

Sonderforschungsbereich 507

Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen
bei neurologischen Erkrankungen

Finanzierungsantrag 1998 – 2001



An die
Deutsche Forschungsgemeinschaft
- Sonderforschungsbereiche -
53170 Bonn

Antrag auf Finanzierung des Sonderforschungsbereichs 507

"Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen"

gefördert seit 7/95

für die Jahre 1998 - 1999 - 2000 - 2001

Sprecherhochschule:

Humboldt-Universität Berlin

Sprecher

Prof. Dr. Karl M. Einhäupl

Neurologische Klinik der Charité
Humboldt-Universität Berlin
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin
Telefon: 030 2802 3228
Telefax: 030 2802 5047
einhaeupl@neuro.charite .hu-berlin.de

Berlin,

Sekretariat des SFB

PD Dr. Ulrich Dirnagl

Neurologische Klinik der Charité
Humboldt-Universität Berlin
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin
Telefon: 030 2802 8318
Telefax: 030 2802 5047
dirnagl@neuro.charite .hu-berlin.de

.....
(Unterschrift des Sprechers des SFB
Prof.Dr. Karl M. Einhäupl)

Berlin,

.....
(Unterschrift des Präsidenten der HU,
Prof.Dr.Dr. Hans Meyer)

0	ERKLÄRUNG ZUR RAUMSITUATION DES SFB 507.....	7
1.1	Forschungsprogramm.....	9
1.2	Übersicht über die Teilprojekte, gegliedert nach Projektbereichen	11
1.3	Inhaltlich strukturelles Umfeld und personelle Situation des Sonderforschungsbereichs	13
1.4	Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses	14
1.5	Alphabetische Liste der am Sonderforschungsbereich beteiligten Wissenschaftler	25
1.6	Verzeichnis der Forschungsthemen, an denen Wissenschaftler des Sonderforschungsbereichs mitarbeiten.....	28
1.7	In der Ordnung des Sonderforschungsbereichs vorgegebene Gremien.....	34
2	ÜBERBLICK ÜBER DIE BISHERIGE UND DIE BEANTRAGTE FÖRDERUNG DES SFB 507.....	35
2.2	.Anzahl der Mitarbeiter/innen, die aus der Grundausrüstung_1998 für die jetzt beantragten Teilprojekte zur Verfügung stehen werden	45
2.3	Anzahl der Mitarbeiter/innen, für die Personalmittel als Ergänzungsausstattung beantragt werden	47
2.4	Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben.....	52
2.5	Liste der Geräte über DM 20.000 (brutto).....	60
2.6	Liste der als Ergänzungsausstattung für die Haushaltsjahre 1998 (2. HJ), 1999, 2000, 2001 (1. HJ) beantragten Geräte über 20.000 (brutto) und Fahrzeuge.....	61
2.7	Angaben zur Versuchstierhaltung	62

Inhaltsverzeichnis

3.0 ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DES PROJEKTBEREICHES A.....	65
A1 Dreier/ Dirnagl	69
A2 Blasig.....	99
A5 Dirnagl.....	121
A6 Lindauer/ Klee.....	147
A7 Grune.....	175
3.0 ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DES PROJEKTBEREICHES B.....	197
B1 Kettenmann	201
B2 Hanisch.....	219
B5 Zimmer	245
B6 (<i>war A3</i>) Weber/ Einhäupl	267
B7 Hass	289
B8 Stein /Welte	305
3.0 ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DES PROJEKTBEREICHES C.....	329
C1 Nitsch	333
C2 Ohm.....	359
C3 Eder/ Heinemann.....	385
C4 Müller.....	415
C5 Woiciechowsky/ Volk.....	433
Z2 Einhäupl.....	459
Z Einhäupl.....	473
SATZUNG DES SFB 507	479

Erklärung zur Raumsituation des SFB 507

- | | | ja | nein |
|-----|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0.1 | Decken die vorhandenen Räume den Bedarf des Sonderforschungsbereichs zum Antragszeitpunkt | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Wird der Raumbedarf in den Haushaltsjahren | | |
| | 1998 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | 1999 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | 2000 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | 2001 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | einschließlich einer etwa beantragten Erweiterung des Sonderforschungsbereichs gedeckt werden? | | |
| 0.2 | Beziehen Arbeitsgruppen von Sonderforschungsbereichen im laufenden Jahr oder im Antragszeitraum neuerbaute oder umgebaute Räume? | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| | Wenn ja, bitte den Zeitpunkt angeben. | | |

Berlin,

.....
(Unterschrift des Präsidenten)

1.

1.1 Forschungsprogramm.

Erkrankungen des Zentralen Nervensystems lösen eine hochkomplexe Kaskade von Ereignissen aus, bei der alle Zellen des Hirnparenchyms beteiligt sind. Darüber hinaus wird in sehr vielen Fällen auch die Integrität der Blut-Hirn-Schranke gestört, so daß Zellen aus dem Blut-system Zugang zum Hirngewebe haben. Dabei ist es eine allgemein anerkannte Tatsache, daß die Zerstörung von Nervenzellen im ZNS ein irreparables Ereignis und daß Regeneration nur in einem sehr beschränkten Umfang möglich ist. Da die Nervenzelle das empfindlichste Glied in der Kette zu sein scheint, konzentriert sich die Mehrheit der Forschungsgruppen beim Thema Degeneration/Regeneration auf die Vulnerabilität und Schadenskaskaden von Neuronen. Der Erhalt der neuronalen Verbände in ihrer vollen Integrität wird auch in Zukunft eine essentielle Rolle für das Funktionieren des Nervensystems nach einem Schädigungsprozeß sein. Dennoch hat schon Virchow 1871 in seiner *Zellulärpathologie* formuliert: *”Wenn man aber das Nervensystem in seinem wirklichen Verhalten studieren will, so ist es außerordentlich wichtig, auch diejenige Masse zu kennen, welche zwischen den eigentlichen Nerventeilen vorhanden ist, welche sie zusammenhält und im ganzen mehr oder weniger seine Form gibt”*. Aus diesem Grunde hat sich der SFB 507 auf die Rolle der nichtneuronalen Zellen bei Erkrankungen des Zentralnervensystems konzentriert, ohne dabei jedoch die Interaktion mit den neuronalen Partnern aus dem Auge zu verlieren. Im Zentrum des Interesses stehen dabei Mikrogliazellen, Astrozyten als intrinsische Zellen im Zentralnervensystem, die Endothelzellen bzw. die Blut-Hirn-Schranke als Nahtstelle zum Blutsystem und diejenigen Blutzellen, die nach dem Aufbrechen der Blut-Hirn-Schranke mit intrinsischen Hirnzellen interagieren, hier im besonderen Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten.

Mikrogliazellen sind wohl die empfindlichsten Sensoren, die auf pathologische Zustände des Gehirns reagieren. Sie durchlaufen eine komplexe Aktivierungskaskade, die von einer ruhenden ramifizierten Zelle ausgeht und sich in eine hochaktive, phagozytierende zytotoxische Zellen umwandeln kann. Sie sind in der Lage, MHC-Klasse II Komplex zu exprimieren und so als Antigen-präsentierende Zelle T-Lymphozyten zu stimulieren. Astrozyten erfüllen wichtige Aufgaben bei der Regulation des Milieus um die Neurone, sei es durch Kontrolle der Ionenkonzentrationen wie zum Beispiel Kalium und Protonen oder durch metabolische Aktivitäten wie der Bereitstellung von Glukose. Sie sind effektive Produzenten von Wachstumsfaktoren und Cytokinen und selber in der Lage, phagozytotisch aktiv zu werden. Störungen in diesen Funktionen können weitreichende Auswirkungen für die Funktion des ZNS haben. Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke regelt den Zugang von Zellen und Substanzen in das Hirnparenchym. Während vieler Krankheitsprozesse, wie zum Beispiel bei Schlaganfall oder Meningitis, bricht diese Barriere kurzfristig zusammen, bei Tumoren kommt es regelmäßig zu Blut-Hirnschrankenstörungen, ebenso bei chronisch-degenerativen Prozessen wie dem M. Alzheimer. Die Kontrollmechanismen für einen solchen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke sind noch weitgehend ungeklärt. Es kommt zum Eindringen von immunkompetenten Zellen in das Zentralnervensystem wie zum Beispiel T-Lymphozyten, die dann mit Zellen des ZNS - insbesondere Mikroglia aber auch Astrozyten - interagieren können.

Durch die Integration von klinisch orientierten und Grundlagen-orientierten Gruppen gibt es ein sehr breites Spektrum an Methoden: Es werden molekularbiologische und zellbiologische

Methoden eingesetzt, elektrophysiologische Verfahren in Kombination mit funktionellen Farbstoffen verfolgt und das Repertoire der Zelldarstellung von der Immunzytochemie über die in situ Hybridisierung bis zur Elektronenmikroskopie angewendet. Darüberhinaus werden bildgebende Verfahren in verschiedenen Schädigungsmodellen in vitro und in vivo eingesetzt. Somit reicht die Spanne der Modelle von sehr einfachen Zelllinien bis hin zum komplexen Ganztier-Versuch.

Der SFB gliedert sich in drei Projektbereiche, die sich an Krankheiten orientieren. Im Projektbereich A spielen Mechanismen bei cerebraler Ischämie/Hypoxie die zentrale Rolle. Es wurde in den letzten Jahren deutlich, daß nicht-neuronale Mechanismen einen starken Einfluß auf das Ausmaß des ischämischen Schadens haben. Dabei spielen sowohl der Einfluß eingewanderter Zellen aus dem Blutsystem, die unterschiedliche Aktivierung intrinsischer Gliazellen (Astrozyten und Mikroglia) als auch die Reaktionen der glatten Gefäßmuskelzellen und des Endothels eine wichtige Rolle. Alle Zellen interagieren miteinander und beeinflussen in einer sehr komplexen Weise die Schadenskaskade, die nach einer hypoxisch/ischämischen Schädigung auftritt. Der Projektbereich B hat entzündliche Prozesse sowie Tumorstadium und Infiltration zum Thema. Auch hier reicht die Spanne der Projekte von sehr molekularbiologisch orientierten Ansätzen bis hin zu Magnetresonanzbildgebung am experimentellen Tumormodell. Gerade bei diesen beiden Projektbereichen wird deutlich, wie eng die Projekte verzahnt sind, da es immer klarer wird, daß zum Beispiel eine Reaktion von Mikrogliazellen auf infiltrierende Zellen, seien es Blutzellen oder Tumorzellen, einem sehr ähnlichen Muster folgen könnte. Das bedeutet, daß die molekularen Elementarprozesse in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, das heißt die Zellen einem Paradigma folgen, das sich unter Umständen bei Meningitis oder Ischämie nicht unterscheidet. Dennoch kann die enge Interaktion dieser Gruppen auch mögliche Unterschiede aufzeigen, da die experimentellen Ansätze der Gruppen leicht untereinander abgestimmt werden können. Der Projektbereich C beschäftigt sich mit den nicht-akuten Schädigungen, nämlich neurodegenerativen Veränderungen. Die Projekte konzentrieren sich auf Veränderungen im Zusammenhang mit der Alzheimerschen Krankheit oder mit epileptischer Aktivität. Ein wichtiger Punkt ist hierbei die Bedeutung der Mikrogliazellen als intrinsische Immunzellen des ZNS. Die Kontrolle ihrer Aktivierung könnte einen zentralen Mechanismus für den Umfang und das Ausmaß des degenerativen Prozesses ausmachen.

In der ersten Antragsperiode haben sich eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Arbeitsgruppen ergeben, die zum einen durch gemeinsame Publikationen dokumentiert sind und sich zum anderen auch in der Projektarbeit niederschlagen. Darüber hinaus hat der SFB versucht, weitere Gruppen heranzuziehen, die eine wichtige Ergänzung sowohl bezüglich ihrer Fragestellung als auch ihrer technischen Möglichkeiten sind. Hierbei sind im besonderen die Projekte zur Rolle immunologischer Prozesse zu nennen. Dadurch ergab sich auch eine neue, sinnvolle Gliederung des SFB im Vergleich zu der ersten Arbeitsphase, die dieser neuen Gruppierung Rechnung trägt.

1.2. Übersicht über die Teilprojekte, gegliedert nach Projektbereichen

neue Teilprojekte sind mit * gekennzeichnet

Teil-Projekt	Titel	Fachgebiet und Arbeitsrichtung	Leiter/in, Institut, Ort
A 1	'Cortical spreading ischemia': Ein neues Ischämieprinzip	Neurologie, Neurophysiologie	Dreier/Dirnagl Neurol. Klinik, Charité, Humboldt Universität
A 2	Einfluss von Astrozyten auf Gehirndothelzellen bei Hypoxie	Neurobiologie, Pharmakologie	Blasig Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
A 5*	Fokale cerebrale Ischämie und induzierte Ischämietoleranz: Rolle von Makrophagen und Mikroglia	Neurologie	Dirnagl Neurol. Klinik, Charité, Humboldt Universität
A 6*	Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien unter physiologischen Bedingungen und nach zerebraler Ischämie und Spreading Depression	Neurobiologie, Neurophysiologie	Klee/Lindauer Inst. für Physiologie, Neurologische Klinik, Charité Humboldt Universität
A 7*	Rolle der Mikroglia im Eisenstoffwechsel des Gehirnes – Schädigung Eisenbindender Proteine bei radikalischer Belastung	Biochemie	Grune Klinik für Phys. Med und Rehabilitation Charité Humboldt Universität
B 1	Physiologische Eigenschaften glialer Tumore	Neurobiologie	Kettenmann Max-Delbrück-Centrum, Berlin
B 2	Intrazelluläre Signalverarbeitung bei mikroglialer Aktivierung: Beteiligung von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen der JAK/STAT und ERK/MAPK Kaskaden	Neurobiologie	Hanisch Max-Delbrück-Centrum, Berlin
B 5*	In vivo MR-Bildgebung der aktivierten Mikroglia	Neuroradiologie	Zimmer: Inst. für Röntgendiagnostik, Charité Humboldt Universität
B 6 (war A3)	Gliaaktivierung - Ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis	Neurologie	Weber/Einhäupl Neurol. Klinik, Charité Humboldt-Universität
B 7*	Signalkaskade der Differenzierung und Aktivierung monozytärer Zellen unter dem Einfluß von Astrozyten	Neurobiologie	Hass Inst. für Anatomie, Charité Humboldt Universität

B 8*	Schmerzinhibition durch Migration Opioid-enthaltender Immunzellen in entzündetes Gewebe	Anästhesiologie	Stein / Welte Klinik für Anästhesiologie und op. Intensivmedizin, UKBF, Freie Universität Berlin
C1	Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion	Anatomie	Nitsch Institut für Anatomie, Charité, Humboldt-Universität
C2	Expression und Regulation von Apolipoprotein E (APOE) in Gliazellen nach experimenteller und neuropathologischer Läsion (M.Alzheimer)	Anatomie	Ohm Institut für Anatomie, Charité, Humboldt-Universität
C3	Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse	Physiologie	Eder / Heinemann Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität
C4	Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, freier Fettsäuren und der Glutathionspiegel in pathologisch veränderten und normalen Astrozyten	Physiologie	Müller Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität
C5*	Untersuchungen zur Kommunikation zwischen Neural- und Immunzellen mittels akuter und chronischer intracerebroventrikulärer Applikation pro und anti-inflammatorischer Zytokine im Tierversuch	Neurochirurgie Immunologie	Woiciechowsky/Volk Klinik für Neurochirurgie, Inst. für Immunologie Charité, Humboldt-Universität
Z 2*	'Zwei-Photonen-Laserscanning Mikroskop '	Neurobiologie	Einhäupl Neurol. Klinik, Charité, Humboldt Universität
Z	Sprecherhaushalt		Einhäupl Neurol. Klinik, Charité, Humboldt Universität

1.2.2 Übersicht über die im letzten Bewilligungszeitraum geförderten Teilprojekte, deren Fortführung nicht beabsichtigt ist

Teilprojekt	Titel	Leiter/in	gefördert von - bis	mit TDM
A4	Untersuchung der zellulären und molekularen Regulationsmechanismen des Endothelinsystems im Gehirn	Paul Institut für Pharmakologie, Berlin, Steglitz	2.HJ 1995 - 1.HJ.1998	527.8
B3	Veränderungen von Zell-Zell-Wechselwirkungen glialer Tumorzellen in vitro und in vivo nach retroviralem und liposomalem Zytokingentransfer	Reszka Max-Delbrück-Centrum, Berlin	2.HJ 1995 - 1.HJ.1998	177.8
B4	Funktionelle Eigenschaften und manipulierte Differenzierung von Retinoblastomzellen	Grantyn Physiologisches Institut, Humboldt-Universität	2.HJ 1995 - 1.HJ.1998	218.9

1.3 Inhaltlich strukturelles Umfeld und personelle Situation des Sonderforschungsbereichs

Eine ausführliche Würdigung des zurückliegenden und geplanten Entwicklung des SFB, seines strukturellen Umfeldes und der Personalsituation findet sich am Anfang des Ergebnisbandes (1.2).

In Berlin existieren derzeit 7 biowissenschaftliche SFBs:

515 Mechanismen entwicklungs- und erfahrungsabhängiger Plastizität des Nervensystems (FU)

506 Onkotherapeutische Nukleinsäuren (FU)

273 Hyperthermie: Methodik und Klinik (HU)

366 Signalerkennung und -umsetzung an Zelloberflächen (FU)

344 Regulationsstrukturen von Nukleinsäuren und Proteinen (FU)

312 Gerichtete Membranprozesse (FU)

193 Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer (TU)

Zum dem Sonderforschungsbereich 515 'Mechanismen der entwicklungs- und erfahrungsabhängigen Plastizität' (Freie Universität) bestehen viele Verbindungen, da sich diese beiden Berliner neurowissenschaftlichen Sonderforschungsbereiche komplementär ergänzen. In einem gemeinsamen, zweitägigen Treffen der beiden SFBs (zusammen mit zwei Graduiertenkollegs) am 4./5. Juni 1997 haben sich die beiden Gruppierungen gegenseitig über ihre Arbeiten berichtet und dieses Treffen hat viele neue Interaktionen geschaffen. Dieses Treffen zeigte

auch, daß die Konzepte der beiden SFBs sich auf zwei ganz verschiedene Bereiche der Neurowissenschaften konzentrieren, zum einen neuronale Plastizität während der Entwicklung und im (normalen) Erfahrungsbereich, zum anderen die Rolle nicht-neuronaler Zellen während Krankheitsprozessen. Durch diese divergenten Themen ist es auch bedingt, daß nur drei Arbeitsgruppen (Grantyn, Heinemann, Kettenmann) Mitglieder in beiden SFBs sind, wobei die Gruppe Grantyn ihr Projekt in diesem, neuen SFB-Antrag nicht mehr weiterführt.

Durch die mannigfaltigen Kooperationen innerhalb des SFBs und zu anderen Arbeitsgruppen im Berliner Raum, durch den inhaltlichen und methodischen Fortgang der Projekte, und nicht zuletzt auch durch das Votum der Gutachter in der Erstbegutachtung hat sich der SFB in dieser Antragsphase erweitert. Eine Reihe von für den SFB hochrelevanten Projekten konnte integriert, und die Struktur des SFB damit konsolidiert werden. Drei Projekte werden nicht mehr innerhalb des SFB weitergeführt werden. Herr Paul (A4) hat das Dekansamt des UKBF übernommen. Der Umfang dieser Tätigkeit macht nach Einschätzung von Herrn Paul eine Fokussierung seiner Projekte notwendig. Dieses sehr erfolgreiche Projekt bleibt aber dem SFB assoziiert. Das Projekt B3 (Reszka) soll ebenfalls als assoziiertes, aber nicht finanziell gefördertes Projekt fortgeführt werden. Das Projekt, das wichtige Ergebnisse erbracht und sich sehr gut in den SFB integriert hat, hat eine inhaltliche Neufokussierung erfahren, die es der Antragstellerin nicht mehr im Zeitraum der Antragstellung ermöglicht hat, einen kompetitiven Antrag vorzulegen. Frau Reszka sollen aber die vielfältigen Angebote des SFBs, insbesondere die Kooperationsmöglichkeiten, offen gehalten werden und so auch ihre Expertise für den SFB erhalten bleiben. Frau Grantyn scheidet mit ihrem Projekt B4 aus, weil sie eine Fokussierung ihrer Untersuchungen durchführen wird. Frau Grantyn ist sowohl im SFB 515 beteiligt als selber auch Mitorganisatorin des DFG Schwerpunktes „Synaptische Übertragung“. Diese SFB- und Schwerpunktförderung ist erst während der ersten Projektphase des SFB 507 hinzugekommen. Die umfangreichen Aufgaben und Projekte im Rahmen der vorgeannten Programme lasten die Kapazität ihrer Arbeitsgruppe aus.

1.4. Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

1.4.1 Verzeichnis der laufenden Dissertationen

Projektbereich A

Teilprojekt A 1 / 5 / 6 Dreier/Lindauer/Dirnagl

1) Dissertationen

Ebert, Nathalie

Cortical Spreading Ischemia: Ein neues Ischämieprinzip des Gehirns

Görner, Astrid

Cortikale Spreading Depression: Rolle von Kalium und NO

Körner, Katrin

Cortikale Spreading Depression: Modulation oder Mediation der CBF-Antwort durch NO

Kunz, Alexander

Interaktion von H⁺, NO, , und Kaliumkanälen bei der cerebrovaskulären Reaktion auf Azidose: Untersuchungen in einem in-vitro Arterien Präparat

Renate Brodowsky

NO-vermittelte cerebrovaskuläre Dilatation und Ca- bzw ATP sensitive Kaliumkanäle: Untersuchungen in einem in-vitro Arterien Präparat

Peters, Oliver

Entstehung freier Sauerstoffradikale bei fokaler zerebraler Ischämie: Rolle von Periinfarktdepolarisationen

Gold, Lorenz

Rolle des trigeminalen und serotonergen Systems bei der Hyperämie der Cortical Spreading Depression

Busch, Christina

Radikale als Mechanismus der Toleranzinduktion gegen zerebrale Ischämie: Untersuchungen mit Chemolumineszenz

Melanie Ahrens

Induktion von Toleranz gegen fokale zerebrale Ischämie mittels hyperbarer Hyperoxygenierung

Christoph Harms

Rolle des postischämischen systemischen arteriellen Blutdruckes für das Infarktvolumen nach fokaler zerebraler Ischämie: Eine tierexperimentelle Untersuchung

Knapp Felix

Rolle der Mikrogliaaktivierung für die Entwicklung von Ischämietoleranz des Gehirns nach 3-Nitropropionsäure

Scheckenbach Klaus

Verlust cerebrovaskulärer Reaktivität auf CO₂ nach kortikaler Spreading Depression: Rolle der NOS

Ruscher Karsten

Rolle der Transkriptionsfaktoren NFκB und HIF bei cerebraler Ischämie und induzierter Ischämietoleranz

Wywiał, Monika

Epitopenscreening nach fokaler cerebraler Ischämie mittels Phage Display in vivo

Heinze Matthias

Rolle von Mikroglia bei zerebraler Ischämie: GFP als Markerprotein

Niko Offenhauser

Antiexzitotoxische kombiniert mit antiinflammatorischer Behandlung des experimentellen Hirninfarktes: Gibt es einen additiven Effekt?

Bergk Alexandra
Selektive Genexpression bei induzierter Ischämietoleranz in vitro

Stephanie Castell
Selektive Genexpression bei der durch 3-NPA induzierten Genexpression mittels SAGE-
Transkriptomanalyse

Bruer Ulrike
Induktion von Toleranz gegen Sauerstoff/ Glukose Deprivation durch metabolische Inhibition
in einem in vitro Modell

Teilprojekt A 2 Blasig

Schroeter, M.L.:
Kokultivierung mit Astrozyten erhöht das antioxidative Potential von Gehirndothelzellen
Zöllner, S.:
Untersuchungen zur Wechselwirkung von NO und O₂⁻ in Endothelzellen

Projektbereich B

Teilprojekt B1 Kettenmann und B2 Hanisch

1.) Dissertationen

Clemens Boucsein
Elektrophysiologische Untersuchungen der Eigenschaften ramifizierter Mikroglia im ZNS
adulter Ratten

Kai Mohrhagen
Anwendung einer optischen Pinzette und eines optischen Skalpells in der Neurobiologie

Nada Martini
Verteilung, Charakterisierung und Identifizierung von Neurorezeptoren an humanen Gliomen

Kathrin Schmidt
Expression von spannungsaktivierten K⁺-Kanälen auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der
Maus.

Sebastian Tuschick
Rezeptor-vermittelte Kalziumsignale von Bergmann Gliazellen aus dem Kleinhirn der Maus
in situ, FU Berlin

Anke Witting
Interaktionen zwischen Mikroglia und apoptotischen Hirnzellen

Teilprojekt B5 Zimmer

Dickmann, Claudia, Dipl. phys.
MR-Perfusionsmapping bei experimentellen Gliomen

Teilprojekt B6 Weber/Einhäupl

Flick Holger:
Effekt von CD-18 Inhibition auf die intrathekale NO-Produktion.

Gassemi Tarraneh:
Rolle von p38 Kinase in der experimentellen Pneumokokkenmeningitis.

Manz Rahel:
iNOS und NO in Astrozyten und Endothelzellen nach PCW-Stimulation

Reuß Stefanie:
Hypothermie bei experimenteller Meningitis

Rosenkranz Thomas:
Visualisierung von Leukozytenrolling und -sticking bei bakterieller Meningitis und pharmakologischer Intervention.

Segert Axel:
Effekt von Rolling-Inhibition auf Entzündungsreaktion bei bakterieller Meningitis.

Sehmsdorf Stefanie:
Effekt von Neuropeptiden auf die Inflammationsantwort nach PCW-Stimulation in Endothelzellkulturen mittels PCR.

Ziegenhorn Andreas:
Expression von mRNA pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach PCW in Astrozyten und Endothelzellen.

Teilprojekt B8 Stein / Welte

1) Dissertationen
Szopko, Christopher (Betr. Stein)
Intraartikuläres Morphin bei chronischer Arthritis - antiinflammatorische und analgetische Effekte

Sießbüttel, Wilfried (Betr. Schäfer, Stein)
Beeinflussung von Phantomschmerz durch anaesthesiologische Methoden

Mayer, Anita (Betr. Schäfer, Stein)

Titel: Oberflächenanalgesie durch Opiode bei Entzündungsschmerz

Goresch, Thorsten (Betr. Welte)

Titel: Myokardiale Kontraktilität im hämorrhagischen Schock und nach Small Volume Resuscitation mit hyperton-hyperonkotischer Kochsalz/Dextran-Lösung

Peter Hiltl (Betr. Welte)

Die pH-Tonometrie bei der Lebertransplantation

Lackermeier, Peter (Betr. Welte)

Auswirkungen der Initialtherapie des hämorrhagischen Schocks mit hypertoner Kochsalz/Dextran-Lösung auf die Durchblutung des poststenotischen Myokards

Projektbereich C

Teilprojekt C 1 Nitsch

1) Dissertationen

Barbara Steiner (Dr. med.): Aktivitätsmodulation von Microgliazellen durch Cytokine

Ilker Yasin Eyüpoglu (Dr. med.):

Myelinisierung/Demyelinisierung des Tractus perforans in vitro

Anne Grampp (Dr. med.):

Proliferation von Astrozyten und Microgliazellen nach Läsion

Andreas Steup (Dr. rer. nat.):

Die Rolle von Semaphorinen im entorhinal-hippocampalen System - Untersuchungen mittels heterologer Expression

Martin Beyer (Dr. med.):

Phagozytoseabhängige Aktivierung von Microgliazellen

Nicolai Savaskan (Dr. med.):

Membrangebundene Faktoren als Steuersysteme in der entorhinal-hippocampalen Projektion

Anja Bräuer (Dr. rer. medic.):

Differential-Display Analyse zur Genexpression nach Läsion

Eckart Stein (Dr. med.):

Eph-Liganden im entorhinal-hippocampalen System

2.) Diplomarbeiten

Jauch, Regina

”Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Doppelpulsdepression corticaler Hemmung”

Teilprojekt C 2 Ohm

1) Dissertationen

Rössler, Marcus; cand med.;

"Morphologische und pharmakologische Veränderungen im Hippocampus in verschiedenen Stadien neurofibrillärer Degeneration vom Alzheimer-Typ"

Bassilikin, Marie-Ange

"Apolipoprotein-E-Expression bei akuter und chronischer Läsion"

Jacobi, Carsten;Dipl.Biol

"Identifizierung eines Proteins, das mit der Tau-Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung exprimiert wird"

Hamker, Ulrike; Dipl.Biol

"Die Rolle von Apolipoprotein-E bei Ontogenese, Differenzierung und Plastizität"

Teilprojekt C 3/4 Eder/Heinemann/Müller

1.) Dissertationen

A. Eilers

Gliale Kalium-Pufferung bei erhöhter neuronaler Aktivität im normalen und sklerotischen Hippocampus der Ratte: Effekte von Barium und Caesium.

A. Kivi

Untersuchungen zur Ontogenese der glialen Kalium-Pufferung: Effekte von Barium und Caesium auf die extracelluläre Kalium-Ionen-Konzentration im Hirnschnitt des juvenilen Hippocampus der Ratte.

R. Kovács

Epilepsiemodelle in der hippocampalen Hirnschnittkultur: Gliale und neuronale Plastizität

S. Schuchmann

Veränderungen von Mitochondrienpotentialen und Oxidationsprozessen in Nerven- und Gliazellen an Kulturen der Trisomie-16 Maus: Eine Untersuchung mit bildgebenden Verfahren

C. Brückner

Pharmakologische Charakterisierung von 4AP-induzierter konvulsiver Aktivität in hippocampalen Kulturen im Vergleich zu entorhinalen Kortex-Hippokampus-präparaten

K. Stenkamp

Der Einfluß von Neuromodulatoren auf synaptische Transmission und epileptiforme Aktivität im entorhinalen Kortex der Ratte

D. Engel

Effekte von GABA-Uptake Hemmern auf GABAerge Potentiale im CA1 Gebiet des Hippokampus

C. Iserhot

Wirkungen von Glutamataufnahmehemmern auf glutamaterge Potentiale im entorhinalen Kortex der Ratte

C. Gebhardt

Bestimmung von Sauerstoffspannungen und Analyse von Membranpotential-änderungen an dissoziierten Hippokampuszellen und Hirnschnitten

H. Richter

Charakterisierung von Einwärtsgleichrichtern an entorhinalen Kortexzellen

2.) Diplomarbeiten

Bressel, Stephan, Dipl. Ing.

Pawels, Dirk, Dipl. Ing..

Teilprojekt C 5 Volk/Woiczechowski

Lingnau, Marcel (Medizindoktorand)

Regulation antiinflammatorischer Zytokine

1.4.2 Besondere Maßnahmen zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

Der Beitrag des Sonderforschungsbereiches "Die Bedeutung nicht neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen" (SFB 507) für die Entwicklung der Ausbildung an der Humboldt Universität, im besonderen der medizinischen Fakultät (Charité), wird durch vielfältige Quervernetzung in das Standardcurriculum realisiert. Im besonderen ist die enge Anlehnung dieses SFBs zum Graduiertenkolleg "Schadensmechanismen und bildgebende Verfahren" zu nennen, welches zum großen Teil von den Projektleitern des Sonderforschungsbereiches getragen wird. Hierbei werden sowohl Doktoranden aus naturwissenschaftlichen Fächern (Biologie, Chemie, Physik) als auch Doktoranden der Humanmedizin gefördert. Im Regelfall beteiligen sich die Doktoranden an den Projekten, die im Rahmen des Sonderforschungsbereiches realisiert werden. Zum Leistungsbericht des Graduiertenkolleges sei auf den gerade fertiggestellten Arbeitsbericht dieses Graduiertenkolleges verwiesen, welcher der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Begutachtung und zur Folgebeantragung im März 1998 vorgelegt wird. Im Rahmen dieses Graduiertenkolleges werden regelmäßig im 14tägigen Abstand Laborkurse für die Stipendiaten des Graduiertenkolleges durchgeführt. Im halbjährigen Turnus haben Präsentationswochenendseminare im Fort- und Weiterbildungszentrum der Charité in Egsdorf stattgefunden. Im Rahmen dieser Fort- und Weiterbildungsseminare wurden die Pro-

jekte des Sonderforschungsbereiches, aber auch die durchgeführten Untersuchungen der Doktoranden im Rahmen der Projekte des Sonderforschungsbereiches vorgestellt. Ausdrücklich zu betonen ist die Tatsache, daß im Rahmen der gemeinschaftlichen Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses durch SFB und Graduiertenkolleg eine große Zahl von Publikationen in internationalen Zeitschriften vorgelegt werden konnte, in denen die Stipendiaten Erstautor oder zumindest Co-Autor waren bzw. sind.

Im Rahmen der Fortbildungsaktivitäten des Sonderforschungsbereiches wird das Neurowissenschaftliche Kolloquium in der Charité durchgeführt. Diese Veranstaltung ist für Studenten offen und wird von studentischer Seite, ebenso aber auch von wissenschaftlichem Nachwuchs auf der Ebene der Doktoranden und Postdoktoranden in großer Zahl nachgefragt. Es wird im besonderen darauf geachtet, daß die Vorträge in ihrer Darstellungsform sich auf den Wissensstand auch von Studenten der Medizin und Biologie einlassen und somit eine Möglichkeit des Kennenlernens der wissenschaftlichen Arbeit auch für Nichtspezialisten ermöglichen. Aufgrund der Tatsache, daß die jeweiligen Referenten und Referentinnen sich vor dem Vortrag zumeist ein Tag in den jeweiligen Labors der Neurowissenschaftlichen Arbeitsgruppen besonders in der Charité, aber auch in anderen Einrichtungen Berlins, die sowohl am Graduiertenkolleg als auch am Sonderforschungsbereich beteiligt sind (Max-Delbrück-Centrum, Freie Universität) aufhalten, ist der direkte Kontakt von Doktoranden mit den von uns eingeladenen, international renommierten Wissenschaftlern gewährleistet. Wir halten es für eine besonders wichtige Komponente dieses Programms, das ein direkter Diskussionskontakt zwischen solchen erfahrenen Wissenschaftlern und Nachwuchswissenschaftlern im Labor am jeweiligen Arbeitsplatz hergestellt wird.

Projektbereich A

A1/5 (Dirnagl / Dreier)

Doktorandenseminar der Experimentellen Neurologie, Di 12h - 14 h, Bonhoeffer Raum der Neurologischen Klinik

Methodenkurse im Rahmen der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft (mehrtägig), verschiedene Angebote (z.B. 'Optische Methoden in der Hirnforschung', 'Methoden der Ischämieforschung', 'Untersuchung von selektiver Genexpression im Kontext cerebraler Ischämie'). Mit praktischen Übungen. In den Räumen der Experimentellen Neurologie.

Klinische Kurse der Neurologischen Klinik. Die Doktoranden und jungen Wissenschaftler des SFB und des Graduiertenkollegs sind besonders angesprochen und können kostenlos teilnehmen. Ziel ist es u.a., Grundlagenforschern Zugang zu klinisch-neurologischen Fragestellungen zu geben. Jeweils zweitägig. 1998 u.a.:

- Schlaganfall (12./13.6.1998)
- Kopfschmerz (28./29.08.1998)
- EEG (21./22.3.1998)
- Allgemeine neurologische Intensivmedizin (29./30.8.1998)
- Spezielle neurologische Intensivmedizin ((13./14.3.1998)
- Morbus Parkinson und andere Erkrankungen der Basalganglien (21./22.08.1998)
- Demenz und Gedächtnisstörungen (22.08.1998)
- Schwindel und Gleichgewichtsstörungen (4.4.1998)

- Epilepsie (17.1.1998)
- Infektionskrankheiten des ZNS (13.06.1998)

Beteiligung am Graduiertenkolleg Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz bildgebender Verfahren, GRK 238/1-96 Stipendiaten: Weijing Liao, Christina Busch, Matthias Heinze

A 2 (Blasig)

Treffen des Berliner Sauerstoffclubs (monatlicher Turnus) Doktorandenseminar im FMP (quartalsweise) Beziehung zum Graduiertenkolleg GRK 238: M. Schroeter ist assoziiertes Mitglied, es werden Untersuchungen zur Problematik: „Lokalisation von Blut-Hirnschrankenproteinen in Gehirnkapillarendothelzellen unter dem Einfluß von Astrozyten und Hypoxie“

A 7 (Grune)

Mitorganisation des "Berliner Sauerstoffclubs". Bis jetzt etwa 20 Veranstaltungen zu Problemen des Radikalstoffwechsels und der Chemie freier Radikale; ca. 4-5 Treffen pro Jahr mit dem Ziel die Isolation kleiner Forschungsgruppen zu überwinden und Nachwuchswissenschaftlern die Möglichkeit zu geben ihre Ergebnisse dort darzustellen.

Der Antragsteller ist an einer Graduiertenkolleginitiative beteiligt, welches sich z.Zt. in der Begutachtung befindet (Radikalstoffwechsel und Tumore, Sprecher: Dr. v. Zglinicki, Pathologie, stellv. Sprecher: Grune).

Projektbereich B

B 1 (Kettenmann)

Regelmässiges Seminar Bereich Neurowissenschaften: mittwochs, wöchentlich, 13 Uhr, Max-Delbrueck-Haus, Raum 0211

Verbindungen zum Graduiertenkolleg Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz bildgebender Verfahren, GRK 238/1-96 Stipendiaten: Kai Mohrhagen, Oliver Kann, Nada Martini

Verbindungen zum Graduiertenkolleg „Dynamik und Evolution zellulärer und makromolekularer Prozesse“, GRK 268/1-97 (bisher noch kein Stipendiat)

Lokale Organisation des 1998 Forum of European Neuroscience

B2 (Hanisch)

Seminarreihe für die Laboranten am MDC. Grundlagen und Anwendungsaspekte folgender Themen:

- 'Immunologie und immunologische Methoden und Nachweistechiken'
- 'Anwendung radioaktiver Substanzen'
- 'Enzymatische Reaktionen'
- 'Pharmakologie und Rezeptorcharakterisierung'

Für den Sommer ist ein 'summer school'-Beitrag der Graduiertenkollegreihen 238-1-96 und 268-1-97 vorgesehen, die hier von Dr. Alex Verkhratsky organisiert bzw. koordiniert werden. Beitrag: 'Intracellular signalling involving the JAK/STAT and ERK/MAPK systems'.

B 5 (Zimmer)

Neue bildgebende Verfahren in der Radiologie; Zimmer, Bick, Petersein, Bollow, Taupitz; Vorlesung im SS und WS 1998, Di. 10-11 Uhr; Universitätsklinikum Charité.

Der Antragsteller wurde kürzlich als neues Mitglied in das Graduiertenkolleg "Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz von bildgebenden Verfahren" aufgenommen. Ein Neuantrag mit dem Titel "MR-Bildgebung von humanen und experimentellen Gliomen unter besonderer Berücksichtigung der Tumorangiogenese" wurde hier gestellt. Eine inhaltliche Überschneidung ergibt sich dahingehend, als daß gemeinsamer Gegenstand der Forschung (sowohl im SFB als auch im Graduiertenkolleg) die Bildgebung von Hirntumoren ist. Weitere Überschneidungen gibt es nicht.

B 7 (Hass)

Großversuche mit Seminaren im Rahmen des F-Praktikums Teil II für Biochemiker
Termine nach Vereinbarung; Ort: Institut für Anatomie, Charité'

Antrag im Graduiertenkolleg gestellt für die kommende Antragsperiode mit dem Thema: "Kommunikationsprozesse zwischen monozytären Zellen und Astrozyten"
Inhaltliche Verbindungen mit dem SFB-Projekt ergeben sich aus den gemeinsamen Zellkulturmodellen von Monozyten und Astrozyten, wobei die im Graduiertenkolleg bearbeiteten Projekte teilweise die Forschungsvorhaben im SFB-Antrag ergänzen.

B 8 (Stein)

Folgende Seminare, Kolloquien, Symposien für den wissenschaftlichen Nachwuchs sind geplant:

- Colloquium zu speziellen Problemen der anaesthesiologischen und operativen Intensivmedizin
- Schmerztherapie - theoretische Grundlagen und praktische Anwendungen
- Doktorandenseminar: Medizinische Informatik in der Anaesthesiologie
- Doktorandenseminar: Physiologie und Pathophysiologie des Sauerstofftransports bei Intensivpatienten und Risikopatienten
- Doktorandenseminar: Perioperative und posttraumatische Problemsituation bei alkoholkranken Patienten
- Ausgewählte Probleme der operativen Intensivmedizin
- Colloquium zu speziellen Problemen der Anaesthesie und operativen Intensivmedizin
- Opioidanalgesie und Entzündungsschmerz
- Immunsystem und Schmerz

Projektbereich C

C 1/2 (Nitsch / Ohm)

Es wird weiter das Charité - Kolloquium jeden Mittwoch im Semester angeboten (Programm-Koordination Nitsch.

C3 (Eder/Heinemann)

Beteiligung and den Mittwochs-Kolloquien und an den Fortbildungsveranstaltungen im Rahmen des Graduierten-Kollegs einschließlich der jährlichen Wochenendtagung in Eggendorf. Wochenend-Abteilungs-Kolloquium mit Progressreport in Eggendorf organisieren.

C4 (Müller)

Veranstaltung des Symposium "Cellular compartmentation by the second messenger Ca in nervous system cells" (Organisator W.Müller, Charité Satellite to ENA, July 2nd, '98) Sprecher u.a.:

Alexej Verkratsky: " Ca-signalling in glial subcompartments "

Arthur Konnerth: " Ca-signals in long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus"

John A. Connor: " Synaptically induced Ca-influx and Ca-release in hippocampal cells "

Wolfgang Müller: " Muscarinic modulation of synaptic and glutamate-induced Ca-signals"

Winfried Denk: " High resolution imaging of calcium dynamics in intact tissue using multiphoton fluorescence microscopy "

Menachem Segal "to be announced"

Labordemonstration zusammen mit Graduiertenkolleg: 'Beobachtung physiologischer und pathophysiologischer Veränderungen mit bildgebenden optischen und elektrophysiologische Methoden. (ca. Okt. 98)

Verbindungen zum Graduiertenkolleg: 'Schadensmechanismen im Nervensystem'. Projekt Müller: Zelluläre bildgebende Verfahren in der Neurobiologie. Stipendiaten Sebastian Schuchmann, Katrin Bittner (assoziiert)

C 5 (Volk/Woiczechowski)

Interdisziplinäres Kolloquium Immunologie (Immunologie, Rheumatologie, Dermatologie)
Jeden Dienstag 17.00 Uhr, kleiner HS Poliklinik Charité-Mitte

In Vorbereitung: Symposium "Molekulare Medizin-Charité" für den wissenschaftlichen Nachwuchs; 1x jährlich, Eggendorf

1.5. Alphabetische Liste der am Sonderforschungsbereich beteiligten Wissenschaftler

Mitglieder im Sinne der Ordnung des Sonderforschungsbereiches sind mit * vor dem Namen gekennzeichnet

Name, akad. Grad	Fachrichtung	genaue Bezeichnung des Hochschulinstiuts/der Ein- richtung außerhalb der Hochschule	GA oder EA	Teil- projekt
Angstwurm, C. Dr.med.	Neurologie	Charité Neurologie	GA	B6
Bittner, Dr.	Neurophysiologie	Physiologisches Institut Cha- rité Abt. Neurophysiologie	GA	C4
* Blasig, I. Dr. rer. nat.	Pharmakologie	Forschunginstiut für molekul. Pharmakologie	GA	A2
Dieckmann, C. Dipl. Phys.	MR Physik	Inst. F. Röntgendiagnostik	GA	B5
*Dirnagl, U. PD Dr.	Neurologie	Charité Neurologie	GA	A1
Döcke, W-D. Dr. med.	Immunologie	Institut f. Medizinische Im- munologie, Charité, Campus Mitte	GA	C5
Draguhn, A. Dr. med.	Neurophysiologie	Institut f. Physiologie, Charité	GA	C3
*Dreier, J. Dr.med.	Neurologie	Charité Neurologie	GA	A1
* Eder Dr. med.	Neurophysiologie	Physiologisches Institut Cha- rité Abt. Neurophysiologie	GA	C3
* Einhäupl, K. M., Prof. Dr.	Neurologie	Charité Neurologie	GA	B6
Föhring, U. Dr. med. Ing. grad.	Anaesthesiologie med. Informatik	Anaesthesiologie UKBF	GA	B8
Freyer, D. Dr. rer. nat.	Neurologie	Charité Neurologie	EA	B6
Gabriel, Dr. rer. nat.	Neurophysiologie	Physiologisches Institut Cha- rité Abt. Neurophysiologie	EA	C3
Gimsa, U. Dr. rer. nat.	Immunologie	Institut für Anatomie	GA	C1
* Grune, T. Dr. med.	Biochemie	Klinik für Physikalische Me- dizin und Rehabilitation (Cha- rité)	GA	A7
Hamker, U. Dipl. Biol.	Biologie, Bioche- mie	Institut für Anatomie, Charité	EA	C2
* Hanisch, UK Dr. rer. nat.	Neurobiologie	MDC	GA	B2
Haseloff, R. Dr. rer.nat.	exp. Biophysik	FMP	EA	A2
* Hass, R. PD Dr. rer. nat.	Zellbiologie	Institut für Anatomie Charité	GA	B7

* Heinemann, U. Prof.Dr.med.	Neurophysiologie	Institut für Physiologie	GA	C3
* Kettenmann, H. Prof. Dr. rer.nat.	Neurobiologie	MDC	GA	B1
Kirchhoff, F. Dr.rer.nat.	Molekularbiologie	MDC	GA	B2
* Klee, R. Dr. med.	Neurophysiologie	Institut für Physiologie	GA	A6
* Lindauer, U. Dr. med.vet.	Tierphysiologie, Exp. Neurologie	Charité Neurologie	GA	A6
Lüdemann, L. Dr. rer.nat.	MR-Physik	Inst. f. Röntgendiagnostik	GA	B5
Machelska, H. PhD	Pharmakologie	Anaesthesiologie UKBF	GA	B8
* Müller, W. PD Dr. med.	Neurophysiologie	Physiologisches Institut Cha- rité Abt. Neurophysiol.	GA	C4
Ninnemann, O. Dr. rer.nat.	Molekularbiologie	Institut für Anatomie	GA	C1
*Nitsch, R. Prof. Dr. med.	Anatomie	Institut für Anatomie Charité	GA	C1
Ohlemeyer, C. Dr.	Neurobiologie	MDC	EA	B1
* Ohm, Prof. Dr. med.	Anatomie	Institut für Anatomie Charité	GA	C2
* §Paul, Prof. Dr. med.	Pharmakologie	Klinische Pharmakologie Freie Universität, Berlin	GA	A4
Petschke, B. Dipl.Ing.	Molekularbiologie	FMP	GA	A2
Plaschke, M. Dr. med. dent.	Anatomie	Institut für Anatomie Charité	GA	C1
Priller, J. Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik Charité	GA	A1
* §Reszka, R. Dr. rer.nat.	Neurobiologie	MDC	GA	B3
Röckl, W. Dr. rer.nat.	Zellbiologie	Institut für Anatomie, Charité	GA	C2
Schäfer, M. Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie UKBF	GA	B8
Schöning, B. Dr. rer.nat.	Neuro- immunologie	Neurologisch- Neurochirurgische Klinik, Charité, Campus Virchowkli- nikum	EA	C5
Schuchmann, S. Dipl. Phys.	Physiologie	Inst.für .Physiologie Charité	GA (GK)	C4
Simburger, Dr.	Anatomie	Institut für Anatomie Charité	GA	C1
Spies, C. PD Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie UKBF	GA	B8
Steffenhagen, Dr.	Anatomie	Institut für Anatomie Charité	GA	C2
*Stein, C. Prof. Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie UKBF	GA	B8
Stoltenburg, G. Prof. Dr. med.	Neuropathologie	Institut für Pathologie Charité, Campus Virchowklinikum	GA	C5
* Volk, H.-D. Prof. Dr. med.	Immunologie	Institut für Medizinische Im- munologie, Charité, Campus Mitte	GA	C5

1.5.

