts verloren hatte (Liu et al., 2005). Der Krankheitsbeginn, wie auch die Überlebenszeit waren durch die Expositionsbedingungen sowohl bei Männchen wie auch bei Weibchen der SOD1^{G93A} (Abb. 18) sowie der SOD1^{G85R} Linie (Abb. 19) nicht verändert.

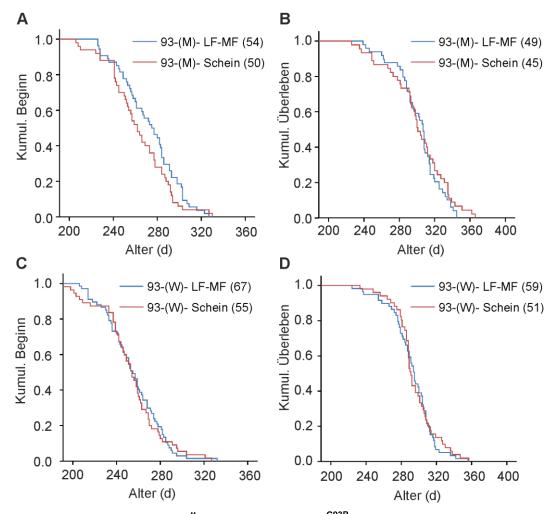


Abb. 18: Krankheitsbeginn und Überleben von SOD1^{G93R} transgenen Tieren in Abhängigkeit von der Exposition. (A, C) Der Krankheitsbeginn wurde definiert, wenn die Tiere 10 % ihres Maximalgewichts verloren hatten. (B, D) Der Endpunkt der Krankheit wurde definiert, wenn sich die Tiere innerhalb von zehn Sekunden, nachdem sie auf die Seite gelegt wurden, nicht aufrichten konnten. Männchen (A, B) und Weibchen (C, D) wurden getrennt analysiert. Die Graphen repräsentieren Kaplan-Meier-Kurven. Die Anzahl der Individuen je Gruppe ist in der Legende angegeben. Die statistischen Vergleiche der jeweiligen Tiergruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede (Log-Rank-Test: A: p=0,165; B: p=0,475; C: p=0,855; D: p=0,681).

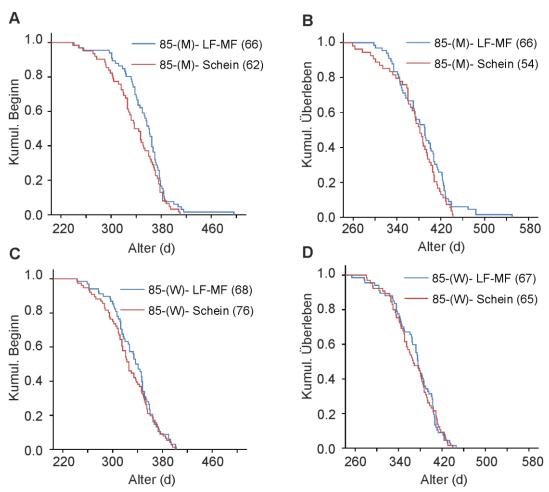


Abb. 19: Krankheitsbeginn und Überleben von SOD1^{G85R} transgenen Tieren in Abhängigkeit von der Exposition. (A, C) Der Krankheitsbeginn wurde definiert, wenn die Tiere 10 % ihres Maximalgewichts verloren hatten. (B, D) Der Endpunkt der Krankheit wurde definiert, wenn sich die Tiere innerhalb von zehn Sekunden, nachdem sie auf die Seite gelegt wurden, nicht aufrichten konnten. Männchen (A, B) und Weibchen (C, D) wurden getrennt analysiert. Die Graphen repräsentieren Kaplan-Meier-Kurven. Die Anzahl der Individuen je Gruppe ist in der Legende angegeben. Die statistischen Vergleiche der jeweiligen Tiergruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede (Log-Rank-Test: A: p=0,078; B: p=0,184; C: p=0,374; D: p=0,782).

3.3. LF-MF Exposition von APP23 Mäusen

Zur Untersuchung, ob LF-MF den Krankheitsverlauf und die Pathologie der Alzheimer Demenz verändern, wurden APP23 Tiere einem 1 mT Magnetfeld für 18 Monate ausgesetzt. Die APP23 Mauslinie zeichnet sich durch einen moderaten Krankheitsverlauf aus, bei dem neben der altersabhängigen Entstehung von amyloiden Plaques auch Defizite beim Lernverhalten der Tiere auftreten. Alle Analysen wurden mit 18 Monate alten Tieren durchgeführt. Die Expressionsanalysen wurden getrennt nach Männchen und Weibchen durchgeführt. Außerdem wurden die Expressionsspiegel im Cortex und im Hippocampus untersucht, da beide Gewebe im Verlauf der Krankheit betroffen sind.

3.3.1. Untersuchung der APP-Spiegel

Die APP23 Mauslinie überexprimiert die schwedische Doppelmutante des humanen APP, die auch bei Patienten zur Alzheimer Demenz führt. Ähnlich wie bei den Mausmodellen der SOD1, entwickeln die transgenen Mäuse die Pathologie dosisabhängig. Um zu untersuchen, ob etwaige Veränderungen der Pathologie auf unterschiedliche APP-Spiegel zurückzuführen sind, wurden die Proteinspiegel bestimmt. Mit dieser Methode wurde nur die Expression des transgenen humanen APP analysiert. Sowohl im Cortex als auch im Hippocampus weiblicher Tiere wurden keine veränderten APP-Spiegel festgestellt (Abb. 20). Ein vergleichbares Ergebnis zeigte auch die Analyse der Männchen (nicht gezeigt).

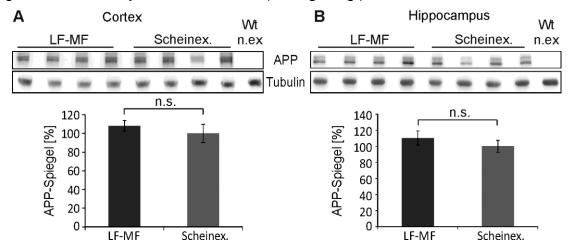


Abb. 20: Die APP-Spiegel sind von der Exposition unabhängig. Gesamtlysate vom Cortex (A) und Hippocampus (B) weiblicher APP23 Tiere wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und densitometrisch ausgewertet. Zur Bestimmung der APP-Spiegel wurde nur die obere Bande ausgewertet. Die untere Bande des Duplets stellt sAPP α dar (siehe 3.3.2). Die APP-Spiegel wurden gegenüber Tubulin abgeglichen und die Werte der Scheinexposition normalisiert. Der Graph stellt die Mittelwerte +/ SEM dar. (Cortex je n=11; Hippocampus je n=10; Mann-Withney-U Test)

3.3.2. Analyse der löslichen APP Spaltprodukte

APP kann prinzipiell auf zwei Arten prozessiert werden. Über den amyloiden Weg entsteht durch die Aktivität der β -Sekretase und der γ -Sekretase neben dem A β -Fragment auch sAPP β . Über den nicht-amyloiden Weg entsteht das p3-Fragment, dessen Funktion bisher nicht geklärt ist, und sAPP α , das neuroprotektive Eigenschaften haben soll (Thornton et al., 2006). Beiden Wegen ist gemein, dass das N-terminale Fragment *APP intracellular domain* (AICD) entsteht, das vermutlich die Transkription verschiedener Gene reguliert (von Rotz et al., 2004). Die Spiegel von sAPP α und sAPP β sind demnach ein Ma β für die Aktivitäten der Sekretasen.

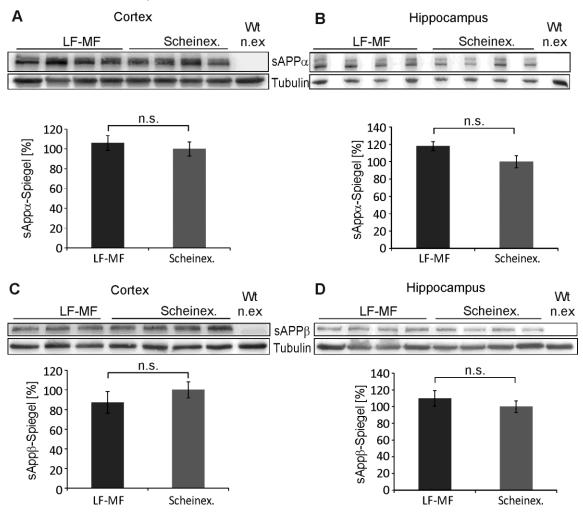


Abb. 21: Analyse der sAPP α - und sAPP β -Proteinspiegel. Gesamtlysate des Cortex (A, C) und des Hippocampus (B, C) von 18 Monate alten weiblichen Tieren wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinspiegel von sAPP α (A, B) und sAPP β (C, D) mit Western Blot bestimmt. Für die Bestimmung der sAPP α -Spiegel wurden jeweils die unteren Banden der Doppelbanden ausgewertet. Die obere Bande repräsentiert APP (siehe 3.3.1). Nach der densitometrischen Auswertung wurden die Proteinspiegel gegen die Ladekontrolle Tubulin abgeglichen und auf die Scheinexposition normalisiert. Die Graphen stellen die Mittelwert +/- SEM dar (sAPP α : Cortex je n=11, Mann-Withney-U-Test; Hippocampus LF-MF n=10, Scheinexp. n=12, t-Test) (sAPP β : Cortex je 10, Mann-Withney –U-Test; Hippocampus LF-MF n=10, Scheinexp. n=13, t-Test)

Die Analyse von Gesamtlysaten des Cortex und des Hippocampus von Weibchen (Abb. 21) und Männchen (nicht gezeigt) zeigte, dass die Spiegel der löslichen APP-Fragmente durch die Exposition mit LF-MF nicht verändert wurden. Wenn man berücksichtigt, dass auch die Gesamt-APP Spiegel durch die Exposition nicht verändert wurden, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivität der Sekretasen unverändert ist.