* Weber, J. R., Dr.	Neurologie	Neurologie Charité	GA	B6
Welte, M. PD Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie UKBF	GA	B8
Witting, A.	Neurobiologie	MDC	EA	B1
*Woiciechosky, C.Dr. med.	Neurochirurgie	Neurologisch- Neurochirurgische Klinik, Charité, Campus Virchowkli- nikum	GA	C5
* Zimmer, C. Dr. med.	Neuroradiologie	Inst. für Röntgendiagnostik	GA	B5

§ Assoziiertes Mitglied

1.6. Verzeichnis der Forschungsthemen, an denen Wissenschaftler des Sonderforschungsbereichs mitarbeiten

und die in anderen Verfahren der Deutschen Forschungsgemeinschaft oder anderer Zuwendungsgeber (z.B. Bund, Land, Stiftung Volkswagenwerk, AiF, Wirtschaftsunternehmen oder Zweckverbände) gefördert werden oder für die Förderungsanträge gestellt worden sind

Thema	Name der beteiligten Wissenschaftler	Zuwendungsgeber und Aktenzeichen oder Antragsdatum	Teilprojekt
Mechanismen der Regulation der zerebralen Durchblutung	Dirnagl	DFG-454 /8-2 Heisenberg Programm	A1/5
Induktion von zerebraler Ischämietoleranz mittels 3-NPA	Dirnagl	Heinz Nixdorf-Stiftung/ Deutsche Schlaganfallstiftung (seit 1996)	A1/5
Neurovascular Coupling - Mechanisms for Brain Imaging	Dirnagl	German Israel Science Foundation I - 0520 (1/98-1/2000)	A1/5
Selektive Genexpression bei induzierter endogener Neuroprotektion	Dirnagl/Einhäupl	BMBF Leitprojekt (in der Vorauswahl, Antragstellung Mai 98)	A1/5
ZK 200755: Experimental characterization in cerebral ischemia of a novel AMPA receptor antagonist	Dirnagl	Schering (seit 1997)	A1/5
Physiologische Validierung der Nahinfrarotspektroskopie	Dirnagl	DFG Klinische Forschergruppe Ei 207 2-1 Projekt 2 (seit 1996)	A1/5
Rolle von Mikroglia/Makrophagen bei zerebraler Ischämie	Dirnagl	DFG Graduiertenkolleg 238, Projekt 1 (seit 1993)	A1/5
Selektive Genexpression bei induzierter Ischämietoleranz im ZNS	Dirnagl	DFG Me 1562 1-1 (5/97-5/99)	A1/5
"Metabolismus des Lipidperoxidationsproduktes 4-Hydroxynonenal in der perfundierten Niere und in Nierenzellkulturen"	Grune	DFG: Gr 1240/3-1	A7

"Poly-ADP-Ribose vermittelte Regulation des Proteasoms während der Streßantwort"	Grune	DFG-Antrag im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Struktur, Funktion und Regulation des 20S/26S Ubiquitin-Proteasomsystems"	A7
"Abbau radikalisch modifizierter Proteine in der Zellalterung - Rolle der 20S Protease"	Grune	Stiftung VerUm:	A7
"Einfluß von Vitamin E auf die Lipidperoxidation und die Proteinoxidation"	Grune	BASF AG	A7
"Untersuchungen der radikalischen Belastung bei Lymphödem unter Selentherapie"	Grune	GN-Pharm	A7
"Einfluß radikalischer Belastung auf den Turnover der Histoneproteine - Bedeutung des multikatalytischen Proteasomkomplexes, Proteasom"	Grune	Schering-Stiftung	A7
Molekulare Mechanismen der Regulation von Motilitäts- und Phagozytoseaktivität bei Mikrogliazellen	Helmut Kettenmann Christiane Nolte	DFG 329/8-3	B1
Akute Hirnschnitte aus pathologischen ZNS-Geweben als Modelle zur Untersuchung dynamischer Eigenschaften von aktivierter Mikroglia	Helmut Kettenmann Christiane Nolte	DFG 329/13-1	B1
Koordinierungsarbeiten Mikroglia-Schwerpunkt	Helmut Kettenmann Meino Gibson	DFG 329/12-1	B1
Neuron-Glia-Interaktionen. Bedeutung glialer Transmitterrezeptoren im Cerebellum	Jana Hartmann	DFG, SFB 515-96	B1
Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz von bildgebenden Verfahren	Helmut Kettenmann Oliver Kann Nada Martini Kai Mohrhagen	Graduiertenkolleg GRK 238/1-96	B1

Dynamik und Evolution zellulärer und mikromolekularer Prozesse	Helmut Kettenmann	Graduiertenkolleg GRK 268/1-97	B1
MR-Untersuchung des angiogenetischen Profils von experimentellen Gliomen vor und nach antiangiogenetischer Therapie"	C. Zimmer, L. Lüdemann, C. Dieckmann	DFG, Zi 477/2-1	B5
Untersuchungen zur Zellzyklusregulation bei humanen Leukämiezelllinien	Ralf Hass	Deutsche Krebshilfe Antrag v. 16.1.98	B7
Untersuchung interzellulärer Kommunikationsprozesse bei menschlichen Leukämiezellen	Ralf Hass Igor Prudovsky	BMBF Az: 01KX9611	B7
Periphere Opioidanalgesie und Sympathisches Nervensystem	Christoph Stein, Michael Schäfer Halina Machelska	DFG, Ste 477/4-1 /4-2 11.12.97	B8
Mechanismen und funktionelle Bedeutung kortikaler Reorganisation nach Amputation	Christoph Stein, Michael Schäfer	DFG Forschergruppe "Kortikale Plastizität" Fl 156/16-1,2	B8
Peripher wirkende Opioidsubstanzen zur Behandlung von Entzündungsschmerz	Christoph Stein	ADOLOR Corporation, USA	B8
Uterine Pain – Mechanisms and Modulation	Christoph Stein	NIH, RO1 NS36553-01 Co- Investigator	B8
Consequences of μ -receptor knockout on peripheral opioid analgesia - receptors and endogenous ligands	Christoph Stein, Michael Schäfer	Teilprojekt NIH Center Grant Proposal (Sprecher: R. Dubner) 1.3.98	B8
Zelltypen und neuronale Verbindungen des transentorhinalen Cortex: Gründe für den frühen Befall durch neurodegenerative Veränderungen?	Nitsch, Hailer, Ninnemann, Plaschke, Simbürger, Skutella	Ni 344/10-1	C1
Transneuronalen Veränderungen an identifizierten Neuronen nach Läsion	Nitsch, Skutella	Ni244/1-2	C1
Zelluläre und molekulare Mechanismen	Nitsch, Zintz	18.09.1995, Hertie-Stiftung AZ GHS 2354/95	C1

Zelluläre und molekulare Mechanismen transneuronaler Veränderungen an identifizierten Neuronen nach neuropathologischer Läsion	Ohm, Thomas G.	DFG Oh48/4-2	C2
European Nimodipin Alzheimer Study (ENAS)	Ohm, Thomas G.	Bayer AG	C2
ApoE-Polymorphismus und Kalziumflux der neuronalen Zellen, Interaktion mit β /A4 und Metabolismus	Ohm, Thomas G.	Bayer AG	C2
Propentophylline and Apolipoprotein-E-Metabolismus	Ohm	Hoechst-Marion-Roussel, beantragt 12/97	C2
Aufklärung der molekularen Mechanismen entorhinal/hippocampaler Interaktion	Ohm, Nitsch	Hertie-Stiftung, GHS 2/354	C2 C1
Effekte von Apolipoprotein E-Isoformen auf Phosphorylierung und Transkriptionsfaktoren bei Degeneration und Regeneration	Ohm	DFG, Schwerpunkt: Molekulare Mechanismen neuraler Reparaturmechanismen; beantragt 11/97	C2
Investigation of putative signal transduction processes of normal prion protein and their role in spongiform encephalopathy pathogenesis	Ohm	EU, Biomed-II, beantragt 4/97 (mündlich positiver Bescheid)	C2
Mechanisms of intracellular signalling in Alzheimer's disease: the role of apolipoprotein E	Ohm	EU, Biomed-II PL950162	C2
Analyse des Einflusses von Apolipoprotein-E-Polymorphismus auf die dendritische Plastizität bei der Alzheimer'schen Erkrankung	Ohm	DFG Graduiertenkolleg: Klinische und kognitive Neurowissenschaft	C2
BMBF-Verbundprojekt "Perinatale Lunge" und Dopamin und Cholecystokinin" Teil III	Heinemann	BMBF, Teil III, Schwerpunkt 2 - TV 2.2.4; Laufzeit: 01.01.1996 - 30.06.1998	C3
Innovationskolleg Kompensations- und Regenerationsmechanismen nach definierten Veränderungen an Transmissionssystemen und ihre Bedeutung für Hirnfunktionen	Heinemann	DFG Teilprojekt B3 INK 21/A1-1 Laufzeit: 01.01.1996 - 31.12.1997	C3

TP/B3: Wirkungen von Serotoninrezeptoren auf neuronales Verhalten, epileptiforme Aktivität und Hypoxietoleranz im kombinierten entorhinalen Kortex-Hippocampuspräparat der normalen und genetisch sowie konventionell veränderten Ratte			
SFB515 Mechanismen entwicklungs- und erfahrungsbedingter Plastizität des Nervengewebes Teilprojekt B1 Thema: Aktivitätsabhängige Veränderungen in der synaptischen Organisation des juvenilen Hippocampus und entorhinalen Kortex	Heinemann	DFG Teilprojekt B1 SFB515/TP B1 Laufzeit: 01.01.1996 - 31.12.1998	C3
DFG-Schwerpunktprojekt Molekulare Physiologie der synaptischen Interaktion: Analyse in definierten Säugetiermutanten Thema: Rolle der Glutamat-uptake Moleküle bei der erregenden Übertragung in der hippocampalen Formation und im Kleinhirn	Heinemann	DFG Teilbereich HE 1128/11-1 Laufzeit: 01.03.1997 - 28.02.99	C3
Graduiertenkolleg Charité Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz bildgebender Verfahren	Heinemann	DFG GRK 238/1-96 Laufzeit: 01.01.1996 - 31.12.98	C3
BMBF-Verbundprojekt Programmierter Zelltod Teilprojekt Thema: Bedeutung freier Radikale bei Zellschäden durch neurodegenerative Erkrankungen	Heinemann	BMBF Förderkennzeichen: 0310974 Laufzeit: 01.08.1997 - 31.07.2000	C3
GIF German-Israeli-Foundation for Scientific Research and Development Thema: Role of sodium channels in cortical hypoxic injury	Heinemann	German-Israeli-Foundation Research Proposal No. I 109-202.08/96 Laufzeit: 01.01.1998 - 31.12.2000	C3

Graduiertenkolleg Thema "Klinische und Kognitive Neurowissenschaft" an der Humboldt-Universität zu Berlin und der Freien Uni- versität Berlin C3 Teilprojekt: Folgen von Mikroläsionen im entorhinalen Cortex für die Interaktion des entorhinalen Cortex und Hippokampus	Heinemann	DFG Förderkennzeichen: III GK - GRK 423/1 Laufzeit: 1. 4. 1997 - 31.03.2000	C3
Zentralnervöse Ca-Signalgebung	Müller, W.	DFG Mu 809/6-2	C4
Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz bild- gebender Verfahren	Müller, W.	Graduiertenkolleg 238 (DFG & Land Berlin)	C4
Cytokine und maligne kutane Lymphome	Volk	DFG Sterry/Volk Ste 366/6-1	C5
Gentherapie in der Transplantation	Volk	DFG Volk/Reinke Vo 489/6-1	C5
Mechanismen der LPS-Desensibilisierung	Volk, Döcke	DFG Volk/Wendel Vo 489/5-1	C5
Regulation des IL-10 Promoters	Volk, Döcke	DFG Platzer/Prösch/Volk Pl 163/1-2	C5
Minderung der Immunogenität künstlicher Gewebe	Volk	DFG Seifert/Volk Se 657/2-1	C5
Rolle antiinflammatorischer Zytokine beim M. Crohn	Volk	EU Teilprojekt	C5
Adaptiver T-Zelltransfer bei chronischen Viruserkran- kungen	Volk	Industrie – Medplus GmbH	C5
Hemmung der chronischen Rejektion	Volk	Industrie – Fumapharm GmbH	C5
IL-10 in der Psoriasis	Volk, Döcke	Industrie – Schering-Plough Inc.	C5
Entwicklung von IL-10 Antagonisten	Volk	Industrie – BAYER AG	C5
G-CSF in der Sepsis	Volk	Industrie – Amgen Inc.	C5
Entwicklung eines Zytokinassays	Volk, Döcke	Industrie – DPC Inc.	C5

1.7. In der Ordnung des Sonderforschungsbereichs vorgegebene Gremien (außer Mitgliederversammlung) und ihre personelle Zusammensetzung

Sprecher

Prof. Dr. Karl M. Einhäupl

Prof. Dr. Helmut Kettenmann (Stellvertreter)

Vorstand

Prof. Dr. Karl M. Einhäupl

und die Projektbereichsleiter:

Priv. Doz. Dr. Ulrich Dirnagl

Prof. Dr. Helmut Kettenmann

Prof. Dr. Robert Nitsch

Sekretär

Priv. Doz. Dr. Ulrich Dirnagl

2 Überblick über die bisherige und die beantragte Förderung des SFB 507

2.1.1 Zusammenstellung der dem Sonderforschungsbereich aus der Grundausrüstung (GA) (bei Fortsetzungsanträgen) im letzten Förderungszeitraum zur Verfügung gestellten Sachmittel sowie des entsprechenden Ansatzes für 1998 (2. Halbjahr (HJ)) und 1999 (1. HJ), (bei Einrichtungsanträgen) im Haushaltsjahr 1998 (2. HJ) und 1999 (1. HJ) voraussichtlich zur Verfügung stehenden Sachmittel

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben

I: Investitionsmittel (Geräte über 20.000)

Angaben in TDM

Haushaltsjahr	GA Hochschule			GA beteiligte Einrichtungen			gesamt
	SV	I	Summe	SV	I	Summe	
1995 2. HJ	37,5	647,0	684,5	15,0	27,0	42,0	727
1996	75,0	5.110,0	5.185,0	30,0	79,0	109,0	5.294
1997	75,0	1.569,0	1.644,0	30,0	34,0	64,0	1.708
1998 1. HJ	37,5	80,0	117,5	15,0		15,0	133
Zwischensumme	225,0	7.406,0	7.631,0	90,0	140,0	230,0	7.861
1998 2. HJ	67,0		67,0	15,5		15,5	
1999	67,0		67,0	15,5		15,5	

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel

PK: Personalkosten

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben

I: Investitionsmittel (Geräte über 20.000)

Angaben in TDM

Haushaltjahr				gesamt
	PK	SV	I	
1995 (2. HJ)	444,5	278,3		722,8
1996	912,3	358,7		1.271,0
1997	889,6	405,1		1.294,7
1998 (1. HJ)	445,6	187,6		633,2
Summe 95/2-98/1	2.692,0	1.229,7		3.921,7
1998 (2. HJ)	643,5	505,8	886,8	2.036,1
1999	1.284,3	635,2		1.919,5
2000	1.329,9	623,2		1.953,1
2001 (1. HJ)	663,3	330,5		963,8
Summe 98/2-01/1	3.921,0	2.064,7	886,8	6.872,5

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	gesamt
1995 2.HJ	A1	47.400	14.700		62.100
	A2	19.900	10.000		29.900
	A3	18.100	26.400		44.500
	A4	69.000	15.800		84.800
	A	154.400	66.900	0	221.300
	B1	57.900	14.900		72.800
	B3	18.100	15.000		33.100
	B4	39.800	10.000		49.800
	B	115.800	39.900	0	155.700
	C1	42.800	15.000		57.800
	C2	36.200	23.500		59.700
	C3	39.800	40.000		79.800
	C4	32.400	50.000		82.400
	C	151.200	128.500	0	279.700
Z	23.100	43.000		66.100	
	insgesamt	444.500	278.300	0	722.800

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	gesamt
1996	A1	99.600	20.400		120.000
	A2	41.800	20.000		61.800
	A3	38.300	20.000		58.300
	A4	145.200	31.500		176.700
	A	324.900	91.900	0	416.800
	B1	121.900	29.800		151.700
	B3	38.300	20.000		58.300
	B4	61.000	20.000		81.000
	B	221.200	69.800	0	291.000
	C1	89.700	30.000		119.700
	C2	76.600	47.000		123.600
	C3	83.600	30.000		113.600
	C4	68.000	20.000		88.000
	C	317.900	127.000	0	444.900
Z	48.300	70.000		118.300	
	insgesamt	912.300	358.700	0	1.271.000
	plus/minus	467.800	80.400	0	548.200

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	gesamt
1997	A1	99.600	20.400		120.000
	A2	41.800	20.000		61.800
	A3	38.300	20.000		58.300
	A4	145.200	31.500		176.700
	A	324.900	91.900	0	416.800
	B1	121.900	29.800		151.700
	B3	38.300	20.000		58.300
	B4	38.300	20.000		58.300
	B	198.500	69.800	0	268.300
	C1	89.700	30.000		119.700
	C2	76.600	47.000		123.600
	C3	83.600	30.000		113.600
	C4	68.000	20.000		88.000
	C	317.900	127.000	0	444.900
Z	48.300	116.400		164.700	
	insgesamt	889.600	405.100	0	1.294.700
	plus/minus	-22.700	46.400	0	23.700

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereichbis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	gesamt
1998 1.HJ	A1	50.400	10.200		60.600
	A2	19.900	10.000		29.900
	A3	18.100	10.000		28.100
	A4	73.800	15.800		89.600
	A	162.200	46.000	0	208.200
	B1	62.400	14.900		77.300
	B3	18.100	10.000		28.100
	B4	19.800	10.000		29.800
	B	100.300	34.900	0	135.200
	C1	45.600	15.000		60.600
	C2	38.000	23.500		61.500
	C3	39.800	15.000		54.800
	C4	35.100	10.000		45.100
	C	158.500	63.500	0	222.000
Z	24.600	43.200		67.800	
	insgesamt	445.600	187.600	0	633.200
	plus/minus	-444.000	-217.500	0	-661.500
<hr/>					
	Zwischensumme 95-98	2.692.000	1.229.700	0	3.921.700

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	<i>gesamt</i>
1998 2.HJ	A1	42.600	17.600	57.300	117.500
	A2	42.600	10.000		52.600
	A5	19.800	9.500		29.300
	A6	19.800	27.100		46.900
	A7	19.800	32.500		52.300
	A	144.600	96.700	57.300	298.600
	B1	62.400	15.650		78.050
	B2	30.600	12.500		43.100
	B5	19.800	30.000		49.800
	B6	19.800	25.400		45.200
	B7	44.400	9.000		53.400
	B8	50.400	18.000	47.300	115.700
	B	227.400	110.550	47.300	385.250
	C1	64.200	39.300	55.200	158.700
	C2	19.800	54.200	37.000	111.000
	C3	65.400	65.200		130.600
	C4	35.100	10.000	40.000	85.100
	C5	62.400	30.350		92.750
	C	246.900	199.050	132.200	578.150
	Z	24.600	99.500		124.100
	Z2			650.000	650.000
	insgesamt	643.500	505.800	886.800	2.036.100
	plus/minus	197.900	318.200	886.800	1.402.900

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	gesamt
1999	A1	85.200	19.900		105.100
	A2	85.200	38.000		123.200
	A5	39.600	19.000		58.600
	A6	39.600	18.000		57.600
	A7	39.600	22.000		61.600
	A	289.200	116.900	0	406.100
	B1	124.800	31.300		156.100
	B2	61.200	25.000		86.200
	B5	36.900	21.000		57.900
	B6	39.600	36.800		76.400
	B7	88.800	18.000		106.800
	B8	100.800	35.900		136.700
	B	452.100	168.000	0	620.100
	C1	128.400	32.000		160.400
	C2	39.600	33.600		73.200
	C3	130.800	30.000		160.800
	C4	70.200	20.000		90.200
	C5	124.800	60.700		185.500
	C	493.800	176.300	0	670.100
	Z	49.200	174.000		223.200
	Z2				0
	insgesamt	1.284.300	635.200	0	1.919.500
	plus/minus	640.800	129.400	-886.800	-116.600

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	<i>gesamt</i>
2000	A1	85.200	19.900		105.100
	A2	85.200	20.000		105.200
	A5	39.600	19.000		58.600
	A6	39.600	18.000		57.600
	A7	39.600	22.000		61.600
	A	289.200	98.900	0	388.100
	B1	124.800	31.300		156.100
	B2	61.200	25.000		86.200
	B5	36.900	21.000		57.900
	B6	39.600	36.800		76.400
	B7	88.800	18.000		106.800
	B8	100.800	35.900		136.700
	B	452.100	168.000	0	620.100
	C1	128.400	32.000		160.400
	C2	39.600	33.600		73.200
	C3	130.800	30.000		160.800
	C4	115.800	20.000		135.800
	C5	124.800	60.700		185.500
	C	539.400	176.300	0	715.700
	Z	49.200	180.000		229.200
	Z2				0
	insgesamt	1.329.900	623.200	0	1.953.100
	plus/minus	45.600	-12.000	0	33.600

2.1.

2.1.2 Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 1998 (1.HJ) bewilligten und für die Haushaltsjahre 1998 (2.HJ), 1999, 2000 und 2001 (1. HJ) beantragten Mittel (**Fortsetzung**)

Jahr	Teilprojekt	PK	SV	I	gesamt
2001 1.HJ	A1	42.600	10.000		52.600
	A2	42.600	10.000		52.600
	A5	19.800	9.500		29.300
	A6	19.800	9.000		28.800
	A7	19.800	7.300		27.100
	A	144.600	45.800	0	190.400
	B1	62.400	15.650		78.050
	B2	30.600	12.500		43.100
	B5	19.800	10.500		30.300
	B6	19.800	18.400		38.200
	B7	44.400	9.000		53.400
	B8	50.400	18.000		68.400
	B	227.400	84.050	0	311.450
	C1	64.200	16.000		80.200
	C2	19.800	16.800		36.600
	C3	65.400	15.000		80.400
	C4	54.900	10.000		64.900
	C5	62.400	30.350		92.750
C	266.700	88.150	0	354.850	
Z	24.600	82.500		107.100	
Z2				0	
	insgesamt	663.300	300.500	0	963.800
	plus/minus	-666.600	-322.700	0	-989.300
Zwischensumme 98-01		3.921.000	2.064.700	886.800	6.872.500

2.2 Anzahl der Mitarbeiter/innen, die aus der Grundausrüstung 1998 für die jetzt beantragten Teilprojekte zur Verfügung stehen werden

Besoldungsgruppe/Vergütungsgruppe	Anzahl der beteiligten Mitarbeiter/innen (ohne beratende Wissenschaftler)
<u>Wissenschaftliches Personal</u>	
Sondervertrag (C4)	5
C3 / A16	3
C2 / A15	1
C1 / A14	4
A13	
BAT I	1
BAT Ia	3
BAT Ib	4
BAT IIa	15
BAT IIa/2	2
Heisenberg Stipendiaten	2
Habilitations Stipendiaten	1
Summe wissenschaftliches Personal	28
Wissenschaftliche Hilfskraft	1
Stud. Hilfskraft	2
<u>Nichtwissenschaftliches Personal</u>	
BAT III	1
BAT IVa	2
BAT IVb	2
BAT Va/b	9
BAT Vc	2
BAT VIb	1
BAT VII - X / MTL	
Summe nichtwiss. Personal	17

2.3. Anzahl der Mitarbeiter/innen, für die Personalmittel als Ergänzungsausstattung beantragt werden

zum Vergleich wird das 1. Halbjahr 1998 angegeben

	Teilpro- jekt	Sonder- vertrag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa /2	Summe Sond. - BAT IIa /2	wissenschaft- liche Hilfs- kräfte	studentische Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/b	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII- X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insgesamt (ohne Hilfs- kräfte)	
1998 1.HJ	A1			1,0		1,0											1,0	
	A2				1,0	1,0											1,0	
	A3					1,0	1,0										1,0	
	A4			1,0	1,0	2,0											2,0	
	A			2,0	3,0	5,0											5,0	
	B1				1,0	1,0	2,0											2,0
	B3					1,0	1,0											1,0
	B4					1,0	1,0											1,0
	B				1,0	3,0	4,0											4,0
	C1					1,0	1,0							1,0			1,0	2,0
	C2					2,0	2,0											2,0
	C3				1,0		1,0											1,0
	C4					1,0	1,0					1,0					1,0	2,0
	C				1,0	4,0	5,0					1,0	1,0				2,0	7,0
	Z														1,0		1,0	1,0
	gesamt			4,0	10,0	14,0						1,0	1,0	1,0		3,0	17,0	

2.3. Anzahl der Mitarbeiter /innen, für die Personalmittel als Ergänzungsausstattung beantragt werden (**Fortsetzung**)

Teilpro- jekt	Sonder- vertrag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa /2	Summe Sond. - BAT IIa /2	wissen- schaftliche Hilfskräfte	studentische Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/b	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII-X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insgesamt (ohne Hilfs- kräfte)
1998	A1		1,0		1,0											1,0
2.HJ	A2		1,0		1,0											1,0
	A5			1,0	1,0											1,0
	A6			1,0	1,0											1,0
	A7			1,0	1,0											1,0
	A		2,0	3,0	5,0											5,0
	B1		1,0	1,0	2,0											
	B2										1,0				1,0	2,0
	B5			1,0	1,0											1,0
	B6			1,0	1,0											1,0
	B7			1,0	1,0								1,0		1,0	2,0
	B8		1,0		1,0											1,0
	B		2,0	4,0	6,0						1,0		1,0		2,0	8,0
	C1			2,0	2,0								1,0		1,0	3,0
	C2			1,0	1,0											1,0
	C3	1,0		1,0	2,0											2,0
	C4		0,5		0,5						0,5				0,5	1,0
	C5		1,0	1,0	2,0											
	C	1,0	1,5	5,0	7,5						0,5		1,0		1,5	9,0
	Z												1,0		1,0	1,0
	Z2															
	gesamt		1,0	5,5	12,0	18,5					1,5		3,0		4,5	23,0
	+/-		1,0	1,5	2,0	4,5					0,5	-1,0	2,0		1,5	6,0

2.3. Anzahl der Mitarbeiter /innen, für die Personalmittel als Ergänzungsausstattung beantragt werden (**Fortsetzung**)

	Teilpro- jekt	Sonder- vertrag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa /2	Summe Sond. - BAT IIa /2	wissenschaft- liche Hilfs- kräfte	studentische Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/b	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII- X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insgesamt (ohne Hilfs- kräfte)		
1999	A1			1,0		1,0											1,0		
	A2			1,0		1,0											1,0		
	A5					1,0											1,0		
	A6					1,0											1,0		
	A7					1,0											1,0		
	A			2,0	3,0	5,0											5,0		
	B1				1,0	1,0	2,0										2,0		
	B2											1,0					1,0	1,0	
	B5					1,0	1,0										1,0	1,0	
	B6					1,0	1,0											1,0	
	B7					1,0	1,0								1,0		1,0	2,0	
	B8			1,0			1,0											1,0	
	B			2,0	4,0	6,0						1,0		1,0			2,0	8,0	
	C1					2,0	2,0								1,0		1,0	3,0	
	C2					1,0	1,0											1,0	
	C3		1,0			1,0	2,0											2,0	
	C4				0,5		0,5						0,5					0,5	1,0
	C5				1,0	1,0	2,0											2,0	
	C		1,0	1,5	5,0	7,5							0,5		1,0		1,5	9,0	
	Z														1,0		1,0	1,0	
Z2																			
gesamt			1,0	5,5	12,0	18,5						1,5		3,0		4,5	23,0		
	+/-																		

2.3. Anzahl der Mitarbeiter /innen, für die Personalmittel als Ergänzungsausstattung beantragt werden (**Fortsetzung**)

	Teilpro- jekt	Sonder- vertrag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa /2	Summe Sond. - BAT IIa /2	wissenschaft- liche Hilfs- kräfte	studentische Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/b	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII- X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insgesamt (ohne Hilfs- kräfte)	
2000	A1			1,0		1,0											1,0	
	A2			1,0		1,0											1,0	
	A5				1,0	1,0											1,0	
	A6				1,0	1,0											1,0	
	A7				1,0	1,0											1,0	
	A			2,0	3,0	5,0												5,0
	B1			1,0	1,0	2,0												2,0
	B2											1,0					1,0	1,0
	B5					1,0	1,0											1,0
	B6					1,0	1,0											1,0
	B7					1,0	1,0								1,0		1,0	2,0
	B8			1,0			1,0											1,0
	B			2,0	4,0	6,0						1,0		1,0			2,0	8,0
	C1					2,0	2,0								1,0		1,0	3,0
	C2					1,0	1,0											1,0
	C3		1,0			1,0	2,0											2,0
	C4			1,0			1,0					0,5					0,5	1,5
	C5			1,0	1,0	1,0	2,0											2,0
	C		1,0	2,0	5,0	8,0						0,5		1,0			1,5	9,5
	Z														1,0		1,0	1,0
Z2																		
gesamt			1,0	6,0	12,0	19,0						1,5		3,0		4,5	23,5	
+/-				0,5		0,5											0,5	

2.3. Anzahl der Mitarbeiter /innen, für die Personalmittel als Ergänzungsausstattung beantragt werden (**Fortsetzung**)

	Teilpro- jekt	Sonder- vertrag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa /2	Summe Sond. - BAT IIa /2	wissenschaft- liche Hilfs- kräfte	studentische Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/b	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII- X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insgesamt (ohne Hilfs- kräfte)	
2001 1. HJ	A1			1,0		1,0											1,0	
	A2			1,0		1,0											1,0	
	A5					1,0											1,0	
	A6					1,0											1,0	
	A7					1,0											1,0	
	A			2,0	3,0	5,0												5,0
	B1			1,0	1,0	2,0												2,0
	B2											1,0					1,0	1,0
	B5					1,0	1,0											1,0
	B6					1,0	1,0											1,0
	B7					1,0	1,0								1,0		1,0	2,0
	B8			1,0			1,0											1,0
	B			2,0	4,0	6,0						1,0		1,0		2,0		8,0
	C1					2,0	2,0								1,0		1,0	3,0
	C2					1,0	1,0									1,0	1,0	2,0
	C3		1,0			1,0	2,0											2,0
	C4			1,0			1,0					0,5					0,5	1,5
	C5			1,0	1,0													2,0
	C		1,0	2,0	5,0	8,0						0,5		1,0	1,0	2,5		10,5
	Z														1,0		1,0	1,0
Z2																		
gesamt			1,0	6,0	12,0	19,0						1,5		3,0	1,0	5,5	24,5	
+/-															1,0	1,0	1,0	

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

Teilprojekt		Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	<i>gesamt</i>
1995	A1	4.500	10.200						<i>14.700</i>
	2.HJ		10.000						<i>10.000</i>
	A3	16.400	10.000						<i>26.400</i>
	A4		15.800						<i>15.800</i>
	A	20.900	46.000	0	0	0	0	0	<i>66.900</i>
	B1		14.900						<i>14.900</i>
	B3	5.000	10.000						<i>15.000</i>
	B4		10.000						<i>10.000</i>
	B	5.000	34.900	0	0	0	0	0	<i>39.900</i>
	C1		15.000						<i>15.000</i>
	C2		23.500						<i>23.500</i>
	C3		15.000						<i>15.000</i>
	C4		10.000						<i>10.000</i>
	C	0	63.500	0	0	0	0	0	<i>63.500</i>
	Z		5.000	15.000	15.000		8.000		<i>43.000</i>
insgesamt		25.900	149.400	15.000	15.000	0	8.000	0	<i>213.300</i>

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben (**Fortsetzung**)

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

Teilprojekt	Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	<i>gesamt</i>
1996								
A1		20.400						<i>20.400</i>
A2		20.000						<i>20.000</i>
A3		20.000						<i>20.000</i>
A4		31.500						<i>31.500</i>
A	0	91.900	0	0	0	0	0	<i>91.900</i>
B1		29.800						<i>29.800</i>
B3		20.000						<i>20.000</i>
B4		20.000						<i>20.000</i>
B	0	69.800	0	0	0	0	0	<i>69.800</i>
C1		30.000						<i>30.000</i>
C2		47.000						<i>47.000</i>
C3		30.000						<i>30.000</i>
C4		20.000						<i>20.000</i>
C	0	127.000	0	0	0	0	0	<i>127.000</i>
Z		10.000	30.000	30.000				<i>70.000</i>
insgesamt	0	298.700	30.000	30.000	0	0	0	<i>358.700</i>
plus/minus	-25.900	149.300	15.000	15.000	0	-8.000	0	

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben (**Fortsetzung**)

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

Teilprojekt	Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	<i>gesamt</i>
1997								
A1		20.400						<i>20.400</i>
A2		20.000						<i>20.000</i>
A3		20.000						<i>20.000</i>
A4		31.500						<i>31.500</i>
A	0	91.900	0	0	0	0	0	<i>91.900</i>
B1		29.800						<i>29.800</i>
B3		20.000						<i>20.000</i>
B4		20.000						<i>20.000</i>
B	0	69.800	0	0	0	0	0	<i>69.800</i>
C1		30.000						<i>30.000</i>
C2		47.000						<i>47.000</i>
C3		30.000						<i>30.000</i>
C4		20.000						<i>20.000</i>
C	0	127.000	0	0	0	0	0	<i>127.000</i>
Z		10.000	56.400	50.000				<i>116.400</i>
insgesamt	0	298.700	56.400	50.000	0	0	0	<i>405.100</i>
plus/minus	0	0	26.400	20.000	0	0	0	

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben (**Fortsetzung**)

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

Teilprojekt	Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	<i>gesamt</i>
1998	A1	10.200						10.200
1.HJ	A2	10.000						10.000
	A3	10.000						10.000
	A4	15.800						15.800
	A	0	46.000	0	0	0	0	46.000
	B1		14.900					14.900
	B3		10.000					10.000
	B4		10.000					10.000
	B	0	34.900	0	0	0	0	34.900
	C1		15.000					15.000
	C2		23.500					23.500
	C3		15.000					15.000
	C4		10.000					10.000
	C	0	63.500	0	0	0	0	63.500
	Z		5.000	18.200	15.000	5.000		38.200
	insgesamt	0	149.400	18.200	15.000	0	5.000	187.600
	plus/minus	0	-149.300	-38.200	-35.000	0	5.000	-217.500
Zwischensumme 95-98	25.900	896.200	119.600	110.000	0	13.000	0	1.164.700

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben (**Fortsetzung**)

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

	Teilprojekt	Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	gesamt
1998	A1	7.700	10.000						17.700
2.HJ	A2		10.000						10.000
	A5		9.500						9.500
	A6	18.100	9.000						27.100
	A7	17.900	14.700						32.600
	A	43.700	53.200	0	0	0	0	0	96.900
	B1		15.650						15.650
	B2		12.500						12.500
	B5		30.000						30.000
	B6	7.000	18.400						25.400
	B7		9.000						9.000
	B8		18.000						18.000
	B	7.000	103.550	0	0	0	0	0	110.550
	C1	23.300	16.000						39.300
	C2	37.400	16.800						54.200
	C3	50.200	15.000						65.200
	C4		10.000						10.000
	C5		30.350						30.350
	C	110.900	88.150	0	0	0	0	0	199.050
	Z		6.000	38.250	38.250	17.000			99.500
	Z2								
	insgesamt	161.600	250.900	38.250	38.250	17.000	0	0	506.000
	plus/minus	161.600	101.500	20.050	23.250	17.000	-5.000	0	318.400

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben (**Fortsetzung**)

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

Teilprojekt	Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	<i>gesamt</i>
1999								
A1		19.900						<i>19.900</i>
A2		38.000						<i>38.000</i>
A5		19.000						<i>19.000</i>
A6		18.000						<i>18.000</i>
A7		22.000						<i>22.000</i>
A	0	116.900	0	0	0	0	0	<i>116.900</i>
B1		31.300						<i>31.300</i>
B2		25.000						<i>25.000</i>
B5		21.000						<i>21.000</i>
B6		36.800						<i>36.800</i>
B7		18.000						<i>18.000</i>
B8		35.900						<i>35.900</i>
B	0	168.000	0	0	0	0	0	<i>168.000</i>
C1		32.000						<i>32.000</i>
C2		33.600						<i>33.600</i>
C3		30.000						<i>30.000</i>
C4		20.000						<i>20.000</i>
C5		60.700						<i>60.700</i>
C	0	176.300	0	0	0	0	0	<i>176.300</i>
Z		12.000	85.500	76.500				<i>174.000</i>
Z2								
insgesamt	0	473.200	85.500	76.500	0	0	0	<i>635.200</i>
plus/minus	-161.600	222.300	47.250	38.250	-17.000	0	0	<i>129.200</i>

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben (**Fortsetzung**)

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

Teilprojekt	Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	<i>gesamt</i>
2000								
A1		19.900						<i>19.900</i>
A2		20.000						<i>20.000</i>
A5		19.000						<i>19.000</i>
A6		18.000						<i>18.000</i>
A7		22.000						<i>22.000</i>
A	0	98.900	0	0	0	0	0	<i>98.900</i>
B1		31.300						<i>31.300</i>
B2		25.000						<i>25.000</i>
B5		21.000						<i>21.000</i>
B6		36.800						<i>36.800</i>
B7		18.000						<i>18.000</i>
B8		35.900						<i>35.900</i>
B	0	168.000	0	0	0	0	0	<i>168.000</i>
C1		32.000						<i>32.000</i>
C2		33.600						<i>33.600</i>
C3		30.000						<i>30.000</i>
C4		20.000						<i>20.000</i>
C5		60.700						<i>60.700</i>
C	0	176.300	0	0	0	0	0	<i>176.300</i>
Z		12.000	91.500	76.500				<i>180.000</i>
insgesamt	0	455.200	91.500	76.500	0	0	0	<i>623.200</i>
plus/minus	0	-18.000	6.000	0	0	0	0	<i>-12.000</i>

2.4. Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für sächliche Verwaltungsaufgaben (**Fortsetzung**)

Mit * gekennzeichnete Titel sind für den gesamten SFB durch das Projekt Z ausgewiesen.

Teilprojekt		Kleingeräte bis 20 TM	Verbrauchs- mittel und Versuchstiere	Reisemittel*	Gastwissen- schaftler*	Druckkosten*	Vervielfälti- gungen*	Sonstiges*	gesamt
2001 1. HJ	A1		10.000						10.000
	A2		10.000						10.000
	A5		9.500						9.500
	A6		9.000						9.000
	A7		7.300						7.300
	A	0	45.800	0	0	0	0	0	45.800
	B1		15.650						15.650
	B2		12.500						12.500
	B5		10.500						10.500
	B6		18.400						18.400
	B7		9.000						9.000
	B8		18.000						18.000
	B	0	84.050	0	0	0	0	0	84.050
	C1		16.000						16.000
	C2		16.800						16.800
	C3		15.000						15.000
	C4		10.000						10.000
	C5		30.350						30.350
	C	0	88.150	0	0	0	0	0	88.150
	Z		6.000	38.250	38.250				82.500
Z2									
insgesamt		0	224.000	38.250	38.250	0	0	0	300.500
plus/minus		0	-231.200	-53.250	-38.250	0	0	0	-322.700
Zwischensumme 98-01		161.600	1.403.300	253.500	229.500	17.000	0	0	2.064.900

2.5. Liste der Geräte über DM 20.000 (brutto)

sowie der Fahrzeuge, die aus Mitteln des Sonderforschungsbereichs oder aus Mitteln der Grundausrüstung (HBFG, Mitteln der Hochschule, des Landes) beschafft worden sind oder als Leihgabe der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung stehen

Bezeichnung des Geräts	Anschaffungsjahr	Anschaffungspreis in TDM	Eingesetzt i.d. Teilprojekten	finanziert durch
Sequenzierautomat ALF	98	80	A1,A3	sonst. + Charité
Sequenzierautomat ALF	97	100	A1,A3	sonst.
Mausarbeitsplatz (Respirator/Kapnometer etc.)	97	30	A1/A3	Charité
Siemens Magnetom Vision 1,5 Tesla MR-Gerät	96	5000	A1;B5	HBFG
Luminometer	95	27	A4	UKBF
EPC-9 Patch Clamp Amplifier	96	23	B1	MDC
Micromanipulator (Narishigi)	97	34	B1	MDC
Kryostat-System LEICA 3050	96	56	B3	MDC
Fluoreszenzmikroskop	95	80	B4	Charité
Ultrastainer	95	25	C1	Charité
beta-Counter	95	35	C1	Charité
Forschungsmikroskop	95	60	C1	Charité
Fluoreszenzmikroskop	95	65	C1	Charité
Ultratom	95	70	C1	Charité
FACS	96	110	C1	Charité
Fixed-stage Mikroskop mit patch-Einrichtung und slice-Kammer	95	120	C1	Charité
Elektronenmikroskop Zeiss 912	97	1000	C1	HBFG
Ca-Imaging (Fura) System	95	45	C2	Charité
Konfokales Mikroskop Noran OZ	97	439	C3/4	HBFG/Charité
Fluoreszenzmikroskop 1995	95	37	C4	Charité
Ca-Meßstand (CCD-Kamera, V-Beleuchtungssystem, Tisch etc.)	95	150	C4	DFG
SUMME		7789		

b) - deren Beschaffung 1998 (2. HJ) und 1999 (1. HJ) aus Mitteln des Sonderforschungsbereichs beabsichtigt ist

Bezeichnung des Gerätes	Anschaffungsjahr	Anschaffungspreis in DM	eingesetzt in den Teilprojekten	finanziert durch
Perimed Multi functional laser Doppler system 5000	1998	57.400	A1	SFB (beantragt)
Olympus Inverses Mikroskop (IX70)	1998	55.200	C1	SFB (beantragt)
Inverses Mikroskop	1998	37.000	C2	SFB (beantragt)
Polychromatisches Beleuchtungssystem mit Kondensator und Filtermodulen	1998	40.000	C4	SFB (beantragt)
Dual Photon Confokal Mikroskop	1998	650.000	Z2	SFB (beantragt)
SUMME		839.600		

2.6. Liste der als Ergänzungsausstattung für die Haushaltsjahre 1998 (2. HJ), 1999, 2000, 2001 (1. HJ) beantragten Geräte über 20.000 (brutto) und Fahrzeuge

alle Preisangaben in DM einschließlich Mehrwertsteuer und Transportkosten usw.

Teilprojekt	Bezeichnung des Gerätes	beantragt für das Haushaltsjahr	Anschaffungspreis in DM
A1	Perimed Multi functional laser Doppler system 5000	1998	57.400
C1	Olympus Inverses Mikroskop (IX70)	1998	55.200
C2	Inverses Mikroskop	1998	37.000
C4	Polychromatisches Beleuchtungssystem mit Kondensator und Filtermodulen	1998	40.000
Z2	Dual Photon Confokal Mikroskop	1998	650.000
SUMME			839.600

2.7 Angaben zur Versuchstierhaltung

(Angaben pro Jahr)

Teil-Projekt	Tierart	Anzahl	durchschnittl. Haltungsdauer in Tagen	Beschaffungskosten		Haltungskosten		vorhandene Tierpflegestellen der Grundausstattung	Ort der Tierhaltung
				pro Tier	insgesamt	pro Tier	insgesamt		
A1	Ratte Wistar	100	7	20	2000	GA	-	7	Zentrales Tierlabor Charité Tucholskystr
A2	Wistar-Ratte	150	2	20	3000	GA	-	2	FMP
A5	Maus (Wildyp bzw. transgen)	200	90	32,5	6500	GA	-	s.o.	Zentrales Tierlabor Charité Tucholskystr
A6	Ratte	350	7	20	7000	GA	-	s.o.	"
A7	Ratte	25	2	20	500	GA	-	s.o.	"
B1	Ratten	62	21	40	2500	10	500	2	Chirurg. Forschungs-labor der Charité
B2	Maus	300	-	2,50	750	-	-	-	-
	Maus	75	-	30	2250	-	-	-	-
B5	Ratten	60	90	50	3000	10	600	2	Chirurg. Forschungs-labor Charité

B6	Ratte (300g)	95	7-90	15	1425	GA	-	s.o.	Zentrales Tierlabor Charité Tucholskystr
B8	Ratte (30g)	300		7	2100				
	Maus	120		5	600				
	Maus transgen Wistar Ratten	150 750	6	15 20	2250 15000	0.8 /Woche	600	-	Zentrales Tierlabor Krahmerstr.6 12207 Berlin
C1	Ratte adult	50	60-90	20	1000	25	1250	1	Institut für Anatomie
	Ratte p10	100	-	10	1000	-	-		
	Ratte neugeb.	200	-	5	1000	-	-		
C2	Ratte	100	60-90	20	2000	50	5000	1	Institut für Anatomie
C3	Ratten	500	30	14	7000	2,60	1300	s.o.	Zentrales Tierlabor Charité Tucholskystr
C4	Mäuse	150	120	10	1500	8,80	1320	s.o.	Zentrales Tierlabor der Charité Tuch- olskystr
	Ts65Dn Mäuse	40	120	150	6000	8,80	352		
	Nachkommen	200	60			4,40	880		
C5	Ratten, Sprague Dawley	200	14	22,50	4500	1,25 in 14 Tagen	250	5	Forschungs- haus, Charité Virchow-Kl.
Insgesamt		4177			72875		12052		

Tierschutzbeauftragter der Charité: Dr.Grosse - Siestrup, Charté Campus Virchow, Augustenburgerplatz 1, 13353 Berlin, Tel 030- 45076041

PROJEKTBEREICH A
Zerebrale Ischämie/Hypoxie
(Projektbereichsleiter: PD Dr.U.Dirnagl)

- A 1 'Cortical spreading ischemia': Ein neues Ischämieprinzip
Dreier/Dirnagl

- A 2 Einfluss von Astrozyten auf Gehirndothelzellen bei Hypoxie
Blasig

- A 5 Fokale cerebrale Ischämie und induzierte Ischämietoleranz: Rolle von Makrophagen und Mikroglia
Dirnagl

- A 6 Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien unter physiologischen Bedingungen und nach zerebraler Ischämie und Spreading Depression
Klee/Lindauer

- A 7 Rolle der Mikroglia im Eisenstoffwechsel des Gehirnes – Schädigung Eisen-bindender Proteine bei radikalischer Belastung
Grune

3.0 Zusammenfassende Darstellung des Projektbereiches A

Der neuronale Schaden ist für das klinische Endresultat nach zerebraler Ischämie sicherlich die wesentliche Determinante. Es wurde jedoch in den letzten Jahren deutlich, nicht zuletzt auch aus den Untersuchungen der hier beteiligten Arbeitsgruppen unter Förderung im SFB, daß nicht-neuronale Mechanismen an den Pathomechanismen des ischämischen Schadens einen hervorragenden Anteil spielen. Sie sind damit auch wichtige Ziele für therapeutische Strategien. Der zerebrale Blutfluß (von dem die Störung ja in der Regel ausgeht), aus dem Blut einwanderende Zellen (Leukozyten), gliale Zellen (Astro- und Mikroglia), sowie die glatte Gefäßmuskelzelle und das Endothel können in der komplexen Schadenskaskade ebenso protektiv wie destruktiv beteiligt sein. Es ist das übergeordnete Ziel der Untersuchungen in dieser Projektgruppe, die Interaktion dieser nicht-neuronalen Mechanismen mit Neuronen, für deren Überleben oder Untergang sie mitverantwortlich sind, aufzuklären.

Im Projekt A1 (Dreier/Dirnagl) wird ein Phänomen untersucht, welches in diesem Projekt in der zurückliegenden Antragsperiode entdeckt wurde: die 'Cortical Spreading Ischemia'. Im Gegensatz zum normalen Ablauf einer Ischämie, bei der aus einem zirkulatorischen Problem ein parenchymaler Schaden entsteht, geht hier der Auslöser für die Ischämie vom Hirnparenchym aus und erfaßt sekundär die Zirkulation. Möglicherweise spielt ein Cortical Spreading Ischemia - artiger Mechanismus beim verzögerten Vasospasmus nach Subarachnoidal-

Projektbereich A

blutung oder in der Entstehung von migränösen Infarkten eine Rolle. Bevor diese klinische Beziehung weiter gesichert werden kann soll in den geplanten Untersuchungen das Phänomen weiter charakterisiert und seine Mechanismen verstanden werden. Unabhängig von der möglichen klinischen Relevanz des Modells werden die hier durchgeführten Untersuchungen wichtige Einblicke in die Interaktion von Blutfluß, zerebralem Endothel, glatter Muskelzelle, Astrozyten und Neuronen unter ischämischen Bedingungen geben, wobei ein besonderer Fokus auf der Interaktion des NO-Systems und Kalium bzw. dessen Kanälen liegt.

Aufbauend auf die Befunde der zurückliegenden Antragsperiode, in der ein in-vitro Modell der Bluthirnschranke etabliert und charakterisiert wurde und auf die Untersuchung der Wechselwirkung von Astrozyten und Endothelzellen bei Hypoxie angewendet wurde, werden im Projekt A2 (Blasig) nun die Signaltransduktionskaskaden zwischen den beiden Zelltypen während Hypoxie untersucht. Dabei werden mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden die NO-abhängige Phosphorylierung von Endothelzell-Proteinen untersucht, und nach Faktoren (Proteine, mRNAs) welche durch Astrozyten in Endothelzellen bei Hypoxie induziert werden. Die Untersuchungen werden damit unser Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Kommunikation dieser beiden Zelltypen bei Hypoxie fördern und zum Verständnis der Blut-Hirnschrankenstörung bei zerebraler Ischämie beitragen.

Inflammatorische Mechanismen haben möglicherweise einen wichtigen Anteil am zerebral ischämischen Schaden. Dies ist potentiell von großer therapeutischer Relevanz, insofern sich diese Schadensmechanismen verzögert entwickeln, und ein therapeutischer Eingriff möglicherweise noch nach Stunden und vielleicht sogar nach Tagen nach Beginn der Ischämie effektiv sein kann. Für die Inflammation verantwortlich sind vor allem aus dem Blut einwandernde Leukozyten, aber auch das hirneigene 'Immunsystem', die Mikroglia. Die differentielle Rolle dieser Zellen ist aber wegen methodischer Schwierigkeiten in der Untersuchung noch sehr unklar, auch ist fraglich ob Mikrogliaaktivierung unter diesen Bedingungen eher schadensbringend ('bad guy') oder schadensmindernd ('good guy') ist. Die Untersuchung in Projekt A5 (Dirnagl) wenden sich mit transgenen und bildgebenden Ansätzen genau diesen Fragestellungen zu. Dabei bedient sich die Gruppe einerseits etablierten Ischämie modellen, zum anderen dem Phänomen der 'induzierten Ischämietoleranz'. Die Induktion von Ischämietoleranz wird in diesem Projekt genutzt, um erstmals die protektiven von den destruktiven Momenten in der Interaktion inflammatorischer Mechanismen bei der zerebralen Ischämie zu differenzieren.

Lindauer und Klee (Projekt A6) befassen sich wie das Projekt A1 mit der Interaktion von zerebralem Endothel und glatter Muskelzelle bei Ischämie, aber methodisch/modellmäßig komplementär. Aus eigenen Voruntersuchungen und aus den Ergebnissen von Projekt A1 wissen die Antragsteller, daß in der zerebrovaskulären Regulation eine sehr enge Beziehung zwischen dem NO/cGMP - System einerseits und glattmuskulären Kaliumkanälen andererseits, besteht. Die Antragsteller entwickeln die Hypothese, daß das Verständnis dieser Interaktion den Schlüssel für die Aufklärung der Mechanismen der wohlbekannten Störung der zerebrovaskulären Regulation im Gefolge der zerebralen Ischämie ist. Aus methodischen Gründen müssen diese pharmakologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen in in-vitro Systemen (zerebrales Arterienpräparat, dissoziierte Muskelzelle) durchgeführt werden. Die Untersuchungen liefern damit zunächst grundlegende Informationen zu Mechanismen der zerebrovaskulären Reaktivität, um diese dann auf die Pathophysiologie der klinisch relevanten Störung dieser Reaktivität nach zerebraler Ischämie anzuwenden.

Es gilt als gesichert, daß radikalischer Stress einen wesentlichen Beitrag zum Gewebeschaden bei zerebraler Ischämie, aber auch bei einer Vielzahl anderer akuter und chronischer Erkran-

kungen des ZNS liefert. Die Radikale entstehen bei der Ischämie akut nach Induktion der zerebralen Ischämie in Folge exzitotoxischer Mechanismen, aber auch und vermutlich in noch größerem Umfang während der inflammatorischen Phase des Prozesses (siehe Projekt A5). Eisenstoffwechsel und Radikalentstehung sind biochemisch eng gekoppelt, wobei Mikrogliazellen eine zentrale Rolle in der Regulation des Eisenhaushaltes des Gehirnes spielen und damit besonders relevant für das Verständnis radikalischer Schadensprozesse im ZNS werden. Das Projekt A7 (Grune) setzt hier an und untersucht mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden in Zellkultur und Brain slice Systemen grundlegende Aspekte des Eisenstoffwechsels der Mikroglia in Bezug auf die Entstehung oder Detoxifikation von Radikalen. Die Untersuchungen haben damit Bedeutung für unser Verständnis der Schadenskaskaden der zerebralen Ischämie, aber auch degenerativer Erkrankungen wie M.Parkinson und M.Alzheimer.

Der Projektbereich befaßt sich also mit dem Beitrag nicht-neuronaler Mechanismen an einer prototypischen, akuten Erkrankung des ZNS, der zerebralen Ischämie. Das Modellspektrum der Untersuchungen reicht von in - vitro bis zu in - vivo Modellen, an denen mit biochemischen, molekularbiologischen, elektrophysiologischen und systemphysiologischen Ansätzen gearbeitet wird. Durch dieses breite Methoden- und Modellspektrum ergibt sich die Basis für eine intensive Kooperation innerhalb der Gruppe, welche sich aber nicht nur auf methodische Hilfestellung und gegenseitige Validierung, sondern, wie oben deutlich gemacht, auch auf inhaltliche Aspekte bezieht. Offensichtlich sind die Beziehungen zwischen den Projekten A1, A2, und A6, die sich ja alle mit verschiedenen Aspekten der Rolle von Astrozyten, Endothelzellen, und Muskelzellen bei der Ischämie befassen. Sowohl A5 und A7 befassen sich mit der Mikroglia, aber unter verschiedenen Fragestellungen, wobei das Spektrum von in vivo Modellen der Ischämie in Projekt A5 für alle Teilprojekte der Gruppe von Interesse ist. Durch diese breite methodische Basis sowie durch die enge Anbindung der Arbeitsgruppen an die klinische Diagnose und Behandlung des Schlaganfalls (z.B. Stroke Unit und Neurologische Intensivstation der Neurologischen Klinik der Charité) wird eine sehr eng vernetzte Diagnose- bzw. Therapie-orientierte Grundlagenforschung gewährleistet.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A1

3.1.1 Thema:

„Cortical spreading ischemia: Ein neues Ischämieprinzip“

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neurologie

3.1.3 Leiter/in:

Dr. Dreier, Jens, 11.09.1965 / PD Dr. Dirnagl, Ulrich, 09.08.1960

Neurologische Klinik der Charité

10098 Berlin

Tel: +49-30-2802-8318

Fax: +49-30-2802-5047

E-mail: dreier@neuro.charite.hu-berlin.de; dirnagl@neuro.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

Dreier: (X) nein () ja, befristet bis zum :

Dirnagl: () nein (x) ja, befristet bis zum : 5/2000 (Heisenbergstipendium)

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen () ja (x) nein
- klinische Studien im Bereich der
- somatischen Zell- oder Gentherapie () ja (x) nein
- Tierversuche (x) ja () nein
- gentechnologische Versuche () ja (x) nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs-ausgaben	Investition	Gesamt
bis 1995	47,4	14,7	-	62,1
1996	99,6	20,4	-	120,0
1997	99,6	20,4	-	120,0
1, Hj, 1998	50,4	10,2	-	60,6
Zwischen-summe	297	65,7	-	362,7
2, Hj, 1998	42,6	17,7	57,3	117,6
1999	85,2	19,9	-	105,1
2000	85,2	19,9	-	105,1
1, Hj, 2001	42,6	10,0	-	52,6

3.2 Zusammenfassung

Gegenstand der hier vorgeschlagenen Untersuchungen ist die ‚Cortical Spreading Ischemia‘ (CSI), ein von uns im Verlauf des Projektes A1 entdecktes, neues Ischämieprinzip. Die CSI wird durch eine Cortical Spreading Depression (CSD) ausgelöst, führt aber im Gegensatz zu dieser nicht zu einer Hyperämie, sondern zur Ischämie. Der Vorgang einer CSD-induzierten Ischämie wurde von verschiedenen Autoren als pathophysiologisches Korrelat migränöser Infarkte theoretisch postuliert. Mit unseren Untersuchungen ist zum ersten Mal die Existenz dieses Phänomens experimentell nachgewiesen worden. Pharmakologisch kann die CSI aber u.a. durch Hämoglobin und erhöhte Kaliumkonzentration im Subarachnoidalraum ausgelöst werden. Hirninfarkte, die beim Menschen spontan in Gegenwart von subarachnoidaler Hämoglobin- und Kaliumfreisetzung auftreten, sind die sogenannten verzögerten ischämischen Defizite (‚delayed ischemic deficits‘, DID) nach Subarachnoidalblutung. Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß der Vasodilatator Nimodipin, welcher klinisch in der Prophylaxe von DIDs wirksam ist, die CSI in eine normale CSD zurückverwandelt. Die CSI ist daher ein denkbarer Pathomechanismus auch für die nach wie vor unverstandenen DIDs. Daraus leitet sich als weitere Hypothese ab, daß DIDs eine Subgruppe migränöser Infarkte darstellen könnten.

Bei der CSI führt die astrozytär-neuronale Depolarisation über eine gestörte Kopplung zwischen Metabolismus und Blutfluß zur Vasokonstriktion und dadurch zur Ischämie. Wir wollen nun im Ganztier (Ratte) und akuten Hirnschnitten mit pharmakologischen, elektrophysiologischen und optischen Methoden die Mechanismen dieser negativen Kopplung von Metabolismus und Blutfluß untersuchen. Dazu sollen weitere Studien mit anderen Vasodilatoren als Nimodipin durchgeführt werden, die teilweise auch ein therapeutisches Potential besitzen. In Ergänzung möchten wir die der CSI zugrundeliegende Vasokonstriktion analysieren. Dabei wird zunächst aufgrund von Literaturbefunden und eigenen Pilotuntersuchungen das Catecholamin- bzw. Serotonin-Reuptake System im Vordergrund stehen. Wir wollen zusätzlich

die Entstehung von Infarkten bei der CSI, für die wir erste Hinweise haben, histologisch charakterisieren. In Hirnschnitten der Ratte wollen wir die Blutfluß-unabhängigen Wirkungen der zur Erzeugung von CSI eingesetzten Pharmaka auf die Spreading Depression *in vitro* untersuchen.

3.3 Stand der Forschung

3.3.1 CSD und Migräne

In der Regel entstehen Ischämien entweder durch einen Herzkreislaufstillstand als globale Ischämie oder durch einen primären Gefäßverschluß als fokale Ischämie, sei es durch einen Embolus, eine Thrombose oder primäre Vasokonstriktion. Dem Parenchym wird dabei keine ursächliche mechanistische Bedeutung zuerkannt. Ein Ischämietyp existiert jedoch für den ein anderer Pathomechanismus postuliert wurde. Dabei handelt es sich um die migränösen Infarkte. Für diese Form des Hirninfarkts wird angenommen, daß ein primäres Ereignis des Parenchyms über sekundäre Veränderungen der Gefäße eine Ischämie auslöst (Moen et al., 1987; Bogousslavsky et al., 1988; Broderick, 1997). So führten Bogousslavsky und Mitarbeiter eine prospektive, kontrollierte klinische Studie zur Ätiopathogenese migränöser Infarkte bei 66 Patienten durch. Ausgewertet wurden Computertomogramm, Ultraschall der hirnversorgenden Gefäße, zerebrale Angiographie, Echokardiographie sowie verschiedene Laborparameter. Als Schlußfolgerung ihrer Studie schreiben die Autoren 1988: "It is possible that persisting neuronal depression may lead to ischemic necrosis in some cases [of migrainous aura], but the exact mechanism is still unknown... Further research in migrainous stroke should focus on the neuronal metabolism-blood flow cascade which may lead to irreversible cellular necrosis, not on associated cardiac or arterial lesions." Das Ereignis des neuronal-astrozytären Netzwerks, dem Bogousslavsky und Mitarbeiter eine ursächliche Bedeutung für die Entstehung migränöser Infarkte beimaßen, war die Cortical Spreading Depression. Der Grund unserer Ausführungen liegt darin, daß die von uns entdeckte Cortical Spreading Ischemia der erste experimentelle Nachweis dieses theoretisch postulierten Mechanismus einer durch das neuronal-astrozytäre Netzwerk ausgelösten Ischämie ist (Dreier et al., in press). Verstehen läßt sich die Spreading Ischemia-Theorie migränöser Infarkte aber nur auf dem historischen Hintergrund der Spreading Depression-Theorie der Migräneaura, die daher im folgenden kurz erläutert wird:

In etwa 10 % der Migräne-Patienten wird eine Migräneattacke eingeleitet durch ein fokales neurologisches Defizit, das als Migräneaura bezeichnet wird. Erst nach der Migräneaura kommt es in der Regel zum Kopfschmerz. Die klinische Symptomatik einer Migräneaura ist am besten nachzuvollziehen anhand einer berühmten Beschreibung der eigenen visuellen Migräneaura durch den Arzt Lashley (1941): Er berichtete, daß seine Symptome als schmaler flimmernder Streifen im Zentrum des Gesichtsfeldes begannen. Der Flimmerstreifen breitete sich kontinuierlich innerhalb von 10 bis 15 Minuten konzentrisch in die Peripherie eines Gesichtsfeldes aus. Stellt man sich eine Welle vor, dann kann der Flimmerstreifen als Wellenberg aufgefaßt werden. Dieser wurde gefolgt von einem Sehverlust als Wellental. 15 Minuten nach der vollständigen Ausbreitung des Flimmerstreifens kehrte die Sehfähigkeit wieder zurück. Bei manchen Migräneuren spielt sich das gleiche Geschehen nach Rückbildung der visuellen Symptome auch im sensiblen System ab. Dabei bemerkt der Patient einen kribbelnden Streifen (Wellenberg) auf der Körperoberfläche, der allmählich z.B. von der Hand in den Arm und schließlich über die ganze Körperhälfte wandert. Der kribbelnde Streifen ist gefolgt von einem vorübergehenden Taubheitsgefühl (Wellental). In ähnlicher Weise können auch andere Modalitäten wie z.B. Motorik und Sprache betroffen sein.

Lashley interpretierte die Symptome der Migräneaura auf der Basis seiner neuroanatomischen Kenntnisse als Welle, die sich mit einer Geschwindigkeit von 3 mm / min in der Sehrinde ausbreitet. Die Welle bestehe aus einem Wellenberg in Form einer neuronalen Übererregung, der gefolgt sei von einem Wellental in Form einer neuronalen Untererregbarkeit (Lashley, 1941). Ähnliche Berechnungen wurden später auch für sensible Auren angestellt (Lord, 1986). Wie brilliant neuroanatomische Zuordnung und Geschwindigkeitsberechnung des Phänomens durch Lashley waren, zeigte sich drei Jahre später, als Leão 1944 im Tierexperiment die Cortical Spreading Depression (CSD) entdeckte. Als Welle primärer intensiver neuronaler Erregung gefolgt von einer verlängerten Phase neuronaler Untererregbarkeit im EEG, die sich in der Hirnrinde mit 3 mm / min ausbreitet, erfüllte sie alle Kriterien eines pathophysiologischen Korrelats der Migräneaura. Die Formulierung dieser sogenannten „Spreading Depression-Theorie“ der Migräneaura erfolgte in Arbeiten von Leão und Morrison (1945), Milner (1958), Lauritzen und Olesen (1984) und Lauritzen (1994).

Die methodische Entwicklung schritt fort und 1984 veröffentlichten Lauritzen und Olesen eine Arbeit über die Blutflußveränderungen während Migräneaura des Menschen mit der ¹³³Xe-Methode. Sie fanden eine milde Blutflußverminderung, die im Bereich der Sehrinde ihren Ausgang nahm und sich von dort mit einer Geschwindigkeit von etwa 3 mm / min in andere Bereiche der Hirnrinde ausbreitete. Diese „Spreading Oligemia“ stimmte in praktisch allen Parametern mit der zweiten Phase der Blutflußantwort auf CSD im Tierexperiment überein. Das prinzipielle Auftreten einer wachsenden Hypoperfusion während Migräneaura des Menschen wurde mit Hilfe der ¹³³Xe-Methode auch von anderen Untersuchern bestätigt, obwohl über die Tiefe und die Art der Hypoperfusion teilweise Uneinigkeit bestand (Olsen et al., 1987; Olesen und Friberg, 1991). In der an sich technisch überlegenen Positronen-Emissions Tomographie (PET) ist die Spreading Oligemia erst einmal bei einem Patienten nachgewiesen worden (Woods et al., 1994). Dies liegt am ehesten am kurzen Zeitfenster, in dem solche Messungen durchführbar sind. Besser untersuchbar ist im PET dagegen das auf die Migräneaura folgende Kopfschmerzstadium. Dabei zeigten sich hyperämische corticale Areale und eine Hirnstammaktivierung (Weiller et al., 1995), die mit einer Generatorfunktion des Hirnstamms für den Kopfschmerz vereinbar ist (Moskowitz et al., 1993).

Bei der normalen Migräneaura kommt es nicht zu einem persistierenden neurologischen Defizit, d.h. nicht zu einem neuronalen Schaden. In seltenen Fällen jedoch kann die Migräneaura ein permanentes neurologisches Defizit einleiten. Kernspin- und computertomographisch zeigen sich in diesen Fällen am häufigsten corticale Infarkte mit okzipitaler Prädilektion (Broderick, 1997; Bogousslavsky et al., 1988). Die Identität der initialen klinischen Symptomatik bei der normalen Migräneaura und beim migränösen Infarkt spricht für das gleiche initiale pathophysiologische Ereignis, d.h. einer Spreading Depression folgt man der gleichnamigen Theorie. Das Fehlen eines neuronalen Schadens bei der normalen Migräneaura im Gegensatz zur Induktion eines solchen bei migränösen Infarkten ist dann am ehesten vereinbar mit einer unterschiedlichen zerebralen Blutflußantwort auf CSD. Die Blutflußantwort auf eine normale CSD im Tierexperiment besteht aus einer kurzen initialen Blutflußsteigerung (Cortical Spreading Hyperemia (CSH)), die gefolgt ist von der bereits erwähnten Cortical Spreading Oligemia und nicht aus einer Ischämie (Lauritzen, 1987; Duckrow, 1991). Daher wurde die CSD mit physiologischer Blutflußantwort als pathophysiologisches Korrelat der normalen Migräneaura eingeordnet (Lauritzen, 1994). Demgegenüber postulierten Moen et al. (1987), Bogousslavsky et al. (1988) und Broderick (1997) für migränöse Infarkte die Abfolge einer durch Spreading Depression eingeleiteten Ischämie. Diese Hypothese erhielt ihre Plausibilität nicht nur aus der Klinik sondern auch aus dem Fehlen kardiovaskulärer Risikofaktoren dieser in der Regel jungen Patienten. Experimentell gab es bisher jedoch keine Hinweise, daß ein derartiges Ischämieprinzip existiert. Mit der Cortical Spreading Ischemia ist zum ersten Mal der experimentelle Nachweis dieses Prinzips gelungen (Dreier et al., im Druck).

Mit einem neuronal/glialen Faktor Migräne-assoziiertes Infarkte vereinbar ist der Befund zweier großer epidemiologischer Studien, daß Migräne ein Risikofaktor für Hirninfarkte ist, jedoch kein Risikofaktor für andere Organinfarkte wie z.B. Herzinfarkt (Sternfeld et al., 1995; Buring et al., 1995). In diesem Zusammenhang besonders interessant ist ein genetisch definiertes migränöses Infarktsyndrom (Klopstock et al., 1996), das MELAS-Syndrom (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). Obwohl die mitochondrialen Veränderungen bei MELAS, insbesondere die mitochondriale Angiopathie, auch das Herz betreffen, kommt es zwar zur Kardiomyopathie, nicht jedoch zum Herzinfarkt. Bei MELAS werden aber analog zu den klassischen migränösen Infarkten am häufigsten okzipital gelegene Hirnrindeninfarkte beobachtet. Es existieren klinische Berichte, daß Infarkte bei MELAS sowohl durch epileptische Anfälle als auch Migräneattacken eingeleitet wurden (Rosen et al., 1990; Matthews et al., 1991). Interessanterweise treten CSD und epileptische Aktivität in pathophysiologischen Modellen häufig gemeinsam auf wie z.B. im Niedrig-Magnesium-Modell im Hirnschnitt der Ratte (Mody et al., 1987; Dreier, 1993) und des Menschen (Avoli et al., 1991).

Zusammengefaßt basiert die ‚Spreading Depression-Theorie‘ der klassischen Migräne (Leão und Morison, 1945; Milner, 1958; Olesen und Lauritzen, 1984; Lauritzen, 1994) auf der Annahme, daß der neurologischen Symptomatologie der Migräneaura eine CSD mit normaler Kopplung und Blutflußantwort zugrundeliegt. Es ereignen sich im Regelfall keine Ischämie und kein neuronaler Schaden. Ausnahmsweise kann es aber doch einmal zu einem migränösen Infarkt mit persistierendem neurologischen Defizit kommen, der durch eine Aura eingeleitet wird (Moen et al., 1987; Bogousslavsky et al., 1988; Broderick, 1997). Unsere ‚Spreading Ischemia‘-Hypothese geht davon aus, daß in dieser seltenen Konstellation Spreading Depression eine ischämische Blutflußantwort auf der Basis einer gestörten Kopplung zwischen Metabolismus und Blutfluß produziert haben könnte. Damit wurde das erste pathophysiologisch begründete Modell für migränöse Infarkte im Rahmen unseres SFB-Projekts entdeckt (Dreier et al., im Druck).

3.3.2 CSD und ‚Delayed Ischemic Deficits‘ nach Subarachnoidalblutung

Interessanterweise kann die Cortical Spreading Ischemia (CSI) u.a. durch eine Kombination von Hämoglobin und erhöhter subarachnoidaler Kaliumkonzentration ausgelöst werden. Die natürliche Quelle von Hämoglobin und K^+ im Subarachnoidalraum unter pathologischen Bedingungen sind lysierende Erythrozyten nach Subarachnoidalblutung (SAB). Die intrazelluläre erythrozytäre Hämoglobinkonzentration beträgt beim Menschen $21,03 \pm 0,75$ mM (Stobbe, 1991) und die Kaliumkonzentration $102,4 \pm 3,9$ mM (Beutler, 1995). CSI wurde von uns im Tierexperiment spontan ausgelöst durch eine subarachnoidale Hämoglobinkonzentration von 2 mM und eine subarachnoidale Kaliumkonzentration ab 20 – 35 mM. Ohta et al. (1983) haben in intrazerebralen Hämatomen bei neurochirurgischen Patienten extrazelluläre Kaliumkonzentrationen bis zu 50 mM mit einigen Tagen Verzögerung nach Blutung gemessen. Daher ist im weiten Subarachnoidalraum des Menschen eine extrazelluläre Akkumulation von Hämoglobin und K^+ im subarachnoidalen Blutgerinnsel hypothetisch denkbar. Da das Gerinnsel die Hirnrinde quasi ummauert, ist ein direkter Kontakt des neuronal/astrozytären Netzwerks mit den pathologischen Hämoglobin- und Kaliumkonzentrationen anzunehmen.

Der klinische Verlauf der SAB wird durch das Auftreten der ‚Delayed Ischemic Deficits‘ (DIDs) kompliziert. Ihr Auftreten ist zeitlich korreliert mit der Hämolyse (Kassell et al., 1990; MacDonald and Weir, 1991) und abhängig von der Größe des subarachnoidalen Blutgerinnsels im kranialen CT (Fisher et al., 1980; Brouwers et al., 1993). So beschreiben Fisher et al. (1980), daß ein subarachnoidales Blutgerinnsel größer als 5 x 3 mm im CT oder Blutschich-

ten von mehr als 1 mm in Fissuren und Cisternen praktisch immer zu DIDs führten. Aus diesem Grunde werden seit der Erstbeschreibung der DIDs durch Robertson (1949) von den meisten SAB-Forschern intrazelluläre Produkte der Erythrozyten, insbesondere freies Hämoglobin, als ursächlich angeschuldigt (MacDonald und Weir, 1991).

Der Forschungsschwerpunkt liegt aus historischen und methodischen Gründen auf dem angiographisch sichtbaren Vasospasmus und nicht in der Mikrozirkulation, obwohl DIDs auch ohne angiographisch sichtbaren Vasospasmus entstehen können (Zabramski, 1997). Passend zu einem im wesentlichen mikrozirkulatorischen Problem finden sich als pathomorphologisches Substrat der DIDs nicht Territorialinfarkte, sondern in über 90 % weitverteilte corticale Mikroinfarkte (Stoltenburg-Didinger und Schwarz, 1987; Stoltenburg-Didinger, 1997; Neil-Dwyer et al., 1994). Interessanterweise sind die infarzierten corticalen Areale nicht durch die normalen vaskulären Territorien begrenzt, was zu einem Spreading Depression-Mechanismus passen würde (Stoltenburg-Didinger und Schwarz, 1987; Stoltenburg-Didinger, 1997).

Um die Korrelation zwischen CSI und DIDs zu testen, haben wir als erstes die Wirksamkeit von Nimodipin auf die CSI untersucht. Denn in sieben doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten, klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß der L-Typ-Calcium-Kanal-Antagonist Nimodipin das Risiko eines schlechten klinischen Verlaufs nach SAB um 42 % reduziert (Tettenborn und Dycka, 1990). Dieser Effekt beruhte auf einer Reduktion der Schwere und Frequenz von DIDs. Den angiographisch sichtbaren Vasospasmus beeinflusste Nimodipin jedoch nicht, was zusätzlich zu den oben aufgeführten Argumenten gegen eine alleinige ursächliche Rolle der größeren Gefäße spricht (Allen et al., 1983; Espinosa et al., 1984; Petruk et al., 1988). In unseren tierexperimentellen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß Nimodipin die CSD-induzierte Ischämie in eine CSD mit fast normaler Blutflußantwort zurückverwandelt. Die Induktion von CSI durch Hämoglobin und Kalium, die kortikale Lokalisation, die Kreuzung vaskulärer Territorien und die Nimodipin-Sensitivität unterstützen eine mögliche Verbindung zwischen CSI und DIDs.

In diesem Zusammenhang besonders interessant ist der erste direkte multiparametrische Nachweis von CSD *in vivo* durch Mayevsky et al. (1996) bei einem von 14 Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma. Bei diesem Patienten wurden corticaler Blutfluß und Blutvolumen mit Laser-Doppler, extrazelluläre Kaliumkonzentration, NADH-Redox-Zustand und DC-Potential aufgezeichnet. Die initialen spontanen Veränderungen in allen Parametern waren übereinstimmend mit den typischen Änderungen bei CSD in Tierexperimenten (Duckrow, 1991; Fabricius et al., 1995; Wolf et al., 1996; Mayevsky et al., 1991; Dreier et al., im Druck). Interessanterweise zeigten die CSDs bei diesem Patienten mit der Zeit eine Veränderung der Blutflußantworten hin zu akuten, initialen Hypoperfusionen. Eine solche initiale CSD-assoziierte Hypoperfusion ist außerdem noch bekannt bei CSD-induzierten Blutflußantworten der Ratte, wenn die NO-Synthase inhibiert ist (Duckrow, 1993; Fabricius et al., 1995; Dreier et al., im Druck). Die CSI ist quasi eine verstärkte und verlängerte Version dieser kurzen initialen CSD-induzierten Hypoperfusion (Dreier et al., im Druck). Als Voraussetzung für CSI muß allerdings zusätzlich zur NO-Senkung die subarachnoidale K^+ -Konzentration erhöht sein. Bei dem Patienten von Mayevsky et al. (1996) kommt Hämoglobin als NO-Senker in Frage, denn die Registrierung wurde im rechts frontalen Cortex durchgeführt; das kraniale CT zeigte eine kontusionelle Blutung im rechts parietalen Cortex. Möglicherweise wurde eine CSI-verwandte Blutflußantwort daher schon beim Menschen in der Umgebung einer Hirnblutung gemessen.

Zusammenfassend haben wir in unseren Untersuchungen zum ersten Mal experimentell einen Mechanismus nachgewiesen, über den Blutprodukte Ischämien auslösen können. Damit haben wir eine langjährige, aus klinischen und pathologischen Beobachtungen entstandene Hypothese verifizieren können. Sollte eine Verbindung zwischen CSI und

den DIDs bestehen, könnte die pathophysiologische Charakterisierung unseres Modells zur Optimierung der Therapie beitragen. Trotz Nimodipin stellen die DIDs nach SAB immer noch eine für Letalität und Morbidität relevante Komplikation bei etwa 14 % der Patienten dar (MacDonald, 1997).

Kombiniert man die beiden pathophysiologischen Hypothesen bzgl. migränösem Hirninfarkt und DIDs, halten wir es für denkbar, daß DIDs eine Subgruppe migränöser Infarkte darstellen.

Literatur

- 1 Allen GS, Ahn HS, Preziosi TJ, Battye R, Boone SC, Chou SN et al (1983) Cerebral arterial spasm - a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med* 308(11):619-624
- 2 Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, Villemure JG (1991) Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol* 30(4):589-596
- 3 Beutler E (1995) Composition of the erythrocyte. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ eds. *Williams Hematology*, McGraw-Hill, pp 364-369
- 4 Bogousslavsky J, Regli F, Van Melle G, Payot M, Uske A (1988) Migraine stroke. *Neurology* 38:223-227
- 5 Broderick JP (1997) Stroke and migraine. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B eds. *Primer on Cerebrovascular Diseases*, Academic Press, pp 333-335
- 6 Brouwers PJ, Dippel DW, Vermeulen M, Lindsay KW, Hasan D, van Gijn J (1993) Amount of blood on computed tomography as an independent predictor after aneurysm rupture. *Stroke* 24:809-814
- 7 Buring JE, Herbert P, Romero J, Kittross A, Cook N, Manson J, Peto R, Hennekens C (1995) Migraine and subsequent risk of stroke in the physician's health study. *Arch Neurol* 52(2):129-134
- 8 Dreier JP (1993) Physiologische und pharmakologische Eigenschaften der Niedrig-Magnesium-Epilepsie im Temporallappenpräparat der Ratte. Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
- 9 Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1997) Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induce cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab im Druck*
- 10 Duckrow RB (1991) Regional cerebral blood flow during spreading cortical depression in conscious rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:150-154
- 11 Duckrow RB (1993) A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res* 618:190-195
- 12 Espinosa F, Weir B, Overton T, Castor W, Grace M, Boisvert D (1984) A randomized placebo-controlled double-blind trial of nimodipine after SAH in monkeys. Part 1: Clinical and radiological findings. *J Neurosurg* 60(6):1167-1175

- 13 Fabricius M, Akgören N, Lauritzen M (1995) Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol* 269 (Heart Circ Physiol 38):H23-H29
- 14 Fisher CM, Kistler JP, Davis JM (1980) Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6:1-9
- 15 Kassell NF, Torner JC, Haley EC, Jane JA, Adams HP, Kongable GL and participants (1990) The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg* 73:18-36
- 16 Klopstock T, May A, Seibel P, Papagiannuli E, Diener HC, Reichmann H (1996) Mitochondrial DANN in migraine with aura. *Neurology* 46(6):1735-1738
- 17 Lashley KS (1941) Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch Neurol Psychiat* 46:331-339
- 18 Lauritzen M (1987) Cerebral blood flow in migraine and cortical spreading depression [review]. *Acta Neurol Scand Suppl* 76(113):1-40
- 19 Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura The spreading depression theory. *Brain* 117:199-210
- 20 Lauritzen M, Olesen J (1984) Regional cerebral blood flow during migraine attacks by Xenon-133 inhalation and emission tomography. *Brain* 107:447-461
- 21 Leão AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390
- 22 Leão AAP, Morison RS (1945) Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 8:33-45
- 23 Lord GDA (1986) Clinical characteristics of the migrainous aura. In: Amery WK, Wauquier A, eds. *The prelude to the migraine attack*, London, Baillière Tindall, pp 87-98
- 24 MacDonald L (1997) Cerebral vasospasm. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B eds. *Primer on Cerebrovascular Diseases*, Academic Press, pp 490-497
- 25 MacDonald RL, Weir BKA (1991) A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22:971-982
- 26 Matthews PM, Tampieri D, Berkovic SF, Andermann F, Silver K, Chityat D, Arnold DI (1991) Magnetic resonance imaging shows specific abnormalities in the MELAS syndrome. *Neurology* 41:1043-1046
- 27 Mayevsky A, Weiss HR (1991) Cerebral blood flow and oxygen consumption in cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:829-836
- 28 Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE (1996) Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res* 740:268-274
- 29 Milner B (1958) Note on a possible correspondence between the migraine scotomata and spreading depression. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 10:705
- 30 Mody I, Lambert JD, Heinemann U (1987) Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 57:869-888

- 31 Moen M, Levine SR, Newman DS, Dull-Baird A, Brown GG, Welch KMA (1987) Bilateral posterior cerebral artery strokes in a young migraine sufferer. *Stroke* 19:525-528
- 32 Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP (1993) Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci* 13(3):1167-1177
- 33 Neil-Dwyer G, Lang DA, Doshi B, Gerber ChJ, Smith PWF (1994) Delayed cerebral ischemia: the pathological substrate. *Acta Neurochir (Wien)* 131:137-145
- 34 Ohta O, Osaka K, Siguma M, Yamamoto M, Shimizu K, Toda N (1983) Cerebral vasospasm following ruptured intracranial aneurysms, especially some contributions of potassium ion released from subarachnoid hematoma to delayed cerebral vasospasm. In: Bevan JA, ed. *Vascular Neuroeffector Mechanisms*, New York, Raven Press, pp 353-358.
- 35 Olsen TS, Friberg L, Lassen NA (1987) Ischemia may be the primary cause of the neurological deficits in classic migraine. *Arch Neurol* 44:156-161
- 36 Olesen J, Friberg L (1991) Xenon 133 SPECT studies in migraine with aura. In: Olesen J, ed. *Migraine and other headaches*, New York, Raven Press, pp 121-130
- 37 Petruk KC, West M, Mohr G, Weir BK, Benoit BG, Gentili F et al (1988) Nimodipine treatment in poor-grade aneurysm patients. Results of a multicenter double-blind placebo-controlled trial. *J Neurosurg* 68(4):505-517
- 38 Robertson EG (1949) Cerebral lesions due to intracranial aneurysms. *Brain* 72:150-185
- 39 Rosen L, Philipps S, Enzmann D (1990) Magnetic resonance imaging in MELAS syndrome. *Neuroradiology* 32:168-171
- 40 Sternfeld B, Stang P, Sidney S (1995) Relationship of migraine headaches to experience of chest pain and subsequent risk for myocardial infarction. *Neurology* 45(12):2135-2142
- 41 Stobbe H (1991) *Untersuchungen von Blut und Knochenmark*, Berlin, Verlag Gesundheit GmbH
- 42 Stoltenburg-Didinger G (1997) Neuropathology of subarachnoid hemorrhage. In: Bederson JB ed. *Subarachnoid hemorrhage: pathophysiology and management*, Neurosurgical Topics, The American Association of Neurological Surgeons, pp 41-60
- 43 Stoltenburg-Didinger G, Schwarz K (1987) Brain lesions secondary to subarachnoid hemorrhage due to ruptured aneurysms. In: Cervós-Navarro J, Ferszt R eds. *Stroke and Microcirculation*, New York, Raven Press, pp 471-480
- 44 Tettenborn D, Dycka J (1990) Prevention and treatment of delayed ischemic dysfunction in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 21(12 Suppl):IV85-IV89
- 45 Weiller C, May A, Limmroth V, Juptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC (1995) Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* 1(7):658-660
- 46 Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC (1994) Bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med* 331(25):1689-1692
- 47 Zabramski JM (1997) Vasospasm after subarachnoid hemorrhage. In: Bederson JB ed. *Subarachnoid hemorrhage: pathophysiology and management*, Neurosurgical Topics, The American Association of Neurological Surgeons, pp 127-156

3.4 Eigene Vorarbeiten

Folgende Befunde zur Physiologie und Pathophysiologie der CSD wurden bisher von uns erhoben.

- NO-scavenging durch Hämoglobin oder NO-Synthase (NOS)-Inhibition mit Nitro-L-Arginin (L-NA) induziert eine Transformation der Blutflußantwort auf CSD von einer ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ in eine ‚Cortical Spreading Ischemia‘ in Thiopental-anästhesierten Ratten mit kranieller Fensterpräparation (Dreier et al., im Druck):

Durch eine subarachnoidale Hämoglobinkonzentration kombiniert mit Kaliumerhöhung auf 35 mM werden akute, spontane, transiente ischämische Ereignisse hervorgerufen. Dabei wird der Blutfluß auf 14 ± 7 % im Vergleich zur Baseline (= 100 %) reduziert. Die ischämischen Ereignisse dauern 53 ± 17 Minuten und sind assoziiert mit einer Negativierung des subarachnoidalen DC-Potentials um -7.3 ± 0.6 mV, die 49 ± 12 Minuten andauert. Wird in unserem experimentellen Protokoll Hämoglobin durch NOS-Inhibition ersetzt, ereignen sich die gleichen spontanen Ischämien. Die folgende Analyse ergibt, daß es sich bei den transienten Ischämien um spontane K^+ -induzierte (35 mM!) CSDs mit ischämischer Blutflußantwort handelt:

Unter Superfusion mit einer erhöhten subarachnoidalen Kaliumkonzentration von 20 mM in Kombination entweder mit Hämoglobin oder NOS-Inhibitor entstehen spontan in der Regel keine transienten Ischämien. Eine transiente Ischämie entsteht unter diesen Bedingungen aber dann, wenn eine CSD aus einem entfernten Hirnareal in den Bereich der superfundierten Hirnrinde wandert. Demgegenüber induziert CSD dort keine transiente Ischämie sondern eine Hyperämie bei Superfusion von physiologischer ACSF, ACSF mit NO⁻-Senker und normaler K^+ -Konzentration oder ACSF mit erhöhter K^+ -Konzentration ohne NO⁻-Senker. Die transiente Ischämie breitet sich mit einer Geschwindigkeit von 3.4 ± 0.6 mm / min aus, d.h. mit der gleichen Ausbreitungsgeschwindigkeit wie die ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ unter Normalbedingungen. Aufgrund der Ausbreitungscharakteristik läßt sich die CSD-induzierte Ischämie daher am besten als ‚Cortical Spreading Ischemia‘ beschreiben. Als ursächlich wird eine gestörte Kopplung zwischen Metabolismus und Blutfluß während CSD durch NO⁻-Senkung und K^+ -Erhöhung angenommen.

Nimodipin (2 µg / min / kg KG) verwandelt die ‚Cortical Spreading Ischemia‘ im Gegensatz zur Vehikelkontrolle wieder in eine fast normale ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ zurück.

Messung der freien Sauerstoffradikalproduktion mit Lucigenin-induzierter Chemilumineszenz zeigt bei normaler CSD keine Veränderung der Radikalproduktion, während CSI das typische Radikalproduktionsmuster transienter Ischämien in anderen *in vivo*-Ischämie-Modellen (Dirnagl et al., 1995; Peters et al., im Druck) sowie transienter Hypoxie in Hirnschnitten (Schreiber et al., 1995) zeigt.

- Chronische Transsektion des N.nasociliaris, der trigeminale perivaskuläre Nerven für den frontalen Cortex führt, vermindert ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ im frontalen Cortex um 23 ± 13 %. Kombinierte chronische Transsektion von N. nasociliaris und Parasympathicus reduziert ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ um 55 ± 19 %, d.h. sowohl trigeminale als auch parasympathische perivaskuläre Nerven sind an der Blutflußantwort auf CSD beteiligt (Reuter et al., im Druck).
- Intravenöse Gabe des 5-HT₂-Rezeptor Antagonisten Ritanserin reduziert signifikant die ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ um 44 %. Wir schlußfolgern daraus, daß auch Serotonin an der Modulation der Blutflußantwort auf CSD beteiligt ist (Gold et al., im Druck).
- Während CSD im normalen Gehirn kommt es zu einem Anstieg in der Hämoglobin-Oxygenierung und im Gewebe-pO₂. In dieser Studie konnten wir auch zeigen, daß die hä-

modynamischen Konsequenzen der CSD nicht-invasiv mittels Nahinfrarotspektroskopie an der Ratte gemessen werden können (Wolf et al., 1996). Die Nahinfrarotspektroskopie ist eine nicht-invasive Methode, die auch beim Menschen angewandt werden kann.

- Nach Okklusion der A. cerebri media können Periinfarktdepolarisationen mit Hilfe der Nahinfrarotspektroskopie bei der Ratte nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit Messungen der Gewebs-Sauerstoffspannung vermindert sich die Hämoglobinoxygenierung initial, während sie unter Normalbedingungen ansteigt (Wolf et al., 1997). Damit existiert ein charakteristisches Muster der Periinfarktdepolarisationen, das mit Hilfe der Nahinfrarotspektroskopie darstellbar ist. Derzeit laufen in unserer Klinik parallele Untersuchungen, Periinfarktdepolarisationen bei Patienten mit Schlaganfall sowohl mit Hilfe von Nahinfrarotspektroskopie als auch funktioneller Kernspintomographie zu messen.
- Permanente Okklusion der A. cerebri media führt zu einem stetigen Anstieg der freien Sauerstoffradikalproduktion, während Reperfusion nach Mediaokklusion zu einem überschießenden Anstieg der Radikalproduktion führt. In beiden Modellen kommt es nicht zu einem Radikalanstieg in Korrelation mit Periinfarktdepolarisationen (Peters et al., im Druck).
- Darüberhinaus konnten wir zeigen, daß NOS-Inhibition unter physiologischen Bedingungen zu einer Unterdrückung der K^+ -induzierten Blutflußsteigerung führt (Dreier et al., 1995; Dirnagl und Dreier, 1997). Applikation eines NO^- -Donors unter NOS-Inhibition restituiert die normale K^+ -induzierte Blutflußsteigerung. Somit besitzt NO^- bei der K^+ -Antwort der zerebralen Zirkulation ebenso eine Bedeutung wie bei der CO_2^- (Niwa et al., 1993) und der Adenosinantwort (Dirnagl et al., 1994).