3.3.3. Quantitative Analyse der Aß-Spiegel

Die Entstehung von Aß-Fragmenten durch die Aktivität der γ -Sekretase und der β -Sekretase gilt als kritischer Schritt in der Pathogenese der Alzheimer Demenz. Dabei entstehen A β -Fragmente von unterschiedlicher Länge. Längere A β -Fragmente (A β (42)) haben eine stärkere Neigung zu aggregieren. Es wird davon ausgegangen, dass diese eine höhere Toxizität im Vergleich zu den kürzeren Fragmenten (z.B. A β (38)) aufweisen, weil sie in verstärktem Maße bei Alzheimer Patienten gefunden wurden (Suzuki et al., 1994). Die quantitative Bestimmung der Gesamt-A β -Spiegel im Hippocampus und im Cortex von 18 Monate alten Weibchen (Abb. 22A, B) und Männchen (nicht gezeigt) zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die detailliertere Analyse der Spiegel von A β -Fragmenten unterschiedlicher Länge, A β (40) und A β (42), durch einen quantitativen ELISA zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Spiegel durch die Exposition mit LF-MF (Abb. 22C-F). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass APP-Prozessierung und damit die Aktivitäten der Sekretasen nicht verändert sind.

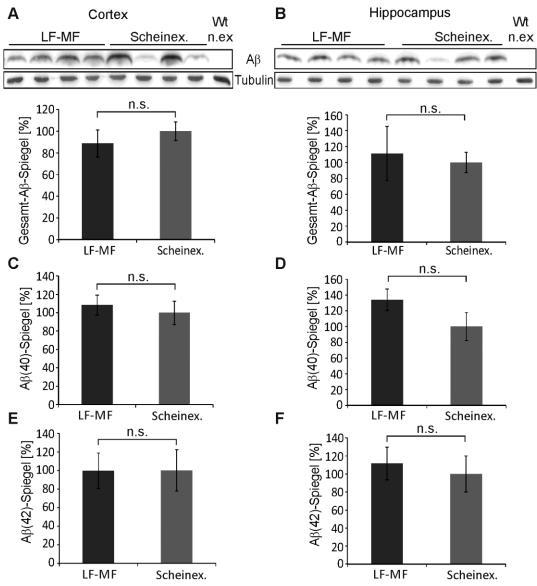


Abb. 22: Quantitative Analyse der Aβ-Spiegel. (A, B) Gesamtlysate des Cortex und des Hippocampus wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Aß durch Western Blot nachgewiesen. Die densitometrische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied der Aß-Spiegel (+/- SEM; Cortex: je n=11; Hippocampus: LF-MF n=10, scheinexp. n=12; Mann-Withney-U-Test). (C bis F) Aß(40) (C, D) und Aß(42) (E, F) wurde in löslichen Fraktionen des Cortex (C, E) und des Hippocampus (D, F) mit kommerziellen ELISA-Tests nachgewiesen. Die Ergebnisse der exponierten Tiere wurden auf die von scheinexponierten Tieren bezogen. (Mittelwert +/- SEM; Cortex: Aβ(40) LF-MF n=10, scheinexp. n=8; Aβ(42) LF-MF n=10, scheinexp n=9; Hippocampus: Aβ(40) und Aβ(42) LF-MF n=10, scheinexp. n=9; Mann-Withney-U-Test)

3.3.4. Analyse der amyloiden Plaques im Cortex und Hippocampus

Neben der Bestimmung der APP-Spiegel und dessen Spaltprodukten, wurden auch die Anzahl der amyloiden Plaques im Cortex und Hippocampus untersucht. Dazu wurden koronale Schnitte der Gehirne mit Kongorot gefärbt und die Fluoreszenzsignale im Cortex und Hippocampus analysiert (Abb. 23). Die Auswertung der Schnitte von exponierten und scheinexponierten Tieren zeigte keine

signifikanten Unterschiede (Abb. 24). Dagegen wurde bei weiblichen Tieren im Vergleich zu männlichen Tieren eine erhöhte Anzahl von Plaques gezählt (Abb. 25A, B). Die APP-Spiegel (Abb. 25G) und die Spiegel von löslichen Aβ40 und Aβ42 (Abb. 25C bis F) waren ebenfalls erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Exposition von LF-MF keinen Einfluss auf die Ausbildung der amyloiden Plaques hat, aber die Expression von APP und damit das Auftreten von löslichen und aggregierten Spaltprodukten vom Geschlecht der Tiere abhängt.

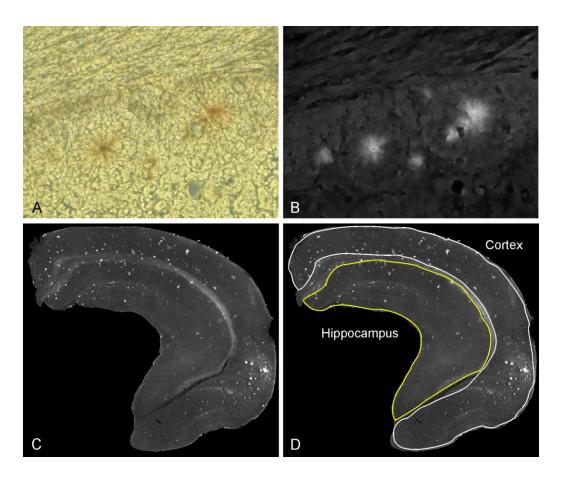


Abb. 23: Darstellung von amyloiden Plaques. Gehirne von APP transgenen Tieren wurden fixiert und koronal geschnitten. Die Schnitte wurden mit Kongorot gefärbt. Die Darstellung der Plaques im Lichtmikroskop (A) entspricht dem Fluoreszenzsignal bei einer Anregung von 545nm (B). (C), (D): Mehrere Bilder eines Gehirnschnittes wurden zusammengesetzt und der Bereich des Hirnstamms und des Diencephalon zur besseren Auswertung entfernt.

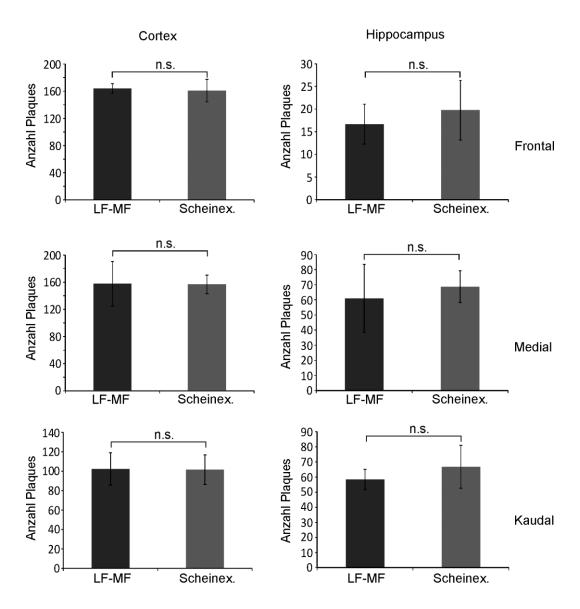


Abb.24: Anzahl von amyloiden Plaques im Cortex und Hipocampus. Koronale Schnitte von Gehirnen exponierter und scheinexponierter Weibchen (18 Monate alt) wurden mit Kongorot gefärbt und die Anzahl der Plaques im Cortex und Hippocampus bestimmt (siehe Abb. 23). Die ausgewerteten Schnitte wurden dem frontalen, medialen und kaudalen Bereich des Gehirns zugeordnet. Die Anzahl der Plaques war unabhängig von der Exposition. (Mittelwert +/- SEM; Exposition n=3 für jeden Bereich, Scheinexposition n=4, t-Test).