Folgende Vorarbeiten zum angewandten Methodenspektrum wurden von uns durchgeführt:

- Kranielle Fenstertechniken (Dirnagl et al., 1991; Lindauer et al., 1993; 1996; Dreier et al., 1995). Zerebrales Multiparametermonitoring bei CSD (simultan: kranielles Fenster, Nahinfrarotspektroskopie, Elektrophysiologie, pO_2 -Elektrode und Laser-Doppler Blutfluß (Wolf et al., 1996).
- Ischämie Modelle: Fokal (Dirnagl und Pulsinelli, 1990; Peters et al., im Druck) sowie global (Dirnagl et al., 1993)
- Laser-Doppler Blutflußmessung: Validierung der Technik mit ^{14}C -Iodoantipyrin (Dirnagl et al., 1989), electromagnetic flow measurements and confocal scanning laser microscopy (Barfod et al., 1997)
- Messung mit ionensensitiven Mikroelektroden in Hirnschnitten der Ratte (Dreier et al., 1990; 1991)
- Messung von Blutfluß und somatosensorischen Potentialen nach Whiskerstimulation (Lindauer et al., 1993)

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

- 1 Barfod C, Akgören N, Fabricius M, Dirnagl U, Lauritzen M (1997) Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation. *Acta Physiol Scand* 160(2):123-132
- 2 Dirnagl U, Pulsinelli W (1990) Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:327-336
- 3 Dirnagl U, Dreier J (1997) Regulation of cerebral blood flow by ions. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B eds. *Primer on Cerebrovascular Diseases*, Academic Press, pp 75-77

A1 Dreier/Dirnagl

- 4 Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W (1989) Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:589-596
- 5 Dirnagl U, Villringer A, Gebhardt R, Haberl RL, Einhüpl KM (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain microcirculation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:353-360
- 6 Dirnagl U, Thoren P, Villringer A, Sixt G, Them A, Einhüpl KM (1993) Global forebrain ischemia in the rat: controlled reduction of cerebral blood flow by hypobaric hypotension and two vessel occlusion. *Neurol Res* 15:128-130
- 7 Dirnagl U, Niwa K, Lindauer U, Villringer A (1994) Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: Role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol* 267:H296-H301
- 8 Dirnagl U, Lindauer U, Them A, Schreiber S, Pfister H-W, Koedel U, Reszka R, Freyer D, Villringer A (1995) Global cerebral ischemia in the rat: Online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:929-940
- 9 Dreier JP, Heinemann U (1990) Late low magnesium-induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Neurosci Lett* 119:68-70
- 10 Dreier JP, Heinemann U (1991) Regional and time dependent variations of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp Brain Res* 87:581-596
- 11 Dreier JP, Körner K, Görner A, Lindauer U, Weih M, Villringer A, Dirnagl U (1995) Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:914-919
- 12 Dreier JP, Körner K, Ebert, N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1997) Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induce cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab im Druck*
- 13 Gold L, Reuter U, Back T, Arnold G, Dreier J, Dirnagl U (1997) Cortical spreading depression associated hyperemia in rats: involvement of serotonin. *Brain Res im Druck*
- 14 Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1993) Characterization of CBF response to somatosensory stimulation: model and influence of anesthetics. *Am J Physiol* 33:H1223-1228
- 15 Lindauer U, Dreier J, Angstwurm K, Rubin I, Villringer A, Einhüpl K-M, Dirnagl U (1996) Role of nitric oxide synthase inhibition in leukocyte-endothelium interaction in the rat pial microvasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1143-1152
- 16 Niwa K, Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1993) Blockade of nitric oxide synthesis in rats strongly attenuates the CBF response to extracellular acidosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:535-539
- 17 Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1997) Increased formation of reactive oxygen species following permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow im Druck*
- 18 Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U () Locally triggered release of neurotransmitters from perivascular nerves contributes to cortical spreading depression associated hyperemia in rats. *Am J Physiol im Druck*

- 19 Schreiber SJ, Megow D, Raupach A, Victorov IV, Dirnagl U (1995) Age-related changes of oxygen free radical production in the rat brain slice after hypoxia: on-line measurement using enhanced chemiluminescence. *Brain Res* 703:227-230
- 20 Villringer A, Planck J, Hock C, Schleinkofer L, Dirnagl U (1993) Near infrared spectroscopy (NIRS): A new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults. *Neurosci Lett* 154:101-104
- 21 Wolf T, Lindauer U, Obrig H, Dreier J, Back T, Villringer A, Dirnagl U (1996) Systemic nitric oxide synthase inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression in rats: A noninvasive near-infrared spectroscopy and laser-Doppler flowmetry study. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1100-1107
- 22 Wolf T, Lindauer U, Reuter U, Back T, Villringer A, Einhüpl K, Dirnagl U (1997a) Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:950-954
- 23 Wolf T, Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1997b) Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow responses to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res* 761:290-299

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zum Antragsthema:

- 1 Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ (1977) Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp Brain Res* 27:237-243
- 2 Lux HD, Neher E (1973) The equilibration time course of $[K^+]_o$ in cat cortex. *Exp Brain Res* 17:190-205
- 3 Verhaegen M, Todd MM, Warner DS (1992) The influence of different concentrations of volatile anesthetics on the threshold for cortical spreading depression in rats. *Brain Res* 581(1):153-155

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Folgende Ziele ergeben sich aus dem oben Ausgeführten für unser Projekt:

Histologischer Nachweis des Hirninfarkts als Folge der Cortical Spreading Ischemia (Studie A)

Pilotversuche haben ergeben, daß CSI im Gegensatz zu Kontrollversuchen zu ausgedehnten corticalen Hirninfarkten führt. Zur Auslösung der CSI wird in diesen Experimenten Hämoglobin und eine erhöhte K^+ -Konzentration im Subarachnoidalraum eingesetzt. Als Kontrollversuche werden alleinige subarachnoidale Hämoglobinapplikation, alleinige subarachnoidale K^+ -Erhöhung mit Auslösung normaler CSDs und die Kombination von Hämoglobin und erhöhter K^+ -Konzentration im Subarachnoidalraum unter Halothanblockade der CSD durchgeführt. Die Art und Ausdehnung des histologischen Schadens ermöglicht einen Vergleich mit

anderen Schadensmodellen (z.B. exzitotoxischer Schaden durch Glutamat, fokale Ischämie nach Mediaokklusion) und Infarktmustern beim Menschen

Vergleich der Ausbreitungscharakteristik der Cortical Spreading Hyperemia und Ischemia mit Hilfe eines Multi-functional-laser-Doppler-Systems 500 von Perimed (Studie B)

Die Ausbreitung von DC-Potential, Ionenänderungen und Blutflußwelle bei normaler CSD ist gut dokumentiert. Interessant ist, ob sich diese Parameter, insbesondere die Ausbreitung der Blutflußwelle, bei CSI verändern. Mit Hilfe von 4 in definiertem Abstand voneinander positionierten Laser-Doppler-Sonden ist eine genauere Analyse von Geschwindigkeit und räumlichen Variationen der Blutflußwelle im Cortex möglich. Die wandernde Ischämie ist zusätzlich an der pialen Oberfläche direkt für das Auge durch das Mikroskop sichtbar und kann mit einer Videokamera aufgezeichnet werden. Diese Untersuchungen können Ausgangsbasis für die Anwendung weiterer optischer Methoden sein (s. Studie H).

Welchen Einfluß haben unterschiedliche Vasodilatoren auf die Cortical Spreading Ischemia? (Studie C)

Wie bereits erwähnt, kann der Vasodilatator Nimodipin die CSI in eine fast normale CSH zurückverwandeln. In Studie C wollen wir das pharmakologische Profil der Beeinflussbarkeit von CSI durch unterschiedliche Vasodilatoren charakterisieren. Zu den untersuchten Substanzen gehört der NO-freisetzende Vasodilatator S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP), der Membran-permeable cGMP-Agonist 8-Bromo-cGMP, der teilweise NO-abhängige und teilweise NO-unabhängige Vasodilatator Adenosin sowie der NO-unabhängige Vasodilatator Papaverin. Als NO-Senker wird in diesen Untersuchungen Nitro-L-Arginin eingesetzt.

Ist die Verlängerung der Depolarisation durch NO-Senkung und extrazelluläre Kaliumerhöhung perfusionsabhängig? (Studie D)

Der Mechanismus der *in vivo* beobachteten Verlängerung des DC-Potentials bei CSI ist nach unserer Hypothese perfusionsabhängig, d.h. Folge des Energiemangels durch Ischämie und nicht direkt pharmakologisch induziert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wollen wir in Hirnschnitten untersuchen, ob CSD-assoziiertes DC-Potential und K^+ -Signal durch NO-Senkung und K^+ -Erhöhung im Gegensatz zur *in vivo*-Situation unbeeinflusst bleiben. Als Kontrolle wollen wir in unserem Hirnschnittmodell zeigen, daß auch *in vitro* eine Verlängerung beider Signale durch Energiemangel (z.B. milde Hypoxie) erfolgt.

Ist an der Erzeugung von ‚Cortical Spreading Ischemia‘ das Catecholamin- bzw. Serotonin-Re-Uptake-System beteiligt? (Studie E)

Zur Überprüfung eines serotonergen Mechanismus der Vasokonstriktion bei CSI wollen wir Ouabain bzw. die subarachnoidale K^+ -Erhöhung im pharmakologischen Protokoll der CSI durch andere Inhibitoren des Serotonin-Re-Uptake-Systems ersetzen wie z.B. den Na^+ -Kanal-Öffner Veratridin, ein tricyclisches Antidepressivum wie Amitriptylin und möglicherweise Cocain (Gillis, 1985; Weiner und Molinoff, 1994).

Zusätzlich wollen wir prüfen, ob ein 5HT₂-Antagonist wie z.B. Ritanserin die Funktion der NO⁻-Senkung im Protokoll der CSI übernehmen kann.

Welchen Effekt hat die Senkung des NO⁻-Spiegels in Kombination mit einer Inhibition der Na⁺-K⁺-ATPase durch Ouabain auf die Kopplung zwischen zerebralem Metabolismus und Blutfluß? (Studie F)

In dieser Studie wollen wir untersuchen, ob die Kopplung durch eine Kombination aus NOS-Inhibition und Ouabain auch in anderen Modellen wie fokaler Epilepsie, CO₂-Antwort und Whisker-Stimulation gestört ist, d.h. ob es auch in diesen Modellen zu einer Umkehrung der Blutflußantworten kommt.

Wie verändern sich DC-Potential und extrazelluläre Kaliumkonzentration bei Cortical Spreading Ischemia im Vergleich zur Cortical Spreading Hyperemia? (Studie G)

In dieser Studie wollen wir laminare Profile mit Kalium-sensitiven Mikroelektroden von der pialen Oberfläche bis in eine Tiefe von 200 µm durchführen. Verglichen werden die Antworten auf CSD unter Normalbedingungen, Ouabain und einer erhöhten subarachnoidalen Kaliumkonzentration. Im zweiten Teil der Studie werden DC-Potential sowie extrazelluläre Kalium- und Calciumkonzentration zwischen normaler CSD und CSI in Pia mater, Glia limitans und Cortex verglichen.

Messung von Periinfarktdepolarisationen und Cortical Spreading Ischemia mit Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) (Studie H)

CSD und Periinfarktdepolarisationen (PIDs) wurden von uns bereits mit dem Vier-Wellenlängen-Spektrometer NIRO 500 von Hamamatsu untersucht (Wolf et al., 1996; Wolf et al., 1997a; 1997b). Dabei war insbesondere die Interpretation des Signals der Cytochromoxidase durch die geringe Signaldekonvolution des NIRO 500 limitiert. Es ist geplant, mit dem uns mittlerweile zur Verfügung stehenden verbesserten Versuchsaufbau Messungen von PIDs durchzuführen, die neben validen Aussagen über den Redox-Zustand der Cytochromoxidase auch eine wesentlich höhere räumliche Auflösung versprechen. Die experimentelle fokale Ischämie wird an anästhetisierten Ratten durch irreversiblen Verschuß der A. cerebri media induziert. Die gleichen Messungen sollen auch bei CSI durchgeführt werden, um Hämoglobinoxygenierung und Oxygenierung der Atmungskette bei CSI und PIDs zu vergleichen.

Welchen Einfluß haben unterschiedliche Vasodilatoren auf Periinfarktdepolarisationen? (Studie I)

In Studie I soll in Analogie zu Studie C das pharmakologische Profil der Beeinflussbarkeit von Periinfarktdepolarisationen durch unterschiedliche Vasodilatoren charakterisiert werden. Es werden die gleichen Substanzen lokal appliziert wie in Studie C, d.h. SNAP, 8-Bromo-cGMP und Papaverin. Eine fokale Ischämie soll durch Mediaokklusion mit dem Häkchen ausgelöst werden. In dieser Studie wollen wir zusätzlich untersuchen, ob es bei Periinfarktdepolarisationen unter NO⁻-Synthase-Inhibition zu CSI-verwandten Blutflußveränderungen kommt. NO⁻-Synthase-Inhibition soll nämlich im Frühstadium einer fokalen Ischämie zu einer Infarktolumenzunahme führen, deren Mechanismus unbekannt ist. Vereinbar mit einem CSI-

Mechanismus, wird allgemein angenommen, daß Verminderung von NO⁻, welches durch endotheliale NO⁻-Synthese produziert wird, am ehesten über einen Blutfluß-senkenden Effekt in der Penumbra eines Hirninfarkts schädigend wirkt.

3.5.2 Methoden

Spezies, Narkose, Präparation:

Die vorgeschlagenen Untersuchungen werden an Ratten durchgeführt. Diese Spezies eignet sich hierfür aus folgenden Gründen: Sehr gut charakterisierte Anatomie, Histologie, Immunologie; leichte Auslösbarkeit der CSD; alle Techniken etabliert und validiert; ethische Vertretbarkeit (vgl. Katze); Zellkultursysteme (Astrozyten, Neuronen, Endothelien) und Hirnschnitte aus derselben Spezies im Labor für parallel laufende *in vitro* Ansätze verfügbar, Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Projekten im SFB.

Die Versuche werden mit zwei unterschiedlichen Anästhesieprotokollen durchgeführt: Thiopental (100 mg / kg KG i.p., bei Bedarf Nachinjektion) und Halothan/N₂O. Die Halothan/N₂O-Narkose bietet die Möglichkeit, die Tiere nach dem chirurgischen Eingriff wieder aufwachen zu lassen, um z.B. zeitlich verzögert den histologischen Schaden im Ischämiemodell zu untersuchen oder Experimente zeitlich verzögert durchzuführen.

Folgende physiologischen Parameter werden während des Experiments kontinuierlich gemessen und digital registriert: Endexpiratorischer pCO₂ und Lachgaskonzentration (Heyer Infrarot-CO₂ und N₂O-Analysator Artema), arterieller Blutdruck, rektale Körpertemperatur. Arterielle Blutgase (AVL-Blutgasanalysator) und Hämatokrit werden in geeigneten Abständen ermittelt.

Die *kranielle Fenstertechnik* wurde mehrfach von uns beschrieben (Lindauer et al., 1993; Dirnagl et al., 1991). Nach Entfernung eines 4 x 5 mm großen Knochenstückchens über dem parietalen Cortex wird die Dura mater entfernt und das Fenster mit einem Deckgläschen geschlossen. Kontinuierliche Superfusion von artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (ionale Zusammensetzung und Gasspannungen wie normaler Liquor). Über diesen Zugang Möglichkeit der Superfusion von Pharmaka, Hämoglobin sowie Änderung des ionalen Milieus. Durch das Fenster Messung des cerebralen Blutflusses (CBF) mit Laser-Doppler. Über einen kleinen temporalen Schornstein mit offenem Fenster Auslösung von CSD mit KCl (300 mM) möglich. In den künstlichen Subarachnoidalraum des Fensters ist eine Silberchlorid-Elektrode mit Agarbrücke getaucht, über die DC-Veränderungen meßbar sind. Für die Messung mit Mikroelektroden verzichten wir auf die Abdeckung des kraniellen Fensters. Die Superfusionsraten müssen wegen der Abgasung von CO₂ entsprechend erhöht werden.

Im folgenden werden die Untersuchungstechniken kurz beschrieben:

Laser-Doppler Blutflußmessung (LDF):

Die LDF-Methode wurde von uns für die Messung relativer Veränderungen des lokalen Blutflusses im Rattencortex unter Kontroll- und Ischämiebedingungen validiert (Dirnagl et al., 1989). Die Methode mißt die mikrozirkulatorische Durchblutung (Produkt aus Blutzellgeschwindigkeit und Volumen) in einem Gewebsvolumen von ca. 1 mm³. Es soll das Multifunctional laser-Doppler System 5000 von Perimed verwendet werden.

Elektrophysiologie (ionensensitive Mikroelektroden):

Für die Messungen werden sogenannte Ionenaustauscherelektroden mit Spitzendurchmessern von 2 bis 3 µm verwendet, mit denen Ionenkonzentrationsänderungen in elektrische Potentialänderungen umgesetzt werden können. Für die Messungen der extrazellulären Kaliumkonzentration wird ein auf Valinomycin basierender Austauscher eingesetzt. Als Calcium-Austauscher dient ETH 1001. Das Herstellungsverfahren geht auf Lux und Neher (1973) und Heinemann et al. (1977) zurück.

Hirnschnittuntersuchungen:

Die Hirnschnittuntersuchungen erfolgen in Perfusionskammern, die in ein Plexiglasgehäuse eingebaut sind. Das Innere des Gehäuses ist mit destilliertem Wasser gefüllt. In das Wasser wird Carbogen eingeleitet, so daß gesättigter Wasserdampf über seitlich der Kammern gelegene Schlitze zu den Präparaten aufsteigen kann. Die Hirnschnitte werden von einer artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit umspült.

Nahinfrarotspektroskopie (NIRS)

NIRS mißt nicht-invasiv Hämoglobin-Oxygenierung und Redoxzustand der Cytochromoxidase (Villringer et al., 1993; Wolf et al., 1996; 1997a; 1997b). Die Methode beruht auf der guten Penetration von nahinfrarotem Licht (ca. 700 – 1000 nm) in biologische Gewebe und der Existenz charakteristischer Absorptionsspektren von Oxyhämoglobin, Hämoglobin und der Cytochromoxidase in diesem Wellenlängenbereich. Mittlerweile steht uns ein verbessertes NIRS-Gerät zur Verfügung, das mittels einer CCD-Kamera den gesamten Spektralbereich von 700 bis 1000 nm messen kann. Überdies erlaubt uns dieser Ansatz die zeitgleiche Messung verschiedener Cortexareale mittels eines Optoden-Arrays.

Histologische Untersuchungen

Histologische Untersuchungen (intrakardiale Perfusion, HE-Färbung) werden von uns in Standardtechnik eingesetzt und werden deshalb hier nicht weiter beschrieben.

Tierversuchsgenehmigungen zur Durchführung der genannten Untersuchungen liegen vor (G0126/95, G0164/97). Gentechnologische sowie Untersuchungen am Menschen werden nicht durchgeführt.

3.5.3 Arbeitsprogramm

Histologischer Nachweis des Hirninfarkts als Folge der Cortical Spreading Ischemia (Studie A)

Standardpräparation eines kraniellen Fensters unter Halothan-Narkose. Da Halothan die Auslösung von CSD stark inhibiert (Saito et al., 1995) wird das eigentliche Experiment mit Blutfluß- und DC-Potentialmessung nach 48 Stunden unter Thiopental-Narkose durchgeführt. Die kurze Experimentdauer ohne weitere chirurgische Maßnahmen (bis 3 Stunden) erlaubt eine einmalige Gabe, so daß die Tiere nach dem Experiment wieder aufwachen. 24 bzw. 48 Stunden nach dem Experiment wird eine intrakardiale Perfusion zur Fixierung durchgeführt. Im

A1 Dreier/Dirnagl

Anschluß erfolgt eine HE-Färbung zum Nachweis des histologischen Schadens durch ‚Cortical Spreading Ischemia‘.

Protokoll I (Schadensnachweis der ‚Cortical Spreading Ischemia‘ unter Thiopental): Superfusion von Hämoglobin (2 mM) plus subarchnoidalem K^+ (35 mM) unter Thiopentalnarkose (n = 5)

Protokoll II (Hämoglobinkontrolle): Superfusion von Hämoglobin (2 mM) plus subarchnoidalem K^+ (3 mM) unter Thiopentalnarkose (n = 2)

Protokoll III (Kaliumkontrolle): Erhöhung der subarchnoidalen Kaliumkonzentration bis mehrere spontane CSDs unter Thiopentalnarkose auftreten, ohne Hämoglobin (n = 2)

Protokoll IV (Hämoglobin- und Kaliumkontrolle unter Halothan, welches die Spontanauslösung von CSD verhindert): Superfusion von Hämoglobin (2 mM) plus subarchnoidalem K^+ (35 mM) (n = 2)

Protokoll V (Kaliumkontrolle unter Halothan): Erhöhung der subarchnoidalen Kaliumkonzentration auf 250 mM, so daß spontane CSDs unter Halothan auftreten (n = 2)

Protokoll VI (Schadensnachweis der ‚Cortical Spreading Ischemia‘ unter Halothan): Superfusion von Hämoglobin (2 mM) und subarchnoidalem K^+ (250 mM) (n = 2)

Studie A, n = 15

Vergleich der Ausbreitungscharakteristik der Cortical Spreading Hyperemia und Ischemia mit Hilfe eines Multi-functional-laser-Doppler-Systems 500 von Perimed (Studie B)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Erzeugung der CSI durch Erhöhung der subarchnoidalen K^+ -Konzentration auf 20 mM kombiniert mit entweder Hämoglobin oder L-NA, Vergleich der Ausbreitungscharakteristik von CSI und CSH mit 4-Kanal Laser-Doppler

Standardpräparation (s.o.), Messung des DC-Potentials mit Mikroelektrode, Erzeugung der CSI durch Erhöhung der subarchnoidalen K^+ -Konzentration auf 20 mM kombiniert mit L-NA, Dokumentation von CSH und CSI mit einfacher Videokamera

Studie B, n = 20

Welchen Einfluß haben unterschiedliche Vasodilatoren auf die Cortical Spreading Ischemia? (Studie C)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Erzeugung der CSI durch Erhöhung der subarchnoidalen K^+ -Konzentration auf 20 mM kombiniert mit L-NA, Vergleich mit zusätzlicher topischer Applikation des NO-Donors S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (Rückverwandlung der CSI in CSH?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Erzeugung der CSI durch Erhöhung der subarchnoidalen K^+ -Konzentration auf 20 mM kombiniert mit Hämoglobin, Vergleich mit zusätzlicher topischer Applikation des Calcium-Antagonisten Nimodipin (Rückverwandlung der CSI in CSH?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Erzeugung der CSI durch Erhöhung der subarchnoidalen K^+ -Konzentration auf 20 mM kombiniert mit L-NA, Vergleich mit zusätzlicher topischer Applikation des cGMP-Agonisten 8-Bromo-cGMP (Rückverwandlung der CSI in CSH?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Erzeugung der CSI durch Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration auf 20 mM kombiniert mit L-NA, Vergleich mit zusätzlicher topischer Applikation des Vasodilatators Adenosin (Rückverwandlung der CSI in CSH?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Erzeugung der CSI durch Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration auf 20 mM kombiniert entweder mit L-NA, Vergleich mit zusätzlicher topischer Applikation des NO^- -unabhängigen Vasodilatators Papaverin (Rückverwandlung der CSI in CSH?)

In jeder Gruppe etwa $n = 10$, d.h. Studie C insgesamt $n = 50$

Ist die Verlängerung der Depolarisation durch NO^- -Senkung und extrazelluläre Kaliumerhöhung perfusionsabhängig? (Studie D)

Hirnschnittpräparation (s.o.), Messung von DC-Potential und extrazellulärem K^+ -Signal mit Mikroelektrode, Erzeugung von CSD durch topische K^+ -Applikation, Einwaschen von Hämoglobin oder L-NA in Kombination mit erhöhter K^+ -Konzentration in der Perfusionslösung (unveränderte Konfiguration des DC-Potentials und K^+ -Signals im Vergleich zur Kontrolle ?)

Hirnschnittpräparation (s.o.), Messung von DC-Potential und extrazellulärem K^+ -Signal mit Mikroelektrode, Erzeugung von CSD durch topische K^+ -Applikation, Hypoxie durch Ersatz von Carbogen- durch Stickstoffbegasung (Verlängerung von DC-Potential und K^+ -Signal im Vergleich zur Kontrolle ?)

In jeder Gruppe etwa $n = 5$, d.h. Studie D insgesamt $n = 10$

Ist an der Erzeugung der ‚Cortical Spreading Ischemia‘ das Catecholamin- bzw. Serotonin-Re-Uptake-System beteiligt? (Studie E)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Superfusion von L-NA kombiniert mit Ouabain (Erzeugung von CSI?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Superfusion von L-NA kombiniert mit Veratridin (Erzeugung von CSI?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Superfusion von L-NA kombiniert mit Amitriptylin (Erzeugung von CSI?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Superfusion von L-NA kombiniert mit Cocain (Erzeugung von CSI?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, intravenöse Gabe von Ritanserin in Kombination mit topischer Applikation von Ouabain (Erzeugung von CSI?)

In jeder Gruppe etwa $n = 10$, d.h. Studie E insgesamt $n = 50$

Welchen Effekt hat die Senkung des NO^- -Spiegels in Kombination mit einer Inhibition der $Na^+ - K^+ - ATPase$ durch Ouabain auf die Kopplung zwischen zerebralem Metabolismus und Blutfluß? (Studie F)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Superfusion von L-NA kombiniert mit Ouabain, CO_2 -Antwort (Umkehrung der Blutflußantwort?)

A1 Dreier/Dirnagl

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Superfusion von L-NA kombiniert mit Ouabain, Auslösung epileptischer Anfälle durch intravenöse Gabe von Pilocarpin (Umkehrung der Blutflußantwort?)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung, DC-Potentialmessung und Messung somatosensorischer Potentiale, Superfusion von L-NA kombiniert mit Ouabain, Whiskerstimulation (Umkehrung der Blutflußantwort?)

In jeder Gruppe etwa n = 10, d.h. Studie F insgesamt n = 30

Wie verändern sich DC-Potential und extrazelluläre Kaliumkonzentration bei ‚Cortical Spreading Ischemia‘ im Vergleich zur ‚Cortical Spreading Hyperemia‘? (Studie G)

Präparation eines offenen kraniellen Fensters (s.o.), CBF-Messung und Messung mit ionensensitiven Mikroelektroden (laminare Profile von der Pia bis in eine Cortextiefe von 200 µm) Messung unter Kontrollbedingungen und unter Erhöhung des subarachnoidalen K⁺ auf 20 mM

(Veränderung der Potentialkonfiguration?)

Messung unter Kontrollbedingungen und unter Ouabain (Veränderung der Potentialkonfiguration?)

Messung der extrazellulären Kaliumkonzentration während CSH und CSI

Messung der extrazellulären Calciumkonzentration während CSH und CSI

In jeder Gruppe etwa n = 10, d.h. Studie G insgesamt n = 40

Messung von Periinfarktdepolarisationen und Cortical Spreading Ischemia mit Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) (Studie H)

Ausdünnung der Schädelkalotte zur Messung von Konzentrationsänderungen von Oxyhämoglobin, Deoxyhämoglobin und Cytochromoxidase an mehreren Punkten des Cortex mit NIRS-Optoden, kombiniert mit DC-Potentialmessung, Spontaninduktion von Periinfarktdepolarisationen durch permanente Mediaokklusion mit der Häkchenmethode

Standardpräparation (s.o.) mit Nahinfrarotspektroskopie und DC-Potentialmessung, Superfusion von L-NA kombiniert mit Erhöhung der subarachnoidalen Kaliumkonzentration (Vergleich normale CSH mit CSI)

Standardpräparation (s.o.) mit Nahinfrarotspektroskopie und DC-Potentialmessung, Superfusion von Hämoglobin kombiniert mit Erhöhung der subarachnoidalen Kaliumkonzentration (Vergleich normale CSH mit CSI)

In jeder Gruppe etwa n = 10, d.h. Studie H insgesamt n = 30

Welchen Einfluß haben unterschiedliche Vasodilatoren auf Periinfarktdepolarisationen? (Studie I)

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Mediaokklusion mit dem Häkchen, Vergleich der Blutflußantworten auf Periinfarktdepolarisationen mit und ohne topische Applikation des NO-Donors S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Mediaokklusion mit dem Häkchen, Vergleich der Blutflußantworten auf Periinfarktdepolarisationen mit und ohne topische Applikation des c-GMP-Analogons 8-bromo-cGMP

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Mediaokklusion mit dem Häkchen, Vergleich der Blutflußantworten auf Periinfarktdepolarisationen mit und ohne topische Applikation des NO⁻-unabhängigen Vasodilatators Papaverin

Standardpräparation (s.o.) mit CBF-Messung und DC-Potentialmessung, Mediaokklusion mit dem Häkchen, Vergleich der Blutflußantworten auf Periinfarktdepolarisationen mit und ohne topische Applikation des NO⁻-Synthase Inhibitors L-NA

In jeder Gruppe etwa n = 10, d.h. Studie H insgesamt n = 40

3.5.4 Zeitplan

Alle beschriebenen Ansätze sind bereits im Labor der Experimentellen Neurologie realisiert, es kann unmittelbar mit den Untersuchungen begonnen werden. Die Mikroelektroden können im Labor von Herrn Prof. Heinemann in der Abteilung für Neurophysiologie gebaut werden. Im ersten Antragsjahr sollen die Studien A bis D durchgeführt werden. Hierzu müssen zusätzlich zu den bereits vorliegenden Experimenten 55 erfolgreiche Experimente durchgeführt werden, bei einer Erfolgsquote der Präparation von etwa 70 % also insgesamt 79 Präparationen. Unter Berücksichtigung der Datenauswertung, dem Schreiben von Manuskripten, Kongreßbesuchen, Ausfallzeiten etc. ist ein Zeitraum von einem Jahr hierfür realistisch. Die Studien E/F können dann im zweiten Antragsjahr durchgeführt werden und die Studien G-I im dritten Antragsjahr. Durch die bis dahin vorliegenden Ergebnisse ist jedoch mit einer Modifikation der Protokolle zu rechnen, so daß darüber hinausgehende Aussagen zum Zeitplan nicht möglich sind.

Literatur:

Bis auf die folgenden Arbeiten bezieht sich die zitierte Literatur auf eigene Vorarbeiten und findet sich daher am Ende von Punkt 3.4.

Saito R, Graf R, Hubel K, Taguchi J, Rosner G, Fujita T, Heiss WD (1995) Halothane, but not alpha-chloralose, blocks potassium-evoked cortical spreading depression in cats. *Brain Res* 699 (1):109-115

Gillis CN (1985) Peripheral metabolism of serotonin. In: Vanhoutte PM ed. *Serotonin and the cardiovascular system*, New York, Raven Press, pp 27-36

Weiner N, Molinoff PB (1994) Catecholamines. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB eds. *Basic Neurochemistry*, New York, Raven Press, pp 261-281

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Eine enge Kooperation des Projekts besteht auf inhaltlicher und methodischer Ebene mit Prof. Heinemann, in dessen Labor der Bau der Mikroelektroden erfolgen soll. Diese Kooperation besteht seit vielen Jahren. Einer der Antragsteller hat seine wissenschaftliche Tätigkeit als Doktorand von Herrn Prof. Heinemann in Köln begonnen. Insgesamt sind im Verlauf dieser Kooperation 13 gemeinsame Originalarbeiten und Buchbeiträge entstanden.

A1 Dreier/Dirnagl

Eine enge Kooperation besteht auch mit der Gruppe Lindauer/Klee, die die Interaktion von K^+ und NO auf der Ebene der isolierten Arterie bzw. auf Ionenkanalebene glatter Muskelzellen der cerebralen Zirkulation untersuchen werden. Gegebenfalls können Protokolle aus der *in vivo*-Ebene auf diese Weise direkt an isolierten Arterien bzw. in ihrer Wirkung auf bestimmte Ionenkanäle ausprobiert werden. Es existieren bereits zahlreiche gemeinsame Publikationen. Beziehungen zum Ischämieprojekt (Dirnagl), das sich mit der Rolle von Mikroglia beim Schlaganfall beschäftigt, bestehen insbesondere über histologische Fragestellungen (z.B. Vergleich fokale Ischämie nach Mediaokklusion – Cortical Spreading Ischemia).

Kooperationspartner außerhalb des Sonderforschungsbereichs sind Prof. M. Lauritzen (Neurophysiologie, University of Copenhagen; Spreading Depression, Dreier et al., im Druck; Barfod et al., 1997), Prof. I. Victorow (Brain Research Institute, Moskau; Histologie), Prof. G. Stoltenburg (Neuropathologie, Rudolf Virchow Klinikum, Berlin; Histologie, SAB) und Prof. A. Villringer (Klinische Forschergruppe, Neurologie, Charité; Nahinfrarot-Spektroskopie; Dreier et al., 1995; im Druck; Wolf et al., 1996; 1997a; 1997b).

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
 SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
 I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2 Hj 1998			1999			2000			1 Hj 2001		
Verg-Gr	Anzahl	Verg-Gr	Anzahl	Betrag in DM	Verg.- Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.- Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.- Gr.	Anzahl	Betrag in DM
		IIa	1	42600	IIa	1	85200	IIa	1	85200	IIa	1	42600
Zus.		zus.	1	42600	zus.	1	85200	zus.	1	85200	zus.	1	42600
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		9957			19914			19914			9957
		515		7676									
		Zusammen		17633	Zusammen		19914	zusammen		19914	zusammen		9957
I		Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:		
		57325			-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	1. Dreier, Jens P. Dr. med.	Neurologie	Neurologie	10/Woche		Ila
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	2. Dirnagl, Ulrich PD Dr. med.	Neurologie	Neurologie	5/Woche		Heisenberg Stipendiat
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-
Ergänzungsausstattung	3. Wolf, Tilo Dr. med.	Neurologie	Neurologie	40/Woche		Ila
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

1. Dreier, Jens P. Dr. med. : Herr Dreier kann dem Projekt neben seinen klinischen Verpflichtungen als Assistent der Neurologischen Klinik etwa 10 Stunden / Woche widmen. Herr Dreier hat drei Jahre bei Herrn Prof. Heinemann in Köln am Hirnschnitt der Ratte mit Mikroelektroden über epileptische Aktivität und Spreading Depression gearbeitet. Seit 1993 ist er in der Neurologischen Klinik tätig und hat etwa zweieinhalb Jahre ganztägig mit kranialen Fenstertechniken *in vivo* an der Ratte über Blutflußregulation und Spreading Depression geforscht. Herr D. hat bisher durch Förderung der DFG in diesem Projekt einen wichtigen Teil der Experimente durchgeführt. Er ist nun auf einer Hausstelle der Neurologischen Klinik auch klinisch tätig (d.h. er befindet sich in seiner Facharztausbildung und strebt die Habilitation auf dem Gebiet der Neurologie an). Er kann neben seinen klinischen Verpflichtungen als Assistent der Neurologischen Klinik etwa 10 Stunden / Woche dem Projekt widmen. Herr D. hat jahrelange Expertise in Brain-Slice und tierexperimentellen Techniken im allgemeinen und in der SD-Forschung im Besonderen, sein bisheriger Beitrag zu dem Projekt wird aus dem Literaturverzeichnis unmittelbar evident. Das Phänomen der Spreading Ischemia, welches wesentlicher Gegenstand dieses Antrages ist, wurde von ihm entdeckt. Er betreut zur Zeit drei medizinische Doktoranden, welche sich mit der CSI befassen. Zwei weitere von ihm betreute Doktoranden haben den experimentellen Teil ihrer Arbeit bereits abgeschlossen.

2. Dirnagl, Ulrich PD Dr. med. : Als Oberarzt der Neurologischen Klinik und Leiter der experimentellen Neurologie kann Herr Dirnagl neben der Betreuung anderer Projekte ca. 5 Stunden / Woche dem Projekt widmen. Herr Dirnagl wird die Projektplanung und Konzeption der Versuche gemeinsam mit Herrn Dreier übernehmen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

entfällt

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Beantragt wird eine wissenschaftliche Assistentenstelle nach BAT IIa für Dr.med. Tilo Wolf zur:

- Durchführung der Tierexperimente
- Auswertung der Experimente
- Adaptation der optischen Technologien (Ganzspektrum NIRS, Multichannel-Laser Doppler).
- Präsentation der Ergebnisse, Verfassen von Manuskripten etc.

Herr W. ist ein junger, engagierter Neurowissenschaftler, der von Anfang an an dem Projekt beteiligt war (siehe unten). Er hat an der Neurologischen Klinik über Blutflußveränderungen bei Spreading Depression und Periinfarktdepolarisationen promoviert. Er beherrscht alle im Antrag vorgeschlagenen *in vivo* Techniken (Schlaganfallmodelle, Kraniale Fenstertechniken etc.). Dazu kommt die Handhabung einer Reihe von optischen und elektrophysiologischen

A1 Dreier/Dirnagl

sowie histologischen Techniken. Dies ist von entscheidender Bedeutung, insofern die Techniken sehr komplex und lernaufwendig sind, und so eine Einarbeitungsphase entfällt. Herr W. würde seine gesamte Arbeitszeit dem Projekt widmen. Herr W. ist auf diesem Gebiet mittlerweile ein etablierter und international bekannter Wissenschaftler und hat seine Ergebnisse vielbeachtet international vorgestellt (u.a. bei: Brain95 in Köln und Brain97 in Baltimore (USA), beim Annual Meeting der Society for Neuroscience (San Diego 1995, Washington 96 und New Orleans 97), beim Treffen der International Society of Oxygen Transport to Tissue 1995 in Istanbul, beim International Headache Research Seminar 1994 und 1997, dem Meeting der International Headache Society 1997 in Amsterdam, sowie beim World Stroke Congress 1996 in München). Herr W. war am Aufbau der Stroke Unit der Neurologischen Klinik beteiligt und betreute die Kopfschmerzambulanz, er ist somit auch in die klinische Kopfschmerz und Schlaganfallproblematik eingearbeitet und kann so aktiv an der Verbindung von klinischen Fragestellungen und experimentellen Ansätzen teilhaben. Wichtig ist auch, daß er mit Herrn Dreier im Sinne einer Rotation zwischen experimenteller und klinischer Tätigkeit wechseln kann, und so eine Kontinuität der Projektarbeiten jederzeit sichergestellt wird.

Wichtige Publikationen von Herrn Wolf im Projekt bisher:

- Wolf T, Lindauer U, Obrig H, Dreier J, Back T, Villringer A, Dirnagl U (1996) Systemic nitric oxide synthase inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression in rats: A noninvasive near-infrared spectroscopy and laser-Doppler flowmetry study. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1100-1107
- Wolf T, Lindauer U, Reuter U, Back T, Villringer A, Einhüpl K, Dirnagl U (1997) Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:950-954
- Wolf T, Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1997) Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow responses to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res* 761:290-299
- Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1997) Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induce cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* im Druck
- Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U () Locally triggered release of neurotransmitters from perivascular nerves contributes to cortical spreading depression associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* im Druck

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung entfällt

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben				
Stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	3.000	6.000	6.000	3.000
Werden als Ergänzungsausstattung beantragt				
Verbrauchsmaterial	9.957	19.914	19.914	9.957
+ Kleingeräte	7.676	-	-	-

Geräte im Einzelwert bis zu DM 20.000 (brutto) ohne Fahrzeuge

2 Precidor Spritzenpumpen Typ 5003 (Einsbach, INFORS HT) zusammen: DM 7.676

Die Superfusion im Subarachnoidalraum unter dem geschlossenen kraniellen Fenster stellt höchste Anforderungen an die Infusionspumpe, da schon kleine Druckschwankungen zu plötzlichen Blutungen führen, die zum Abbruch des Experiments zwingen. Auch die intravenöse Gabe z.B. von Nimodipin muß angesichts der minimalen Infusionsraten bei der Ratte mit hoher Genauigkeit erfolgen, um z.B. systemische Effekte wie RR-Abfall zu vermeiden. Mit der Precidorpumpe haben wir dabei exzellente Erfahrungen gemacht. Superfusion und intravenöse Infusion laufen mit unterschiedlichen Raten gleichzeitig während des Experiments. Daher sind zwei Pumpen erforderlich.

Verbrauchsmaterial und Versuchstiere pro Jahr

1. Versuchstiere

Wistar Ratten: 100 Stück a DM 20 (BGVV Berlin) DM 2.000

Begründung: Die Tiere müssen vom BGVV bezogen werden und können im Tierstall der Charité nur kurzfristig gehalten werden.

2. Chemikalien

Narkotika und Chemikalien zur Präparation: Halothan, Pentobarbital, Urethan, Chloralose, Paladur etc. DM 4.000

Substanzen zur topischen Superfusion: Amitriptylin, Veratridin, Cocain, SNAP, Ritanserin, Papaverin, Adenosin, Nitro-L-Arginin, 8-bromo-cGMP etc. DM 6.000

A1 Dreier/Dirnagl

Begründung: Es handelt sich hierbei um die zur Durchführung der kraniellen Fensterversuche notwendigen Verbrauchsmaterialien.

3. Sondergase zum Begasen des künstlichen Liquors, Blutgasanalyse DM 2.000

Begründung: Die genannten Sondergase stellen spezielle Mischungen dar (z.B. Liquorgas: 6,7 % CO₂, 70 % N₂, 23,3 % O₂), die bei der Fa. AGA Berlin bezogen werden bzw. bei Fa. AVL für den Blutgasanalysator

4. Laser-Doppler Flowsonde DM 1.414

Begründung: Die Laser-Doppler Flowsonde ist sehr empfindlich (Glasfaserbruch durch Einspannen im Mikromanipulator etc.). Erfahrungsgemäß wird auch bei sorgfältigstem Umgang einmal pro Jahr eine neue benötigt

5. Verbrauchsmaterial für Mikroelektroden DM 2.000

Begründung: Für den Bau von Mikroelektroden werden spezialisiertes doppelläufiges Theta-Glas, Silberchlorid-Draht, Ionenaustauscher etc. benötigt.

6. Speichermedien zur Datenspeicherung (DAT-Tapes, Streamer-Tapes und Disketten) DM 2.000

Begründung: Eine Vielzahl von Parametern wird kontinuierlich AD-gewandelt und auf Festplatte gespeichert (DC-Signale, CBF, Blutdruck, etc.). Die Daten müssen periodisch abgespeichert werden.

7. Papier zur Multiparameterregistrierung DM .500

Begründung: Aus Datensicherheitsgründen und zur besseren Trenderkennung wird neben der digitalen Registrierung analog mitgeschrieben. Hierfür wird Papier benötigt.

Summe Verbrauchsmaterial pro Jahr DM 19.914
(1995 und 1998 deshalb nur die halbe Summe)

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Alle Preisangaben in DM einschließlich Mehrwertsteuer, Transportkosten usw.

<i>Bezeichnung des Gerätes</i>	<i>Einzelpreis 2. Hj. 1998</i>	<i>Beantragt für das Haushaltsjahr</i>		
		<i>Einzelpreis 1999</i>	<i>Einzelpreis 2000</i>	<i>Einzelpreis 1. Hj. 2001</i>
Multi-functional laser Doppler system 5000 von Perimed	57.325	-	-	-
<i>Summe</i>	57.325	-	-	-

A1 Dreier/Dirnagl

Begründung: Eine genauere Analyse der Ausbreitungscharakteristik der Blutflußveränderungen im Cortex ist nur mit mindestens drei Laser-Doppler Sonden möglich. Mit drei Sonden kann nämlich auch dann die Geschwindigkeit berechnet werden, wenn, wie in unserem Fall, nicht genau bekannt ist, woher die Blutflußwelle kommt. Dazu müssen die drei Sonden in definiertem Abstand voneinander und im rechten Winkel angeordnet sein. Unter diesen Bedingungen ist dann der Geschwindigkeitsvektor berechenbar. Durch die vierte Sonde kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Geschwindigkeitsänderungen homogen sind. Diese Blutfluß-Messungen sollen mit den Ergebnissen der Nahinfrarotspektroskopie verglichen werden, die die Konzentration des oxygenierten Hämoglobins an mehreren Positionen mißt. Bezüglich Gerätequalität und -leistung bestehen mit dem Vorgängermodell des Periflux 5000 von Perimed in unserem Labor sehr gute Erfahrungen.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A2

3.1.1 Thema:

Einfluß von Astrozyten auf Gehirndothelzellen bei Hypoxie

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neurobiologie, Pathobiochemie, Molekularbiologie

3.1.3 Leiter:

PD Dr. Blasig, Ingolf E., 02.09.1951

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie,

Forschungsverbund Berlin, e.V.,

Alfred-Kowalke-Str. 4, Berlin 10315

Telefon: (030) 5163 290

Fax: (030) 51 28014

email: iblasig@fmp-berlin.de

Befristung der Stelle des Projektleiters ja nein, befristet bis zum:

3.1.4 Weitere Förderung: Das Projekt wird derzeit nicht in anderen DFG-Verfahren gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen:

- Untersuchungen am Menschen ja nein
- klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie ja nein
- Tierversuche ja nein
- gentechnologische Versuche ja nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs:

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs-ausgaben	Investition	gesamt
bis 1995	19,9	10,0	-	29,9
1996	41,8	20,0	-	61,8
1997	41,8	20,0	-	61,8
1. Hj. 1998	21,3	10,0	-	31,3
Zwischen-summe	124,8	60,0	-	184,8
2. Hj. 1998	42,6	10	-	52,6
1999	85,2	38	-	123,2
2000	85,2	20	-	105,2
1. Hj. 2001	42,6	10	-	52,6

3.2 Zusammenfassung

Im Vorprojekt wurde u.a. gezeigt, daß Astrozyten (AZ) einen wesentlichen Einfluß auf die Ausbildung von Blut-Hirnschranken(BHS)-Funktionen in Gehirnkapillarendothelzellen (EZ) ausüben. Außerdem waren EZ in Kokultur mit AZ weniger empfindlich gegenüber Hypoxie und anderen Schädigungen. Es wurde gefunden, daß sich BHS-Eigenschaften auch über den NO/cGMP-abhängigen Signaltransduktionsweg beeinflussen lassen. Deshalb soll zunächst geklärt werden, welche EZ-Proteine über NO/cGMP phosphoryliert werden, und inwieweit es sich dabei um Proteine handelt, die für die BHS essentiell sind. Weiterhin soll untersucht werden, welche Faktoren in EZ durch AZ induziert und ob diese Faktoren durch Hypoxie beeinflußt werden. Die Untersuchungen werden mittels differential Display PCR, Immunoblotting und 2-D-Elektrophorese durchgeführt, um herauszufinden, ob es zu Veränderungen auf mRNA- und/oder Proteinebene kommt. Es wird erwartet, daß die Arbeiten wesentliche Aufschlüsse über Mechanismen ergeben, die an der Bildung bzw. Aufrechterhaltung der BHS beteiligt sind, und daß neue Ansätze zum Schutz der BHS abgeleitet werden können.

3.3 Stand der Forschung

Die BHS wird durch spezifische Wechselwirkungen zwischen EZ gebildet. Es ist unklar, welche Mechanismen an der Induktion bzw. Aufrechterhaltung der BHS beteiligt sind. Es wird angenommen, daß durch den Einfluß von AZ in den EZ BHS-Eigenschaften induziert werden. Eine wesentliche BHS-Eigenschaft sind Zonulae occludens oder tight junctions (tj). Sie befinden sich zwischen EZ als kontinuierliche Verschmelzung der Zellmembranen benachbarter EZ. Dadurch wird die parazelluläre Permeation durch die BHS verhindert (Dichtheit, Barrierefunktion). Andererseits enthalten EZ potente Membrantransporter, z.B. für Glucose, Aminosäuren, Ionen und andere für das ZNS essentielle Stoffe (selektive Transportfunktion). Typisch für die BHS sind weiterhin unspezifische Cholinesterase, alkalische Phosphatase, Mo-

noaminoxidase and aromatische Decarboxylase, die für die Neurotransmittermetabolisierung relevant sind. γ -Glutamyltransferase gilt ebenfalls als spezielles BHS-Enzym, das für den Aminosäuretransport Bedeutung hat. Darüber hinaus sind Immunglobulin-ähnliche Glycoproteine (Gruppenname OX-47) zu nennen, die untereinander große Homologien aufweisen. Sie enthalten 2 extrazelluläre C2-Domänen, Membran-Spannregion und Zytoplasmaschwanz (z.B. Neurothelin, IW 5-Antigen, HT 7-Antigen, Gp42, Basagin, OX-47; 41-52 kDa). Sie erscheinen gleichzeitig mit dem Entstehen der BHS und werden mit Transzytoseprozessen in Zusammenhang gebracht (Davson und Segal, 1996).