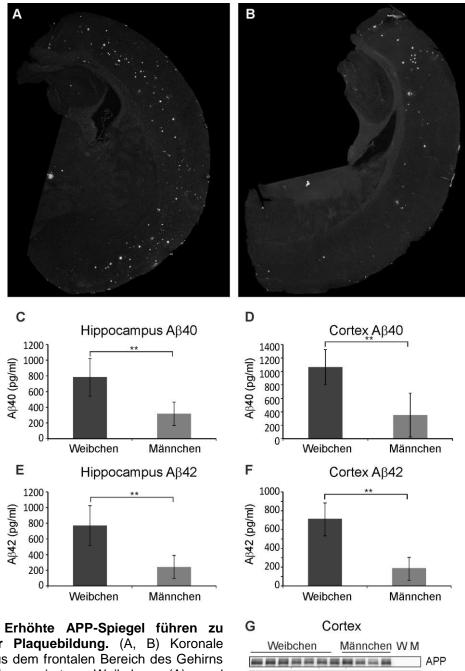
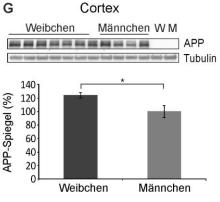


Abb. 25: Erhöhte APP-Spiegel führen zu vermehrter Plaquebildung. (A, B) Koronale Schnitte aus dem frontalen Bereich des Gehirns von scheinexponierten Weibchen (A) und Männchen (B), die jeweils 18 Monate alt waren, wurden Kongorot mit gefärbt. fluorszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten bei Weibchen eine erhöhte Plaguebildung gegenüber Männchen (siehe auch Abb 24). (C) bis (F) Die Spiegel von löslichem Aβ40 (C, D) und Aβ42 (E, F) wurden quantitativ mit einem ELISA-Test bestimmt (siehe Abb. 22). Die Spiegel waren bei scheinexponierten Weibchen



signifikant höher als bei scheinexponierten Männchen (Mittelwert +/- SEM; Hippocampus Weibchen je n=9, Männchen je n=11; Cortex Aβ40 n=8 (Männchen), n=9 (Weibchen); Aβ42 n=7 (Männchen), n=8 (Weibchen); Mann-Withney-U-Test). (G) Gesamtlysate des Cortex scheinexponierter Weibchen und Männchen wurden über PAGE-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und APP und Tubulin mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die densitometrische Auswertung zeigte erhöhte APP-Spiegel bei Weibchen (W: Weibchen n.tg; M: Männchen n.tg) (Mittelwert +/-SEM; je n=11, t-Test).

3.3.5. Tau- und Phospho-Tau-Spiegel in APP23 Tieren

Neben den Aβ-Plaques ist das Auftreten von intrazellulären neurofibrillären Ablagerungen, die durch hyperphosphoryliertes Tau (pTau) entstehen, ein pathologisches Kennzeichen bei Alzheimer Patienten. Die neurofibrillären Fibrillen korrelieren sehr gut mit dem Schweregrad der Erkrankung (Braak and Braak, 1995). Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das im intakten Gehirn in den Axonen von Neuronen vorkommt und Mikrotubuli stabilisiert. Es wird angenommen, dass die krankheitsassoziierte Phosphorylierung von Tau und die Bildung der neurofibrillären Ablagerungen nachgeschaltete Prozesse sind, die aber entscheidend die Aß-Toxizität vermitteln. Zunächst wurde untersucht, inwieweit die die Exposition mit LF-MF die Tau-Spiegel verändert. Die Analyse der Hippocampusgewebe weiblicher Tiere zeigte eine signifikante Steigerung der Tau-Spiegel unter Expositionsbedingungen. Im Cortex dieser Tiere waren die Spiegel nicht verändert (Abb. 26A, B). Die Spiegel der pathologisch relevanten hyperphosphorylierten Variante von Tau waren dagegen sowohl im Cortex als auch im Hippocampus nicht verändert (Abb. 26C, D). Dies deutet insbesondere im Hippocampus darauf hin, dass durch die Exposition zwar die Tau-Spiegel erhöht sind, die Kinasen, die Tauphosphorylieren aber nicht zusätzlich aktiviert wurden. Die Expression von Tau und pTau im Cortex und Hippocampus von Männchen war unabhängig von der Exposition (nicht gezeigt).

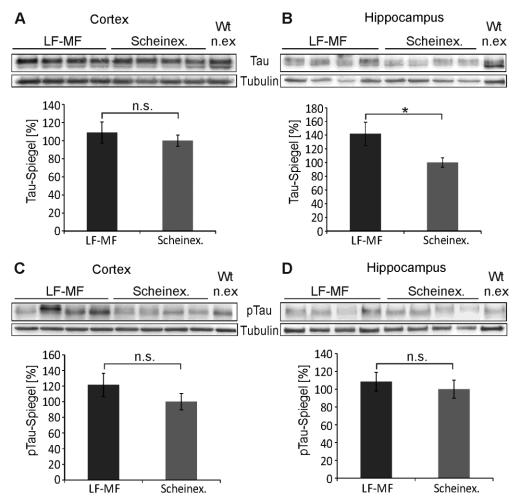


Abb. 26: Analyse von Tau und pTau-Spiegel nach Exposition mit LF-MF. Gesamtlysate von Cortex (A, C) und Hippocampus B, D) transgener APP23 Mäuse wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und Tau (A, B) und pTau (C, D) mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet und auf Tubulin abgeglichen. Die Werte der Exposition wurden auf die der Scheinexposition bezogen. (Mittelwert +/-SEM; Cortex: je=11 Tau und pTau und LF-MF und Scheinexp; Hippocampus: je n=10 für LF-MF und n=12 für Scheinexp; A und B: t-Test; C und D: Mann-Withney-U-Test)

3.3.6. Analyse der Proteinspiegel der Chaperone Hsp110 und Hsp90

Hitzeschockproteine sind wichtige Bestandteile der Regulation der Proteinhomöostase. Die Funktionen sind vielfältig, da sie u.a. Proteine stabilisieren oder fehlgefaltete Proteine den Proteindegradationssystemen zuführen können. Hsp110 ist ein Mitglied der Hsp70 Proteinfamilie, deren Überexpression die Bildung von Proteinaggregaten fehlgefalteter Proteine vermindert (Magrane et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeigt die Verminderung der Hsp90 Aktivität durch selektive Inhibitoren ebenfalls eine protektive Wirkung in Modellen der Alzheimer Demenz (Dickey et al., 2007; Chen et al., 2014). Die protektive Wirkung wird vermutlich dadurch verursacht, dass toxische Proteine, die durch Hsp90 stabilisiert werden, der

Degradation zugeführt werden. Bei der Analyse der Cortex- und Hippocampusgewebe von 18 Monate alten Weibchen zeigten sich tendenziell erhöhte Spiegel von Hsp110 (Abb. 27A, B) und Hsp90 (Abb. 27C, D) wie auch Hsp72 (nicht gezeigt). Die Hsp110-Spiegel waren im Hippocampus signifikant erhöht (Abb. 27B). Bei der Analyse von 18 Monate alten Männchen war dieser Trend nicht zu beobachten. Hier waren die Proteinspiegel von Hsp90 im Cortex signifikant erniedrigt (Anhang 8).

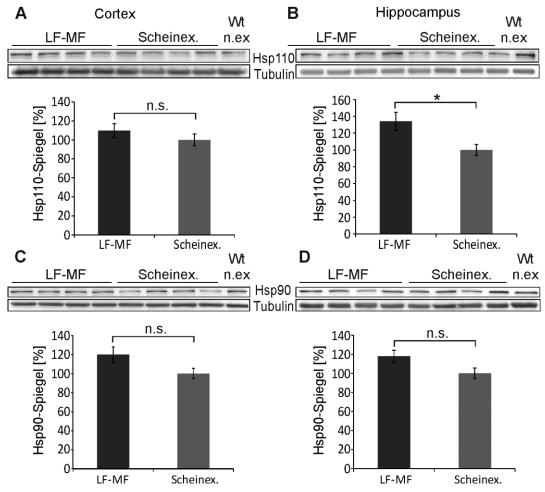


Abb. 27: Die Proteinspiegel von Hsp110 und Hsp90 sind unter Expositionsbedingungen bei Weibchen tendenziell erhöht. Die Proteinspiegel von Hsp110 (A, B) und Hsp90 (C, D) wurden in Gesamtlysaten von Cortex (A, C) und Hippocampus (B, D) weiblicher APP23 Mäuse durch Western Blot bestimmt. Die Werte wurden auf die Ladekontrolle Tubulin abgeglichen und die LF-MF Werte auf die Scheinexposition bezogen. Die Proteinspiegel beider Chaperone sind tendenziell erhöht, wobei die Hsp110-Spiegel im Hippocampus signifikant erhöht sind. (Mittelwert +/- SEM; Cortex für Hsp110 und Hsp90 LF-MF und scheinexp. : je n=11; Hippocampus für Hsp110 und Hsp90: LF-MF je n=10, scheinexp. je n=12; t-Test für alle Vergleiche)

3.3.7. Analyse autophagierelevanter Proteine

Die Rolle der Autophagie im Verlauf der Alzheimer Demenz ist bisher noch nicht verstanden. Histologische Analysen von Patientengewebe belegen eine Anhäufung von autophagischen Vesikeln im Endstadium der Krankheit. (Benzing et al., 1993). Die Stimulation der Autophagie durch Rapamycin führte zu einer Verbesserung des Lernverhaltens in Mausmodellen der Alzheimer Demenz (Spilman et al., 2010).

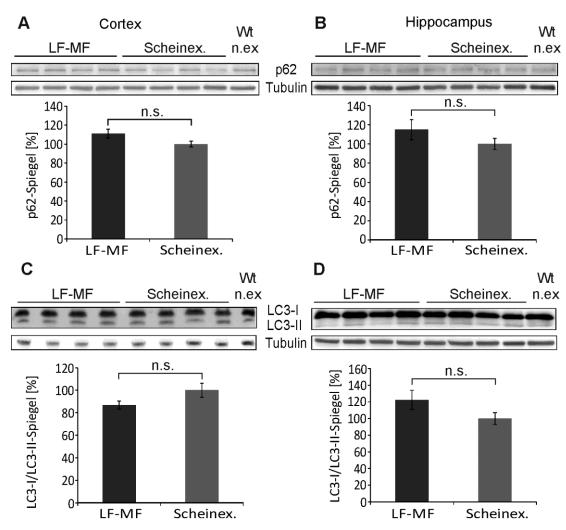


Abb. 28: Die Proteinspiegel autophagierelevanter Proteine sind unverändert. Gesamtlysate von Cortex (A, C) und Hippocampus (B, D) von 18 Monate alten Weichen der Linie APP23 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinspiegel von p62 (A, B) und LC3 (C, D) mit Western Blot bestimmt. Die entsprechenden Proteinspiegel wurden auf Tubulin als Ladekontrolle normalisiert und die Werte der Exposition (LF-MF) auf die Werte der Scheinexposition bezogen. Das Verhältnis LC3-I zu LC3-II ist ein Maß für die Autophagie. (Mittelwert +/- SEM; Cortex: je n=11; t-Test; Hippocampus, p62: LF-MF n=10, scheinex n=12; LC3-I/LC3-II: LF-MF n=11, scheinex n=12, je Mann-Witney-U-Test)

In dieser Studie wurden nun die Proteinspiegel von p62 (Abb. 28A, B) und LC3 (Abb. 28C, D) untersucht. P62 ist ein Autophagierezeptor, der auch durch die Autophagie abgebaut wird. LC3 ist ein cytosolisches Protein, das im Prozess der

Autophagosombildung lipidiert wird (Umwandlung der LC3-I Form in die LC3-II Form) und damit in die Autophagosomenmembran integriert wird. Das Verhältnis der beiden Proteinvarianten zueinander ist ein Maß für die Autophagie. Die Spiegel von p62 und LC3 sind unter Expositionsbedingungen nicht verändert.

3.3.8. Untersuchungen zur glialen Aktivierung

Im Verlauf der Alzheimer Demenz zeigt sich eine zunehmende Aktivierung von Astrozyten (Carter et al., 2012) und Mikrogliazellen (Cagnin et al., 2001), insbesondere, aber nicht ausschließlich in der Umgebung der amyloiden Plaques. Es wird davon ausgegangen, dass diese Aktivierung nicht nur eine Konsequenz der Bildung von amyloiden Plaques ist, sondern dass deren Aktivierung durch Aβ-Fragmente einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese darstellt (Heneka et al., 2013). Die Aktivierung der Gliazellen war in der Analyse von histologischen Schnitten erhöht gegenüber nicht transgenen Tieren, es zeigte sich aber kein qualitativer Unterschied zwischen exponierten und scheinexponierten Tieren (Abb. 29). Zur quantitativen Analyse wurde der Proteinspiegel von IBA1 als Mikroglia-spezifisches Protein (Abb. 30A, B) und das astrozytäre GFAP (Abb. 30C, D) untersucht. Die Spiegel von IBA1 waren im Hippocampus, aber nicht im Cortex von exponierten Weibchen im Vergleich zu scheinexponierten Tieren signifikant erhöht. Dies wurde bei Männchen allerdings nicht bestätigt (nicht gezeigt). Die GFAP Spiegel waren von der Exposition unbeeinflusst.

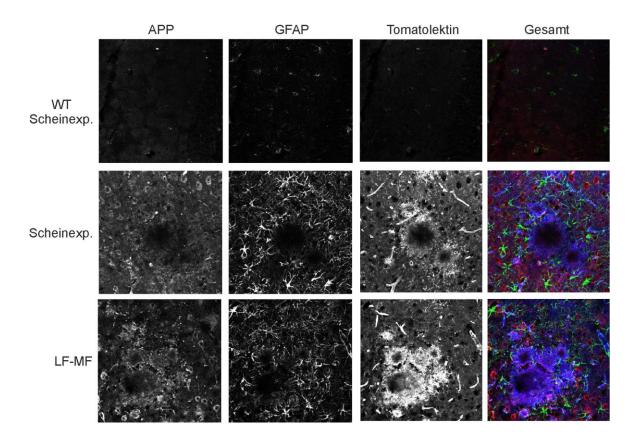


Abb. 29: Gliale Aktivierung im Cortex von APP23 Mäusen. Gefrierschnitte von Wildtyp-Tieren oder APP23 Tieren wurden mit Antikörpern gegen APP (rot) und GFAP (grün) und entsprechenden sekundären Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, gefärbt. Mikrogliazellen wurden mit Tomatolektin (blau) nachgewiesen. Mikrogliazellen traten besonders um amyloide Plaques auf.

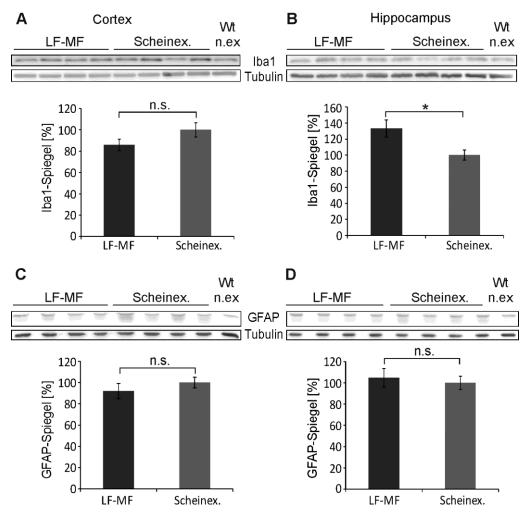


Abb. 30: Die Analyse der glialen Aktivierung in Abhängigkeit von der Exposition. Cortex- (A, C) und Hippocampuslysate (B, D) von 18 Monate alten Weibchen wurden mit Western Blot analysiert und densitometrisch ausgewertet. Die Aktivierung der Mikrogliazellen wurde durch IBA1(A, B) und die Aktivierung der Astrozyten durch GFAP (C, D) nachgewiesen. Die IBA1-Spiegel sind im Hippocampus erhöht (B). Die Werte wurden gegen die Ladekontrolle Tubulin abgeglichen und die Werte der Scheinexposition auf 100 % festgelegt. (Mittelwert +/- SEM; IBA1: Cortex je n=11; Mann-Withney-U-Test; Hippocampus LF-MF n=10, Scheinexp. n=12: t-Test; GFAP: Cortex je n=11; Hippocampus LF-MF n=10, Scheinexp. U-Test)

3.3.9. LF-MF und das Lernverhalten von APP23 Tieren

Neben den charakteristischen pathologischen Veränderungen der APP23 Mäuse, zu denen in erster Linie die Bildung von amyloiden Plaques zählt, ist die verminderte Lernfähigkeit dieser Tiere ein weiteres Kennzeichen der Krankheit. Um zu untersuchen, ob die Exposition mit LF-MF die Fähigkeit zu Lernen beeinflusst, wurden exponierte und scheinexponierte Tiere in einem *Morris-Water-Maze-*Test eingesetzt, bei dem das räumliche Lernen der Tiere untersucht wird (Abb. 31A). Sechs Monate alte Tiere fanden schwimmend innerhalb der Versuchszeit eine versteckte Plattform, wobei die Tiere an unterschiedlichen Stellen eingesetzt wurden

(Abb. 31B). Gealterte Tiere konnten dagegen nach sechs Versuchstagen die Plattform nicht schneller finden, was auf eine verminderte Lernfähigkeit gegenüber den jungen Tieren schließen lässt. (Abb. 32A, B). Am siebten Versuchstag wurde die Plattform entfernt und die Zeit bestimmt, die die Tiere in den jeweiligen Quadranten verbrachten. Der Vergleich zwischen exponierten und scheinexponierten Tieren zeigte, dass sich exponierte Weibchen signifikant länger im Zielquadranten aufhielten als scheinexponierte Tiere und signifikant kürzer in dem Quadranten, in dem die Tiere eingesetzt wurden (Abb. 32C). Dagegen war der Aufenthalt innerhalb der Quadranten von Männchen unabhängig von der Exposition (Abb. 32D).