Für die Aufrechterhaltung der Dichtheit kommen verschiedene Proteine in Frage. Am bekanntesten ist ZO-1. Dies ist ein peripheres Membranprotein (210-225 kDa) auf der zytoplasmatischen Seite der tj und wird auch als zytoplasmatisches Plaque-Protein bezeichnet (Anderson und van Italie, 1995). ZO-1 ist wahrscheinlich unter Vermittlung weiterer Proteine (evtl. Cingulin, 7H6) mit Aktin-Mikrofilamenten des Zytoskeletts assoziiert, die sich direkt unterhalb der Zellmembran befinden (Lum und Malik, 1994; Jesaitis *et al.*, 1994). Cingulin und 7H6 sind ebenfalls Zytoplasma-Plaque-Proteine an tj (Anderson und van Italie, 1995). Occludin (65 kDa) ist ein transmembranales Protein im Bereich der tj mit 4 Spannsegmenten am N-Terminus (Furuse *et al.*, 1993, Anderson und van Italie, 1995). Es bindet wahrscheinlich an Occludin benachbarter EZ (Anderson und van Italie, 1995). Jedoch steht der Beweis noch aus, daß eine solche Wechselwirkung tatsächlich die parazelluläre Permeation verhindert. Mit Antikörpern gegen zerebrale Mikrogefäße (Anti-EBA) wurden 3 Proteine (30, 25 und 23,5 kDa) an der luminalen Gefäßoberfläche beschrieben, die ebenfalls als spezifische tj-Proteine betrachtet werden (Sternberger und Sternberger, 1997).

Neben den genannten Proteinen werden bestimmte Zytoskelettproteine mit tj-Strukturen in Verbindung gebracht. Dazu zählt zytoplasmatisches Actin (46 kDa), worüber kontraktile Mechanismen möglicherweise tj kontrollieren (Lum and Malik, 1996). VASP (vasodilatator-stimulated phosphoprotein) ist ein solches Zytoskelettprotein (unphosphoryliert 46 kDa, phosphoryliert 50 kDa), das durch NO- oder cGMP-abhängige Phosphorylierung in Aortaendothelzellen die parazelluläre Permeation herabsetzt. Es kann weitere Zytoskelettproteine, wie Vinculin, α -Actinin oder Radixin binden, deren genaue Funktion bei Zell-Zell-Wechselwirkungen allerdings unklar ist (Draijer *et al.*, 1995).

Für adhaerens junctions (Zonula adhaerens, Zytoskelettkontakte zwischen Zellen über die Zellmembran hinweg) sind Cadherine von Bedeutung, deren genaue Funktion für die Regulation bzw. Wechselwirkung von Membran- und Zytoskelettproteinen ebenfalls noch unklar sind. Cadherine sind Transmembranproteine; sie können sich in der Nähe von tj befinden und ebenfalls die parazelluläre Dichtheit beeinflussen. Darüber hinaus ist die Bildung eines Komplexes mit dem gleichfalls in diesem Bereich lokalisierten Catenin (intrazelluläres Anheftungsprotein zum Zytoskelett) beschrieben, wobei die Tyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin im E-Cadherin/Catenin-Komplex die Dichtheit der tj verminderte (Staddon *et al.*, 1995).

Von den genannten Proteinen ist insgesamt der Feinmechanismus, über den sie BHS-Eigenschaften bedingen, und letztendlich ihre genaue Bedeutung für die Aufrechterhaltung der BHS nicht klar. Insgesamt wird angenommen, daß es sich dabei, wie für Occludin gezeigt, um transmembranale Proteine handelt, die intrazellulär mit dem Zytoskelett und extrazellulär mit benachbarten EZ in Wechselwirkung treten und sowohl intra- als auch extrazellulär reguliert werden können.

Ebenso unklar sind die Signalwege, die die Dichtheit der BHS beeinflussen. Es gibt Hinweise, daß über cAMP-abhängige Prozesse die BHS dichter wird (Rubin *et al.*, 1991). Auch Retinoesäure (el Hafny *et al.*, 1996) scheint über Signaltransduktionsprozesse im Sinne einer Verstärkung Einfluß auf BHS-Eigenschaften zu nehmen. Darüber hinaus ist mehrfach gezeigt worden, daß Kokultivierung mit AZ bzw. Astrozytomazellen (Meyer *et al.*, 1991), AZ-Bestandteilen oder AZ-konditioniertem Medium (el Hafny *et al.*, 1996) BHS-Eigenschaften in EZ verbessert. Allerdings ist bisher unklar, welches dafür die entscheidenden Faktoren sind. Es wird vermutet, daß es sich dabei um lösliche Peptide handelt (Roux *et al.*, 1994).

Widersprüchliche Angaben zur Beeinflussung der Dichtheit von Endothelzellbarrieren gibt es hinsichtlich cGMP und NO. Zunächst galt als gesichert, daß cGMP die Integrität der BHS verringert (Rubin *et al.*, 1991); andere Untersuchungen belegen dagegen, daß es die parazelluläre Permeation durch Endothelzellmonolayer herabsetzen kann (Draijer *et al.*, 1995). Ähnliches gilt für NO; elektrophysiologische Untersuchungen weisen auf eine regulatorische Bedeutung in der BHS (Janigro *et al.*, 1994). Außerdem wurde unter Vasodilatoren, die über NO-Liberation/cGMP wirken, eine reduzierte parazelluläre Permeation beobachtet (Draijer *et al.*, 1995). Andererseits kann NO auch zur Zunahme der Permeabilität beitragen (Shukla *et al.*, 1996). Letzteres könnte jedoch durch die dabei eingesetzten sehr hohen Konzentrationen bedingt sein, die zytotoxische Effekte hervorrufen. Ein anderer unklarer Einflußfaktor sind Glutamatrezeptoren. *In vivo*-Untersuchungen deuten darauf hin, daß Glutamantagonisten protektiv auf die BHS wirken können (Miller *et al.*, 1996; Belyaev *et al.*, 1995). Allerdings besteht hier das Problem, daß bisher nicht eindeutig geklärt ist, welche Glutamatsubrezeptoren in EZ vorkommen.

Schließlich gibt es eine Reihe von Prozessen, die zumindest zur partiellen Öffnung der BHS führen können. Dazu sind Schädigungszustände wie Ischämie/Reperfusion bzw. Hypoxie/Reoxygenierung oder entzündliche Reaktionen zu zählen, in deren Ergebnis eine Migration von Leukozyten durch die BHS erfolgen kann. Es wurde gezeigt, daß NO bei der Wechselwirkung von Leukozyten und Endothel eine bedeutende Rolle spielt (Lindauer *et al.*, 1996). Dabei scheinen reaktive Spezies, wie z.B. H_2O_2 (Kondo *et al.*, 1996) oder Intermediate der Lipidperoxidation (Stanimirovic *et al.*, 1995) und bestimmte Zytokine, z.B. $TNF\ \alpha$ (Lefer und Ma, 1993) eine vermittelnde Rolle zu spielen. Reaktive Spezies können direkt über eher unspezifische Veränderungen an Membranstrukturen zu BHS-Schäden führen. Dabei sind auch Schäden an tj-Proteinen vorstellbar. Außerdem muß generell bei hypoxischem Energiemangel mit Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol aus extra- und intrazellulären Reservoirs gerechnet werden. Ca^{2+} stimuliert z.B. die Phospholipase A_2 , wodurch die Arachidonsäure-Kaskade aktiviert und Schäden verstärkt werden können.

Reaktive Spezies aktivieren darüber hinaus die Proteinkinase C (PKC) bei gleichzeitiger Inaktivierung bestimmter Proteinphosphatasen (Suzuki *et al.*, 1997). Außerdem wird Phospholipase C aktiviert, wodurch Ca^{2+} - und PKC-abhängige Prozesse verstärkt werden dürften. Die PKC-bedingte Phosphorylierung von Vinculin, α -Actinin und Cateninen führt zur Umorganisation des Actingerüsts und zum Anstieg der parazellulären Permeation (Lum and Malik, 1996). ATP-Mangel führt an tj zur Bildung eines 249 kDa-Protein-Komplexes (enthält u.a. ZO-1), der mit dem Zytoskelett verbunden ist (Tsukamoto and Nigam, 1997). In den genannten Schädigungszuständen werden Zytokine (Lefer and Ma, 1993) freigesetzt, die ebenfalls zur Bildung reaktiver Spezies führen (Meier *et al.*, 1989) und somit BHS-Eigenschaften beeinträchtigen können. Parallel kommt es über die Induktion von NO-Synthase zur Freisetzung

von NO; dabei könnten größere lokale Konzentrationen von NO auch über unspezifische Effekte (Peroxynitritbildung und deren Folgereaktionen) schädigend wirken.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß AZ über einen unbekanntem Mechanismus EZ zur Ausbildung von BHS-Eigenschaften befähigen. Insgesamt scheint die Phosphorylierung von BHS-Proteinen von besonderer Bedeutung für die Regulation der Dichtheit der BHS zu sein (Joó, 1993). Es wird die Hypothese abgeleitet, daß eine cAMP- sowie möglicherweise auch eine cGMP-abhängige Signaltransduktion zur Aufrechterhaltung und eventuell zur Induktion der BHS-Dichtheit beiträgt. Dagegen erscheint der Weg über Proteinkinase C und Ca^{2+} eher von pathologischer Bedeutung zu sein, z.B. für hypoxische Zustände, und zur Öffnung der BHS zu führen.

Literatur

- Anderson, J.M., C.M. Van Itallie (1995) Tight junction and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269: G467-75
- Belayev, L., R. Busto, B.D. Watson, M.D. Ginsberg (1995) Post-ischemic administration of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, protects against blood-brain barrier disruption in photochemical cortical infarction in rats: a quantitative study. *Brain Res* 702: 266-70
- Davson, H., M.S. Segal (1996) Physiology of the CFS and blood brain barriers. CRC Press, New York, S. 95, 143-45
- Draijer, R., A.B. Vaandrager, C. Nolte, H.R. de Jonge, U. Walter, V.W. van Hinsbergh (1995) Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ. Res.* 77: 897-905
- Durieu-Trautmann, O., N. Foignant-Chaverot, J. Perdomo, P. Gounon, A.D. Strosberg, P.O. Couraud (1991) Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27A: 771-78
- el Hafny, B., J.M. Bourre, F. Roux (1996) Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 167: 451-60
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123: 1777-88
- Jesaitis, L.A., D.A. Goodenough (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-1, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J. Cell Biol.* 124: 949-61
- Joo, F. (1993) The blood-brain barrier in vitro: the second decade. *Neurochem. Int.* 23: 499-521
- Kondo, T., H. Kinouchi, M. Kawase, T. Yoshimoto (1996) Differential response in the release of hydrogen peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci. Lett.* 215: 103-6
- Lefter, A.M., X.L. Ma (1993) Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction. *Crit. Care Med.* 21:S9-14

- Lindauer, U., J. Dreier, K. Angstwurm, A. Villringer, K.M. Einhüpl, U. Dirnagl (1996) Role of nitric oxide synthase inhibition in leukocyte-endothelium interaction in the rat pial microvasculature. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 1143-52
- Lum, H., A.B. Malik (1994) Regulation of vascular endothelial barrier funktion. *Am. J. Physiol.* 267: L223-41
- Lum, H., A.B. Malik (1996) Mechanism of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 787-800
- Meier, B., H.H. Radeke, S. Selle, M. Younes, H. Sies, K. Resch, G.G. Habermehl (1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. J.* 263: 539-45
- Meyer, J., J. Rauh, H.J. Galla (1991) The susceptibility of cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood-brain barrier enzymes depends on their proliferative state. *J. Neurochem.* 57: 1971-77
- Miller, R.D., N.T. Monsul, J.R. Vender, J.C. Lehmann (1996) NMDA- and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow. *J. Neurol Sci* 136: 37-40
- Rubin, L.L., D.L. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H.C. Horner, M. Janatpour, C.W. Liaw, K. Manning, J. Morales (1991) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.* 115: 1725-35
- Roux, F., O. Durieu-Trautmann, J.M. Bourre, A.D. Strosberg, P.O. Couraud (1993) Immortalized rat brain microvessel endothelial cells: I-expression of the blood brain barrier markers during angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 331: 201-4
- Roux, F., O. Durieu-Trautmann, N. Chaverot, M. Claire, P. Mailly, J.-M. Bourre, A.D. Strosberg, P.-O. Couraud (1994) Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 159: 101-113
- Staddon, J.M., K. Herrenknecht, C. Smales, L.L. Rubin (1995) Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J. Cell. Sci.* 108: 609-19
- Stanimirovic, D.B., J. Wong, R. Ball, J.P. Durkin (1995) Free radical-induced endothelial membrane dysfunction at the site of blood-brain barrier: relationship between lipid peroxidation, Na,K-ATPase activity, and 51Cr release. *Neurochem. Res.* 20: 1417-27
- Shukla, A., M. Dikshit, R.C. Srimal (1996) Nitric oxide-dependent blood-brain barrier permeability alterations in the rat brain. *Experientia* 52: 136-40
- Sternberger, N.H., L.A. Sternberger (1987) Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8169-73
- Suzuki, Y.J., H.J. Forman, A. Sevanian (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 269-85
- Tsukamoto, T., S.K. Nigam (1997) Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. *J. Biol. Chem.* 272: 16133-39

3.4 Eigene Vorarbeiten

An Endothelzellen wurden Untersuchungen zum NO-Stoffwechsel, zur Wechselwirkung von NO und O_2^- sowie zur Wirkung neuartiger NO-Liberatoren durchgeführt. Dabei wurde die Ca^{2+} -abhängige NO-Freisetzung charakterisiert (Haseloff *et al.*, 1997a). Außerdem ließ sich zeigen, daß die Reduktion von Nitronylnitroxiden für den Nachweis von NO und Superoxidradikalen angewandt werden kann. So konnte z.B. eine Erhöhung der Menge bioverfügbaren NO's in Gegenwart von SOD und SOD-mimetischen Nitroxidverbindungen in Modellsystemen und an Endothelzellen nachgewiesen werden (Zöllner *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde der Mechanismus der NO-Freisetzung durch neuartige NO-Liberatoren (3-halogeno-3,4-dihydrodiazete 1,2-dioxide) aufgeklärt (Kirilyuk *et al.*, 1998). Dabei wurde gezeigt, daß die Freisetzung von NO nach Reaktion dieser Verbindungen mit Thiolen essentiell für die biologische Wirksamkeit ist. Die schädigende Wirkung verschiedener reaktiver Spezies (incl. NO und Peroxynitrit) auf Enzyme sowie der dadurch bedingte proteolytische Abbau durch Proteasomen der auf diese Weise modifizierten Proteine war Gegenstand weiterer Untersuchungen (Grune *et al.*, 1998). Dabei zeigte sich, daß insbesondere Peroxynitrit proteolytische Prozesse erheblich begünstigt. Diese Voruntersuchungen belegen, daß alle analytischen und pharmakologischen Voraussetzungen zum Nachweis bzw. zur Beeinflussung des NO-Stoffwechsels für das beantragte Projekt gegeben sind.

Zur NO/cGMP-abhängigen Signaltransduktion wurde gefunden, daß EZ über endotheliale und induzierbare NO-Synthase (eNOS, iNOS), lösliche (sGC) und partikuläre Guanylatcyclase (pGC), cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I; jedoch nicht über PKG II) und über ein Zytoskelett-Protein, das an EZ-EZ-Kontaktstellen lokalisiert ist (VASP), verfügen. Nach NOS-Aktivierung bzw. -Induktion wird NO und cGMP gebildet. Durch NOS-Aktivierung und durch Erhöhung des zellulären cGMP-Gehaltes wird VASP phosphoryliert, das in makrovaskulären Endothelzellmonolayern die parazelluläre Permeation herabsetzt. AZ verfügen über bNOS (neuronales Isoenzym) und iNOS, sGC, pGC sowie PKG I (Sporbert *et al.*, 1998). Hohe NO-Konzentrationen erhöhen die parazelluläre Permeation (Utepbergenov *et al.*, 1998). Orientierende Versuche mit Zytokinen (führen neben der Freisetzung von Oxyradikalen zur iNOS-bedingten NO- und cGMP-Bildung) zeigen ebenfalls eine erhöhte parazelluläre Permeation, die u.a. auf eine Schädigung der EZ- (Utepbergenov *et al.*, 1998) wie auch der AZ-Membran (Blasig *et al.*, 1997) zurückgeführt werden. Die (partielle) Wiederherstellung der durch oxidativen Stress beeinträchtigten Funktion der BHS durch Antioxidantien (Mertsch *et al.*, 1997) und NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Giese *et al.*, 1995) unterstreicht die Bedeutung reaktiver Spezies sowie von Glutamat-Rezeptoren für die Schädigung der BHS. Dagegen scheinen membranpermeable cGMP-Derivate und natriuretische Peptide (cGMP-Erhöhung durch pGC-Stimulation) die Permeation herabzusetzen. Diese Versuche sollen im beantragten Projekt weitergeführt werden. Dabei ist zu klären, ob (und wenn ja, welche) Proteine neben VASP phosphoryliert werden und ob diese mit BHS-Funktionen in Beziehung stehen.

Für das Projekt wurden verschiedene Zellkulturmodelle von EZ der Ratte erarbeitet. Außerdem wurden EZ mit immortalisierenden bzw. transformierenden Genen transfiziert (large T, middle T, small t antigen von Polyomavirus und SV40). Dadurch wurden 6 Linien erhalten und hinsichtlich BHS-Eigenschaften, NO- und Oxyradikalstoffwechsel charakterisiert. 2 Linien, die gegenwärtig kloniert werden (rBCEC4 und rBCEC6), lassen sich mindestens bis zur 60. Passage subkultivieren und weisen alle Merkmale immortalisierter Zellen auf (Wachstum, Differenziertheit, BHS-Eigenschaften; Blasig *et al.*, 1998a). Zum Vergleich wurden RBE4 (literaturbekannter Zellklon immortalisierter Gehirndothelzellen) untersucht (Mertsch *et al.*,

1997). Die verschiedenen Linien bzw. Klone weisen z.T. sehr unterschiedliche Charakteristika auf, und sollen entsprechend ihrer Eigenschaften im Nachfolgeprojekt eingesetzt werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von AZ auf EZ bzw. auf BHS-Funktionen wurden jeweils EZ-Monokulturen mit EZ/AZ-Kokulturen verglichen. Die Ergebnisse belegen, daß durch AZ der transendotheliale elektrische Widerstand (Maß der parazellulären Ionenpermeabilität) wesentlich erhöht sowie die Permeabilität kleiner organischer Moleküle wesentlich vermindert wird (Giese *et al.*, 1995; Mertsch *et al.*, 1997). Die Kokultivierung führt weiterhin zu einer verstärkten Expression von Markern für differenzierte Endothelzellen (z.B. Faktor VIII, Angiotensin-converting enzyme, Prostaglandinbildung) sowie von BHS-Markern (z.B. γ -Glutamyltranspeptidase, alkalische Phosphatase, ZO-1) (Giese *et al.*, 1995; Mertsch *et al.*, 1997; Blasig *et al.*, 1998a.). Darüber hinaus ist in der Kokultur die Toxizität bestimmter Substanzen (z.B. Ethanol, Acetylsalicylsäure) gegenüber EZ vermindert, was für einen protektiven Einfluß von AZ spricht. Des weiteren können auch Oligodendrozyten, Perizyten (Verstärkung) und Mikroglia (Abnahme) BHS-Eigenschaften beeinflussen. Untersuchungen des Radikalstoffwechsels zeigen, daß die Kokultivierung zur Induktion von Radikalabwehrenzymen führt (Mn-Superoxiddismutase [Mn-SOD], Catalase, Glutathionperoxidase; Schroeter *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang wurde gefunden, daß sowohl stärkere Expression als auch exogene Zugabe dieser Proteine (Utepbergenov *et al.*, 1998) BHS-Funktionen vor hypoxischer Schädigung schützt. Damit sind zahlreiche Anhaltspunkte dafür gegeben, daß AZ in EZ BHS-Proteine induzieren, die im Folgeprojekt genauer untersucht werden sollen.

Hypoxie- und reoxygenierungsbedingte Schäden an Endothelzellen und AZ bzw. EZ/AZ-Kokulturen sind intensiv biochemisch, morphologisch und funktionell charakterisiert worden (Mertsch *et al.*, 1995 und 1997; Giese *et al.*, 1995 und 1996; Blasig *et al.*, 1998b; Haseloff *et al.*, 1997a; Kunstmann *et al.*, 1996). Dabei wurde gefunden, daß Mn-SOD (Schroeter *et al.*, 1998) und NOS durch Hypoxie induziert werden können. Diese Befunde stehen im Einklang mit der nach Hypoxie gemessenen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, der durch reaktive Spezies aktiviert wird und an DNA-Regionen für iNOS und Mn-SOD binden kann. Die zentrale Bedeutung radikalischer Spezies für hypoxieinduzierte Schäden wird auch durch protektive Wirkungen von Antioxidantien verdeutlicht (Mertsch *et al.*, 1997). Weiterhin können reaktive Aldehyde, wie z.B. 4-Hydroxynonenal, das bei Hypoxie/Reoxygenierung von EZ verstärkt gebildet wird (Kunstmann *et al.*, 1997) und die BHS öffnet, zur Induktion von Stress- bzw. Schutzproteinen beitragen. Das heißt, daß auch durch Hypoxie Faktoren induziert werden, die die Integrität der BHS aufrechterhalten bzw. beeinflussen können und im geplanten Vorhaben ebenfalls untersucht werden sollen.

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema

Weitere Untersuchungen waren der Optimierung vorhandener sowie der Entwicklung neuer analytischer Verfahren gewidmet. So wurde z.B. ein modifiziertes ESR-spektroskopisches Verfahren sowie ozonvermittelte Chemilumineszenz auf die Charakterisierung der Wechselwirkung von NO und O₂⁻ nach Ca²⁺-Einstrom in Endothelzellen angewendet (Haseloff *et al.*, 1996). Dabei konnte durch den Einfluß von SOD nachgewiesen werden, daß beide Spezies simultan gebildet werden und ihre Reaktion zur Zellschädigung führt. Mit einer verbesserten ESR-Spintrap-Methode wurden in hypoxiegeschädigten Endothelzellen Mitochondrien als wesentliche Radikalquelle erkannt (Blasig *et al.*, 1996). Außerdem erarbeiteten wir eine neue HPLC-Technik zur verbesserten Analyse von Nukleotidderivaten bei der Charakterisierung von Reoxygenierungsschäden (Krauss *et al.*, 1997). Eine neuartige Spintrapverbindung (2,2-Dimethyl-*d*₆-4-methyl-2H-imidazole-1-oxide-1-¹⁵N) wurde erfolgreich zum Nach-

weis freier Radikale eingesetzt. Insbesondere für (unter hypoxischen Bedingungen verstärkt auftretende) Thiyl- und Alkylradikale bietet diese Substanz im Vergleich zu herkömmlichen Spintraps eine Reihe von Vorteilen (Haseloff *et al.*, 1997b). Erstmals wurde auch die Zytotoxizität von Spintrapverbindungen bestimmt, ein wichtiger Aspekt bei der Anwendung dieser Substanzen zum Nachweis freier Radikale (Haseloff *et al.*, 1997c).

Etablierte Methoden

Zur Untersuchung des Stoffwechsels freier Radikale bzw. reaktiver Spezies liegen umfangreiche Erfahrungen vor. NO wird mit hoher Empfindlichkeit durch ozonvermittelte Chemilumineszenz sowie mit ESR-Techniken gemessen; photometrische Standardverfahren (Griess-Assay) sind gleichfalls verfügbar. Die Isoenzyme der NO-Synthase sind auf mRNA- (RT-PCR) und Proteinebene (Western blot, Immunocytochemie) nachweisbar. Andere freie Radikale ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{CR}$, O_2^- etc.) können mittels ESR-Spektroskopie (Spintrapverfahren) detektiert werden. Darüber hinaus werden Marker der radikalinduzierten Lipidperoxidation (HNE, MDA) und endogene Antioxidantien durch HPLC bestimmt. Antioxidativ wirksame Enzyme, wie Cu/Zn- und Mn-SOD, Katalase und Glutathionperoxidase können hinsichtlich Aktivität, Protein (Western blot) und ggf. mittels Northern blot erfaßt werden.

Zur Untersuchung der NO/cGMP-abhängigen Signaltransduktion (sGC, pGC, PKG, VASP) stehen RT-PCR, Immunoblotting/Immunohistochemie und Autoradiographie zur Verfügung, die durch pharmakologische Ansätze (Stimulatoren/Inhibitoren) unteretzt werden können. cGMP wird mittels RIA gemessen. Für die Untersuchung der Proteinphosphorylierung sind spezifische Antikörper gegen Phospho-Tyrosin, -Serin, -Threonin und Phospho-VASP verfügbar. Zum Studium Ca^{2+} -abhängiger Prozesse wird das in der Abteilung des Antragstellers vorhandene Konfokalmikroskop genutzt. Transkriptionsfaktoren (z.B. NF κ B, AP1) können mit Gelshiftanalyse (EMSA) untersucht werden. Neben den genannten Experimenten zur Phosphorylierung wird mittels Autoradiographie bzw. Western blotting sowie über HPLC versucht, weitere, über den NO/cGMP Signalweg phosphorylierbare Proteine aufzufinden. Gleichzeitig wird auch die Aktivität von Proteinkinasen und Phosphatasen erfaßt. Durch PCR, Northern blotting, Autoradiographie liegen wichtige Vorarbeiten bzw. Methoden für die im Projekt zu verwendende differential Display PCR vor: das Verfahren ist im Labor aufgebaut und wird gegenwärtig an EZ und AZ erprobt (s.u., 3.5.2.). Zur Charakterisierung (Immunocytochemie/Immunoblotting) weiterer BHS-Proteine stehen kommerzielle Antikörper, z.B. gegen ZO-1, Occludin oder Vinculin zur Verfügung. Die Auffindung der Proteine erfolgt mittels 2D-Elektrophorese, die im Labor etabliert ist und derzeit an die im Projekt vorgesehenen Zellkulturen adaptiert wird.

Für die Versuche liegen verschiedene Zellmodelle vor, die unter Kontroll-/Schadigungsbedingungen morphologisch, funktionell sowie biochemisch gut charakterisiert sind und hinsichtlich ihrer Eigenschaften z.T. qualitative oder quantitative Variationen aufweisen. Folgende Ratten-EZ werden routinemäßig kultiviert: Primärkulturen, spontane (rBCEC1, rBCEC2), immortalisierte (rBCEC4, rBCEC6), transformierte (rBCEC5) und spezifisch transfizierte Linien (z.B. rBCEC3) und immortalisierte Zellklone (z.B. RBE4). Ratten-AZ sind als Primär-, Sekundärkulturen und Tumorzelllinien verfügbar. Verschiedene homologe Kokulturen (Ratte) aus EZ und AZ sind zur Modellierung der BHS *in vitro* einsetzbar. Zur Charakterisierung von BHS-Eigenschaften wird die Permeabilität nicht gehirngängiger Substanzen (z.B. Fluorescein, radioaktiv markierte Saccharose), der transendotheliale elektrische Widerstand (Ionenpermeabilität) sowie die Expression BHS-spezifischer Marker herangezogen (z.B. alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltranspeptidase, ZO-1). Die Ausprägung von BHS-Eigenschaften

nimmt in folgender Reihenfolge ab: verbundene Kokultur (EZ und AZ kokultiviert getrennt voneinander auf den beiden Seiten eines Filters, Zellkontakt), getrennte Kokultur (EZ auf dem Filter, AZ räumlich getrennt auf dem Boden des selben Wells; kein Zellkontakt) und EZ-Kulturen in AZ-konditioniertem Medium.

Modelle zur Erfassung von Schäden durch Hypoxie/Reoxygenierung an EZ, AZ und EZ/AZ-Kokulturen stehen zur Verfügung. Sie sind intensiv morphologisch (Licht-, Elektronen-, konfokale Mikroskopie), funktionell (Dichtheit, Permeabilität) und biochemisch (insbesondere Energiestoffwechsel, Membranschäden, Stoffwechsel von NO und Oxyradikalen, Transkriptionsfaktoren) untersucht. Auch mit 2-D-Elektrophorese wurden Messungen an Zellkultursystemen (AZ, Leberzellen) unter oxidativem Stress durchgeführt (vgl. 3.5.2). Die Hypoxiebedingungen können hinsichtlich verschiedener Parameter (Hypoxiegrad, Dauer, Mediumbestandteile, Substratausschluß zur Modellierung ischämischer Aspekte) verändert werden. Darüber hinaus lassen sich die Reoxygenierungsbedingungen variieren (z.B. hinsichtlich Carbogenbegasung/Inkubatoratmosphäre, Dauer). Dabei zeigte sich, daß im allgemeinen eine 2-stündige Begasung mit 95% N₂/5% CO₂ in Anwesenheit von PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺, aber ohne Substrat, ein optimales Modell einer akuten reversiblen hypoxischen Schädigung ist, das das Studium von Proteininduktionsprozessen zuläßt.

Literatur

- Blasig, I.E., B.F. Dickens, W.B. Weglicki, J.H. Kramer (1996) Uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation alters lipid peroxidation-derived free radical production but not recovery of post-ischemic rat hearts and post-hypoxic endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 160/161: 167-177
- Blasig, I.E., A. Sporbert, D.I. Utepbergenov, M.L. Schroeter, K. Mertsch, R.F. Haseloff (1997) Cytokine- and Hypoxia-Induced Lipid Peroxidation in Astrocytes. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 15: (in press)
- Blasig, I.E., H. Giese, M. Schroeter, A. Sporbert, K. Mertsch, I.B. Buchwalov, K. Neubert, G. Schönfelder, I. Schimke, W.-E. Siems, M. Paul, R.F. Haseloff, R. Blasig (1998a) NO and oxy-radical metabolism in new cell lines of brain capillary endothelial cells forming blood-brain barrier. *J. Neurosci.*, *eingereicht*
- Blasig, I.E., T. Grune, S. Kunstmann, B. Wiesner, A.M. Ladhoff, R.F. Haseloff, W.G. Siems, K. Mertsch (1998b) Protective effects of thiophosphate WR 2721 and lazaroid U83836E on lipid peroxidation in endothelial cells during hypoxia/reoxygenation. *Biochem. Pharmacol.*, *eingereicht*
- Giese, H., K. Mertsch, I.E. Blasig (1995) Effect of Mk-801 and U83836E on a porcine brain capillary endothelial cell barrier during hypoxia. *Neurosci. Lett.* 191: 169-172
- Grune, T., K. Müller, S. Zöllner, R.F. Haseloff, I.E. Blasig, H. David, W. Siems (1997) Evaluation of purine nucleotide loss, lipid peroxidation and ultrastructural alterations in posthypoxic hepatocytes. *J. Physiol.-London* 498: 511-22
- Grune, T., I.E. Blasig, N. Sitte, R.F. Haseloff, K.J.A. Davies (1998). Peroxynitrite, but not nitric oxide, enhances susceptibility to proteolytic degradation - Degradation of aconitase by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.*, *eingereicht*

- Haseloff, R.F., S. Zöllner, I.A. Kirilyuk, I.E. Grigor'ev, R. Reszka, R. Bernhardt, K. Mertsch, B. Roloff, I.E. Blasig (1997a) Superoxide-mediated reduction of the nitroxide group can prevent detection of nitric oxide by nitronyl nitroxides. *Free Radical Res.* 26: 7-17
- Haseloff, R.F., I.A. Kirilyuk, S.I. Dikalov, V.V. Khramtsov, D.I. Utepbergenov, I.E. Blasig, I.A. Grigor'ev (1997b) Synthesis and spin trapping applications of 2,2-dimethyl-*d*₆-methyl-2H-imidazole-1-oxide-1-¹⁵N. *Free Radical Res.*, 26:159-168
- Haseloff, R.F., K. Mertsch, E. Rohde, I. Baeger, I.A. Grigor'ev, I.E. Blasig (1997c) Cytotoxicity of spin trapping compounds. *FEBS-Lett.* 418: 73-75
- Kirilyuk, I.A., D.I. Utepbergenov, D.G. Mazhukin, K. Fechner, K. Mertsch, V.V. Khramtsov, I.E. Blasig, R.F. Haseloff (1998) Thiol-Induced NO Release from 3-halogeno-3,4-dihydrodiazete 1,2-Dioxides. *J. Med. Chem. (in press)*
- Kunstmann, S., K. Mertsch, I.E. Blasig, T. Grune (1996) High metabolic rates of 4-hydroxy-nonenal in brain capillary endothelial cells during anoxia/reoxygenation. *Brain Res.* 740: 353-55
- Mertsch, K., T. Grune, A. Ladhoff, N. Saupe, W.G. Siems, I.E. Blasig (1995) Hypoxia and reoxygenation of brain endothelial cells in vitro: a comparison of biochemical and morphological response. *Cell. Mol. Biol.* 41: 243-253
- Schroeter, M.L., K. Mertsch, H. Giese, I.E. Blasig (1998) Astrocytes support antioxidative defence in brain capillary endothelial cells, constituting the blood-brain-barrier. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, *eingereicht*
- Sporbert, A., K. Mertsch, H. Giese, M. Paul, A. Smolenski, U. Walter, F. Hofmann, P. Ruth, I.E. Blasig (1998) Comparison of nitric oxide release and nitric oxide-dependent signal transduction in brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Neurochem.*, *eingereicht*
- Utepbergenov, D., K. Mertsch, A. Sporbert, K. Tenz, R.F. Haseloff, M.Paul, I.E. Blasig (1998) NO protects blood-brain barrier in vitro from damage induced by hypoxia-reoxygenation. *FEBS Letters*, *eingereicht*
- Zöllner, S., R.F. Haseloff, I.A. Kirilyuk, I.E. Blasig, G.M. Rubanyi (1997) Nitroxides increase the detectable amount of nitric oxide released from endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 23076-80
- Giese, H., K. Mertsch, R.F. Haseloff, H. Härtel, I. E. Blasig (1996) Hypoxia and reoxygenation of a cellular barrier consisting of brain capillary endothelial cells and astrocytes, pharmacological interventions. *Adv. Behav. Biol.* 46: 313-18
- Haseloff, R.F., S. Zöllner, K. Mertsch, I.E. Blasig, Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by endothelial cells. ESR and ozone-mediated ¹NO chemiluminescence experiments. In: *The Biology of Nitric Oxide Part 5*, J.S. Stamler, S.S. Gross, S. Moncada, E.A. Higgs, eds., Portland Press, London and Chapel Hill, p. 91-94 (1996)
- Krauss, G.-J., M. Pissarek, I.E. Blasig, (1997) HPLC of nucleic acid components with volatile mobile phases. II. Separations on polymeric supports. *J. High Res. Chromatogr. (in press)*
- Mertsch, K., R.F. Haseloff, I. E. Blasig (1997) Investigations of radical scavengers by using an in vitro model of blood-brain barrier. *Devel. Anim. Veterin. Sci.* 27: 881-86

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Nachweis der NO/cGMP-abhängigen Phosphorylierung von BHS-Proteinen

1. Auffindung von EZ-Proteinen, die durch den NO/cGMP-Signalweg phosphoryliert werden (Weiterführung des vorhergehenden Projektes)
2. Klärung, inwieweit dabei BHS-Proteine phosphoryliert werden und dadurch BHS-Funktionen beeinflusst werden können

Nachweis der Induktion von BHS-Proteinen durch AZ

3. Auffindung von Faktoren (mRNA's, Proteine), die in EZ durch AZ induziert werden
4. Identifizierung der bei 3. aufgefundenen Faktoren, die in EZ durch AZ induziert werden

Nachweis der Induktion von BHS-Proteinen bei Hypoxie

5. Auffindung von Faktoren (mRNA's, Proteine), die in EZ durch Hypoxie induziert werden bzw. deren Induktion durch Hypoxie verändert wird
6. Identifizierung der bei 5. aufgefundenen Faktoren, deren Induktion in EZ durch Hypoxie beeinflusst wird
7. Aufklärung des Einflusses von AZ auf die Expression von BHS-Proteinen bei Hypoxie

Damit sollen neue Aufschlüsse über die Bestandteile erhalten werden, die an der Aufrechterhaltung der BHS beteiligt sind und die bei hypoxischer Schädigung gestört werden, sowie über wesentliche Mechanismen zum Schutz der BHS.

3.5.2 Methoden

Bei den Untersuchungen von BHS-Proteinen, die möglicherweise durch NO/cGMP-abhängige Prozesse einer Phosphorylierung unterliegen, kommen vor allem RT-PCR, Western blotting und Immunhistochemie zum Einsatz (Ziel 1. und 2.). Für Versuche mit VASP (Zytoskelett-Protein an EZ-EZ-Kontaktstellen; Ser, Thr phosphorylierbar) sowie von mit VASP in Wechselwirkung stehenden Proteinen (z.B. Vinculin; Tyr, Ser, Thr phosphorylierbar) stehen Antikörper zur Verfügung, die in Voruntersuchungen getestet wurden. Weiterhin werden Proteine untersucht, die phosphoryliert werden können und für die Antikörper vorhanden oder beschaffbar sind. Solche tj-Proteine sind z.B. ZO-1 (Tyr phosphorylierbar, Vorversuche erfolgt) oder Cingulin. Von den aj-Proteinen ist zunächst β -Catenin (Tyr phosphorylierbar) von Interesse. Darüber hinaus soll Western blotting zum Nachweis von Proteinen mit Phospho-Threonin, -Serin oder -Tyrosin verwendet werden. Nachteil der Antikörper gegen die beiden ersten Phospho-Proteine sind Kreuzreaktionen. Zum Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung (z.B. bei oxidativem Stress) wird auch ein neues HPLC-Verfahren eingesetzt, bei dem Phospho-Tyrosin-Reste nach Abspaltung aus den Proteinen quantifiziert werden (Vorteil: erfaßt auch niedermolekulare Proteine, an die Antikörper nicht binden). Wenn keine Phosphorylierung nachweisbar sein sollte, könnte Autoradiographie eingesetzt werden. Das

scheint aber unwahrscheinlich, da Vorversuche auf Unterschiede im Tyrosin-Phosphorylierungsgrad hinweisen. Bei den Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung ist auch die Bestimmung von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen vorgesehen (Aktivität, PCR, Western blotting). Die Methoden sind eingearbeitet (s. auch Vorarbeiten, 3.4), die Arbeiten wurden z.T. schon begonnen.

Zur Auffindung von mRNA und Proteinen, die durch AZ (Ziel 3) und Hypoxie (Ziel 5) induziert werden, sollen differential Display PCR (DD-PCR) bzw. 2-D-Elektrophorese und Immunoblotting herangezogen werden. DD-PCR basiert auf der RT-PCR Methode (unter Verwendung von einem radioaktiv markierten Nucleotid), bei der alle Kombinationen von 12 verschiedenen spezifischen Primern (dT)₁₁ (G,C,A)_n (3'-Ende) mit 20 degenerierten 10-mer Primern (5'-Ende) eingesetzt werden. Statistisch findet sich in jeder revers transkribierten mRNA wenigstens eine Primerkombination und führt zu einem PCR-Produkt. Auf Acrylamid-Gel werden dann die PCR-Produkte der zu vergleichenden EZ-Kulturen nebeneinander elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch verglichen. Expressionsunterschiede eines Gens werden durch unterschiedliche Schwärzungen der beiden PCR-Produkte sichtbar gemacht. Derartige Produkte sollen aus dem Acrylamid-Gel ausgeschnitten, eluiert und anschließend reamplifiziert werden (Liang und Pardee, *Science* 257:967,1992). Ein Teil der Reamplifikate repräsentiert differentiell exprimierte Gene, die die gesuchten BHS-Proteine kodieren. Sie bilden die Ausgangsprodukte für die anschließende Charakterisierung bzw. Identifizierung: Überprüfung der differentiellen Expression aufgefundenener Gene im Northern blot, Klonierung (kommerzielle Kits) und anschließende Sequenzierung, Vergleich mit Datenbanken. Dadurch sollen schließlich die Gene identifiziert werden, die in EZ durch AZ (Ziel 4) bzw. durch Hypoxie (Ziel 6) verändert exprimiert werden. Die Methodik ist etabliert, Vorversuche wurden begonnen. DNA-Sequenzanalyse steht als Service zur Verfügung, ebenso Datenbankanschlüsse. Problematisch bei DD-PCR sind falsch positive Resultate, denen durch Dreifachbestimmungen sowie durch die Untersuchungen auf Proteinebene (2-D-Elektrophorese, Immunoblotting; s.u.) begegnet werden soll. Durch letzteres wird überprüft, ob sich die mRNA-Änderungen in veränderter Proteinexpression widerspiegeln. Ggf. wird als Alternative/Ergänzung zur DD-PCR die Einsetzbarkeit des Two-Hybridsystem-Verfahrens geprüft. Ein anderes Problem ist, daß in den Datenbanken Angaben zu Rattenmaterial einen relativ geringen Anteil ausmachen. Hier dürften jedoch Homologien zu anderen Spezies sowie der Vergleich mit den Proteindaten (s.u.) weiterhelfen. Für unbekannte Gene wird versucht, das Klonbank-Verfahren heranzuziehen. Bei technischen Schwierigkeiten kann die Kooperation zu I. Horak im Institut bzw. zur Max-Planck-Gruppe M. Strauss genutzt werden, die uns bei der Etablierung unterstützt haben.

2-D-Elektrophorese (2D) wird standardmäßig mit isoelektrischer Fokussierung (1. Dimension) und Gradienten-SDS-Elektrophorese (2. Dimension) durchgeführt. Diese Variante bietet eine große Anwendungsbreite und ist bei unterschiedlichsten Veränderungen von Proteinmustern verschiedener Zelltypen erfolgreich. Es wird das 2D-System von Bio-Rad verwendet, welches die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben in der 2. Dimension gestattet. Die Gele werden gefärbt (z.B. AgNO₃), getrocknet, autoradiographisch analysiert und densitometrisch (Phoretix-System, Bio-Rad) ausgewertet (Abb. 1, Proteinmuster nach oxidativem Stress einer Hepatozytenkultur). Sollten Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt eines aufgefundenen Proteins mit denen bekannter Proteine übereinstimmen (Datenbankanalyse), erfolgt die Identifizierung mit Antikörpern im Western blot und ggf. mit Sequenzanalyse. Dabei wird auch das im Institut als Service verfügbare, sehr leistungsfähige MALDI-System eingesetzt (E. Krause), das auf der Basis massenspektroskopischer Daten in Verbindung mit Datenbanken eine Proteinidentifizierung gestattet. Dabei werden (nach enzymatischer Spaltung eines Protein-

spots im Gel z.B. mit Trypsin) Proteinfragmente (Protein-“fingerprints”) analysiert. Limitierungen können zu kleine Proteinmengen (ggf. Verwendung größerer Zellmengen), unvollständige Spaltung bei nicht entfaltenen Proteinen (ggf. Variation 2D-Bedingungen, Proteasen) sowie posttranslationell modifizierte Proteine sein (ggf. z.B. Berücksichtigung phosphorylierbarer Aminosäurereste). Bei besonderen Problemen wurde uns Unterstützung durch F. Hucho/FU Berlin zugesagt, wo langjährige Erfahrungen mit dieser Methodik bestehen. Darüber hinaus ist im Institut der Zugriff auf alle wichtigen Proteindatenbanken routinemäßig gegeben. Die 2D-Elektrophorese ist verhältnismäßig aufwendig. Deshalb ist zu erwarten, daß Schwankungen im Proteinmuster schon in Monokulturen sowie insbesondere bei Kokulturen auftreten. Diesem Problem soll durch Mehrfachanalysen begegnet werden. Weitere Fehlerquellen liegen in den Proben selbst (nicht gelöstes Material, zu hohe Salzkonzentration, Verunreinigungen durch Nukleinsäuren, evtl. auch durch Lipide und Kohlenhydrate), was ggf. eine Variierung des Verhältnisses von Detergens und Probe sowie Vorbehandlungen der Proben, z.B. mit Dialyse, erfordert. Außerdem müssen die zu verwendenden Chemikalien (Detergenzien und Ampholyte, Milli-Q[®]-deionisiertes Wasser) von höchster Reinheit sein.

Es liegen verschiedene Zellmodelle vor, die unter Kontroll- und Schädigungsbedingungen gut charakterisiert sind (s. Vorarbeiten, 3.4). Für die geplanten Experimente sollen zunächst die von uns immortalisierten und klonierten Ratten-EZ (rBCEC4) eingesetzt werden. Bei Bedarf (z.B. Untersuchung bestimmter Eigenschaften, die über- oder unterexprimiert sein sollen) werden entsprechend geeignete andere Linien bzw. Klone herangezogen. Die Ergebnisse sollen an Primärzellen überprüft werden. Es werden konfluente Monolayer benutzt (standardisierte Zellzahl, Aussaatdichte usw.), da BHS-Funktionen nur bei Vorliegen von EZ-EZ-Kontakten ausgebildet werden. Ratten-AZ werden als Sekundärkultur verwendet. In bestimmten Situationen, z.B. bei zu geringen Effekten auf EZ, werden primäre AZ eingesetzt. Es wird geprüft, ob auch Astrozytomazellen verwendbar sind, was den experimentellen Aufwand reduzieren würde. Als BHS-Modell dienen homologe Systeme (EZ und AZ der Ratte), bei denen die EZ auf einem Filter und die AZ auf dem Boden des selben Wells kultiviert werden. Wenn durch den fehlenden EZ/AZ-Kontakt eine zu geringe Induktion von BHS-Eigenschaften auftritt, sollen Kokulturen untersucht werden, bei denen EZ und AZ auf den beiden Seiten eines Filters zu kultivieren sind (Zellkontakt). Dabei ist jedoch darauf zu achten, daß kein Material der AZ-Seite in die Analysen gelangt. Zur Feststellung der Dichtheit des BHS-Modells bzw. deren Beeinflussung durch Effektoren wird mit nicht gehirngängigen Markern (z.B. Fluoreszein, Saccharose) die Permeabilität bestimmt.

3.5.3 Arbeitsprogramm

1. Auffindung von EZ-Proteinen, die durch den NO/cGMP-Signalweg phosphoryliert werden

Hierzu werden die im Vorprojekt begonnenen Versuche fortgeführt, wobei konfluente EZ-Kulturen in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von Effektoren untersucht werden, die zum Anstieg des zellulären NO- bzw. cGMP-Gehaltes führen. Zur Erhöhung des NO-Gehaltes werden z.B. der NO-Liberator SNAP (S-Nitrosopenicillamin, im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 200 μM) oder authentische NO-Lösungen (1-100 μM) verwendet, so daß steady state-Konzentrationen von NO im submikromolaren Bereich erreicht werden (Inkubationsdauer zunächst 30 bzw. 10 min). Zur intrazellulären cGMP-Erhöhung soll das membranpermeable cGMP-Derivat 8-pCPT-cGMP (1-100 μM) bzw. ANP (atrionatriuretisches Peptid, stimuliert partikuläre Guanylcyclase; 10-100 nM) eingesetzt werden (Inkubationsdauer zu-

nächst 30 min). Bei letzterem ist gleichzeitig der Inhibitor der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase MMQ (4- $\{[3',4'-(\text{Methylene-dioxy})\text{benzyl}]\text{amino}\}$ -6-methoxyquinazoline, 1 μM) zu inkubieren, damit der cGMP-Spiegel über den gesamten Versuchszeitraum erhöht bleibt. Anschließend werden die phosphorylierten Proteine mittels Western blotting (Antikörper gegen Phospho-Ser, Phospho-Thr, Phospho-Tyr), ggf. autoradiographisch (erfaßt alle phosphorylierten Proteine) oder mit HPLC (von Proteinen abgespaltenes Phospho-Tyr) nachgewiesen. Zusätzlich bzw. zur weiteren Charakterisierung der Proteinphosphorylierung werden Phosphataseinhibitoren eingesetzt (z.B. Phenylarsinoxid 0,3-10 μM für Tyrosin-Phosphatase; Okadaic acid ≤ 1 μM für Ser-/Thr-Proteinphosphatase). Zusätzlich sollen Untersuchungen mit oxidativem Stress durchgeführt werden (Hypoxie; reaktive Sauerstoffspezies, z.B. Superoxid). Letzteres kann das NO-System (z.B. Beseitigung von NO), Proteinkinasen (z.B. Aktivierung von Proteinkinase C, phosphoryliert u.a. β -Catenin, Vinculin, Aktinin) und Proteinphosphatasen (z.B. Hemmung von Tyr-Proteinphosphatase) beeinflussen.