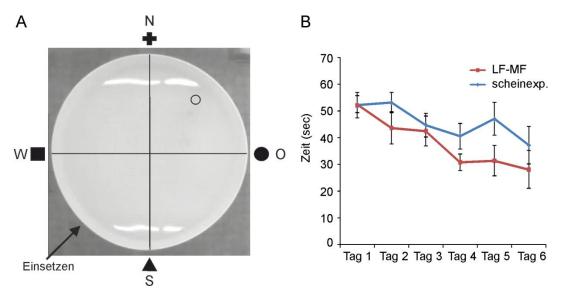


Abb. 31: Morris Water Maze-Test. (A) Nachdem die Tiere an den Versuchsraum und die Versuchsanlage gewöhnt waren, wurden die Mäuse unterschiedlichen Alters an sechs aufeinanderfolgen Tagen je viermal an unterschiedlichen Stellen in das Wasserbecken gesetzt und deren Schwimmbewegungen aufgezeichnet. Der Kreis im Nordost-Quadranten repräsentiert die Position der versteckten Plattform, auf die die Tiere im ersten Versuch geführt wurden. N, O, S und W stellen die Himmelsrichtungen dar, die mit unterschiedlichen Symbolen markiert sind. Im finalen Test am siebten Tag wurde die Plattform entfernt und alle Tiere in den Südwest-Quadranten eingesetzt (Pfeil). (B) Sechs Monate alte Tiere beider Geschlechter wurden über sechs Tage trainiert, um die Plattform zu finden. Exponierte und scheinexponierte Tiere fanden die Plattform bei steigender Anzahl der Versuche schneller (Mittelwert +/- SEM; n=9).

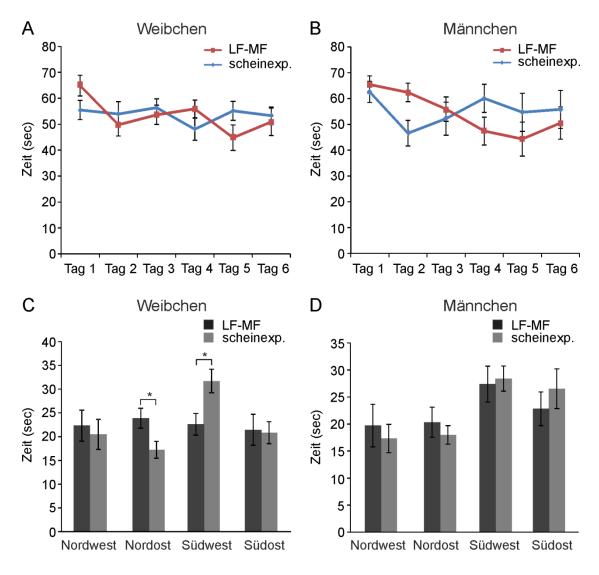


Abb. 32: Lernverhalten 18 Monate alter APP23 Mäuse. (A, B) Exponierte und scheinexponierte APP23 Tiere wurden über sechs Tage trainiert, eine versteckte Plattform zu finden. Die Lernkurve der exponierten Tiere zeigte einen Trend, dass diese Tiere lernen, wobei die scheinexponierten keine Tendenz zeigten. (C, D) Achtzehn Monate alte Weibchen (C) und Männchen (D) wurden sechs Tage lang trainiert die Plattform zu finden. Am 7. Tag wurde die Plattform entfernt. Dargestellt ist die Zeit, die die Tiere in den jeweiligen Quadranten (siehe Abb. 31) verbringen, nachdem sie im Südwest-Quadranten eingesetzt wurden. (für A-D: Männchen: LF-MF n=8; scheinexp n=6; Weibchen: LF-MF=9, scheinexp n=13; C und D: *t*-Test)

4. Diskussion

Die Ursachen für sporadische Fälle von altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen wie der ALS oder der Alzheimer Demenz sind bis heute nicht bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass neben einer genetischen Prädisposition und den Veränderungen in Verlauf der Alterung auch Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle für das Auftreten der Krankheiten spielen. Es ist nach wie vor umstritten, ob die Exposition mit LF-MF ein erhöhtes Risiko darstellt, an ALS oder der Alzheimer Demenz zu erkranken. Epidemiologische Studien und deren Metaanalysen zeigen eindeutiges Ergebnis, so dass die WHO von einem kein Gefährdungspotenzial ausgeht. Neben den epidemiologischen Daten spiegeln auch die experimentellen Studien ein widersprüchliches Bild davon, ob LF-EM einen, und wenn ja, welchen Einfluss auf zelluläre Prozesse ausüben. Bisherige Studien beleuchteten nur ungenügend, ob die Exposition mit LF-MF neurodegenerative Krankheiten wie die ALS oder die Alzheimer auslöst bzw. den Krankheitsverlauf ändern könnte.

In der hier vorgestellten Studie wurden Mausmodelle der ALS und der Alzheimer Demenz dahingehend untersucht, ob die kontinuierliche lebenslange Exposition mit LF-MF (1 mT, 50 Hz) den krankheitsbedingten Phänotyp und die pathologischen Kennzeichen der jeweiligen Erkrankung beeinflusst. Eine mögliche Veränderung könnte nicht nur klären, ob LF-MF in die pathologischen Abläufe eingreifen, sondern auch welche der möglichen, bisher noch nicht eindeutig geklärten Pathomechanismen für die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankungen verantwortlich sind.

4.1. Auswahl der Mausmodelle und methodische Aspekte

In dieser Studie wurden etablierte Mausmodelle der ALS und der Alzheimer Demenz eingesetzt und nach der Genotypisisierung dauernd einem LF-MF ausgesetzt. Transgene Mäuse, die systemisch SOD1^{G85R} und SOD1^{G93A} überexprimieren, entwickeln mehrere pathologische Kennzeichen der menschlichen Krankheit, wie das selektive Absterben der Motorneurone und die darauf folgende fortschreitende Muskelatrophie und Paralyse, die Entwicklung von Proteinaggregaten und die Aktivierung von Gliazellen (Gurney et al., 1994; Bruijn et al., 1997). Diese SOD1-Mutationen lösen auch beim Menschen, wie viele andere SOD1-Mutanten, familiäre Formen der Krankheit aus, die in der Regel dominant vererbt werden. In diesem

Experiment wurden die SOD1-Varianten SOD1 G85R und SOD1 G93A gewählt, weil sie zwei unterschiedliche Klassen von SOD1-Mutationen darstellen. SOD1 G85R zählt zu den dismutaseinaktiven Mutanten, weil sie keine Cu²⁺-Ionen binden können und in Zellen oder Geweben keine Dismutaseaktivität nachweisbar ist (Borchelt et al., 1994; Witan et al., 2008); SOD1^{G93A} ist dagegen eine Wildtyp-ähnliche Mutante. Sie zeigt, obwohl die Mutation eine Strukturveränderung auslöst, sehr ähnliche biochemische und biophysikalische Eigenschaften wie wildtypische SOD1 (Valentine et al., 2005; Weichert et al., 2014). Ein weiteres Kriterium für die Auswahl dieser ALS-Mausmodelle war der langsame Verlauf der Krankheit und damit die Möglichkeit einer relativ langen Expositionszeit. Männchen der SOD1 G85R Linie entwickelten erst im Alter von 338 Tagen (+/- 40 Tage; n=62) einen offensichtlichen Phänotyp. Bei Männchen der SOD1^{G93A} Linie brach die Krankheit nach 263 Tagen (+/- 28 Tage; n=50) aus. Im Vergleich dazu wurden in einer bereits publizierten Studie transgene SOD1^{G93A} Mäuse verwendet, die bereits im Alter von ca. 140 Tagen das Endstadium der Krankheit erreicht hatten und nur über insgesamt sieben Wochen einem LF-MF stundenweise ausgesetzt waren (Poulletier de Gannes et al., 2009). Falls die Exposition mit LF-MF eine Auswirkung auf den Krankheitsverlauf hätte, würde man diese bei beiden Mausmodellen erwarten.

Transgene Mäuse der APP23 Linie stellen ein Modell der Alzheimer Demenz dar, bei dem einige Aspekte der menschlichen Pathologie ausgebildet werden (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Es beruht auf einer Expression von APP, das die schwedische Doppelmutation trägt, unter dem Thy-1-Promotor. Die Tiere entwickeln eine fortschreitende Einschränkung des Lernverhaltens und amyloide Plaques, die in nicht-tansgenen Geschwistertieren nicht sichtbar sind. Ähnlich wie die verwendeten SOD1-transgenen Tiere, stellt die APP23-Linie ein Modell dar, das die Krankheit vergleichsweise langsam entwickelt. In dieser Studie wurden die Tiere in einem Alter von 18 Monaten untersucht. Demgegenüber werden in der Literatur vielfach mehrfach transgene Linien verwendet, die einen rapiden Krankheitsverlauf in Mäusen zeigen (Oddo et al., 2003).

Die eingesetzten Mauslinien stellen also Modelle der jeweiligen Krankheit dar, bei denen sich pathologische Veränderungen relativ spät einstellen. Der Einfluss der LF-MF ist durch die Untersuchung von pathologischen Phänotypen möglich, ohne dass die molekularen Prozesse, die zum Ausbruch der Krankheit führen, bis ins letzte Detail verstanden sein müssen. Sie sind in dieser Hinsicht sehr repräsentativ für die

Entstehung der Krankheit beim Menschen. Der späte Beginn der Krankheit und die große Anzahl der eingesetzten Tiere eröffnen die Möglichkeit, dass eine geringe Beeinflussung der Pathogenese durch LF-MF durch die durchgeführten Analysen detektiert werden können. Allerdings ist bei der abschließenden Beurteilung dieser Studien zu berücksichtigen, dass die Mauslinien genetische Modelle der Krankheiten darstellen. Obwohl sich familiäre Patienten und sogenannte sporadische Patienten, die keine Familienhistorie aufweisen, insbesondere bei der ALS sehr vergleichbar präsentieren, besteht die Möglichkeit, dass zentrale Prozesse der Pathogenese unterschiedlich verlaufen. Unter diesem Gesichtspunkt kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte der Felder zu gering sind, um eine Veränderung der sehr stereotyp ablaufenden Pathogenese in den jeweiligen Mauslinien auszulösen.

4.2. LF-MF Exposition und ALS

Da die Ergebnisse epidemiologischer Studien widersprüchlich sind und auch Metaanalysen bisher zu keiner klaren Aussage führen, ob die Exposition mit LF-MF einen Risikofaktor an ALS zu erkranken darstellt (Sutedja et al., 2009; Zhou et al., 2012; Vergara et al., 2013), wurden in dieser Studie Mausmodelle der ALS nach der Genotypisierung dauernd einem LF-MF von 1 mΤ unter kontrollierten Laborbedingungen ausgesetzt. Dieser Ansatz hat gegenüber einer Studie mehrere Vorteile, in der eine SOD1 G93A transgene Mauslinie verwendet wurde, die durch einen schnellen Krankheitsverlauf charakterisiert ist und bei der bereits nach ca. 140 Tagen das Endstadium der Krankheit erreicht wird (Poulletier de Gannes et al., 2009). In der früheren Studie wurden sieben Tiere pro Gruppe ab einem Alter von 70 Tagen für sieben Wochen für zwei Stunden/Tag (fünf Tage/Woche) exponiert. Die Grundlage für die Auswertung epidemiologischer Studien ist eine Dosisabhängigkeit von möglichen Veränderungen sowohl in Bezug auf die Stärke des Feldes als auch auf die Dauer der Exposition. In dieser Studie wurden die Tiere abhängig vom Alter der Tiere zum Endpunkt der Krankheit über mindestens sieben Monate (SOD1^{G93A}) bzw 10 Monate (SOD1^{G85R}) exponiert. Mit 1 mT liegt die Feldstärke bezogen auf die Größe der Maus über den empfohlenen Grenzwerten. Trotzdem wirkte sich die Exposition bei beiden verwendeten Mausmodellen weder auf den Zeitpunkt des Beginns der Krankheit, noch auf den Krankheitsverlauf und das Erreichen des Endpunktes aus (siehe Abb. 18, Ab.19). Diese Studie ist durch eine hohe statistische Teststärke gestützt, da pro Gruppe (Männchen bzw Weibchen; LF-MF bzw scheinexponiert) zwischen 54 bis 76 Tiere eingesetzt wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Exposition mit LF-MF mindestens bei der Untersuchung von SOD1-vermittelter ALS keinen Einfluss auf pathologische Prozesse ausübt.

4.3. Modelle der Alzheimer Demenz und Exposition mit LF-MF

Neben einer Reihe von epidemiologischen Untersuchungen zum Einfluss von niederfrequenten Magnetfeldern auf die Entstehung der Alzheimer Demenz, die in Metaanalysen zusammengefasst wurden (Garcia et al., 2008; Vergara et al., 2013), sind nur wenige Studien mit Tiermodellen der Krankheit unter definierten Laborbedingungen beschrieben. Demgegenüber ist in mehreren Studien der Einfluss von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF), wie sie bei der Kommunikation mit Mobiltelefonen auftreten, auf die Entstehung der Alzheimer Demenz im Tierversuch untersucht worden. Obwohl epidemiologische Daten dafür sprechen, dass EMF einen negativen Einfluss auf das Lernverhalten haben (Barth et al., 2008), zeigte eine Reihe der Tierstudien einen überraschenderweise positiven Effekt von HF-EMF auf den Verlauf der Krankheit in Modellen der Alzheimer Demenz. Eine lang-andauernde Exposition von 900 MHz EMF verlangsamte in Mausmodellen der Alzheimer Demenz den Abbau der kognitiven Fähigkeiten, erhöhte den cerebralen Blutfluss und verminderte die Bildung von Aβ-Plaques (Arendash et al., 2010). In einer nachfolgenden Studie konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die Exposition von zwei Jahre alten Tieren mit hochfrequenten Feldern die bereits etablierten Aβ-Ablagerungen reduziert, den cerebralen Blutfluss steigert und die kognitiven Fähigkeiten der Tiere verbessert (Arendash et al., 2012). Diese positiven Effekte werden möglichweise durch eine verbesserte mitochondriale Funktion vermittelt (Dragicevic et al., 2011). Die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten scheint aber auf Versuche mit Mausmodellen der Alzheimer Demenz beschränkt zu sein, da Versuche mit gesunden Tieren keine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten bewirkten, wenn die Tiere den Feldern vergleichsweise kurzfristig ausgesetzt waren (Dubreuil et al., 2003).

Vergleichbare Studien mit LF-MF mit Modellen der Alzheimer Demenz sind bisher nicht beschreiben. Unsere Studien zeigten nun, dass die langdauernde Exposition mit LF-MF keine grundlegende Einschränkung der Lernfähigkeit in Männchen oder Weibchen auslöst. Die Daten sprechen eher dafür, dass LF-MF möglicherweise eine positive Wirkung auf das Lernverhalten zeigen, wie für 18 Monate alte Weibchen

gezeigt wurde, die 16 Monate einem LF-MF von 1 mT ausgesetzt waren (Abb. 32). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit elekrophysiologischen Untersuchungen an akuten Schnitten des Hippocampus von Ratten und Mäusen, die entweder aus exponierten Tieren präpariert wurden oder direkt exponiert wurden (Wieraszko, 2004; Varro et al., 2009; Balassa et al., 2013) und Untersuchungen an gesunden Ratten *in vivo* (Komaki et al., 2014). Sie zeigten, dass durch die Exposition die *long-term-potetiation* (LTP) erhöht wurde, was ein elektrophysiologisches Korrelat für eine verbesserte Lernleistung ist. Allerdings ist bisher umstritten, auf welcher molekularen Basis diese Effekte beruhen.

4.4. Einfluss von LF-MF auf krankheitsrelevante zelluläre Prozesse

Obwohl die molekularen Grundlagen für Entstehung und das Fortschreiten sowohl bei der ALS als auch bei der Alzheimer Demenz nicht hinreichend bekannt sind, wurde in dieser Studie eine Reihe von zellulären Prozessen untersucht, die bei den jeweiligen Erkrankungen pathologisch verändert sind. Die zahlreichen Untersuchungen, bei denen der Einfluss von LF-MF auf Abläufe innerhalb von naiven Zellen wie die Stressantwort, der oxidative Status und die Proteinhomöostase beschrieben wurde, zeichnen ein sehr heterogenes Bild (Clement and Behl, 2009). Ursachen dafür sind möglicherweise die Verwendung von unterschiedlichen Zellkultursystemen und von verschiedenen Expositionsprotokollen. In dieser Studie wurden zur Untersuchung der Pathomechanismen bei der ALS zwei unterschiedliche transgene Mauslinien eingesetzt, die unter identischen Expositionsbedingungen gehalten wurden. Wenn die Exposition mit LF-MF einen grundlegenden Einfluss auf zelluläre Prozesse bei dieser Krankheit hätte, würde man Veränderungen in beiden Mauslinien erwarten. Die Analyse der betroffenen Gewebe bei zwei ALS-relevanten Mauslinien zeigte aber nach Exposition keine Veränderung bei den Spiegeln der krankheitsauslösenden SOD1, deren Aktivität, den Spiegeln von anderen ALSauslösenden Proteinen, den Proteinen, die die Proteinhomöostase aufrecht erhalten, der glialen Aktivierung und von Kenngrößen des oxidativen Status. Dabei wurden neben den Proteinspiegeln in einigen Fällen auch die Expressionsspiegel untersucht. Obwohl die Analysen mit Geweben aus Tieren durchgeführt wurden, die bereits das Endstadium der Krankheit erreicht hatten, erlaubt der unveränderte Zeitpunkt des Beginns der Krankheit den Schluss, dass auch in jungen, nicht symptomatischen keine Änderungen Krankheit unterstützen. Mäusen, auftreten, die die

Interessanterweise zeigte sich bei der Untersuchung von Lebergewebe, dass die Proteinspiegel des Hitzeschockproteins Hsp110 nach der Exposition in beiden Mauslinien erhöht waren. Hsp110 gehört zur Superfamilie der Hsp70 Chaperonfamilie (Easton et al., 2000). Hsp110 bildet im Zytosol mit Hsp70 einen Komplex, wobei Hsp110 den Nukleotidaustausch vermittelt (Dragovic et al., 2006). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Exposition mit LF-MF einen gewebespezifischen Einfluss auf die Proteinspiegel haben könnte. In dieser Studie hat die Veränderung der Hsp110 Spiegel in der Leber aber keine Auswirkung auf den Krankheitsverlauf der ALS.