2. Klärung, inwieweit über den NO/cGMP-Weg BHS-Proteine phosphoryliert werden

Zur Identifizierung der bei 1. aufgefundenen Proteine konzentrieren sich die Untersuchungen vor allem auf bekannte tj-Proteine (z.B. ZO-1), ausgewählte aj-Proteine (bes. z.B. β -Catenin) und in Frage kommende Zytoskelett-Proteine (z.B. VASP, Vinculin, Actinin). Dabei wird zunächst von solchen BHS-Proteinen ausgegangen, zu denen Antikörper gegen ihre phosphorylierte Form vorliegen (z.B. an Thr- und Ser-Resten von VASP). Wenn keine Antikörper gegen die phosphorylierte Form eines Proteins beschaffbar sind, wird versucht, entsprechende Proteine über den Molekulargewichtsshift nach Phosphorylierung zu identifizieren. Das sollte z.B. auf Vinculin (und ggf. weitere Proteine) anwendbar sein. Zur Ergänzung, inwieweit durch NO/cGMP-abhängige Prozesse die BHS-Funktion beeinflusst wird, werden Permeationsuntersuchungen durchgeführt. Dabei sollen, soweit vorhanden, spezifische Effektoren erkannter Phosphorylierungsketten einbezogen werden.

3. Auffindung von Proteinen, die in EZ durch AZ induziert werden

Dazu werden die mRNA- und Proteinmuster von EZ-Monokulturen mit den mRNA-/Protein-Mustern solcher EZ verglichen, die mit AZ kokultiviert worden sind. Die mRNA-Analytik erfolgt mittels DD-RT-PCR, wobei zunächst herausgefunden wird, welche mRNA's (cDNA-Banden) zusätzlich bzw. verstärkt oder vermindert auftreten. Mit Northern blotting werden die in der DD-PCR erhaltenen Unterschiede verifiziert und ggf. wird eine quantitative Abschätzung vorgenommen. Neu oder nicht mehr exprimierte bzw. verändert exprimierte Proteine sollen mit 2-D-Elektrophorese herausgefunden werden. Mit diesen Versuchen ist zu klären, ob durch AZ neue Proteine in EZ auf mRNA- und auch auf Proteinebene induziert bzw. ob vorhandene mRNA's und Proteine verändert exprimiert werden. Außerdem kann durch Vergleich von mRNA und Protein festgestellt werden, ob ein Gen nicht nur transkribiert sondern auch translatiert wird. Bei den Untersuchungen ist von konfluenten EZ-Monolayern auszugehen, da BHS-Funktionen nur durch EZ-EZ-Kontakte ausgebildet werden können. Sollte es Anhaltspunkte dafür geben, daß Unterschiede im Grad der EZ-Konfluenz die Expression von BHS-Proteinen beeinflussen, könnte in einem späteren Projektstadium diesem Phänomen zusätzlich nachgegangen werden (Vergleich subkonfluenter/konfluenter EZ-Kulturen). Die EZ werden auf dem Filter und die AZ auf dem Boden desselben Zellkulturgefäßes kokultiviert. Wenn aus der dabei vorhandenen relativ großen Zellentfernung eine zu geringe Expressionsbeeinflussung resultiert, werden die Kulturgefäße so modifiziert, daß Filter und Wellbo-

den sehr nahe beieinanderliegen. Für eine noch engere Kokultivierung können die AZ auch auf der EZ-freien Seite des Filters kokultiviert werden. Dazu muß dann aber die Porengröße des Filters vermindert werden, um das Durchwachsen von AZ-Endfüßen auf die EZ-Seite zu verhindern. Für die Festlegung des Zeitpunktes, wann die EZ für die Analysen verwendbar sind, werden Permeationsuntersuchungen durchgeführt, um möglichst dichte Monolayer zu verwenden, die hohe Gehalte BHS-relevanter Proteine bzw. BHS-relevanter mRNA's besitzen.

4. Identifizierung von Proteinen, die in EZ durch AZ induziert werden

Zur Identifizierung der bei 3. gefundenen unterschiedlich exprimierten Gene wird die erhaltene cDNA nach Klonierung in geeigneten Mikroorganismen und anschließender Nukleinsäure-Sequenzanalyse mit Sequenzen in entsprechenden Computerdatenbanken verglichen. Da sich unter den erwarteten Proteinen vor allem auch die bisher als BHS-Proteine angenommenen Proteine (z.B. Occludin, ZO-1, Anti-EBA usw.) befinden müßten, wird diesen mRNA's besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Daneben sollen aber auch andere Proteine, die unter AZ-Einfluß verstärkt vorhanden sind (siehe Vorarbeiten), genauer untersucht werden (z.B. Faktor VIII, Glutamylnitrosyltransferase, alkal. Phosphatase, Mn-SOD, Catalase, Glutathionperoxidase). Die Proteine, deren Expression verändert ist, werden nach Isolierung (2-D-Elektrophorese) und enzymatischer Zerlegung in Peptidfragmente im Vergleich zu Proteindatenbanken massenspektrometrisch identifiziert (MALDI). Bei unbekanntem Proteinen ist eine partielle Aminosäure-Sequenzanalyse einzelner Peptidbruchstücke möglich, die ebenfalls über Datenbankvergleich eine Identifizierung ermöglicht. Außerdem werden die selektierten Proteinbanden systematisch dahingehend überprüft, ob sie sich mit Antikörpern (soweit diese vorliegen) gegen angenommene BHS-Proteine (z.B. ZO-1, Occludin usw.) bzw. gegen die o.g., durch AZ induzierbaren Proteine identifizieren lassen. Andererseits kann versucht werden, aus Aminosäureteilsequenzen PCR-Primer zu konstruieren, um die entsprechende mRNA/cDNA herauszufinden, zu identifizieren (Sequenzanalyse/Datenbanken) und so auch das dazugehörige Protein zu erkennen.

5. Auffindung von Proteinen, die in EZ durch Hypoxie induziert werden

Durch mRNA- bzw. Protein-Vergleich der EZ vor und nach Hypoxie wird herausgefunden, welche mRNA's und welche Proteine durch Hypoxie in EZ induziert bzw. verändert exprimiert werden (Vorgehensweise analog zu 3.). Bei der verwendeten Hypoxie wird von Standardbedingungen ausgegangen (2 h Hypoxie, 0,5-1 h Reoxygenierung), die bereits Hinweise für eine veränderte Proteinexpression erbracht haben (s. Vorarbeiten). Wenn diese Veränderungen zu gering für die mRNA-/Protein-Analysen sind, können zunächst die Reoxygenierungsbedingungen (Art; Dauer z.B. 6, 12, 24 h) und evtl. die Hypoxiedauer (12, 24, 48 h) modifiziert werden. Auch hier wird den bekannten BHS-Proteinen sowie den in den Vorarbeiten durch Hypoxie verändert gefundenen Proteinen (z.B. SOD, NOS usw.) besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

6. Identifizierung von Proteinen, die in EZ durch Hypoxie induziert werden

Die bei 5. selektierten mRNA's sowie Proteine werden über Sequenzanalyse/Datenbankrecherchen bzw., soweit verfügbar, durch Antikörper identifiziert (Vorgehensweise analog zu 4.).

7. Aufklärung des Einflusses von AZ auf die Expression von EZ-Proteinen bei Hypoxie

Zur Aufklärung des Einflusses von AZ auf EZ bei Hypoxie werden die EZ aus Kokulturen mit AZ vor und nach Hypoxie miteinander verglichen und nach Unterschieden im mRNA- und Proteinmuster gesucht (Vorgehen wie bei 3.).

8. Identifizierung von Proteinen, die in kokultivierten EZ durch Hypoxie induziert werden

Die bei 7. herausgefundenen Unterschiede werden ebenfalls auf mRNA- und Proteinebene identifiziert (Vorgehen wie bei 4.).

3.5.4 Zeitplan

Im ersten Jahr werden schwerpunktmäßig die Programmpunkte 1 und 2 (Proteinphosphorylierung) weitergeführt. Gleichzeitig werden die Untersuchungen zur mRNA- und Protein-Analyse aufgenommen. Im zweiten und dritten Jahr wird der Schwerpunkt auf der Klärung des Einflusses von AZ auf die mRNA- und Protein-Expression von EZ liegen (Punkte 3-4). Im letzten Jahr werden die Versuche zum Einfluß von hypoxischen Zuständen auf die mRNA-/Protein-Expression begonnen. Dabei sind zunächst die Hypoxiebedingungen zu optimieren, um sie erfolgreich für die weiteren Experimente einsetzen zu können. Da die Studien zum Einfluß von AZ sehr aufwendig sind und die Dauer nicht genau vorhersehbar ist, sind die eigentlichen Arbeiten zur Hypoxie (Punkt 5-8) für die weitere Perspektive vorgesehen.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Unser Projekt ist das einzige, bei dem EZ im Mittelpunkt stehen. Bei anderen (z.B. A1/A5 Dirnagl, A6 Lindauer, B6 Weber, A7 Grune) sind sie Nebenaspekt. Dadurch ergeben sich gegenseitige Kultivierungs- und Charakterisierungshilfen. Mit A7 Grune ist die durch AZ in EZ verstärkte Expression von Transferrin-Rezeptoren näher zu untersuchen; außerdem erhalten wir hier Unterstützung bei Durchführung/Auswertung von 2-D-Elektrophoresen. Zu NO/Hypoxie/Oxyradikalen werden die Arbeiten mit A6 Lindauer (in vivo-Überprüfung unserer Zellkulturuntersuchungen), C3 Heinemann, C4 Müller, C5 Volk (Radikalnachweis bei Tumorzellen bzw. degenerativer Schädigung) fortgesetzt. Weiterhin interessiert uns die Bildung von Cytokinen bei Hypoxie (Messung durch B6 Weber, B2 Hanisch). Neue Ansätze gibt es zur Bildung degenerativer Faktoren durch geschädigte EZ, was gemeinsam mit C2 Ohm von Interesse ist. Bei der Identifizierung von Proteinkinasen (Phosphorylierungs-/Induktionsversuche) können die Erfahrungen von B7 Hass genutzt werden. Mit B1 Kettenmann sollen Versuche zum Einfluß von Oligodendrozyten und Mikroglia auf die Expression von BHS-Proteinen weitergeführt werden.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
Ia	0.5	Ia	1	42600	Ia	1	85200	Ia	1	85200	Ia	1	42600
zusammen	0.5	zus.	1	42600	zus.	1	85200	zus.	1	85200	zus.	1	42600
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		10000	515 522		18000 20000	522		20000	522		10000
		zusammen		10000	zusammen		38000	zusammen		20000	zusammen		10000
I		Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	PD Dr. I.E. Blasig	Pathobiochemie	FMP	10	01.07.95	I
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	DI B. Petschke	Molekularbiologie	FMP	40	01.10.97	IIa/2
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	B. Eilemann	MTA	FMP	5	01.07.95	Vb
	G. Hartmann	MTA	FMP	15	01.01.97	Vc
Ergänzungsausstattung	*Dr. R.F. Haseloff	exp. Biophysik	FMP	40	01.07.95 (beratend)	IIa
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

- PD Dr. habil. I.E. Blasig

Dr. Blasig ist verantwortlich für die Leitung des Projektes; er kann wöchentlich ca. 10 Stunden seiner Arbeitszeit dem Projekt widmen, da er weitere Projekte und andere Doktoranden zu betreuen sowie Lehrverpflichtungen wahrzunehmen hat.

- Dipl.-Ing. B. Petschke

Frau Petschke ist Biotechnologin mit molekularbiologischen Erfahrungen und seit dem 01.10.97 als Doktorandin in der Arbeitsgruppe tätig. Im Zusammenhang mit den vorgeschlagenen Untersuchungen arbeitet sie sich bereits in die Methodik der differential Display RT-PCR ein und wird sich vollständig dem vorliegenden Projekt und dabei vorrangig den Untersuchungen auf mRNA-Ebene widmen. Bisher wird sie über den SFB finanziert, vom 1.7.98 an über Haushaltsmittel.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

- FMTA G. Hartmann

Durchführung von Routinearbeiten bei der Zellkultivierung und routinemäßige Bestimmung biochemischer Parameter

- FMTA B. Eilemann

Sicherstellung von Zellkultivierungs- und biochemischen Arbeiten

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

- Dr. R.F. Haseloff (Begründung für BAT IIa Stelle)

Obwohl im ersten Antragszeitraum nominell nicht Mitarbeiter im SFB, hat Dr. Haseloff wesentliche Arbeiten für das Teilprojekt A2 durchgeführt. Das kommt vor allem in den projektrelevanten Publikationen zum Ausdruck, an denen er wesentlichen Anteil hatte. Bei 6 von 11 erschienenen oder im Druck befindlichen Originalarbeiten ist er Erst- oder Korrespondenzautor. Darüber hinaus stellte er bei verschiedenen internationalen Konferenzen die im Projekt erzielten Ergebnisse erfolgreich vor (u.a. Posterauszeichnung). Herr Haseloff hat nicht nur die Vorbereitung und Erarbeitung des Neuantrags wesentlich mitbestimmt, er wird auch an der Durchführung der darin geplanten Untersuchungen federführend beteiligt sein. Das betrifft alle Arbeiten zur Protein-Analyse und -Identifizierung, aber auch die direkte Anleitung und teilweise Durchführung der Phosphorylierungsexperimente sowie die mRNA-Analytik/-Identifizierung. Dazu zählt auch die Betreuung des am Projekt beteiligten Doktoranden. Herr Haseloff besitzt langjährige Erfahrungen hinsichtlich der Projektbearbeitung und hat bereits selbständig Projekte geleitet. Das beantragte Projekt ist andererseits auch für Herrn Haseloff von wesentlicher Bedeutung, da dessen zu erwartende Ergebnisse wesentliche Aspekte seiner Habilitation beinhalten werden, die im Antragszeitraum komplettiert werden soll. Nach Abschluß der Habilitation eröffnen sich im Institut und darüber hinaus neue Entwicklungsmöglichkeiten, insbesondere auch im Hochschulwesen angesichts der Tatsache, daß bereits langjährige Erfahrungen in der Lehre vorliegen. Die sehr anspruchsvollen Aufgaben des geplanten Projektes sind nicht durch einen Doktoranden zu bewältigen. Es ist daher aus unse-

rer Sicht erforderlich, daß mit Dr. Haseloff ein erfahrener Wissenschaftler seine gesamte Arbeitszeit dem Projekt zur Verfügung stellt.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung

keine

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben				
stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	5000	10000	10000	5000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	10000	38000	20000	10000

Kleingeräte

1. PCR-Cycler

18.000 DM

Begründung: Im Rahmen des Projektes sollen differentiell exprimierte Gene unter Einfluß von Astrozyten bzw. unter dem Einfluß von hypoxischen Zuständen mittels differential Display ermittelt werden. Differential Display basiert auf der RT-PCR-Methode. Daher ist ein PCR-Cycler für die Durchführung dieser Methode notwendig. Das vorhandene (aus Haushaltsmitteln beschaffte) Gerät arbeitet nach einer veralteten Technologie, bei der der Probenumsatz relativ gering ist. Es ist abzusehen, daß 1998 (auch wegen anderer, mit diesem Gerät durchzuführender PCR-Untersuchungen) das vorhandene Gerät quantitativ und qualitativ den notwendigen hohen Anforderungen nicht mehr gerecht werden wird. Der vorgesehene Thermocycler ermöglicht eine PCR ohne Öl-Beschichtung, das gleichzeitige Arbeiten mit 96 Proben sowie die Benutzung von Mikrotiterplatten.

Versuchstiere und Verbrauchsmaterial (pro Jahr)

1. Versuchstiere

Ratten: 150 Tiere á 20 DM

3.000 DM

Begründung: Die Tiere werden für die Präparation von Astrozyten sowie (in geringerem Maße) von Gehirndothelzellen benötigt. Eine kurzzeitige Haltung im institutseigenen Tierstall ist möglich. Alle erforderlichen Genehmigungen liegen vor.

2. Zellkulturbedarf

– Kulturgefäße und Zubehör

4.000 DM

– Einwegpipetten, Sterilfilter, Zubehör

4.000 DM

– Wachstumsfaktoren, spez. Effektoren, Antibiotika

1.000 DM

– Sonstige Bio- und Feinchemikalien

2.000 DM

Begründung: Diese Materialien sind von grundsätzlicher Bedeutung, da alle Untersuchungen an Zellkulturen durchgeführt werden. Insbesondere die Beschaffung der für Sterilarbeiten notwendigen Materialien erfordert einen hohen finanziellen Aufwand, der nicht umgangen werden kann.

3. Primer und Antikörper 6.000 DM

Begründung: Primer und Antikörper sind unverzichtbar für die Durchführung der Experimente auf mRNA- bzw. Proteinebene, die das Kernstück der Projekts darstellen.

Summe: **20.000 DM**

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A5

3.1.1 Thema:

Fokale cerebrale Ischämie und induzierte Ischämietoleranz:

Rolle von Makrophagen und Mikroglia

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neurologie, experimentelle Neurologie, Schlaganfallforschung

3.1.3 Leiter:

Dirnagl Ulrich, PD Dr. med. geb. 9.8.1960

Neurologische Klinik der Charité

10098 Berlin

Tel: +49-30-2802-8318

Fax: +49-30-2802-5047

E-mail: dirnagl@neuro.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

nein ja, befristet bis zum : 5/2000 (Heisenbergstipendium)

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen ja nein
- klinische Studien im Bereich der
somatischen Zell- oder Genterapie ja nein
- Tierversuche ja nein
- gentechnologische Versuche ja nein

3.1.6 Beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereiches

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs-Ausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998	19,8	9,5	-	29,3
1999	39,6	19	-	58,6
2000	39,6	19	-	58,6
1. Hj. 2001	19,8	9,5	-	29,3

3.2 Zusammenfassung

Der vorliegende Antrag versucht mittels pharmakologischer und gentechnischer Ansätze Hinweise auf die differentielle Rolle von aus dem Blut einwandernden Leukozyten und aktivierter ortständiger Mikroglia bei experimenteller fokaler zerebraler Ischämie ('Schlaganfall') zu erhalten. Hierzu wird einerseits mittels einer transgenen Maus sowie in einer Knochenmarks-Chimäre, welche das fluoreszierende Markerprotein GFP in blutbildenden Zellen überexprimieren, die Einwanderung/Aktivierung von Makrophagen/ Mikroglia nach fokaler zerebraler Ischämie charakterisiert. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der Möglichkeit, ortständige Mikroglia von eingewanderten Leukozyten, hier insbesondere den Monozyten/Makrophagen, zu unterscheiden, was mit bisheriger, v.a. immunhistochemischer Technik nur begrenzt möglich war. Unsere Untersuchungen bedienen sich der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie im intakten Gehirn des lebenden Versuchstieres, sowie konventioneller Fluoreszenzmikroskopie in Hirnschnitten. Neben dieser Charakterisierung des differentiellen Verhaltens von Makrophagen und Mikroglia werden manipulative Untersuchungen durchgeführt, welche Hinweise auf eine mögliche protektive Rolle der Mikroglia bei zerebraler Ischämie ergeben sollen. Hier bedienen wir uns der Strategie der induzierten Ischämietoleranz (Präkonditionierung). Die vorgeschlagenen Untersuchungen überprüfen damit folgende Hypothesen: 1) GFP labelling eignet sich zur Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen im Hirnparenchym nach fokaler zerebraler Ischämie und damit als Basistechnologie für die elektrophysiologische und molekularbiologische Charakterisierung dieser Zellen nach zerebraler Ischämie. 2) Mikrogliazellen werden aktiviert, bevor Makrophagen einwandern. 3) Induktion von Ischämietoleranz ist mit der Aktivierung von Mikrogliazellen vergesellschaftet. 4) Die aktivierte Mikroglia und von ihr synthetisierte protektive Proteine sind kausal an der Toleranzentwicklung beteiligt, womit ein wichtiger Hinweis für eine protektive Potenz von Mikroglia bei der zerebralen Ischämie gewonnen wäre.

3.3 Stand der Forschung

Inflammation und fokale cerebrale Ischämie: Rolle von Mikroglia und Makrophagen

Daß der Schlaganfall (fokale cerebrale Ischämie) zur lokalen Inflammation führt, kann als gesichert gelten. Diese ist gekennzeichnet durch die Expression proinflammatorischer Mediatoren, einer ausgeprägten Leukozyten-Endothel Interaktion, der Transmigration von Leukozyten ins Hirnparenchym, sowie der Aktivierung von ortständigen immunkompetenten Zellen des ZNS, der Mikroglia.

Induktion von Zytokinen

Proinflammatorische Zytokine, wie TNF α , IL-1 und IL-6 spielen vermutlich als Vermittler der inflammatorischen Komponente der zerebralen Ischämie eine bedeutende Rolle. Wenige Stunden nach Induktion einer experimentellen fokalen Ischämie läßt sich zunächst die Zytokin-mRNA und dann auch das Protein nachweisen (Buttini *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994). Zytokinrezeptorantagonisten bzw. Blocker vermindern in diesen Modellen den ischämischen Schaden (Collins *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 1995). Eine mit der Infarktgröße korrelierende intrathekale Produktion von IL-1 und IL-6 konnte in Infarktpatienten gezeigt werden (Tarkowski *et al.*, 1995).

Die Zytokine haben dabei wohl eine Signalfunktion und verbinden die frühe, exzitotoxische bzw. Periinfarktdepolarisations-Phase mit der eigentlichen Inflammation. Ein frühes Signal für die Induktion der Zytokine, welche zunächst von zerebralen Endothelzellen, Astrozyten, Mikroglia, und evtl. auch Neuronen gebildet werden, sind vermutlich freie Sauerstoffradikale. Diese aktivieren den prototypischen proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B. Neben den Zytokinen TNF α IL-1 und IL-6 induziert NF κ B noch eine Vielzahl anderer für die Inflammation und auch den programmierten Zelltod wichtigen Gene wie die iNOS die Cyclooxygenase-2, die Zelladhäsionsproteine E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1, sowie den apoptoseinduzierender Tumorsuppressor p53, deren Expression während der Ischämie nachgewiesen wurden.

Nachdem die inflammatorische Reaktion über reaktive Sauerstoffspezies, Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutstrom sowie durch Mikrogliaaktivierung in Gang gekommen ist (>12h), sind wohl diese Zellen Hauptquellen für die Zytokinproduktion, welche nun an der Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion beteiligt ist.

Aktivierung von Leukozyten

Eine Vielzahl von Befunden spricht für die Beteiligung von Leukozyten an der ischämischen Schadenskaskade, insbesondere bei der fokalen zerebralen Ischämie: 1) Experimentell induzierte Leukopenie oder Gabe von Antikörpern gegen leukozytär-endotheliale Adhäsionsmoleküle wirken neuroprotektiv (Clark *et al.*, 1991; Vasthare *et al.*, 1990); 2) Akkumulation von Leukozyten in der zerebralen Mikrozirkulation bzw. Extravasation ins Hirnparenchym konnte histologisch gezeigt werden (Garcia *et al.*, 1994; Del Zoppo *et al.*, 1991) 3) bei Schlaganfall-Patienten korreliert die Leukozytenzahl im Blut mit der Schwere der neurologischen Symptome und der Infarktgröße (Bielenberg and Wagener, 1992), außerdem ist die Leukozytenaggregabilität und -Filtrierbarkeit gestört (Grau *et al.*, 1992; Mercuri *et al.*, 1989; Uchiyama *et al.*, 1991).

Welche Faktoren führen zur ischämischen Aktivierung von Leukozyten? 1) NFκB sowie Zytokine regulieren auf den Endothelzellen Adhäsionsrezeptoren hoch (z.B. ICAM-1) (Pober and Cotran, 1990); 2) freie Sauerstoffradikale (Suzuki *et al.*, 1989) bzw. Leukotriene (Lindström *et al.*, 1990) induzieren leukozytäre β2-Integrine (CD11/18) auf der Oberfläche von polymorphkernigen Leukozyten über AP-1 und NFκB; 3) Superoxid führt zur Expression des Leukozyten-Adhäsionsmoleküles GMP140 auf dem Endothel (Patel *et al.*, 1991). Durch diese und eine Vielzahl weiterer Signale kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten (hier insbesondere der Neutrophilen und der Monozyten), welche über die Phasen 'Rollens' (entlang des Endothels); 'Anheften' (am Endothel), 'Transmigration' zunächst in den perivaskulären Raum und dann ins Hirnparenchym gelangen (Pardi *et al.*, 1992; Adams and Shaw, 1994). Auf vielfältige Weise können die Leukozyten dabei am Gewebeschaden teilhaben: Durch Verschlechterung des Fließverhaltens des Blutes im Kapillarbett können sie das Perfusionsdefizit verstärken, wichtiger aber ist wohl noch die Potenz dieser Zellen, toxische Metabolite, insbesondere Radikalspezies zu generieren (Dirnagl, 1993).

Mikrogliaaktivierung

Mikrogliazellen sind die primären Immuneffektorzellen des ZNS, und konstituieren etwa 20 % der glialen Zellpopulation, womit sie gleich häufig oder sogar häufiger als Neuronen sind (Banati *et al.*, 1993). Mikrogliazellen haben ontogenetisch möglicherweise denselben Ursprung wie Makrophagen, und wandern früh nach der Geburt aus der Zirkulation ins ZNS ein, wo sie in einem Ruhezustand verweilen. Danach besteht vermutlich kein Austausch mehr mit dem Makrophagen-Pool außerhalb des ZNS (siehe aber unten, und (Eglitis and Mezey, 1997)). Sie bilden damit die ortständigen Gewebemakrophagen des Gehirnes. Für ruhende Mikrogliazellen ist bisher noch keine Funktion beschrieben worden.

Parallel zur Einwanderung von phagozytierenden Blutmakrophagen (von denen sie im aktivierten Zustand nicht mehr zu unterscheiden ist) kommt es, besonders in der Penumbrazone bei fokaler zerebraler Ischämie, zur Aktivierung von Mikroglia (Gehrmann *et al.*, 1992). Die Mikroglia verändert ihre Morphologie von einer ramifizierten Zelle zu einer amöboiden Form und beginnt zu proliferieren. Dabei exprimieren aktivierte Mikrogliazellen eine Reihe von charakteristischen Oberflächenmarkern (z.B. MHC) (Gehrmann *et al.*, 1995), und sind damit in der Lage, Antigen zu präsentieren. Ähnlich den Leukozyten ist die Mikroglia in der Lage, eine Vielzahl von inflammationsverstärkenden Botenstoffen (v.a. Zytokine) sowie toxischen Metaboliten (v.a. Radikalspezies wie NO und Superoxid) und Enzyme (Cathepsin) zu produzieren. Wie die eingewanderten Makrophagen ist sie außerdem phagozytisch aktiv. Andererseits produziert aktivierte Mikroglia auch antiinflammatorische Zytokine (z.B. TGFβ) und Wachstumsfaktoren. Es muß deshalb betont werden, daß zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig klar ist, ob die Mikroglia bei der zerebralen Ischämie eine rein destruktive Rolle spielt, oder ob auch eine schadensbegrenzende Funktion der Mikroglia vorliegt (Gehrmann *et al.*, 1995; Kreutzberg, 1996).

Erschwert wird die Entscheidung, ob Mikrogliaaktivierung bei fokaler zerebraler Ischämie protektiv oder destruktiv ist, durch die Probleme in der Unterscheidung von aktivierter Mikroglia und eingewanderten Monozyten/Makrophagen. Es ist wahrscheinlich, daß die protektive oder destruktive Funktion vom Zelltyp (Makrophagen im Parenchym gelten allgemein als destruktiv, für die Mikroglia läßt sich dies nicht eindeutig sagen, s.o.), vom Aktivierungsgrad und damit von der Lokalisation (Infarktkern vs. Randzone) sowie vom Zeitpunkt in Bezug auf den aktivierenden Stimulus abhängt.

Zur Klärung der wichtigen Frage nach der Rolle der Mikroglia/Makrophagen müssen also deren möglicherweise differentielle Aktivierungsmuster in Folge von cerebraler Ischämie noch besser charakterisiert werden, und Paradigmen entwickelt werden, in denen protektive von destruktiven Momenten getrennt werden können.

Induzierte Ischämietoleranz

Hypoxische bzw. ischämische Ereignisse von kurzer Dauer können dazu führen, daß ein danach stattfindendes längeres hypoxisches/ischämisches Ereignis zu einem geringeren Schaden führt. Dieses Phänomen, das *induzierte ischämische Toleranz* oder *ischämische Präkonditionierung (IP)* genannt wird, wurde vor mehr als einer Dekade zunächst am Herzen und dann später an einer Reihe von weiteren Organen, einschließlich dem Gehirn beschrieben (Heurteaux *et al.*, 1995; Kitagawa *et al.*, 1990; Kitagawa *et al.*, 1991).

Nachdem die IP am Gehirn zunächst nur für die globale zerebrale Ischämie (das experimentelle Korrelat der ZNS-Folgen des Herzstillstandes) beschrieben wurde (Kitagawa *et al.*, 1990), ist heute klar, daß auch die kurze fokale zerebrale Ischämie (Toyoda *et al.*, 1997), sowie repetitive Depolarisationen (sog. Spreading Depression) (Kobayashi *et al.*, 1995) und inflammatorische Stimuli (z.B. LPS (Tasaki *et al.*, 1997), TNFa (Nawashiro *et al.*, 1997)) zur Ischämietoleranz führen können. Wir konnten zeigen, daß auch pharmakologische Strategien (Riepe *et al.*, 1997; Wiegand *et al.*, 1997) sowie hyperbare Oxygenierung (s.u. Eigene Vorarbeiten) zur Toleranzentwicklung führen können. Die Bedeutung des Phänomens der Präkonditionierung liegt dabei einerseits im therapeutischen Potential (d.h. dem Schutz des Gehirnes gegen fokale Ischämie bei antizipierter Ischämie, z.B. in der Neurochirurgie). Andererseits ist die Präkonditionierung ein interessantes Modell zum Studium endogener protektiver Mechanismen des ZNS, die vermutlich auch bei 'normaler' Ischämie eine Rolle spielen und so isoliert werden können. Interessant im Kontext von inflammatorischen Mechanismen ist, daß ein möglicher gemeinsamer 'Nenner' aller bisher beschriebener toleranzinduzierender Stimuli die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen ist. Sauerstoffradikale können zur Mikrogliaaktivierung führen, wie bereits erwähnt haben sie das Potential protektive Proteine zu synthetisieren. Spreading depression, ein Stimulus welcher ebenfalls zur Ischämietoleranz führen kann, aktiviert Mikroglia. Auch in einem Modell von ischämischer Präkonditionierung bei globaler zerebraler Ischämie war diese mit Mikrogliaaktivierung gekoppelt (Kato *et al.*, 1994). Aus der vorliegenden Evidenz kann daher die Hypothese aufgestellt werden, daß Toleranz möglicherweise zumindest teilweise durch Mikroglia mediiert wird, und Sauerstoffradikale dabei als Signal wirken.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß

- Inflammatorische Mechanismen bei der fokalen zerebralen Ischämie vermutlich einen wichtigen Anteil an der Ausprägung des Schadens haben
- Mikroglia und Makrophagen hierbei eine noch unverstandene Rolle spielen, welche insbesondere was die Mikroglia betrifft, von Protektion bis Destruktion reichen könnte
- Induzierte ischämische Toleranz ein interessantes experimentelles Paradigma ist, mit dem sich endogene protektive Programme studieren lassen, und das in Zukunft auch klinische Relevanz erlangen könnte
- Mikrogliaaktivierung könnte, evtl. über das Signal 'freie Sauerstoffradikale', an der Toleranzentwicklung teilhaben.

Literatur:

- Adams, D.H. and Shaw, S. (1994) Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* 343, 831-836.
- Banati, R.B., Gehrman, J., Schubert, P., and Kreutzberg, G.W. (1993) Cytotoxicity of Microglia. *Glia* 7, 111-118.
- Bielenberg, G.W. and Wagener, G. (1992) PAF antagonists reduce infarct size in focal cerebral ischemia in the rat brain. *in: Pharmacology of cerebral ischemia*. ed.,
- Buttini, M., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1994) Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 23, 126-134.
- Clark, W.M., Madden, K.P., Rothlein, R., and Zivin, J.A. (1991) Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 22, 877-883.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., and Maniatis, T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9, 899-909.
- Del Zoppo, G.J., Schmid-Schönbein, G.W., Mori, E., Copeland, B.R., and Chang, C.M. (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22, 1276-1283.
- Dirnagl, U. (1993) Cerebral ischemia: The microcirculation as a trigger and target. *Prog.Brain Res.* 96, 49-65.
- Eglitis, M.A. and Mezey, E. (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 4080-4085.
- Garcia, J.H., Liu, K.F., and Relton, J.K. (1995) Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am.J.Pathol.* 147, 1477-1486.
- Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., and Del Zoppo, G.J. (1994) Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 144, 188-199.
- Gehrman, J., Banati, R.b., Wiessner, C., Hossmann, K.-A., and Kreutzberg, G.W. (1995) Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 21, 277-289.
- Gehrman, J., Bonnekoh, P., Miyazawa, T., Hossmann, K.-A., and Kreutzberg, G.W. (1992) Immunocytochemical Study of an Early Microglial Activation in Ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 12, 257-269.
- Gehrman, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G.W. (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res.Rev.* 20, 269-287.
- Grau, A.J., Berger, E., Sung, K.L.P., and Schmid-Schönbein, G.W. (1992) Granulocyte adhesion; deformability; and superoxide formation in acute stroke. *Stroke* 23, 33-39.

- Heurteaux, C., Lauritzen, I., Widmann, C., and Lazdunski, M. (1995) Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 4666-4670.
- Kato, H., Kogure, K., Liu, Y., Araki, T., and Itoyama, Y. (1994) Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res.* 652, 71-75.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Kuwabara, K., Tagaya, M., Ohtsuki, T., Hata, R., Ueda, H., Handa, N., Kimura, K., and Kamada, T. (1991) 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res.* 561, 203-211.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M., Handa, N., Fukunaga, R., Kimura, K., Mikoshiba, K., and et al (1990) 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 528, 21-24.
- Kobayashi, S., Harris, V.A., and Welsh, F.A. (1995) Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 15, 721-727.
- Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends.Neurosci.* 19, 312-318.
- Lindström, P., Lerner, R., Palmblad, J., and Patarroyo, M. (1990) Rapid adhesive responses of endothelial cells and of neutrophils induced by leukotriene B4 are mediated by leukocytic adhesion protein CD18. *Scand J Immunol.* 31, 737-744.
- Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1994) Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 25, 1481-1488.
- Mercuri, M., Ciuffetti, G., Robinson, M., and Toole, J. (1989) Blood cell rheology in acute cerebral infarction. *Stroke* 20, 959-962.
- Nawashiro, H., Tasaki, K., Ruetzler, C.A., and Hallenbeck, J.M. (1997) TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17, 483-490.
- Pardi, R., Inverardi, L., and Bender, J.R. (1992) Regulation mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol Today* 13, 224-230.
- Patel, K.D., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., McEver, R.P., and McIntyre, T.M. (1991) Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 112, 749-760.
- Pober, J.S. and Cotran, R.S. (1990) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537-544.
- Riepe, M., Nakase, H., Esclaire, F., Kasischke, K., Schreiber, S., Ludolph, A.C., Dirnagl, U., Hugon, J., and Kempfski, O. (1997) Chemical preconditioning: neuroprotection by chemical inhibition of oxidative phosphorylation. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 17, 257-264.
- Suzuki, M., Inauen, W., Kvietys, P.R., Grisham, M.B., Meininger, C., Schelling, M.E., Granger, H.J., and Granger, D.N. (1989) Superoxide dismutase mediates reperfusion-induced leukocyte endothelial cell interactions. *Am.J.Physiol.* 257, H1740-H1745

- Tarkowski, E., Rosengren, L., Blomstrand, C., Wikkelso, C., Jensen, C., Ekholm, S., and Tarkowski, A. (1995) Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 26, 1393-1398.
- Tasaki, K., Ruetzler, C.A., Ohtsuki, T., Martin, D., Nawashiro, H., and Hallenbeck, J.M. (1997) Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 748, 267-270.
- Thomas, W.S., Mori, E., Copeland, B.R., Yu, J.Q., Morrissey, J.H., and Del Zoppo, G.J. (1993) Tissue factor contributes to microvascular defects after focal cerebral ischemia. *Stroke* 24, 847-853.
- Toyoda, T., Kassell, N.F., and Lee, K.S. (1997) Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuroreport.* 8, 847-851.
- Uchiyama, S., Yamazaki, M., and Maruyama, S. (1991) Role of platelet-activating factor in aggregation of leukocytes and platelets in cerebral ischemia. *Lipids* 26, 1247-1249.
- Vasthare, U.S., Heinel, L.A., Rosenwasser, R.H., and Tuma, R.F. (1990) Leukocyte involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Surg Neurol* 33, 261-265.
- Wiegand, F., Liao, W., Redetzki, F., Knapp, F., Riepe, M., Lindauer, U., Meisel, A., and Dirnagl, U. (1997) Induced tolerance to focal cerebral ischemia by chemical inhibition of oxidative phosphorylation in the rat: time course and dependence on protein synthesis. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17(Suppl.1), S207-S207(Abstract)
- Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y., and Kogure, K. (1995) Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26, 676-680.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Fokale zerebrale Ischämie

Der Antragsteller befaßt sich seit Jahren mit den Schadenskaskaden beim Schlaganfall (z.B.: Dirnagl *et al.*, 1989; Dirnagl and Pulsinelli, 1990; Dirnagl *et al.*, 1990; Dirnagl *et al.*, 1993; Dirnagl, 1993; Dirnagl *et al.*, 1994; Dirnagl *et al.*, 1995). In einer Vielzahl von Untersuchungen konnten Modelle und Methoden der experimentellen Schlaganfallforschung etabliert werden und Elemente der Schadenskaskade untersucht werden. Von Bedeutung für die hier beantragten Untersuchungen ist, daß im Labor des Antragstellers nun auch alle Techniken und Modelle zum Einsatz von knockout und transgenen Mäusen in der Schlaganfallforschung etabliert sind (Beatmung und Narkose, S1-Tierlabor, etc.). Wir arbeiten derzeit u.a. mit einer iNOS-defizienten Maus (Kooperation C.Nathan, Rockefeller U, New York; MacMicking, Nathan, et al. 1995) in der wir die Rolle dieses Enzymes, das insbesondere auch von Mikrogliazellen exprimiert wird, bei zerebraler Ischämie und Präkonditionierung untersuchen. Darüber hinaus untersuchen wir in einer Kooperation mit Rudolph Jänisch (MIT Boston) und Mike Moskowitz (Harvard U Boston) die Rolle der DNA-Methylierung an einer Methyltransferase-heterozygoten Maus (Laird, Jackson-Grusby, et al. 1995). Präliminäre Ergebnisse zeigen, daß diese Tiere etwa 50 % kleinere Infarkte als Wildtyp-Mäuse haben. Wir erweitern

diese Untersuchungen derzeit auf die Frage, ob DNA-Methylierung auch bei Präkonditionierung relevant ist.

Rolle der Leukozyten und Mikroglia bei der zerebralen Ischämie

Durch Etablierung von konfokal mikroskopischen Untersuchungen am lebenden Versuchstier (Dirnagl *et al.*, 1991; Dirnagl *et al.*, 1992; Dirnagl *et al.*, 1994) und Charakterisierung eines Farbstoffes (Rhodamin 6G) mittels dessen intravital Leukozyten gefärbt werden können (Villringer *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 1997a) haben wir uns der Frage der Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten und deren Rolle für die Mikrozirkulationsstörung nach globaler zerebraler Ischämie zugewandt (Dirnagl *et al.*, 1994). Dabei konnten wir zum ersten Mal in vivo die postischämische Transmigration von Leukozyten ins Parenchym bildgebend darstellen und charakterisieren. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Kettenmann (MDC) haben wir nun diesen Farbstoff eingesetzt, um bei fokale ischämischen Tieren Leukozyten des Blutstromes zu markieren und nach Gewinnung von akuten Brain Slices nach bestimmten Zeitpunkten eine elektrophysiologische Charakterisierung der Rhodamin-positiven im Vergleich zur Rhodamin-negativen (residenten) Makrophagen/Mikroglia durchzuführen (Lyons *et al.*, 1997) (Manuskript in Vorbereitung). Diese hauptsächlich von Frau S. Lyons (MDC) durchgeführten Untersuchungen zielen letztendlich auf die Frage, ob die hier gefundenen, charakteristischen Kalium-Ströme für die Mikrogliaaktivierung kausal von Bedeutung sind.

Inflammation und fokale zerebrale Ischämie:

Ausgehend von Befunden von C. Iadecola (Iadecola, Zhang, et al. 1995) haben wir untersucht, ob bei permanenter fokaler cerebraler Ischämie der Ratte eine extrem verzögerte Behandlung mit einem antiinflammatorischen Agens wirksam sein kann. Gabe von Aminoguanidin, einem Inhibitor der induzierbaren NOS, 24 h nach Ischämieinduktion für 3 Tage, reduzierte dabei die nach 7 Tagen vermessene Infarktgröße um 30 % im Vergleich zur Kontrolle. Diese Befunde wecken große Hoffnungen in Bezug auf die Möglichkeit einer verzögerten Therapie und belegen indirekt die Relevanz inflammatorischer Schadensmechanismen (Manuskript in Vorbereitung).

Ischämische Präkonditionierung.

Zum ersten Mal konnten wir eine pharmakologische Strategie zur Toleranzinduktion gegen den Schaden bei der globalen (Riepe *et al.*, 1997) und dann bei der fokalen zerebralen Ischämie beschreiben (Wiegand *et al.*, 1997, Manuskript eingereicht). Einmalige Gabe von 3-NPA, einem Inhibitor der Succinatdehydrogenase, führt nach 3 Tagen zu Infarkten, welche 70% kleiner sind als die von nicht präkonditionierten Kontrollen. Eine Zusammenfassung der Daten findet sich in Abb. 1. Dieser Effekt ist Proteinsynthese-abhängig, insofern die Koapplikation von 3-NPA und dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximide die Präkonditionierung vollständig inhibiert. Diese Dosierung von 3-NPA führt zu keinem nachweisbaren Schaden (histologisch, molekularbiologisch) und zu keinen Verhaltensauffälligkeiten bei den Tieren. Wir konnten zeigen, daß 3-NPA innerhalb von ca. 2 Stunden einen Radikalburst auslöst. Koapplikation von 3-NPA mit dem Radikalfänger DMTU führt ebenfalls zur kompletten Inhibition der Präkonditionierung, weshalb wir mutmaßen, daß die Radikale relevante Momente der Transduktionskaskade der Präkonditionierung sind. OX-42-Immunhistochemie ergab, daß 3-NPA Behandlung nach 3 Tagen, also zum Zeitpunkt des maximalen Schutzes, zu einer milden, globalen Aktivierung von Mikroglia führt.

Derzeit untersuchen wir, ob ein unmittelbar klinisch einsetzbarer Stimulus, welcher zur Radikalgenerierung führt, ebenfalls präkonditionierend beim Schlaganfall wirkt: Hyperbare Oxygenierung. Vorläufige Daten belegen, daß in der Tat bei Ratten der 5 - malige Aufenthalt

in 100 % Sauerstoff bei 2 Atm (entspricht Tauchtiefe 20m) im Abstand von 24 Stunden zu einer signifikanten Infarktvolumenreduktion führt.

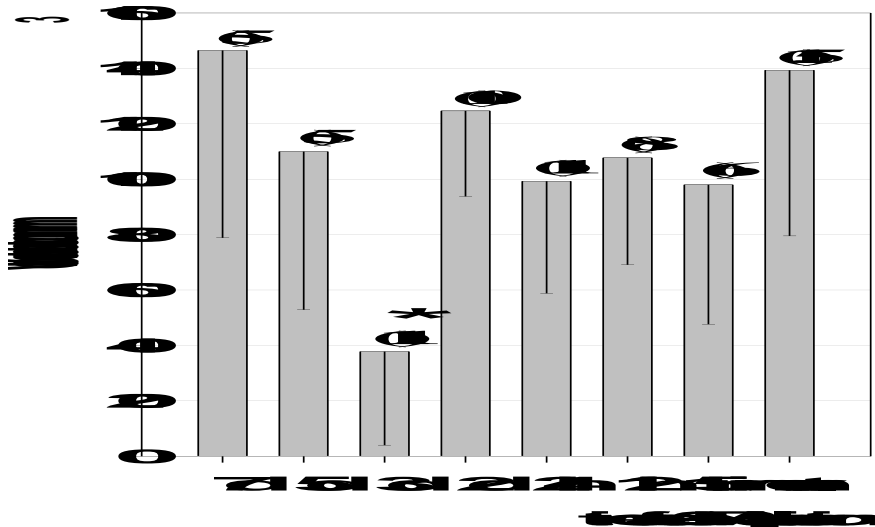


Abb.1: Induktion von Ischämietoleranz durch eine ip Injektion von 20 mg/kg NPA. Maximaler Effekt bei permanenter fokaler Ischämie 3 Tage nach 3-NPA Injektion: Infarktvolumen nur noch 30 % der Kontrollgruppe. Der Effekt von 3-NPA ist vollständig inhibierbar durch Koapplikation der Proteinsynthesehemmers Cycloheximid oder des Radikalfängers DMTU (Daten nicht gezeigt).

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie in vivo

Seit Jahren befaßt sich der Antragsteller mit der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie und ihrer Anwendung zum Studium der zerebralen Mikrozirkulation, insbesondere der Endothel-Leukozyten Interaktion (Villringer et al., 1989; Dirnagl et al., 1991; Villringer et al., 1991; Dirnagl et al., 1994; Villringer et al., 1994; Lindauer et al., 1996; Lorenzl et al., 1993; Weber et al., 1997b, Weber et al., 1997a, Barfod et al., 1997), Übersichten:(Dirnagl et al., 1992; Villringer et al., 1992; Dirnagl et al., 1994; Villringer and Dirnagl, 1993). Dabei konnten sowohl die Möglichkeit als auch die Probleme dieses Ansatzes erhellt werden. Das Hauptproblem des bisherigen Einsatzes war die rel. geringe Eindringtiefe und das Problem der Phototoxizität. Durch eine Modifikation der Methode, die sog. Dual Photon Confokal Microscopy, sind bei beiden Punkten jedoch entscheidende Fortschritte erzielt worden (siehe Projekt Z2 und unten.).

GFP-Transfektion, Zellkultur, Knochenmarkstransplantation

Ein Mitarbeiter des Projektes (Josef Priller) hat Erfahrung in der Herstellung von GFP – Fusionen (GFP-Frataxin) und deren Transfektion (Priller *et al.*, 1997). Die nötige Ausstattung und Expertise zur Kultivierung der Stammzellen und deren Transfektion ist in unserem Zellkultur-Labor gegeben, in dem u.a. neuronale (Bruer *et al.*, 1997), gliale (Freyer *et al.*, 1996), und endotheliale (Weikert *et al.*, 1997) Zellen routinemäßig kultiviert werden.

In Voruntersuchungen mit F.Kirchhoff aus der AG Kettenmann am MDC konnten wir mittels Immunhistochemie zeigen, daß CD11b nur auf Mikroglia, nicht auf Astrozyten und Neuronen

in Kultur exprimiert wird. Dies ist wichtig für die Konstruktion der transgenen Maus (siehe unten), bei der das fluoreszierende Markerprotein GFP unter Kontrolle eines Mikroglia/Makrophagenspezifischen Promoters exprimiert werden soll. Der CD11b Promotor ist kloniert und sequenziert (Shelley und Aranaout 1991) und wurde uns von M.A.Arnaout (Harvard University, USA) zur Verfügung gestellt, woraus wir das für die Oocyten-Injektion benötigte CD11b-GFP Konstrukt hergestellt haben, welches wir derzeit in verschiedene Zelltypen (u.a. Mikroglia) transfizieren und testen. Die Knochenmarkstransplantations-Technologie wurde von uns in Zusammenarbeit mit Prof.Volk (Inst.für Immunologie, Charité) und Frau Dr.Just (GSF München) etabliert. Die Zellsortierung (MACS/FACS) wird in Kooperation mit Prof.Radbruch vom Deutschen Rheumaforschungszentrum durchgeführt. Der für die GFP-Transfektion der Knochenmarks-Stammzellen (s.u.) nötige Vektor (Viral-producer cell line) steht uns zur Verfügung (A.W.Nienhuis, St.Judes Hospital Memphis), wir optimieren derzeit die Transfektionsbedingungen.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

- Barfod, C., Akgören, N., Fabricius, M., Dirnagl, U., and Lauritzen, M. (1997) Erythrocyte recruitment during hypo- and hypercapnia and locally evoked increases of cerebral blood flow. *Acta Physiol Scand* 160, 123-132.
- Bruer, U., Isaev, N., Weih, M., Ruscher, K., Bergk, A., Wiegand, F., Meisel, A., Victorov, I., and Dirnagl, U. (1997) Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons: hypoxic versus pharmacologic preconditioning. *FEBS Lett* 414, 117-121.
- Dirnagl, U. (1993) Cerebral ischemia: The microcirculation as a trigger and target. *Prog.Brain Res.* 96, 49-65.
- Dirnagl, U., Jacewicz, M., and Pulsinelli, W. (1990) Nimodipine posttreatment does not increase blood flow in rats with focal cerebral ischemia. *Stroke* 21, 1357-1361.
- Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M., and Pulsinelli, W. (1989) Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser- Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 9, 589-596.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., Them, A., Pfister, W., Einhüpl, K.M., and Villringer, K.M. (1994) Subsurface microscopical visualization of brain tissue in vivo: present, problems, and prospects. *Micron* 24, 611-622.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., Them, A., Schreiber, S.J., Pfister, H.W., Koedel, U., Reszka, R., Freyer, D., and Villringer, A. (1995) Global cerebral ischemia in the rat: online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 15, 929-940.
- Dirnagl, U., Niwa, K., Sixt, G., and Villringer, A. (1994) Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in the rat is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 25, 1028-1038.
- Dirnagl, U. and Pulsinelli, W. (1990) Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 10, 327-336.
- Dirnagl, U., Thoren, P., Villringer, A., Sixt, G., Them, A., and Einhüpl, K.M. (1993) Global forebrain ischemia in the rat: controlled reduction of cerebral blood flow by hypobaric hypotension and two vessel occlusion. *Neurol.Res.* 15, 128-130.

- Dirnagl, U., Villringer, A., and Einhäupl, K.M. (1992) In-vivo confocal laser scanning microscopy of the cerebral microcirculation. *J Microscopy* 165, 147-158.
- Dirnagl, U., Villringer, A., Gebhardt, R., Haberl, R.L., and Einhäupl, K.M. (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain cortical microcirculation in vivo. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 11, 353-360.
- Freyer, D., Weih, M., Weber, J.R., Manz, R., Ziegenhorn, A., Angstwurm, K., Burger, W., and Dirnagl, U. (1996) Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF α in astroglial enriched cultures. *Glia* 16, 1-16.
- Lindauer, U., Dreier, J.P., Angstwurm, K., Villringer, A., Einhäupl, K.M., and Dirnagl, U. (1996) Role of nitric oxide synthase inhibition in leukocyte- endothelium interaction in the rat pial microvasculature. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 1143-1153.
- Lorenzl, S., Koedel, U., Dirnagl, U., Ruckdeschel, G., and Pfister, H.W. (1993) Imaging of leukocyte-endothelium interaction using in vivo confocal laser scanning microscopy during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J.Infect.Dis.* 168, 927-933.
- Lyons, S.A., Pastor, A., Wiegand, F., Kann, O., Ohlemeyer, C., Knapp, F., Kettenmann, H., and Dirnagl, U. (1997) Brain-derived microglia and blood-born macrophages are activated in acute adult rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion. *Soc.Neurosci.Abstr.* 23, (in press)(Abstract)
- Priller, J., Scherzer, C.R., Faber, P.W., MacDonald, M.E., and Young, A.B. (1997) Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann.Neurol.* 42, 265-269.
- Riepe, M., Nakase, H., Esclaire, F., Kasischke, K., Schreiber, S., Ludolph, A.C., Dirnagl, U., Hugon, J., and Kempfski, O. (1997) Chemical preconditioning: neuroprotection by chemical inhibition of oxidative phosphorylation. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 17, 257-264.
- Villringer, A. and Dirnagl, U. (1993) Towards imaging of cerebral blood flow and metabolism on a microscopical scale in vivo. *Adv Exp Med Biol* 333, 193-213.
- Villringer, A., Dirnagl, U., and Einhäupl, K.M. (1992) Microscopical visualization of the brain in vivo. In: *Visualization in biomedical microscopies. 3D-imaging and computer applications*, 161-181. Edited by Kriete, A., Weinheim, VCH.
- Villringer, A., Dirnagl, U., Them, A., Schurer, L., Krombach, F., and Einhäupl, K.M. (1991) Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc.Res* 42, 305-315.
- Villringer, A., Haberl, R.L., Dirnagl, U., Anneser, F., Verst, M., and Einhäupl, K.M. (1989) Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res.* 504, 159-160.
- Villringer, A., Them, A., Lindauer, U., and Dirnagl, U. (1994) Capillary perfusion of the rat brain cortex: an in vivo confocal microscopy study. *Circ Res* 75, 55-62.
- Weber, J.R., Angstwurm, K., Rosenkranz, T., Lindauer, U., Burger, W., Einhaupl, K.M., and Dirnagl, U. (1997a) Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis in rats. *Neurosci.Lett.* 226, 17-20.
- Weber, J.R., Rosenkranz, T., Angstwurm, K., Lindauer, U., Burger, W., Einhäupl, K.M., and Dirnagl, U. (1997b) Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in

pial vessels in the early phase of bacterial meningitis. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17(Suppl.1), S712-S712(Abstract)

Weikert, S., Freyer, D., Weih, M., Isaev, N., Busch, C., Schultze, J., Megow, D., and Dirnagl, U. (1997) Rapid, Ca^{2+} -dependent NO-production from CNS-cells in culture measured by NO-nitrite/ozone chemoluminescence. *Brain Res.* 748, 1-11.

Wiegand, F., Liao, W., Redetzki, F., Knapp, F., Riepe, M., Lindauer, U., Meisel, A., and Dirnagl, U. (1997) Induced tolerance to focal cerebral ischemia by chemical inhibition of oxidative phosphorylation in the rat: time course and dependence on protein synthesis. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17(Suppl.1), S207-S207(Abstract)

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N: Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase [published erratum appears in *Cell* 1995 Jun 30;81(7):following 1170]. *Cell* 1995;81:641-650

Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R: Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995;81:197-205

Iadecola C, Zhang F, Xu X: Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am.J.Physiol.* 1995;268:R286-R292

Shelley CS, Arnaout MA : The promoter of the CD11b gene directs myeloid-specific and developmentally regulated expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Dec 1;88(23):10525-10529

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Eine Vielzahl von Hinweisen belegt die Relevanz inflammatorischer Schadensmechanismen bei zerebraler Ischämie. Insbesondere die Rolle der Mikroglia, welche im Prinzip protektive und destruktive Potenz hat, ist hierbei jedoch nach wie vor ungeklärt. Induzierte Ischämietoleranz ist ein interessantes Paradigma, endogene protektive Programme zu studieren. Es gibt Hinweise auf die Beteiligung von Mikroglia bei induzierter Ischämietoleranz.

Es ist daher das Ziel der vorgeschlagenen Studien, die Rolle von Mikroglia/Makrophagen bei fokaler zerebraler Ischämie und induzierter Toleranz zu untersuchen.

Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen angegangen werden:

- Welche Ansätze erlauben uns die Differenzierung von Makrophagen und Mikroglia in vivo?

Hypothese: GFP labelling eignet sich zur Unterscheidung von Mikroglia und Makrophagen im Hirnparenchym nach fokaler zerebraler Ischämie und damit als Basistechnologie für die

zellphysiologische, elektrophysiologische und molekularbiologische Charakterisierung dieser Zellen nach zerebraler Ischämie.

- Wie ist der zeitliche Verlauf der Aktivierung / Rekrutierung von Mikrogliazellen im Vergleich zu Makrophagen?

Hypothese: Mikrogliazellen werden aktiviert, bevor Makrophagen einwandern.

- Spielen Makrophagen/Mikroglia eine protektive oder destruktive Rolle bei der fokalen zerebralen Ischämie?

Hypothese: Makrophagen führen im Parenchym ausschließlich zu destruktiven Effekten, während Mikroglia protektiv wirken kann.

- Führen Ischämietoleranz-induzierende Stimuli zur Mikrogliaaktivierung?

Hypothese: Induktion von Ischämietoleranz ist mit der Aktivierung von Mikrogliazellen vergesellschaftet

- Ist Mikrogliaaktivierung beteiligt an der Toleranzentwicklung?

Hypothese: Die aktivierte Mikroglia und von ihr synthetisierte protektive Proteine sind kausal an der Toleranzentwicklung beteiligt, womit ein wichtiger Hinweis für eine protektive Potenz von Mikroglia bei der zerebralen Ischämie gewonnen wäre

3.5.2 Methoden

Tierversuchsgenehmigungen zur Durchführung der genannten Untersuchungen liegen vor (G0416/96), Folgeanträge sind gestellt.. Die Labore der Experimentellen Neurologie haben die Sicherheitsstufe 1 laut GenTG Vorraussetzung (VE 1 / 541-96). Projektleiter nach GenTG ist Dr.A. Meisel.

Ischämiemodell:

Wegen der Verwendung von transgenen und knock-out Mäusen werden die Experimente in dieser Spezies durchgeführt. Die hierfür notwendige Expertise liegt im Labor des Antragstellers vor.

Zum Einsatz kommt das sog. Fadenmodell (modifiziert nach (Zea Longa *et al.*, 1989)), bei dem in Halothan-anästhesierten Mäusen unter Kontrolle des regionalen cerebralen Blutflusses mit Laser Doppler Flowmetry über die A.carotis interna ein monofiler Faden (7-0, an der Spitze 150µm Silicon coating) bis zum Abgang der A.cerebri media vorgeschoben wird, sodaß er diese okkludiert. Der rCBF über dem parietalen ipsilateralen Cortex fällt dabei auf ca. 10 % ab. Die Tiere erwachen Minuten später aus der Narkose und werden nach 90 min zur Entfernung des Fadens (Reperfusion) kurz reanästhesiert. Die Narkosezeiten liegen bei ca. 20 min für die Okklusion und < 5 min für das Ziehen des Fadens.

Präkonditionierung:

3-NPA Präkonditionierung: 3 Tage vor Induktion der Ischämie erhalten die Tiere eine Einzeldosis von 50 mg/kg NPA i.p.

Hyperbare Oxygenierung: Im Abstand von 24 Stunden werden die Tiere 5 Tage lang für je eine Stunde bei 2 atm in 100 % Sauerstoff verbracht. Am 6. Tag erfolgt Induktion der Ischämie.

Osteopetrose - Maus

Die sogenannte *Osteopetrose - Maus* ist defizient im colony stimulating factor - 1 (CSF-1 *-/-*) (Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1990). Die Tiere haben eine stark reduzierte Monozyten/Makrophagen Population. Die Entwicklung von Mikroglia in diesen Tieren ist jedoch über

einen CSF-1 unabhängigen Weg möglich, sodaß sie über eine normale Ausstattung mit diesen Zellen verfügen. Die Proliferation von Mikrogliazellen nach Aktivierung ist jedoch stark verringert (Raivich *et al.*, 1994). Osteopetrose-Mäuse zeigten in einem wenig akzeptierten Modell fokaler zerebraler Ischämie (Verschluß multipler penetrierender pialer Arteriolen durch externen Zugang) größere Läsionen als der Wildtyp (Fedoroff *et al.*, 1997, Berezovskaya *et al.*, 1995; Berezovskaya *et al.*, 1996), womit ein Hinweis auf eine protektive Funktion von Mikroglia gegeben wird. Die Mäuse sind über Jackson Laboratories kommerziell verfügbar.

CD11b-GFP-transgene Maus

Darüber hinaus wollen wir Untersuchungen durchführen an *GFP-transgenen Tieren*, in denen das green fluorescent protein (GFP) in myeloiden Stammzellen unter Kontrolle des CD11b-Promoters exprimiert wird. Damit produzieren deren *aktivierte* Monozyten / Makrophagen das fluoreszierende Protein und sind ohne Einsatz von exogen zugeführten Fluoreszenzfarbstoffen detektierbar. Sollten sich Mikrogliazellen in der Tat von Monozyten/Makrophagen ableiten, würden diese das Protein bei Aktivierung auch exprimieren. Die Herstellung eines solchen transgenen Tiere ist mittels Standardtechnologie möglich, indem das GFP-Gen an den myelo-monozytär spezifischen CD11b-Promoter (Shelley and Arnaout, 1991) gekoppelt in Oozyten transfiziert wird. Das Promoterkonstrukt steht uns bereits zur Verfügung. Wir testen derzeit das Plasmid, welches das GFP-Gen unter Kontrolle des CD11b Promoters enthält. Der Auftrag zur Erzeugung der transgenen Maus (Fa. Transgenics, Berlin-Buch) wird im März 1998 erteilt, mit der Lieferung ist bis 6/98 zu rechnen.

Die Problematik der mangelnden Unterscheidbarkeit von Makrophagen und Mikroglia (es ist kein für eine dieser Zelltypen spezifischer Promoter bekannt) wird in den Experimenten dann durch eine Knochenmarks-Explantation und -rekonstitution angegangen (sog. Chimären, s.u.)

Knochenmarkstransplantation (modifiziert nach Persons et al. 1997):

Entnahme von Knochenmark aus den Femurknochen von mit 5-Fluorouracil vorbehandelten Donormäusen, MACS bzw. FACS-Sortierung der CD34 positiven Stamm- und Vorläuferzellen. Danach 48 h Stunden Kokultur dieser Zellen mit den MGirL22Y producer cells (s.u.) in Anwesenheit von IL-3, IL6, und rat stem cell factor (werden von AMGEN zur Verfügung gestellt). Erneutes FACS Sorting der transfizierten, GFP-positiven Zellen. Die Zellsortierung (MACS/FACS) wird am Deutschen Rheumaforschungszentrum (Phillipstr., 5 min von Exp.Neurologie) in Kooperation mit Prof.Radbruch (der diese Methoden, insbes. MACS, teilweise maßgeblich entwickelt hat; Radbruch A, Recktenwald D 1995) durchgeführt. Dann sofort Rekonstitution des Knochenmarkes durch i.v. (Schwanzvene) Injektion der Zellen in mit 1 Gy vorbestrahlte (Kooperation mit Inst.für Radiologie der Charité) Mäuse. Hierdurch entstehen Mäuse, deren Blutzellen in hohem Prozentsatz das fluoreszierende GFP exprimieren, während die Mikrogliazellen bei diesen Tieren kein Transgen enthalten und damit nicht fluoreszieren ('GFP-Knochenmarkschimären').

Der im Prinzip gleiche Ansatz wird mit den Knochenmark von CD11b-GFP transgenen Mäusen verfolgt, dies kann sofort nach Entnahme in bestrahlte Wildtyp-Mäuse rekonstituiert werden. Auch der umgekehrte Prozess ist möglich, d.h. die Rekonstitution von nicht transgenem Knochenmark in GFP transgenen Mäusen (d.h. markierte Mikroglia, unmarkierte Blutzellen).

Retrovirale GFP Transfektion

Für die oben beschriebenen Untersuchungen wird unter Verwendung eines auf einem Maus-Stammzell-Virus basierenden *retroviralen Vektors GFP in explantierte Maus-Knochenmarkszellen* transfiziert werden. Hierzu wird Knochenmark entnommen und dieses mit Zellen kokultiviert, welche den retroviralen GFP-Vektor exprimieren und Trimetrexat resistent sind (bicistronischer Vektor). Diese Kokulturen sind frei von replikationsfähigem Stammzell-Virus. Die Zelllinie (MGirL22Y producer cell) ist uns von DA Persons (Dept. of Hematology, St. Judes Children's Hospital, U Tennessee, Memphis) zur Verfügung gestellt worden und erlaubt sehr hohe (40 -70 %) Transfektionsraten (Michaelson *et al.*, 1996). Durch Zugabe von Trimetrexat (bzw. auch durch FACS) werden die GFP-exprimierenden Zellen dann weiter selektiert.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit (Eglitis and Mezey, 1997) wurde eine ähnlicher Ansatz gewählt und sehr provokative Ergebnisse erzielt, welche Implikationen für die hier vorgeschlagenen Untersuchungen haben könnten. Die Arbeit muß hier daher kurz diskutiert werden: In Knochenmarks-transplantierten Mäusen (Knochenmarkschimären, Transfektion des Neomycinresistenzgenes, Detektion der transfizierten Zellen in Hirnschnitten mittels in-situ Hybridisierung) fanden die Autoren, daß Blutzellen, welche sich aus den transplantierten Stammzellen ableiten (d.h. Neo positiv hybridisieren), sich im Hirnparenchym unter physiologischen Bedingungen detektieren lassen, und diese Zellen einerseits mikrogliale Marker exprimieren, andererseits astrozytäre Marker (GFAP) zeigen. Die provokative Schlußfolgerung ist, daß hämatopoetische Zellen 1) unter physiologischen Bedingungen ins Gehirnparenchym einwandern, und dort 2) zu Mikro- oder Makroglia differenzieren können. Damit würde ein ‚mesodermaler‘ hämatopoetischer Zelltyp zu einem ‚neuroektodermalen‘ differenzieren, was einem Bruch bisher akzeptierter ontogenetischer Prinzipien entsprechen würde. Die Arbeit wirft neben diesen inhaltlichen Aspekten noch eine Reihe von methodologischen Problem auf und muß daher mit großer Vorsicht interpretiert werden. In Bezug auf die hier vorgeschlagenen Untersuchungen würde die Arbeit implizieren, daß die hier vorgeschlagene Methodik nicht zu einer Differenzierung von Blutmakrophagen und Mikroglia im Gehirn genutzt werden kann. Hierzu ist zu sagen, daß die Reproduktion der Ergebnisse mit unserem GFP-Ansatz (der einige der methodischen Probleme der zitierten Studie überwinden würde) für sich hochgradig relevant wäre und dann völlig neue Aspekte eröffnen würde, welche sich nicht nur auf die Physiologie und Pathophysiologie (Wie wird dieser Austausch durch Ischämie beeinflußt?) der Makrophagen/Mikroglia beziehen, sondern auch auf völlig neue Wege des ‚Organtargeting‘. Es könnte damit gezeigt werden, daß man so genetisch manipulierte Zellen (welche man z.B. auch mit neuroprotektiven Genen transfizieren könnte) in das Gehirn und möglicherweise sogar besonders an Regionen pathologischer Aktivität bringen kann. Wahrscheinlicher jedoch ist, daß sich die Ergebnisse nicht reproduzieren lassen, dann können die Untersuchungen in der hier vorgeschlagenen Weise durchgeführt werden.

Pharmakologischer Ansatz:

Mikrogliaaktivierung kann pharmakologisch durch Propentophyllin gehemmt werden (Banati *et al.*, 1994; McRae *et al.*, 1994). Propentophyllin fazilitiert den A2Adenosinrezeptor, vermutlich über eine Hemmung des Nukleosidtransports (Parkinson *et al.*, 1994). Wir wollen Propentophyllin (Sigma) in einer Dosis von 10 mg/kg i.p. sowohl zum Zeitpunkt der Präkonditionierung als auch, in einer eigenen Gruppe, zum Zeitpunkt der Ischämieinduktion verabreichen.

Konfokale Mikroskopie

Mittels Dual Photon konfokaler Mikroskopie (Denk *et al.*, 1990) in vivo soll in den GFP-transgenen Tieren und den GFP-Knochenmarkschimären die Adhäsion und Migration von Zellen aus dem Blutstrom in das Parenchym sowie die Morphologie- und damit Aktivitätsveränderungen von ortsständigen Mikrogliazellen (falls im transgenen Modell GFP-exprimierend) untersucht werden. Für Details zur Methodik wird auf den Antrag Z2 hingewiesen. Bei beatmeten Mäusen nach temporoparietaler Kraniotomie und Entfernung der Dura mater Implantation eines kraniellen Fensters (Dalkara *et al.*, 1995). Kontinuierliches Monitoring von systemischem Blutdruck über A.femoralis Katheter und des endexpiratorischen pCO₂ (SAR 830 Mouse Ventilator and IR - CO₂ Monitor). Das Tier wird in spezieller Maus-Stereotaxie auf computerisiertem XYZ - Tisch fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Dual Photon CLSM, siehe Projekt Z2, sonst Biorad MRC 600, verfügbar im Labor des Antragstellers) durch das kranielle Fenster untersucht. Diese Untersuchungen werden unmittelbar nach Verschuß der MCA und zu ausgewählten Zeitpunkten nach Reperfusion (siehe Versuchsplan) durchgeführt. Zitate zu konfokaler Mikroskopie in vivo siehe oben (Eigene Vorarbeiten). Der Vorteil der Dual Photon konfokalen Mikroskopie besteht in diesen Experimenten darin, daß sie gegenüber konventioneller Mikroskopie eine wesentlich höhere Auflösung entlang der optischen Achse und eine höhere Eindringtiefe in biologische Gewebe hat. In Bezug auf die ‚konventionelle Konfokale Mikroskopie‘ hat der Dual Photon Ansatz den Vorteil, eine erheblich höhere Eindringtiefe zu bieten und weniger phototoxisch zu sein (Denk and Svoboda, 1997). Wir können damit durch das kranielle Fenster bei der Maus den parietalen Kortex optisch erreichen und Leukozyten-Endothelinteraktion GFP exprimierender Zellen (v.a. in Venolen) beobachten, sowie Veränderungen der Morphologie GFP - exprimierender Mikrogliazellen verfolgen. Zelluläre Auflösung ist für über 250 µm Eindringtiefe im Rattencortex beschrieben (Svoboda *et al.*, 1997; Svoboda *et al.*, 1996).

Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

In Kryoschnitten bzw. Parafineinbettungen nach Fixation (muß entschieden werden nachdem Pilotexperimente mit GFP überexprimierenden Tieren durchgeführt worden sind) unter konventionellem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Optiphot). Dokumentation der Verteilung GFP exprimierender Zellen. Aufzeichnung mittels Farb-CCD und Digitalisierung. Räumliche Registrierung mit Darstellung des Infarkt volumens nach VAF-Färbung (siehe unten) in angrenzenden Schnitten. Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen (GFAP, F4/80, etc.)

Infarktvolumenanalyse

Die Infarktvolumina werden mit semiautomatischer Bildverarbeitung nach Färbung der Kryoschnitte (20µm) mit Vanadium - Acidic -Fuchsin (VAF) gefärbt. Danach werden die Schnitte gescannt und aus mindestens 20 Schnitten, welche den Infarkt einschliessen, mittels Bildanalyseprogramm (Sigmascan Pro) das Infarktvolumen berechnet. Durch Vermessung der kontralateralen Hemisphäre ist eine Korrektur für das Ödemvolumen möglich.

3.5.3 Arbeitsprogramm

Studie I: GFP Transgen

Bei GFP-transgenen Mäusen wird eine 90 min fokale zerebrale Ischämie induziert. Nach 1, 8, 24, 72 Stunden wird ein kraniales Fenster implantiert (n=3 pro Gruppe) und mittels konfokaler Mikroskopie in vivo Leukozyten/Endothel-Interaktion in pialen Gefäßen sowie morphologische Veränderungen von Mikrogliazellen dokumentiert und quantifiziert. Die angegebenen Zeitpunkte sind evtl. nach den Ergebnissen zu modifizieren, d.h. zu verkürzen oder zu verlängern. Das Fenster wird so plziert, daß besonders die Infarkttrandzone (Penumbra) zur Beobachtung kommt. Die Tiere werden dann getötet und histologisch aufbereitet und dann der gesamte Infarkt sowie angrenzende Areale konventionell fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Ziel dieser Studie: 1) Klärung der Frage, ob GFP Transfektion sinnvolle Technologie zum Studium von Makrophagen/Mikrogliaaktivierung ist (z.B. auch für spätere Charakterisierung der Zellen mit molekularbiologischen (single cell PCR) oder elektrophysiologischen Techniken (patch clamp)). 2) Charakterisierung des zeitlichen und räumlichen Musters der Einwanderung von Leukozyten (insbes. Monozyten/Makrophagen). Selbst wenn Mikroglia auch GFP exprimieren sollte (siehe 3) und 4)), erlaubt die in vivo konfokale Mikroskopie hier die Beobachtung der Adhäsion und Transmigration von Blutzellen ins Gehirn .3) Möglicherweise auch Erhalt von Hinweisen auf den ontogenetischen Ursprung von Mikrogliazellen (sind diese auch GFP transfiziert?) 4) Falls Mikroglia auch GFP exprimiert: Kann so ihre Aktivierung in vivo studiert werden (konfokale Mikroskopie)?

Studie II: GFP-Stammzell-Transfektion und Knochenmarkschimären

Bei mit GFP-transfizierten Stammzellen transplantierten Mäusen wird eine 90 min fokale zerebrale Ischämie induziert. Nach 1, 8, 24, 72 Stunden wird wie oben beschrieben vorgegangen, also ein kraniales Fenster implantiert (n=3 pro Gruppe) und mittels konfokaler Mikroskopie in vivo Leukozyten/Endothelinteraktion in pialen Gefäßen dokumentiert. Das Fenster wird so plziert, daß besonders die Infarkttrandzone (Penumbra) zur Beobachtung kommt. Die Tiere werden dann getötet und histologisch aufbereitet und dann der gesamte Infarkt sowie angrenzende Areale konventionell fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Ziel dieser Studie: Komplementär zur Studie I 1) Klärung der Frage, ob GFP Knochenmarkschimären sinnvolle Technologie zum Studium der Beteiligung von Leukozyten bei zerebraler Ischämie ist (z.B. auch für spätere Charakterisierung der Zellen mit molekularbiologischen (single cell PCR) oder elektrophysiologischen Techniken (patch clamp)). 2) Charakterisierung des zeitlichen und räumlichen Musters der Einwanderung von Leukozyten .

Studie III: 3-NPA Präkonditionierung und Propentofyllin

Mäuse werden mit 3-NPA präkonditioniert (50 mg/kg i.p.). Nach 3 Tagen wird eine 90 minütige fokale zerebrale Ischämie induziert. Eine Gruppe von Tieren wird zum Zeitpunkt der Präkonditionierung mit 10 mg/kg i.p. Propentofyllin behandelt, eine Gruppe erhält das Propentofyllin bei Induktion der Ischämie, zwei weitere Gruppen erhalten zu den angegebenen Zeiten Propentofyllin, werden aber nicht präkonditioniert. Eine Gruppe erhält weder Präkonditionierung noch Propentofyllin. In jeder Gruppe müssen ca. 8 -10 Tiere untersucht werden. Nach 3 Tagen werden die Mäuse getötet und die Infarkt volumina ermittelt. In ausgewählten Schnittebenen werden Mikroglia/Makrophagen immunhistochemisch gefärbt (F4/80).

Ziel dieser Studie: 1) Klärung der Frage, ob pharmakologische Hemmung von mikroglialer Aktivierung in der Lage ist, pharmakologische Präkonditionierung zu inhibieren. 2) Charakterisierung des hierzu nötigen zeitlichen Dosierungsschemas.

Studie IV: 3-NPA Präkonditionierung in op/op Mäusen

Op/op Mäuse und Wildtyp-Mäuse werden für 90 Minuten einer fokalen zerebralen Ischämie ausgesetzt. In jeder Gruppe müssen ca. 8 -10 Tiere untersucht werden. Nach 3 Tagen werden die Mäuse getötet und die Infarkt volumina ermittelt. In ausgewählten Schnittebenen werden Mikroglia/Makrophagen immunhistochemisch gefärbt (F4/80).

Ziel dieser Studie: 1) Klärung der Frage, ob op/op Mäuse in einem klinisch relevanten Ischämiemodell größere Infarkte haben. 2) Klärung der Frage, ob CSF-1 Defizienz pharmakologische Präkonditionierung vermindert oder verhindert.

Studie V: Hyperbare Sauerstoffpräkonditionierung (Modell abhängig von Ergebnissen in Studie III-IV).

Unter Verwendung der Strategie, welche in den o.g. Versuchen am erfolgreichsten war, wird als Präkonditionierungs Stimulus statt 3-NPA hyperbare Oxygenierung eingesetzt. Hierzu an 5 konsekutiven Tagen je 60 min 100 % Sauerstoff bei 2 atm. Am 6.Tag Induktion von 90 min fokaler zerebraler Ischämie, nach weiteren 3 Tagen werden die Mäuse getötet und die Infarkt volumina ermittelt. In ausgewählten Schnittebenen werden Mikroglia/Makrophagen immunhistochemisch gefärbt (F4/80). Vergleich mit nicht hyperbar präkonditionierter Gruppe (n = 8 -10 in jeder Gruppe).

Ziel dieser Studie: Ist Mikroglia auch in einem anderen, unmittelbar klinisch einsetzbaren Präkonditionierungs-Schema an der Toleranzinduktion beteiligt?

3.5.4 Zeitplan

Das Programm ist im Zeitraum von 3 Jahren durchführbar.

Die GFP-labelling und die Präkonditionierungsversuche sollen parallel durchgeführt werden.

Ein tentativer Zeitplan findet sich in der Tabelle:

2.HJ 1998	1999	2000	1.HJ 2001
Etablierung der GFP Stammzelltransfektion, Knochenmarkstransplantation etc.	Konfokale und konventionell fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen mit Knochenmarks-transplantierten Mäusen	Konfokale und konventionell fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Knochenmarks-transplantierten Mäusen	
Konfokale und konventionell fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit GFP transgenen Mäusen	Konfokale und konventionell fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen mit GFP transgenen Mäusen		
Propentophyllin Präkonditionierungsexperimente	op/op Präkonditionierungsexperimente	op/op Präkonditionierungsexperimente	Möglicherweise Präkonditionierungsexperimente mit GFP-Mäusen

Risikoabschätzung:

Sämtliche tierexperimentellen und mikroskopischen Techniken sowie die Ischämie-Modelle und die Präkonditionierung sind bereits im Labor des Antragstellers etabliert. Die CSF-1 defiziente Maus ist als +/- Heterozygote über Jackson Laboratories verfügbar, die op/op Maus wird hieraus gezüchtet (Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1990). Die Technik der Knochenmarkstransplantation stellt eine Standardtechnik dar, welche wir unter Hilfestellung von Prof. Volk (Institut für Immunologie) etabliert haben. Mit dem Institut für Strahlentherapie der Charité sind die Bestrahlungen abgesprochen, hier existieren sogar spezielle Vorrichtungen für die Bestrahlung von Mäusen. Die Transfektion von GFP in Knochenmarks-Stammzellen und Retransplantation ist publiziert, die Vektor-exprimierenden Zellen stehen uns zur Verfügung. Es muß jedoch überprüft werden, ob das Expressionslevel und die Absorptionscharakteristik des GFP genügend Signal garantieren. Auf die Problematik des möglicherweise existierenden Austausches von hämatopoetischen Zellen mit Mikro- und Makroglia wurde oben bereits ausführlich eingegangen. Falls die Befunde von Eglitis und Mezey durch uns reproduziert werden sollten, würde dies unser Projekt vermutlich sogar noch interessanter und relevanter machen. Ein weiteres Problem stellt die Frage dar, welcher Prozentsatz von GFP transfizierten Zellen im peripheren Blut nach Transplantation zum Zeitpunkt des eigentlichen Experimentes zu erreichen ist. Sicherlich werden nach Bestrahlung einige Stammzellen zurückbleiben, auch wird ein gewisser Prozentsatz nicht transfizierter Zellen transplantiert werden. 70 – 90 % GFP positiver Zellen sind realistisch (Persons *et al.*, 1997). Damit würde aber immer noch ein geringer Prozentsatz von Blutzellen nach Migration ins Hirnparenchym der Detektion entgehen. Deshalb muß vor den Ischämieexperimenten eine Quantifizierung der Effizienz von Transfektion und Transplantation durchgeführt werden: GFP-negative Zellen im Hirnparenchym, welche monozytär/mikrogliale Marker tragen, sind dann maximal mit der so gefundenen Wahrscheinlichkeit vom Blutstrom eingewandert. Obzwar die Erstellung von Knochenmarkschimären eine Standardtechnik darstellt, muß erwähnt werden, daß hier mit einer verzögerten Immunantwort auf die rekonstituierten Zellen (welche ja ein Transgen tragen) möglich ist. Dies könnte dann durch Rekonstitution in bestrahlte, genetisch immundefiziente Mäuse umgangen werden. Die Herstellung von GFP-transgenen Mäusen, welche in Blutstammzellen GFP exprimieren, sollte nach gegenwärtigem Stand der Technologie kein Problem darstellen. Hier kann jedoch nicht garantiert werden, daß dies mit den hier angestrebten Konstrukt und Targetzellen in der Tat erfolgreich ist.

Literatur zu 3.5 (zitierte eigene Arbeiten bei 3.4)

- Banati, R.B., Schubert, P., Rothe, G., Gehrman, J., Rudolphi, K., Valet, G., and Kreutzberg, G.W. (1994) Modulation of intracellular formation of reactive oxygen intermediates in peritoneal macrophages and microglia/brain macrophages by propentofylline. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 14, 145-149.
- Berezovskaya, O., Maysinger, D., and Fedoroff, S. (1995) The hematopoietic cytokine, colony-stimulating factor 1, is also a growth factor in the CNS: congenital absence of CSF-1 in mice results in abnormal microglial response and increased neuron vulnerability to injury. *Int.J.Dev.Neurosci.* 13, 285-299.
- Berezovskaya, O., Maysinger, D., and Fedoroff, S. (1996) Colony stimulating factor-1 potentiates neuronal survival in cerebral cortex ischemic lesion. *Acta Neuropathol.(Berl.)* 92, 479-486.
- Dalkara, T., Irikura, K., Huang, Z., Panahian, N., and Moskowitz, M.A. (1995) Cerebrovascular responses under controlled and monitored physiological conditions in the anesthetized mouse. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 15, 631-638.

- Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.
- Denk, W. and Svoboda, K. (1997) Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 18, 351-357.
- Eglitis, M.A. and Mezey, E. (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 4080-4085.
- Fedoroff, S., Berezovskaya, O., and Maysinger, D. (1997) Role of colony stimulating factor-1 in brain damage caused by ischemia. *NEUROSCI.BIOBEHAV.REV.* 21, 187-191.
- McRae, A., Rudolphi, K.A., and Schubert, P. (1994) Propentofylline depresses amyloid and Alzheimer's CSF microglial antigens after ischaemia. *Neuroreport*. 5, 1193-1196.
- Michaelson, M.D., Bieri, P.L., Mehler, M.F., Xu, H., Arezzo, J.C., Pollard, J.W., and Kessler, J.A. (1996) CSF-1 deficiency in mice results in abnormal brain development. *Development* 122, 2661-2672.
- Parkinson, F.E., Rudolphi, K.A., and Fredholm, B.B. (1994) Propentofylline: a nucleoside transport inhibitor with neuroprotective effects in cerebral ischemia. *Gen.Pharmacol.* 25, 1053-1058.
- Persons, D.A., Allay, J.A., Allay, E.R., Smeyne, R.J., Ashmun, R.A., Sorrentino, B.P., and Nienhuis, A.W. (1997) Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors in vitro and identification of genetically modified cells in vivo. *Blood* 90, 1777-1786.
- Radbruch A, Recktenwald D Detection and isolation of rare cells.*Curr Opin Immunol* 1995;**7**:270-273
- Raivich, G., Moreno-Flores, M.T., Moller, J.C., and Kreutzberg, G.W. (1994) Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *Eur.J.Neurosci.* 6, 1615-1618.
- Shelley, C.S. and Arnaout, M.A. (1991) The promoter of the CD11b gene directs myeloid-specific and developmentally regulated expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 10525-10529.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., and Tank, D.W. (1997) In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385, 161-165.
- Svoboda, K., Tank, D.W., and Denk, W. (1996) Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science* 272, 716-719.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W.J., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1991 Jul 1;88(13):5937]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87, 4828-4832.
- Zea Longa, E., Weinstein, P., Carlson, S., and Cummins, R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20, 84-91.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Das Projekt fügt sich sehr gut in den Bereich A ein, in dem Schadensmechanismen bei akuten ZNS-Erkrankungen untersucht werden. Das Projekt schließt damit eine inhaltliche und methodische Lücke im Spektrum der hier untersuchten Krankheiten, insofern der Schlaganfall noch nicht direkt Gegenstand im SFB war. Im Projekt A1 werden Schadensmechanismen untersucht, welche Bedeutung für Perinfarktdepolarisationen und Subarachnoidalblutung haben könnten. Es ergeben sich zwangsläufig vielfältige inhaltliche und methodische Synergismen. Die hier erarbeiteten GFP Modelle könnten für eine Reihe von anderen SFB-Projekten von Interesse sein. Hier muß an das Projekt B6 (Meningitis), aber auch an die Neurodegenerationsprojekte gedacht werden. Auch das Projekt Volk/Woiczechowski (Wechselwirkung Immunsystem - ZNS) könnte die Mäuse unmittelbar einsetzen. Mit diesem Projekt besteht ohnehin eine starke methodische Kooperation: Das Institut für Immunologie unterstützt uns bei der Knochenmarkstransplantation und bei der FACS – Auftrennung der GFP-Zellen. Mit Prof.Kettenmann vom MDC arbeiten wir gemeinsam am Mikroglia-GFP-Transgen, es besteht eine enge Koordination, der Austausch der entwickelten Modelle ist geplant. Dies führt nicht nur zur ‚Risikostreuung‘, sondern auch möglicherweise zu Modellen, bei denen verschiedene Stadien mikroglialer Aktivierung untersucht werden können.

Methodisch besteht innerhalb des Projektes eine sehr enge Zusammenarbeit mit W.Müller (Inst. für Physiologie) und R.Nitsch (Inst. für Anatomie). Zusammen werden wollen wir die Dual Photon Konfokale Mikroskopie zur Untersuchung in Hirnscheiben und in-vivo etablieren, das Gerät wird daher auch gemeinsam beantragt (s. Projekt Z2).

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
-	-	IIa/2	1	19800	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	19800
zusammen	-	zus.	1	19800	zus.	1	39600	zus.	1	39600	zus.	1	19800
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		9500			19000			19000			9500
		zusammen		9500	zusammen		19000	zusammen		19000	zusammen		9500
I		Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		-			-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Einstu- fung in BAT ...
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Dirnagl Ulrich, PD Dr.med.; Oberarzt	experimentelle Neurologie	Neurologische Klinik	10	neues Projekt	Heisenberg- Stipendiat
	Priller Josef, Dr.med.	Neurologie	”	5		AiP
	Heinze Matthias (cand.med)		”	20		Mitglied des Gra- duiertenkollegs
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Klatt, Renate, MTA	”	Neurologische Klinik	5	”	BAT Vb
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	N.N* (Doktorand)	”	”	40	”	BAT IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Ulrich Dirnagl, PD Dr.med. (Projektleiter)

Planung und Leitung der Arbeiten, Durchführung von Versuchen, Einarbeitung von Mitarbeitern an den Präkonditionierungen und Ischämie-Modellen und am konfokalen Mikroskop. Koordinierung der Zusammenarbeit mit den anderen SFB-Projekten und den auswärtigen Institutionen.

Josef Priller, Dr.med.

Mitarbeit bei den Transfektionsversuchen, Zellkultur, Molekularbiologie

Heinze Matthias cand.med.

Herr Heinze ist seit 9/97 Mitglied des Graduiertenkollegs ‚Schadensmechanismen im ZNS‘ und arbeitet unterstützend bei den Tierexperimenten (Transplantation, Präkonditionierung, Ischämie) mit.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Renate Klatt

MTA. Mitarbeit bei der Kultivierung und Transfektion der Stammzellen, bei der Gewebeaufarbeitung und immunhistochemischen Färbungen

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

NN, Naturwiss. Doktorand

Beantragt wird ein naturwissenschaftlicher Doktorand (BAT IIa/2), der

- die Tierexperimente (Präkonditionierung, fokale zerebrale Ischämie, kraniale Fenster) durchführt,
- Infarkt volumina bestimmt,
- die Knochenmarks-Transplantationen durchführt,
- die in vivo konfokalen Experimente durchführt.

Diese Besetzung dieser Stelle ist von ausschlaggebender Bedeutung für das Projekt. Die in vivo Arbeiten sowie die Dual-Photon Konfokale Mikroskopie sind äußerst komplex und aufwendig, sodaß ein Wissenschaftler ganztägig damit beschäftigt ist und eine technische Hilfskraft hierfür nicht in Frage kommt (bzw. auch aus Tierschutz-rechtlichen Gründen nicht einsetzbar ist). Der Hauptantragsteller und Dr.Priller sind durch andere wissenschaftliche Projekte bzw. klinische Tätigkeit soweit gebunden, daß sie nur begrenzt an dem Projekt mitarbeiten können.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung

entfällt

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	<i>8 TDM</i>	<i>16 TDM</i>	<i>16 TDM</i>	<i>8 TDM</i>
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	<i>9,5 TDM</i>	<i>19 TDM</i>	<i>19 TDM</i>	<i>9,5 TDM</i>

Kosten für Versuchstiere (p.a.) 6500 DM

Verbrauchsmaterial zur Durchführung der Tierexperimente (Gase, Narkotika, Nahtmaterial etc.) 3500 DM

Zellkulturmaterialien (Einwegmaterial, Medien, Wachstumsfaktoren, etc) 4500 DM

Antikörper (GFAP, F4/80, etc.) 4500 DM

Zusammen (p.a.) 19000 DM

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

entfällt

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A6

3.1.1 Thema:

Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien unter physiologischen Bedingungen und nach zerebraler Ischämie und Spreading Depression

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neurologie, Neurophysiologie

3.1.3 Leiter/in:

Dr. Lindauer Ute, geb. 15.12.1964

Dienstanschrift: Neurologische Klinik der Charité
Experimentelle Neurologie
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin
030 / 2802-3337
Fax: 2802-5047
email ulind@neuro.charite.hu-berlin.de

Dr. Klee Rolf, geb. 07.10.1966

Dienstanschrift: Institut für Physiologie der Charité
Abteilung Neurophysiologie
Tucholskystr. 2
10117 Berlin
030 / 2802-6596

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

Dr.Lindauer:

nein ja, befristet bis: 3/2000

Dr.Klee:

nein ja, befristet bis: 3/1999

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen ja nein
- klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie ja nein
- Tierversuche ja nein
- gentechnologische Versuche ja nein

3.1.6 Beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs-ausgaben	Investition	Gesamt
2. Hj. 1998	19,8	27,1	-	46,9
1999	39,6	18	-	57,6
2000	39,6	18	-	57,6
1. Hj. 2001	19,8	9	-	28,8

3.2 Zusammenfassung

Unter physiologischen Bedingungen ist der regionale Blutfluß des Gehirns eng gekoppelt an die neuronale Aktivität. Die Signal-Kaskade ausgehend vom aktivierten Neuron hin zu ihrem Effektor - der glatten Muskelzelle des Gefäßes - ist jedoch nicht hinreichend aufgeklärt. Aufgrund eigener Voruntersuchungen und aus der Literatur wissen wir, das sowohl Kalium, als auch Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) in der Vermittlung der aktivitätsabhängigen Vasodilatation eine wichtig Rolle spielen. Wir postulieren, daß NO die Bereitschaft der Gefäße zur Vasodilatation reguliert ('Modulatorfunktion'), nicht aber den eigentlichen Mediator der Dilatation darstellt. Dies Rolle könnte von Kalium ausgeübt werden, das bei neuronaler Aktivität freigesetzt wird, und bis 20 mM als Vasodilatator wirkt. Wir formulieren weiter, daß die modulatorische Rolle von NO über Leitfähigkeitsänderungen von Kaliumkanälen der glatten Muskelzelle erfolgen, also eine enge Interaktion von NO und Kalium in der cerebrovaskulären Regulation besteht. Unter einer Vielzahl von pathophysiologischen Bedingungen kommt es zu einer Entkoppelung des regionalen Blutflusses vom zellulären Metabolismus. Als Beispiel seien hier die zerebrale Ischämie und die artifiziell ausgelöste kortikale Spreading Depression (cortical spreading depression, CSD) in nicht ischämischem Hirngewebe genannt. Auch hier postulieren wir, daß diese Entkoppelung zumindest teilweise aus der gestörten Interaktion von NO und Kalium erwächst (z.B. veränderte Kanalexpression und Leitfähigkeiten, NO-Synthase Aktivitätsänderung). Die eben genannten Hypothesen sollen mittels pharmakologischer, biochemischer und elektrophysiologischer Ansätze in einem isolierten Zerebralarterienpräparat sowie an isolierten zerebralen Gefäßmuskelzellen überprüft werden. Dazu werden wir im ersten, physiologisch orientierten Teil des Projektes die cerebrovaskuläre Reaktivität auf Kalium unter physiologischen Bedingungen charakterisieren (Identifizierung der beteiligten Kalium-Kanäle) und mögliche Mechanismen einer Beeinflussung durch NO aufklären. Im zweiten, pathophysiologischen Abschnitt wollen wir dann in Arterien bzw. Muskelzellen, welche nach zerebraler Ischämie oder CSD präpariert werden, Veränderungen in der Kaliumkanal-Expression oder -Aktivität und die möglicherweise gestörte Interaktion von NO und Kalium(kanälen) untersuchen. Allgemeines Ziel des Projektes ist damit die Aufklärung der Interaktion von Endothel, glatter Muskelzelle, sowie Neuronen und Glia bei der neurovaskulären Koppelung, sowie möglicher Mechanismen der Störung dieser Kopplung bei ZNS - Erkrankungen.