Für die Analyse molekularer Veränderungen wurden bei APP23 Tieren getrennt nach Männchen und Weibchen die Hippocampus- und Cortexgewebe untersucht. Ein Funktionsverlust und der nachfolgende Zelltod in diesen Gehirnbereichen werden bei Patienten für die Verhaltensveränderungen im Verlauf der Erkrankung verantwortlich gemacht. Ähnlich wie bei den SOD1 Tieren, waren die Proteinspiegel des Transgens APP und dessen Spaltprodukten $A\beta$, $sAPP\alpha$ und $sAPP\beta$ nach der Exposition nicht verändert. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen waren auch die Anzahl der Plaques, die bei 18 Monate alten Tieren entstanden sind, unabhängig von der Exposition mit LF-MF. Die APP- und $A\beta$ -Spiegel waren bei Weibchen höher als bei Männchen, was sich auch in der Anzahl der Plaques niederschlug und mit früheren Daten übereinstimmt (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000). Trotzdem zeigten die Weibchen kein deutlich schlechteres Lernverhalten.

Die Untersuchung der Spiegel von Proteinen, die die Proteinhomöostase aufrechterhalten, zu denen Chaperone und Autophagie-relevante Proteine zählen, zeigte einen Trend zu erhöhten Proteinspiegeln bei APP23 Weibchen nach Exposition sowohl im Hippocampus als auch im Cortex. Bei Männchen dagegen sind die Ergebnisse heterogen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass durch die Regulation einer microRNA durch die Exposition mit LF-MF die Expression von Beclin, das an der Bildung von Autophagosomen beteiligt ist, reguliert wird und damit die Autophagie verstärkt (Marchesi et al., 2014). Auch in den Tieren könnte eine durch die Exposition mit LF-MF verstärkte Autophagie die geschädigten Gewebe schützen. In keinem Fall konnten wir aber zeigen, dass die Exposition mit LF-MF die nach heutigem Wissen relevante molekulare Signatur verändert, so dass das Lernverhalten von APP23 Tieren signifikant beeinträchtigt wurde.

4.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Studie zum Einfluss von LF-MF auf die Entstehung und das Fortschreiten von ALS und der Alzheimer Demenz wurden Mäuse repräsentativer Krankheitsmodelle unter definierten Laborbedingungen untersucht. Sowohl die eine beim Menschen Alzheimer auslösende APP-Mutation überexprimierenden Tiere wie auch Tiere der beiden mutanten SOD1 Mauslinien zeigten nach einer lang andauernden Exposition mit LF-MF (50 Hz, 1 mT) keine Beeinträchtigung der jeweiligen Phänotypen. Obwohl in dieser Studie eine große Anzahl von Tieren eingesetzt wurde und die Tiere über einen langen Zeitraum den Feldern ausgesetzt waren, ist nicht auszuschließen, dass eine repetitive Exposition andere könnte. Übereinstimmend mit dem unveränderten Auswirkungen haben Krankheitsverlauf der beiden Mausmodelle bei einer lang andauernden Exposition, zeigte eine detaillierte Analyse von molekularen Markern, die während des Krankheitsverlaufs pathologisch verändert sind, keine signifikanten Veränderungen, die auf eine Verstärkung der Pathologie hindeuten würden. Demzufolge deuten die Daten dieser Studie sehr stark darauf hin, dass die Exposition mit LF-MF die zellulären Prozesse, die für die Entstehung von ALS oder der Alzheimer Demenz zur Zeit verantwortlich gemacht werden, nicht beeinflusst.

5. Referenzen

- Al-Chalabi A, Hardiman O (2013) The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. Nat Rev Neurol 9:617-628.
- Andersen PM, Al-Chalabi A (2011) Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? Nat Rev Neurol 7:603-615.
- Arendash GW, Mori T, Dorsey M, Gonzalez R, Tajiri N, Borlongan C (2012) Electromagnetic treatment to old Alzheimer's mice reverses beta-amyloid deposition, modifies cerebral blood flow, and provides selected cognitive benefit. PloS One 7:e35751.
- Arendash GW, Sanchez-Ramos J, Mori T, Mamcarz M, Lin X, Runfeldt M, Wang L, Zhang G, Sava V, Tan J, Cao C (2010) Electromagnetic field treatment protects against and reverses cognitive impairment in Alzheimer's disease mice. J Alz Dis 19:191-210.
- Balassa T, Varro P, Elek S, Drozdovszky O, Szemerszky R, Vilagi I, Bardos G (2013) Changes in synaptic efficacy in rat brain slices following extremely low-frequency magnetic field exposure at embryonic and early postnatal age. Int J Dev Neurosci 31:724-730.
- Barber SC, Mead RJ, Shaw PJ (2006) Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. Biochim Biophys Acta 1762:1051-1067.
- Barth A, Winker R, Ponocny-Seliger E, Mayrhofer W, Ponocny I, Sauter C, Vana N (2008) A meta-analysis for neurobehavioural effects due to electromagnetic field exposure emitted by GSM mobile phones. Occup Environm Med 65:342-346.
- Behl C (2005) Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. Subcell Biochem 38:65-78.
- Benzing WC, Mufson EJ, Armstrong DM (1993) Alzheimer's disease-like dystrophic neurites characteristically associated with senile plaques are not found within other neurodegenerative diseases unless amyloid beta-protein deposition is present. Brain Res 606:10-18.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006a) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. Neuron 52:39-59.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW (2006b) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. Science 312:1389-1392.
- Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH, Jr., Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW (1994) Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. Proc Natl Acad Sci U S A 91:8292-8296.
- Braak H, Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. Neurobiol Aging 16:271-278.
- Brotherton TE, Li Y, Glass JD (2012) Cellular toxicity of mutant SOD1 protein is linked to an easily soluble, non-aggregated form in vitro. Neurobiol Dis 49C:49-56.
- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. Neuron 18:327-338.
- Cagnin A, Myers R, Gunn RN, Lawrence AD, Stevens T, Kreutzberg GW, Jones T, Banati RB (2001) In vivo visualization of activated glia by [11C] (R)-PK11195-PET following herpes encephalitis reveals projected neuronal damage beyond the primary focal lesion. Brain 124:2014-2027.

- Carter SF, Scholl M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Langstrom B, Nordberg A (2012) Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracer PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. J Nucl Med 53:37-46.
- Chen Y, Wang B, Liu D, Li JJ, Xue Y, Sakata K, Zhu LQ, Heldt SA, Xu H, Liao FF (2014) Hsp90 chaperone inhibitor 17-AAG attenuates Abeta-induced synaptic toxicity and memory impairment. J Neurosci 34:2464-2470.
- Clement AM, Behl C (2009) Auswirkung von niederfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Entstehung und den Verlauf der Alzheimer Erkrankung und der Amyotrophen Lateralsklerose.http://doris.bfs.de/jspui/handle/urn:nbn:de:0221-201004201532.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. Science 302:113-117.
- Consales C, Merla C, Marino C, Benassi B (2012) Electromagnetic fields, oxidative stress, and neurodegeneration. Int J Cell Biol 2012:683897.
- D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H (2013) Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Free Radic Biol Med 65:509-527.
- Davanipour Z, Tseng CC, Lee PJ, Sobel E (2007) A case-control study of occupational magnetic field exposure and Alzheimer's disease: results from the California Alzheimer's Disease Diagnosis and Treatment Centers. BMC Neurol 7:13.
- Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, Klosak N, Bailey RM, Dunmore J, Ash P, Shoraka S, Zlatkovic J, Eckman CB, Patterson C, Dickson DW, Nahman NS, Jr., Hutton M, Burrows F, Petrucelli L (2007) The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. J Clin Invest 117:648-658.
- Dragicevic N, Bradshaw PC, Mamcarz M, Lin X, Wang L, Cao C, Arendash GW (2011) Long-term electromagnetic field treatment enhances brain mitochondrial function of both Alzheimer's transgenic mice and normal mice: a mechanism for electromagnetic field-induced cognitive benefit? Neuroscience 185:135-149.
- Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A, Hartl FU (2006) Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. EMBO J 25:2519-2528.
- Dubreuil D, Jay T, Edeline JM (2003) Head-only exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields does not alter rat's memory in spatial and non-spatial tasks. Behavioural brain research 145:51-61.
- Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR (2000) The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. Cell stress & chaperones 5:276-290.
- Falone S, Mirabilio A, Carbone MC, Zimmitti V, Di Loreto S, Mariggio MA, Mancinelli R, Di Ilio C, Amicarelli F (2008) Chronic exposure to 50Hz magnetic fields causes a significant weakening of antioxidant defence systems in aged rat brain. Int J Biochem Cell Biol 40:2762-2770.
- Gamerdinger M, Carra S, Behl C (2011a) Emerging roles of molecular chaperones and cochaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. J Mol Med 89:1175-1182.
- Gamerdinger M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C (2011b) BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. EMBO Rep 12:149-156.

- Garcia AM, Sisternas A, Hoyos SP (2008) Occupational exposure to extremely low frequency electric and magnetic fields and Alzheimer disease: a meta-analysis. Int J Epidemiol 37:329-340.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science 264:1772-1775.
- Hebert LE, Beckett LA, Scherr PA, Evans DA (2001) Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050. Alzheimer Dis Assoc Disord 15:169-173.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. Nature 493:674-678.
- Huss A, Spoerri A, Egger M, Roosli M (2009) Residence near power lines and mortality from neurodegenerative diseases: longitudinal study of the Swiss population. Am J Epidemiol 169:167-175.
- Ittner LM, Gotz J (2011) Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci 12:65-72.
- Janssens J, Van Broeckhoven C (2013) Pathological mechanisms underlying TDP-43 driven neurodegeneration in FTLD-ALS spectrum disorders. Hum Mol Genet 22:R77-87.
- Jelenkovic A, Janac B, Pesic V, Jovanovic MD, Vasiljevic I, Prolic Z (2005) The effects of exposure to extremely low-frequency magnetic field and amphetamine on the reduced glutathione in the brain. Ann N Y Acad Sci 1048:377-380.
- Jelenkovic A, Janac B, Pesic V, Jovanovic DM, Vasiljevic I, Prolic Z (2006) Effects of extremely low-frequency magnetic field in the brain of rats. Brain Res Bull 68:355-360.
- Kheifets L, Bowman JD, Checkoway H, Feychting M, Harrington JM, Kavet R, Marsh G, Mezei G, Renew DC, van Wijngaarden E (2009) Future needs of occupational epidemiology of extremely low frequency electric and magnetic fields: review and recommendations. Occup Environ Med 66:72-80.
- Komaki A, Khalili A, Salehi I, Shahidi S, Sarihi A (2014) Effects of exposure to an extremely low frequency electromagnetic field on hippocampal long-term potentiation in rat. Brain research 1564:1-8.
- Korac J, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, Terzic J, Dikic I (2013) Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. J Cell Sci 126:580-592.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, Kayed R (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. FASEB J 26:1946-1959.
- Lepore AC, Rauck B, Dejea C, Pardo AC, Rao MS, Rothstein JD, Maragakis NJ (2008) Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. Nat Neurosci 11:1294-1301.
- Liu J, Shinobu LA, Ward CM, Young D, Cleveland DW (2005) Elevation of the Hsp70 chaperone does not effect toxicity in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 93:875-882.
- Lucin KM, Wyss-Coray T (2009) Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? Neuron 64:110-122.

- Maes A, Verschaeve L (2012) Can cytogenetics explain the possible association between exposure to extreme low-frequency magnetic fields and Alzheimer's disease? J Appl Toxicol 32:81-87.
- Magrane J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW (2004) Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. J Neurosci 24:1700-1706.
- Marchesi N, Osera C, Fassina L, Amadio M, Angeletti F, Morini M, Magenes G, Venturini L, Biggiogera M, Ricevuti G, Govoni S, Caorsi S, Pascale A, Comincini S (2014) Autophagy Is Modulated in Human Neuroblastoma Cells Through Direct Exposition to Low Frequency Electromagnetic Fields. J Cell Physiol.
- Martinez-Samano J, Torres-Duran PV, Juarez-Oropeza MA, Verdugo-Diaz L (2012) Effect of acute extremely low frequency electromagnetic field exposure on the antioxidant status and lipid levels in rat brain. Arch Med Res 43:183-189.
- Maruyama H et al. (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature 465:223-226.
- Mattsson MO, Simko M (2012) Is there a relation between extremely low frequency magnetic field exposure, inflammation and neurodegenerative diseases? A review of in vivo and in vitro experimental evidence. Toxicology 301:1-12.
- Merritt R, Purcell C, Stroink G (1983) Uniform magnetic field exposure by three, four, and five square coils. Rev Sci Instrum 54:879-882.
- Migliore L, Coppede F (2008) Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. Mutat Res 667:82-97.
- Miyakawa T, Yamada S, Harada S, Ishimori T, Yamamoto H, Hosono R (2001) Exposure of Caenorhabditis elegans to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses. Bioelectromagnetics 22:333-339.
- Nassif M, Matus S, Castillo K, Hetz C (2010) Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. Antiox Redox Sig 13:1955-1989.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science 314:130-133.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. J Neuropathol Exp Neurol 64:113-122.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron 39:409-421.
- Papadeas ST, Kraig SE, O'Banion C, Lepore AC, Maragakis NJ (2011) Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 108:17803-17808.
- Park RM, Schulte PA, Bowman JD, Walker JT, Bondy SC, Yost MG, Touchstone JA, Dosemeci M (2005) Potential occupational risks for neurodegenerative diseases. Am J Ind Med 48:63-77.
- Parlett LE, Bowman JD, van Wijngaarden E (2011) Evaluation of occupational exposure to magnetic fields and motor neuron disease mortality in a population-based cohort. J Occup Environ Med 53:1447-1451.

- Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH (2010) Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. Journal Neurosci30:14946-14954.
- Poulletier de Gannes F, Ruffie G, Taxile M, Ladeveze E, Hurtier A, Haro E, Duleu S, Charlet de Sauvage R, Billaudel B, Geffard M, Veyret B, Lagroye I (2009) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and extremely-low frequency (ELF) magnetic fields: a study in the SOD-1 transgenic mouse model. Amyotroph Lateral Scler 10:370-373.
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet 13:43-47.
- Roosli M (2008) Commentary: Epidemiological research on extremely low frequency magnetic fields and Alzheimer's disease--biased or informative? Int J Epidemiol 37:341-343.
- Roosli M, Lortscher M, Egger M, Pfluger D, Schreier N, Lortscher E, Locher P, Spoerri A, Minder C (2007) Mortality from neurodegenerative disease and exposure to extremely low-frequency magnetic fields: 31 years of observations on Swiss railway employees. Neuroepidemiology 28:197-206.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362:59-62.
- Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. PLoS One 5:e9979.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleroche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Science 319:1668-1672.
- Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M (2000) Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. An N Y Acad Sci 920:134-139.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 94:13287-13292.
- Sutedja NA, Fischer K, Veldink JH, van der Heijden GJ, Kromhout H, Heederik D, Huisman MH, Wokke JJ, van den Berg LH (2009) What we truly know about occupation as a risk factor for ALS: a critical and systematic review. Amyotroph Lateral Scler 10:295-301.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. Science 264:1336-1340.
- Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J, Julien JP (2011) Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. Brain 134:2610-2626.
- Thornton E, Vink R, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C (2006) Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. Brain Res 1094:38-46.

- Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. Ann Rev Biochem 74:563-593.
- Varro P, Szemerszky R, Bardos G, Vilagi I (2009) Changes in synaptic efficacy and seizure susceptibility in rat brain slices following extremely low-frequency electromagnetic field exposure. Bioelectromagnetics 30:631-640.
- Vergara X, Kheifets L, Greenland S, Oksuzyan S, Cho YS, Mezei G (2013) Occupational exposure to extremely low-frequency magnetic fields and neurodegenerative disease: a meta-analysis. J Occup Environ Med 55:135-146.
- Villarini M, Ambrosini MV, Moretti M, Dominici L, Taha E, Piobbico D, Gambelunghe C, Mariucci G (2013) Brain hsp70 expression and DNA damage in mice exposed to extremely low frequency magnetic fields: a dose-response study. Int J Radiat Biol 89:562-570.
- von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. J Cell Sci 117:4435-4448.
- Weichert A, Besemer AS, Liebl M, Hellmann N, Koziollek-Drechsler I, Ip P, Decker H, Robertson J, Chakrabartty A, Behl C, Clement AM (2014) Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase stabilizes mutant variants by heterodimerization. Neurobiol Dis 62:479-488.
- WHO (2007) Environmental health criteria 322: Electromagnetic fields and public health: Exposure to extremely low frequency fields. WHO Press.
- Wieraszko A (2004) Amplification of evoked potentials recorded from mouse hippocampal slices by very low repetition rate pulsed magnetic fields. Bioelectromagnetics 25:537-544.
- Witan H, Kern A, Koziollek-Drechsler I, Wade R, Behl C, Clement AM (2008) Heterodimer formation of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-causing mutant Cu/Zn-superoxide dismutase induces toxicity independent of protein aggregation. Hum Mol Genet 17:1373-1385.
- Witan H, Gorlovoy P, Kaya AM, Koziollek-Drechsler I, Neumann H, Behl C, Clement AM (2009) Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) does not facilitate, but impedes the formation of protein aggregates of amyotrophic lateral sclerosis causing mutant SOD1. Neurobiol Dis 36:331-342.
- Wong E, Cuervo AM (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. Nat Neurosci 13:805-811.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. Neuron 14:1105-1116.
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci 11:251-253.
- Zhou H, Chen G, Chen C, Yu Y, Xu Z (2012) Association between extremely low-frequency electromagnetic fields occupations and amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. PLoS One 7:e48354.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt: Bundesamt für Strahlenschutz Postfach 10 01 49 38201 Salzgitter Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885 Internet: www.bfs.de E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.