3.3 Stand der Forschung

Unter physiologischen Bedingungen ist der regionale Blutfluß des Gehirns eng gekoppelt an die neuronale Aktivität im entsprechenden Areal. Die Signal-Kaskade ausgehend vom aktivierten Neuron hin zu ihrem Effektor - der glatten Muskelzelle des Gefäßes - ist jedoch noch nicht hinreichend aufgeklärt.

Neben vasodilatatorisch wirkenden Produkten des neuronalen und glialen Stoffwechsels - H^+ und CO_2 , K^+ , Produkte des Purin-Metabolismus wie z.B. Adenosin, - kann die Beteiligung des Bioradikals Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) an der Koppelung von neuronaler Aktivität, erhöhtem Metabolismus und zerebralem Blutfluß als mittlerweile gesichert angesehen werden. Es konnte gezeigt werden, daß nach Blockade des NO produzierenden Enzyms NO Synthetase (NOS) die Gefäßreaktionen der zerebralen Zirkulation auf eine Vielzahl von physiologischen Stimuli vermindert oder sogar aufgehoben sind. Dazu zählt neben der Blutflußerhöhung auf CO_2 / H^+ und Adenosin auch die Vasodilatation auf Erhöhung des extrazellulären Kalium-Konzentration sowie die zeitlich und räumlich eng umschriebene Erhöhung des regionalen zerebralen Blutflusses auf funktionelle neuronale Stimulation.

3.3.1 Kalium-vermittelte Änderungen des Gefäßtonus und des Membranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen

Änderungen des Membranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen führen über eine veränderte Leitfähigkeit spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zu Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Membrandepolarisation erhöht und Membranhyperpolarisation erniedrigt die Aktivität spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, sodaß es über einen Anstieg bzw. Abfall der Ca^{2+} -Konzentration in der glatten Muskelzelle zur Konstriktion oder Relaxation der einzelnen Zelle mit Konstriktion oder Dilatation des entsprechenden Gefäßabschnitts kommt. Die Regulation des Membranpotentials erfolgt in erster Linie über Veränderungen der Aktivität / Leitfähigkeit von K^+ -Kanälen. Somit stellt die Aktivierung von K^+ -Kanälen mit nachfolgender Zellhyperpolarisation einen Hauptmechanismus der Vasodilatation dar (Faraci and Sobey, 1996) (Übersichtsartikel), (Standen et al., 1989).

In glatten Gefäßmuskelzellen der zerebralen Zirkulation spielen vorrangig drei unterschiedliche K^+ -Kanäle eine Rolle bei der basalen Vasotonusregulation und der Reaktion auf dilatatorisch und konstriktorisch wirkende Stimuli unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen: ATP-abhängige K^+ -Kanäle (Standen et al., 1989; Nelson et al., 1990; Kleppisch and Nelson, 1995), Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (Brayden and Nelson, 1992; Robertson et al., 1993; Nelson and Quayle, 1995; Song and Simard, 1995; Nelson et al., 1995) und die sogenannten inward rectifier K^+ -Kanäle (Quayle et al., 1993). Darüber hinaus sind spannungsabhängige K^+ -Kanäle in glatten Muskelzellmembranen zerebraler Gefäße beschrieben (Hirst et al., 1986; Bonnet et al., 1991), die an der Regulation des Membranpotentials bei Veränderungen des intravaskulären Drucks beteiligt zu sein scheinen (Nelson and Quayle, 1995; Knot and Nelson, 1995). Ihre hauptsächliche Funktion wird hierbei in einer Limitierung der bei Erhöhung des intravaskulären Drucks erfolgenden Membrandepolarisation vermutet (Hirst and Edwards, 1989).

Da die Aktivität ATP-abhängiger K^+ -Kanäle hauptsächlich durch Änderungen im pO_2 oder pH sowie der intrazellulären ATP-Konzentration beeinflusst wird, scheint der metabolische

Status der Zelle eine wichtige Einflußgröße der Kanalleitfähigkeit darzustellen (Nelson, 1993). Während diesen Kalium-Kanälen eine eher untergeordnete Rolle bei der Regulation des Ruhetonus unter physiologischen Bedingungen zukommt (Faraci and Heistad, 1993; Wahl et al., 1994; Armstead, 1996; Bari et al., 1996a), gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung an der Vasodilatation unter hypoxischen Zuständen (Taguchi et al., 1994; Fredericks et al., 1994).

Im Gegensatz zu ATP-abhängigen K^+ -Kanälen scheinen die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle glatter Muskelzellen größerer zerebraler Gefäße auch unter Ruhebedingungen aktiv zu sein (Fujii et al., 1990; Fujii et al., 1991) und damit eine wesentliche Rolle bei der Ruhetonusregulation und bei der Gegenregulation zu vasokonstriktorisch wirkenden Einflüssen (Brayden and Nelson, 1992; Nelson et al., 1995) inne zu haben. In der Mikrozirkulation jedoch ist ihre Beteiligung am basalen Tonus eher untergeordneter Natur (Taguchi et al., 1995). Während für die Vasodilatation auf Substanzen, die zu einer intrazellulären Erhöhung des cAMP führen, eine deutliche Abhängigkeit von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen besteht (Song and Simard, 1995; Taguchi et al., 1995; Hong et al., 1996), ist dies für Guanylatcyclase-aktivierende Stimuli umstritten (Taguchi et al., 1995; Cohen and Vanhoutte, 1995; Paterno et al., 1995).

Während die bisher beschriebenen Kalium-Kanäle in erster Linie bei der Tonusregulation größerer zerebraler Gefäße beteiligt sind, spielen sie in der Mikrozirkulation keine primäre Rolle. Das Membranpotential und damit der Tonus glatter Muskelzellen von Arteriolen, die die Hauptwiderstandsgefäße der zerebralen Zirkulation darstellen, scheint vielmehr in erster Linie über die sogenannten inward rectifier Kalium-Kanäle (K_{IR}) reguliert zu werden. Während größere zerebrale Gefäße und auch Arteriolen nicht-zerebraler Gewebe bereits unter geringer Erhöhung des extrazellulären Kaliums ($[K^+]_0$) in der Regel konstringieren, führen an Gefäßen der zerebralen Mikrozirkulation Veränderungen im $[K^+]_0$ im Bereich von 5 bis 20 mM zu Membranhyperpolarisation glatter Muskelzellen und damit zur Dilatation (Kuschinsky et al., 1972; Edwards et al., 1988; McCarron and Halpern, 1990; McCarron et al., 1991). Diese Dilatation kann durch externe Barium-Applikation in niedriger Konzentration, nicht aber durch Inhibitoren ATP-abhängiger, Ca^{2+} abhängiger oder spannungsabhängiger Kalium-Kanäle geblockt werden. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß die ihr zugrunde liegende Hyperpolarisation u.a. durch eine Aktivierung von K_{IR} vermittelt wird (Edwards et al., 1988; McCarron and Halpern, 1990; Quayle et al., 1993).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Aktivität von Kalium-Kanälen sicherlich einen wichtigen Regulationsmechanismus sowohl bei der Aufrechterhaltung des basalen Vasotonus als auch bei der Dilatation zerebraler Arterien darstellt. Bei größeren Gefäßen der zerebralen Zirkulation stehen hier Ca^{2+} -abhängige und ATP-abhängige Kanäle der glatten Gefäßmuskelzellen im Vordergrund. Unter Bedingungen des Ruhemembranpotentials weisen allerdings ATP-abhängige Kanäle eine nur geringe Öffnungswahrscheinlichkeit auf und sind damit am Ruhetonus nicht wesentlich beteiligt. An Gefäßen der zerebralen Mikrozirkulation erfolgt sowohl die Ruhetonusregulation als auch die Dilatation auf geringgradige Erhöhung des extrazellulären Kaliums (physiologische neuronale Depolarisation - neurovaskuläre Koppelung) in erster Linie über inward rectifier Kalium-Kanäle.

3.3.2 Rolle des NO bei der zerebrovaskulären Reaktivität unter physiologischen Bedingungen

Während bisher davon ausgegangen wurde, daß NO in der Regulation der Hirndurchblutung und bei der Blutflußantwort auf funktionelle neuronale Stimulation eine echte Mediator-

Funktion inne hat, weisen neuere Daten darauf hin, daß zumindest bei einigen Reaktionen der Hirndurchblutung NO eine eher modulatorische Rolle im Sinne eines permissiven Faktors einnimmt. So konnten wir neben anderen Arbeitsgruppen im Tierexperiment zeigen, daß die externe Applikation von NO während kontinuierlicher Blockade des Enzymes NOS zu einer Restitution der zuvor verringerten Blutflußantworten auf leicht erhöhten extrazellulären K^+ -Spiegel im Gewebe, auf systemische Hyperkapnie und auf somatosensorische Stimulation führt (Iadecola et al., 1994; Dreier et al., 1995a; Dreier et al., 1995b; Wolf et al., 1996). Diese Befunde könnten dahingehend interpretiert werden, daß ein basaler NO Spiegel im Gewebe notwendig ist für die Reaktion der glatten Muskelzelle zerebraler Gefäße auf andere, noch nicht näher charakterisierte Mediatoren gesteigerter neuronaler Aktivität (modulatorische Rolle des NO, NO als permissiver Faktor).

Mehrere Befunde der letzten Jahre lassen den Schluß zu, daß die permissive Rolle des NO zumindest teilweise über eine direkte oder indirekte Modulation von Kalium-Kanälen vermittelt sein könnte.

Diese Modulation durch NO wurde bisher in mehreren Untersuchungen an zerebralen und extrazerebralen Gefäßen für die Aktivität Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle gezeigt. Einerseits führt eine Erhöhung von NO vermutlich über Nitrosylierung von Protein-Sulphydrylgruppen direkt zu einer erhöhten Kanal-Aktivität (Bolotina et al., 1994). Neben dieser cGMP unabhängigen Wirkung des NO ist andererseits auch eine cGMP vermittelte Erhöhung der Aktivität Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle beschrieben. Als Mechanismus wird hierbei eine Phosphorylierung des Kanals durch die cGMP abhängige Proteinkinase vermutet (Robertson et al., 1993; Archer et al., 1994; Yamakage et al., 1996; Peng et al., 1996; Onoue and Katusic, 1997). Erste Hinweise auf eine Beeinflussung anderer als der Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle durch NO ergeben sich aufgrund von Untersuchungen, die eine reduzierte Relaxation auf externe NO Gabe nach $BaCl_2$ Applikation (Inhibitor des K_{IR} -Kanals) bei zerebralen Arterien (Onoue and Katusic, 1997) bzw. nach 4-Aminopyridin (Inhibitor des spannungsabhängigen K^+ -Kanals) bei Pulmonalarterien (Yuan et al., 1996) zeigen.

Es läßt sich zusammenfassend feststellen, daß bei einer Vielzahl von kortikovaskulären Reaktionen das NO eine zentrale Rolle im Sinne eines Modulators einnimmt. Diese modulatorische Funktion scheint entweder durch eine direkte Beeinflussung von Kalium-Kanälen durch NO (Nitrosylierung von Kalium-Kanälen) oder indirekt über die Aufrechterhaltung eines basalen cGMP Spiegels in der glatten Muskelzelle zerebraler Gefäße (z.B. Phosphorylierung von Kalium-Kanälen) zu erfolgen. Im Zentrum der Modulation durch NO stehen die Ca^{2+} -abhängigen Kalium-Kanäle, wobei es aber auch indirekte Hinweise für eine NO-Modulation des K_{IR} -Kanals gibt.

3.3.3 Störung der zerebrovaskulären Reaktivität nach Ischämie und Spreading Depression: Hinweise auf Veränderungen des Zusammenwirkens von Kalium-Kanalaktivitäten und NO

Zu einer Störung der zerebrovaskulären Reaktivität kommt es unter einer Vielzahl von pathophysiologischen Bedingungen. Nach zerebraler Ischämie treten darüberhinaus spontane repetitive Depolarisationen auf, welche mit regional unterschiedlichen Blutflußveränderungen einhergehen (Spreading Depression, Periinfarkt-Depolarisation). Auch nach einer artifiziell ausgelösten kortikalen Spreading Depression (cortical spreading depression, CSD) in nicht

ischämischem Hirngewebe kommt es zu einer Beeinträchtigung der Gefäßreaktivität über Stunden. Die CSD wird von charakteristischen Veränderungen der extrazellulären Ionen- und Neurotransmitterkonzentration begleitet, die auch für die starke Erhöhung des zerebralen Blutflusses während der charakteristischen elektrophysiologischen Veränderungen (über den Kortex propagierendes Sistieren der elektrischen Aktivität - spreading depression) verantwortlich gemacht werden. Inwieweit hierbei NO allgemein als Vasodilatator eine Rolle spielt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Duckrow, 1991; Goadsby et al., 1992; Zhang et al., 1994; Colonna et al., 1994; Fabricius and Lauritzen, 1994; Meng et al., 1995; Dreier et al., 1995a; Colonna et al., 1997).

Veränderungen der zerebrovaskulären Reaktivität nach Ischämie und CSD können für eine Vielzahl von in unbeeinträchtigtem Gewebe vasodilatatorisch wirkenden Stimuli beobachtet werden. In erster Linie scheint es sich hierbei um NO abhängige Reaktionen zu handeln. So konnte für die Blutflußantwort auf Hyperkapnie und funktionelle neuronale Stimulation eine deutliche Reduktion sowohl nach globaler wie auch fokaler Ischämie und nach CSD gezeigt werden (Kagström et al., 1983; Lauritzen, 1984; Wahl et al., 1987; Helfaer et al., 1991; Lacombe et al., 1992; Dettmers et al., 1993; Christopherson et al., 1993; Florence et al., 1994; Fabricius et al., 1995). Darüberhinaus wird eine je nach Stimulus unterschiedlich stark ausgeprägte Verringerung der vaskulären Reaktivität nach CSD auf topische Applikation von Adenosin, Bradykinin, Protonen, 20mM extrazellulärem Kalium und Acetylcholin beschrieben (Wahl et al., 1987; Cipolla et al., 1997). Dagegen bleibt die vaskuläre Reaktivität auf CSD selbst auch nach mehrmals zuvor erfolgten CSDs unverändert (eigene Befunde), und auch die Autoregulation sowie die Blutflußantwort auf Papaverine, einem NO unabhängigen Vasodilatator, ist nach einer erfolgten CSD erhalten (Lauritzen, 1984; Florence et al., 1994). Nach globaler Ischämie führt die lokale Applikation eines NO Donors zu unbeeinträchtigter Vasodilatation, während die Reaktivität auf Achetylcholin signifikant reduziert ist (Clavier et al., 1994).

Die dieser zerebrovaskulären Störung nach Ischämie und CSD zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht hinreichend geklärt. Es gibt Hinweise auf eine Veränderung im Aktivitäts- oder Expressionsmuster von Kalium-Kanälen nach Ischämie. So ist nach globaler zerebraler Ischämie die Reaktivität zerebraler Gefäße auf Aktivierung ATP-abhängiger K^+ -Kanäle vermindert (Busija and Louis, 1995; Louis et al., 1996; Bari et al., 1996b). Auch konnte nach Ischämie eine erhöhte NOS (v.a. Typ I NOS, konstitutive neuronale NO Synthese) Aktivität nachgewiesen werden (Kader et al., 1993; Zhang et al., 1994; Samdani et al., 1997). Welche Veränderungen der gestörten zerebrovaskulären Reaktivität nach CSD zugrunde liegen, ist bisher nicht bekannt. Es gibt jedoch erste Hinweise, daß auch hier veränderte basale NO Spiegel oder Veränderungen in der Leitfähigkeit von Kalium-Kanälen eine Rolle spielen könnten (siehe eigene Vorarbeiten).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Reihe von zerebrovaskulären Reaktionen auf vasodilatatorisch wirkende Stimuli unter pathophysiologischen Bedingungen (zerebrale Ischämie, CSD) deutlich reduziert sind. Welche Mechanismen diese Störung bewirken, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, daß ihr eine veränderte Kalium-Kanal-Ausstattung bzw. Aktivität der glatten Muskelzellen zerebraler Gefäße sowie veränderte NOS-Aktivitätsmuster mit veränderten NO Spiegeln im Gewebe zugrunde liegen.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Folgende Befunde zur Rolle von Kalium und NO bei der zerebrovaskulären Koppelung unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen wurden bisher von uns erhoben:

- NO ist an der physiologischen Regulation der Hirndurchblutung beteiligt. (Niwa et al., 1993; Lindauer et al., 1993; Dirnagl et al., 1993a; Dirnagl et al., 1993b; Dirnagl et al., 1994a)
- Unter unspezifischer Inhibition der NOS mit dem irreversiblen Blocker N^o-Nitro-L-Arginin verringert sich die Blutflußantwort auf somatosensorische Stimulation um ca. 50 %, wobei der Ruhefluß auf ca. 80 % des Ausgangswertes gesenkt wird. Unter fortgeführter NOS-Inhibition läßt sich die Blutflußantwort unter Zugabe sowohl von NO (SIN-1 oder SNAP als NO-Donoren) als auch von cGMP vollständig restituieren. Diese Befunde sprechen für eine modulatorische Rolle von NO bei der neurovaskulären Koppelung. (Dirnagl et al., 1993b) (Lindauer and Dirnagl, 1997)(Manuskript in Vorbereitung)(Wolf et al., 1996)
- Ebenfalls permissiv wirkt NO bei der Erhöhung des zerebralen Blutflusses durch extrazelluläre Applikation von 20 mM Kalium: Restitution der durch NOS-Inhibition signifikant reduzierten Blutflußantwort durch Zugabe von NO. (Dreier et al., 1995b)
- Erste Untersuchungen in unserem Labor weisen darauf hin, daß die nach CSD fast vollständig ausgeschaltete Blutflußantwort auf Hyperkapnie durch Applikation von zellgängigem cGMP wieder hergestellt werden kann (kranielle Fenstertechnik an der Ratte) (Untersuchungen noch nicht abgeschlossen).
- Die isolierte Arteria cerebri media reagiert auf extraluminale Azidose mit einer 20 - 25 % - igen Dilatation, die sowohl durch unspezifische NOS-Inhibition als auch durch den spezifischen Inhibitor der neuronalen NOS 7-NI fast vollständig geblockt werden kann. Auch diese reduzierte Dilatation kann durch Zugabe von NO oder cGMP unter fortdauernder NOS-Inhibition wiederhergestellt werden. Die Dilatation auf Azidose ist nicht vom Endothel vermittelt, und eine Beteiligung von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen konnte gezeigt werden. (Kunz et al., 1997) (Manuskript in Vorbereitung).
- Mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie und Laser-Doppler-Blutflußmessung konnten wir zeigen, daß die Blutflußantwort und die Blutoxygenierungsveränderung auf somatosensorische Stimulation und CSD nicht Substrat-abhängig erfolgt (O₂ und Glucose), und daß die zerebrale Hyperämie unter Hyperkapnie nach einer CSD deutlich verringert ist. (Wolf et al., 1997b)
- Perinfarkt-Depolarisationen (PIDs) - mit Nah-Infrarot-Spektroskopie erfaßt - gehen einher mit einer Hypoxygenierung im ischämischen Gewebe, um im weiteren Verlauf (Ausbreitung der PID in nicht-ischämisches Gewebe) zu Hyperoxygenierung zu führen, wie sie bei regulären CSDs gesehen werden. (Wolf et al., 1997a)
- Nach globaler Ischämie kommt es im Anschluß an die kurzzeitige Hyperperfusion direkt nach Reperfusion zu einer langanhaltenden Hypoperfusion, die nicht durch mechanisch den Blutfluß in der Mikrozirkulation behindernde Leukozyten verursacht wird (Dirnagl et al., 1994b). Bei Reperfusion nach globaler und fokaler Ischämie entstehen freie Sauerstoffradikale, die je nach Dauer der Ischämie auch während der Hypoperfusion verstärkt im Gewebe zu finden sind (Dirnagl et al., 1995; Peters et al., 1997).

Folgende Vorarbeiten zum geplanten Methodenspektrum wurden von uns durchgeführt:

- Ischämie Modelle der Ratte: global (Dirnagl et al., 1993) und fokal (MCA Häkchenokklusion nach Brint (Brint et al., 1988; Dirnagl et al., 1989; Dirnagl et al., 1993), Fadenmodell (Peters et al., 1997; Wolf et al., 1997a)) jeweils mit Erfassen des regionalen zerebralen Blutflusses mittels Laser-Doppler Blutflußmessung (Dirnagl et al., 1989; Barfod et al., 1997).
- Auslösung von CSDs in vivo an der Ratte mit Erfassen des regionalen zerebralen Blutflusses mittels Laser-Doppler Blutflußmessung (Dirnagl et al., 1989; Barfod et al., 1997) und des DC-Potentials mittels Kalomel-Elektrode sowie der Hämoglobin-Oxygenierung mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie (Wolf et al., 1996).
- Präparation isolierter kanülierter zerebraler Arterien nach Duling und Rivers (Dacey and Duling, 1982; Duling and Rivers, 1986), modifiziert nach Bryan et al. (Bryan et al., 1995; Bryan et al., 1996). Das Modell wurde im Anschluß eines Forschungsaufenthalts am Baylor College of Medicine in Houston, Texas bei Prof. R. Bryan von der Antragstellerin Dr. Ute Lindauer aufgebaut und ist seit ca. 1 Jahr im Labor der experimentellen Neurologie in Verwendung (Lindauer, 1996; Kunz et al., 1997) (Manuskript in Vorbereitung)
- Präparation isolierter glatter Muskelzellen aus verschiedenen zerebralen Gefäßsegmenten mittels eines enzymatisch-mechanischen Verfahrens (Kleppisch and Nelson, 1995). Das Verfahren wird standardmäßig für elektrophysiologische Messungen an glatten Muskelzellen vom Antragsteller Dr. Rolf Klee eingesetzt und ermöglicht eine hohe Ausbeute an isolierten Zellen.

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

- Charakterisierung der zerebrovaskulären Reaktivität auf somatosensorische Stimulation der Ratte unter verschiedenen Narkoseformen (Lindauer et al., 1993).
- Unter NOS Inhibition kommt es zu keiner Veränderung des Anstiegs der neuronalen Aktivität während somatosensorischer Stimulation bei der Ratte (Lindauer et al., 1996).
- Spannungsgesteuerte transiente Kaliumströme werden altersabhängig in unterschiedlichem Ausmaß durch extrazelluläre Kaliumionen moduliert (Klee et al., 1997).

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Eine intakte zerebrovaskuläre Reaktivität ist für eine ungestörte Hirnfunktion von grundlegender Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen wird der zerebrale Blutfluß sowohl global (Autoregulation: Aufrechterhaltung einer konstanten Blutversorgung über weite Bereiche des systemischen Blutdrucks) als auch regional räumlich und zeitlich eng umschrieben (neurovaskuläre Koppelung: regionale Anpassung des Blutflusses an den sich mit Aktivierung / Deaktivierung ständig ändernden metabolischen Bedarf) an die jeweiligen Bedürfnisse angepaßt. Jede Veränderung dieser feinen Abstimmung zieht Konsequenzen für die Funktion des gesamten Organs, einzelner Teile oder Zellgruppen nach sich. Veränderungen im zerebralen Blutfluß sind somit nicht nur als Konsequenz pathologischer Prozesse zu sehen, sondern häufig auch ursächlich wesentlich an der Schadensentstehung beteiligt.

Zwei Mediatoren der zerebrovaskulären Reaktivität stehen seit langem im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses: Während sich extra- wie intrazellulär die Kaliumkonzentration bei jeder auch noch so feinen Änderung des Membranpotentials bis hin zur Zelldepolarisation ändert und damit auf Nachbarzellen wiederum auf deren Membranpotentiale Einfluß nimmt, hat NO neben seiner starken vasodilatatorischen Wirkung auch Bedeutung als Neurotransmitter. Sowohl Kalium als auch NO stellen somit wichtige Kandidaten der Vermittlung globaler wie auch regionaler vaskulärer Reaktivität im Gehirn dar. Es liegt deshalb nahe, die Ursache für Störungen der zerebrovaskulären Reaktivität in Veränderungen der Konzentration dieser Mediatoren bzw. deren Effektoren zu suchen.

Ziel der hier vorgeschlagenen Untersuchungen soll deshalb im ersten Teil sein:

- die zerebrovaskuläre Reaktivität auf Kalium zu charakterisieren: Identifizierung der beteiligten Kalium-Kanäle
- die Beeinflussung von Kalium-abhängigen Tonusänderungen zerebraler Gefäße durch NO unter physiologischen Bedingungen zu charakterisieren
- den Mechanismus der NO Abhängigkeit dieser Kalium-vermittelten Reaktivität glatter Muskelzellen zerebraler Gefäße aufzuklären (Bereitstellung eines basalen cGMP Spiegels in der Zelle - Nitrosylierung von Ionenkanälen, Zellproteinen oder Enzymen des kontraktiven Apparates der Zelle)

Im zweiten Teil sollen folgende pathophysiologische Hypothesen auf ihre Gültigkeit überprüft werden:

- Nach Ischämie und CSD kommt es zu einer veränderten Kalium-Kanal-Expression oder -Aktivität in der glatten Muskelzelle zerebraler Gefäße.
- Die veränderten NO-Konzentrationen im Gewebe führen zu veränderten cGMP-Spiegeln und Nitrosylierungsmustern in der glatten Muskelzelle.
- Diese Veränderungen sind wesentliche Ursache für die Störung der zerebrovaskulären Reaktivität nach Ischämie und CSD.

3.5.2 Methoden

Da Untersuchungen im in vivo Ansatz durch die Komplexität nicht hinreichend standardisierbarer Einflüsse aus dem Hirnparenchym zu unüberwindbaren Problemen führen dürften, sollen die oben dargestellten Hypothesen in zwei in vitro Modellen untersucht werden.

Das Zusammenwirken von Kalium und NO soll in funktionellen (Gefäßdurchmesser isolierter Gefäße als Meßparameter) und elektrophysiologischen Untersuchungen (Kalium-Ströme isolierter Muskelzellen als Meßparameter) unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen charakterisiert werden. Hierzu sollen isolierte kanülierte zerebrale Arteriensegmente verschiedener Abschnitte der arteriellen Zirkulation und isolierte glatte Muskelzellen unterschiedlicher zerebraler Gefäßsegmente aus der Ratte Verwendung finden. Die Gefäße bzw. isolierten glatten Gefäßmuskelzellen werden jeweils aus gesunden Tieren oder aus Tieren entnommen, bei denen vor der Entnahme in vivo mehrere CSDs ausgelöst wurden bzw. eine fokale oder globale Ischämie eingeleitet wurde. Sowohl das Modell der experimentell ausgelösten CSD als auch die Ischämie Modelle an der Ratte sind seit langem im Labor der experimentellen Neurologie etabliert und werden deshalb hier nicht näher beschrieben (siehe Abschnitt: Vorarbeiten zum geplanten Methodenspektrum).

Modell der isolierten Zerebralarterie:

Das Modell isolierter kanülierter zerebraler Arterien nach Duling und Rivers (Dacey and Duling, 1982; Duling and Rivers, 1986), modifiziert nach Bryan et al. (Bryan et al., 1995; Bryan et al., 1996) wurde im Anschluß eines Forschungsaufenthalts am Baylor College of Medicine in Houston, Texas bei Prof. R. Bryan von der Antragstellerin Dr. Ute Lindauer aufgebaut und ist seit ca. 1 Jahr im Labor der experimentellen Neurologie in Verwendung (Lindauer, 1996; Kunz et al., 1997) (Manuskript in Vorbereitung).

Dieses kanülierte und perfundierte Präparat ist arteriellen Ring oder Streifenpräparaten in Bezug auf deren Vergleichbarkeit zu in-vivo Gefäßreaktivitäten überlegen. Ganz entscheidend ist dabei, daß in diesem Präparat der Vasotonus ohne pharmakologische Intervention über den transmuralen Druck eingestellt werden kann sowie intraluminal und extraluminal voneinander getrennt interveniert werden kann.

Nach Dekapitation zuvor mit Halothan anästhesierten Wistar-Ratten wird das Gehirn entnommen und sofort in 4°C kalten physiologischen MOPS-Puffer (enthält 1 % bovines Serum-Albumin) verbracht (Zusammensetzung nach Dacey und Duling, 1982 (Dacey and Duling, 1982)). Das entsprechende Gefäßsegment (hier Arteria cerebri media: Hauptstamm, Äste zweiter oder dritter Ordnung, penetrierende Arteriolen) wird sorgfältig freipräpariert, in die ebenfalls mit 4°C kaltem physiologischen MOPS-Puffer (enthält 1 % bovines Serum-Albumin) gefüllte Arterienkammer verbracht und auf zwei Glaspipetten aufgezogen. Über die Glaspipetten erfolgt nun die Perfusion des Gefäßabschnitts (MOPS-Puffer mit 1 % bovinem Serum-Albumin), wobei der transmurale Druck durch Positionierung der in- und outflow Reservoirs auf entsprechende Höhe über der Gefäßkammer auf die in vivo vorhandenen Druckverhältnisse (80 bis 40 mm Hg je nach Gefäßabschnitt) eingestellt wird. Der extraluminale Puffer (ausgetauscht gegen MOPS-Puffer ohne bovinem Serum-Albumin) wird auf 37°C erwärmt und kontinuierlich ausgetauscht. Ein physiologischer Vasotonus stellt sich spontan ein. Die Darstellung des Gefäßdurchmessers erfolgt mittels eines inversen Mikroskops (Vergrößerung x200), das über eine Videokamera mit einem Monitor verbunden ist. Einzelne, digital gespeicherte Bilder oder Videosequenzen werden off-line ausgewertet.

Patch-Clamp Technik isolierter Gefäßmuskelzellen:

Gefäßmuskelzellen werden mit Hilfe eines enzymatisch-mechanischen Isolationsverfahrens (Kleppisch and Nelson, 1995) aus verschiedenen zerebralen Gefäßsegmenten gewonnen. Dazu wird das Gehirn äthernarkotisierter Ratten präpariert und in eiskalte HEPES-gepufferte Lösung überführt. Unter mikroskopischer Kontrolle werden die interessierenden Gefäßsegmente (A. cerebri media - Hauptstamm/Äste 2. o. 3. Ordnung/penetrierende Arteriolen) freipräpariert und anschließend einer zweistufigen Andauung (1. Schritt: Papain, Dithioerythritol, Albumin; 2. Schritt: Collagenase H, Hyaluronidase, Albumin) in kalziumfreier HEPES-gepufferten Lösung bei 37 °Celsius unterzogen. Nach Auswaschen der enzymhaltigen Lösung erfolgt die mechanische Dispersion der Gefäßwände mittels feuerpolierter Pasteurpipetten. Die Zellen werden anschließend bei 4 °Celsius in nominell kalziumfreier Lösung aufbewahrt. Kaliumströme werden innerhalb von maximal 8 Stunden nach Entnahme der Arterien mit Hilfe der Patch-clamp-Technik an solchermaßen isolierten Zellen gemessen.

Die Identifizierung und Charakterisierung der Kaliumleitfähigkeiten und der passiven elektrischen Eigenschaften glatter Gefäßmuskelzellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen soll mit Hilfe der Patch-clamp Technik sowohl in der Ganzzellkonfiguration als auch an isolierten inside - out bzw. outside - out Patches durchgeführt werden. Die Isolation einzelner Kaliumleitfähigkeiten gelingt dabei durch den Einsatz von speziellen intra- bzw. extrazellulären Meßlösungen oder den Einsatz von Pharmaka/Toxinen bzw. durch die An-

wendung von geeigneten Meßprotokollen in der Spannungsklemme. Durch den Einsatz von sog. perforated-patches erhält man einen niederohmigen Zugang zum Zellinneren bei gleichzeitig höchstmöglicher Schonung intrazellulärer Signalkaskaden und Pufferungsmechanismen, mithin die Möglichkeit deren Einfluß auf die Regulation der gefundenen Kaliumleitfähigkeiten untersuchen zu können.

Tierversuchsgenehmigungen zur Durchführung der genannten Untersuchungen liegen vor (Tötungsanzeige mit anschließender Entnahme der Arterien bzw. Kultur glatter Muskelzellen zerebraler Gefäße: T0322/96; Tierversuchsantrag zu CSD in vivo: G0126/95; Tierversuchsantrag zu Ischämie in vivo: G0164/97)

3.5.3 Arbeitsprogramm

Studie A: Charakterisierung des Zusammenwirkens von Kalium und NO unter physiologischen Bedingungen

Studie A1: isolierte Zerebralarterien

1. Klärung der Beteiligung der unterschiedlichen Kalium-Kanäle an der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien unter Verwendung spezifischer Kalium-Kanal-Blocker:

Aus unbehandelten männlichen Wistar Ratten (240-260 g) werden in unterschiedlichen Versuchsansätzen Äste der Arteria cerebri media (Hauptstamm, Äste zweiter oder dritter Ordnung und penetrierende Arteriolen) wie oben beschrieben präpariert. Nach einer etwa eine Stunde dauernden Äquilibrierungsphase (Entwicklung des spontanen Vasotonus nach Druckaufbau im Gefäß) wird eine Kontrolldilataion mit 20 mM Kalium im extraluminalen Bad ausgelöst. Nach Erreichen eines konstanten (erhöhten) Gefäßdurchmessers wird anschließend das erhöhte Kalium durch mehrfachen Austausch der Pufferlösung wieder aus dem Bad entfernt. Nach Wiedererreichen des Ausgangstonus des Gefäßes erfolgt die Zugabe spezifischer Kalium-Kanalblocker in getrennten Versuchsansätzen. Hierbei sollen folgende Substanzen zum Einsatz kommen: Glibenclamide für ATP-abhängige K^+ -Kanäle, Charybdotoxin für Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle, $BaCl_2$ für K_{IR} und 4-Aminopyridin für spannungsabhängige K^+ -Kanäle. Nach einer 30 minütigen Einwirkzeit des jeweiligen Kanalblockers erfolgt erneut eine Erhöhung des extraluminalen Kaliums auf 20 mM. Nach Erreichen eines konstanten Durchmessers (zeitlicher Ablauf identisch mit der Kontrolldilataion) wird dieser erfasst und im Anschluß daran wiederum das erhöhte Kalium aus dem Bad ausgewaschen. Am Ende des Experiments wird die Effektivität der Kanalblockade durch Zugabe des jeweils spezifischen Kanal-Öffners überprüft. Bei erfolgreicher Kanalblockade bleibt die zuvor nachgewiesene Dilatation auf Zugabe der Kanal-Öffner aus. Die optimalen Konzentrationen der jeweiligen Kalium-Kanalblocker und -Öffner (gute Wirkung bei erhaltener Spezifität) wird in Vorexperimenten durch Verwendung aufsteigender Konzentrationen ermittelt.

Anzahl der voraussichtlich notwendigen Einzelexperimente (nicht eingeschlossen sind hier Vorexperimente zur Ermittlung der optimalen Konzentrationen): jeweils $n=4$ für jeden Kalium-Kanal, gesamt $n=16$, für 3 verschiedene Arteriensegmente: $n=48$.

2. Klärung der Art der Beteiligung von NO an der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien unter Durchführung einer NOS Blockade:

Auch hier finden Präparate der Arteria cerebri media - Hauptstamm, Äste zweiter oder dritter Ordnung, penetrierende Arteriolen - aus unbehandelten männlichen Wistar Ratten (240-260 g) wie oben beschrieben Verwendung. Nach Durchführung der Kontrolldilatation auf 20 mM Kalium im extraluminale Bad wird unspezifisch das NO produzierende Enzym NOS durch extraluminale Zugabe des Nitroarginins L-NNA (L^o-Nitro-L-Arginin) oder spezifisch lediglich die neuronale NOS mit 7-NI inhibiert. Nach Erreichen der maximalen Enzymblockade (ca. 1 Stunde Einwaschzeit) wird die Kalium-Antwort erneut getestet. Erfolgt wie aus in vivo Befunden zu erwarten eine Reduktion der Kalium-vermittelten Dilatation unter NOS-Blockade, wird im Anschluß daran die Art der Rolle des NO aufgeklärt: echte Mediatorfunktion oder modulatorische Rolle. Hierzu wird in unterschiedlichen Versuchsansätzen unter weiter bestehender NOS Inhibition durch Zugabe von SIN-1 bzw. SNAP (NO-Donoren) oder 8-Br- cGMP (zellgängiges cGMP-Derivat) der basale NO-Spiegel bzw. des basalen cGMP Spiegels in der glatten Muskelzelle wiederhergestellt. Als Meßgröße zur exakten Einstellung des ursprünglich vorhandenen basalen NO Spiegels / cGMP Spiegels dient der Ruhedurchmesser. Dieser ist nach einer erfolgreichen NOS-Blockade um ca. 25 % erniedrigt (erhöhter Vasotonus durch fehlenden dilatatorischen Einfluß des basalen NO), die zuzugebende NO / cGMP Menge, respektive NO-Donor-/ 8-Bromo-cGMP- Konzentration ergibt sich somit durch das Erreichen des ursprünglichen Ruhedurchmessers vor der Enzymblockade. Nun wird in diesem System (NOS Blockade und artifiziell wiederhergestellter basaler NO / cGMP Spiegel) die Vasodilatation of extraluminale Gabe von 20mM Kalium erneut überprüft.

Anzahl der voraussichtlich notwendigen Einzelexperimente: jeweils n=4 für L-NNA + SIN1, L-NNA + SNAP, L-NNA + cGMP, 7-NI + SIN1, 7-NI + SNAP, 7-NI + cGMP, gesamt n=24, für 3 verschiedene Arteriensegmente: n=72.

3. Klärung der Art der Beteiligung von NO an der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien unter Durchführung einer spezifischen Blockade der NO sensitiven Guanylatcyclase:

Auch hier finden Präparate der Arteria cerebri media - Hauptstamm, Äste zweiter oder dritter Ordnung, penetrierende Arteriolen - aus unbehandelten männlichen Wistar Ratten (240-260 g) wie oben beschrieben Verwendung. Nach Durchführung der Kontrolldilatation auf 20 mM Kalium im extraluminale Bad wird durch extraluminale Zugabe von ODQ (spezifischer Blocker der NO sensitiven Guanylatcyclase) die Guanylatcyclase der glatten Muskelzelle gehemmt. Ist die anschließend durchzuführende Kalium vermittelte Dilatation verringert, ist dies ein weiterer Hinweis auf einen cGMP abhängigen Anteil dieser Dilatation. Im weiteren Verlauf des Experiments soll überprüft werden, ob sich dieser cGMP-abhängige Anteil durch Zugabe von cGMP, nicht aber durch NO-Zugabe restituieren läßt. Diese Experimente dürften weiteren Aufschluß darüber geben, inwieweit für eine mögliche modulatorische Rolle von NO ein basaler cGMP-Spiegel in der glatten Muskelzelle von Bedeutung ist.

Anzahl der voraussichtlich notwendigen Einzelexperimente: jeweils n=4 für ODQ + cGMP und ODQ + SNAP, gesamt n=8, für 3 verschiedene Arteriensegmente: n=24.

4. Klärung des Einflusses von NO bei der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien unter erhöhten basalen NO / cGMP-Spiegeln:

Auch hier finden Präparate der Arteria cerebri media - Hauptstamm, Äste zweiter oder dritter Ordnung, penetrierende Arteriolen - aus unbehandelten männlichen Wistar Ratten (240-260 g) wie oben beschrieben Verwendung. Nach Durchführung der Kontrolldilatation auf 20 mM Kalium im extraluminale Bad wird durch Zugabe eines NO-Donors (SIN1 oder SNAP) bzw.

von 8-Br-cGMP in aufsteigender Konzentration der basale, unter physiologischen Bedingungen im System vorhandene Spiegel von NO bzw. cGMP erhöht. Dieser Einfluß auf die zerebrovaskuläre Reaktivität wird nun durch Wiederholen der Kalium vermittelten Dilatation untersucht.

Anzahl der voraussichtlich notwendigen Einzelexperimente: jeweils n=4 für SIN1, SNAP und cGMP, gesamt n=12, für 3 verschiedene Arteriensegmente: n=36.

Studie A2: isolierte glatte Muskelzellen zerebraler Gefäße

Aus unbehandelten männlichen Wistar Ratten (240-260 g) werden in unterschiedlichen Versuchsansätzen Äste der Arteria cerebri media (Hauptstamm, Äste zweiter oder dritter Ordnung und penetrierende Arteriolen) entnommen und die glatten Muskelzellen wie oben beschrieben isoliert.

Folgende Untersuchungen sind geplant:

1. Identifizierung der verschiedenen Kaliumleitfähigkeiten in den glatten Gefäßmuskelzellen unterschiedlicher Gefäßsegmente:

Mit Hilfe der Patch-clamp-Technik werden hierbei die in den verschiedenen Gefäßabschnitten enthaltenen ATP-abhängigen (K_{ATP}), kalzium-abhängigen (K_{CA}), rein spannungsgesteuerten auswärtsgerichtenden (K_{DR}) und einwärtsgerichtenden Kaliumleitfähigkeiten (K_{IR}) identifiziert. Es werden die kinetischen Eigenschaften der gefundenen Leitfähigkeiten bestimmt und Stromdichtemessungen durchgeführt. In diesem ersten Untersuchungsabschnitt soll auch geklärt werden, ob in bestimmten Gefäßsegmenten bestimmte Kaliumleitfähigkeiten dominieren.

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 4 unterschiedliche Einzelstudien, Gesamt-tierzahl: n = 20

2. Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften identifizierter Kaliumleitfähigkeiten unter Verwendung der im isolierten Arterienpräparat eingesetzten Kaliumkanalblocker:

Hierbei soll v.a. geklärt werden, inwiefern die in den Experimenten an isolierten Zerebralarterien eingesetzten Blocker (Glibenclamid, Charybdotoxin, Ba^{2+} , 4-Aminopyridin) spezifisch auf eine bestimmte Leitfähigkeit in der glatten Muskelzelle wirken.

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 4 unterschiedliche Einzelstudien, Gesamt-tierzahl: n = 20

3. Aufklärung einer Beeinflussbarkeit der wichtigen Kaliumleitfähigkeiten durch Kaliumionen selbst und durch NO sowie Klärung der NO abhängigen intrazellulären Signalkette: Die Experimente an isolierten Zerebralarterien (Studie A1, 1. Einsatz von Kaliumkanalblockern) geben Aufschluß über die Bedeutung der verschiedenen Kaliumleitfähigkeiten für die kaliumvermittelte Gefäßdilatation. Darauf aufbauend sollen die folgenden Experimente im wesentlichen auf diese „bedeutsamen“ Leitfähigkeiten beschränkt bleiben:

- Beeinflussbarkeit durch Kalium: Durch schrittweise Veränderung (insb. Erhöhung) der extrazellulären Kaliumionenkonzentration ($[K^+]_0$) soll geprüft werden, inwiefern die extrazelluläre Kaliumkonzentration die jeweiligen Kaliumleitfähigkeiten in Gefäßmuskelzellen beeinflusst. Unter schrittweiser Veränderung von $[K^+]_0$ werden Ganzzellableitungen durchgeführt und dabei in erster Linie Kinetik und Stromamplitude bestimmt. In Einzelkanalablei-

tungen werden Einzelkanalleitfähigkeit, Offenwahrscheinlichkeit und Selektivität bestimmt.

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 2 unterschiedliche Einzelstudien (Ganzzellableitungen, Einzelkanalableitungen), Gesamtanzahl: n = 10

- Beeinflussbarkeit durch NO: durch extrazelluläre Gabe von nativem NO oder NO-freisetzenden Substanzen wie SIN1 oder SNAP in unterschiedlichen Konzentrationen werden in cell-attached Ableitungen bzw. Ableitungen an perforated-patches die Veränderungen der Eigenschaften von Kaliumkanälen untersucht, die für die Relaxation der glatten Muskelzelle bedeutend sind. Als wichtigste Parameter gelten hier Amplitudenänderung und Änderung der Stromkinetik (perforated-patches) bzw. Änderung der Einzelkanalleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit (cell-attached Ableitungen).

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 6 unterschiedliche Einzelstudien (NO nativ, SIN1, SNAP jeweils in Ganzzellableitungen und Einzelkanalableitungen), Gesamtanzahl: n = 30

- cGMP-Abhängigkeit: Zur Klärung, ob ein möglicher modulatorischer Effekt von NO auf Kaliumkanäle über die NO sensitive Guanylatcyclase vermittelt ist oder ob er (z.T.) Guanylatcyclase-unabhängig ist, sollen folgende Experimente durchgeführt werden: In Untersuchungen mit cell-attached Ableitungen bzw. Ableitungen an perforated-patches werden Kaliumleitfähigkeiten nach Präinkubation der Zellen mit ODQ (Guanylatcyclasehemmer) untersucht und daran anschließend der Einfluß eines wiederhergestellten NO-Spiegels (Zugabe von SIN1 o. SNAP) bzw. cGMP-Spiegels (8-Bromo-cGMP) untersucht. Die elektrophysiologischen Meßparameter ergeben sich abhängig vom Ergebnis des ersten Schrittes.

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 6 unterschiedliche Einzelstudien (ODQ+SIN1, ODQ+ SNAP, ODQ+8-Br-cGMP jeweils in Ganzzellableitungen und Einzelkanalableitungen), Gesamtanzahl: n = 30

- Untersuchungen zu cGMP-abhängigen Modifikationen der Kaliumleitfähigkeiten: In der intakten Zelle (perforated-patch) werden durch Gabe von H8 unspezifisch sowohl die cAMP- als auch die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PK) oder spezifisch mittels Rp-cGMPS die cGMP-abhängige PK inhibiert. Der Einfluß von unspezifischer und spezifischer Blockade auf die relevanten elektrophysiologischen Meßparameter der Kaliumleitfähigkeiten wird bestimmt. In einem zweiten Schritt soll die Bedeutung der Proteinkinaseinhibition unter dem fortdauernden Einfluß einer externen NO Erhöhung (SIN1 oder SNAP) bzw. einer intrazellulären cGMP-Erhöhung (8-Bromo-cGMP) bestimmt werden.

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 6 unterschiedliche Einzelstudien (H8+SIN1, H8+ SNAP, H8+8-Br-cGMP, Rp-cGMPS+SIN1, Rp-cGMPS+SNAP, Rp-cGMPS+8-Br-cGMP in Ganzzellableitungen), Gesamtanzahl: n = 30

- Untersuchungen zu NO-abhängigen, nicht cGMP-bedingten Nitrosylierungen von SH-Gruppen an Kaliumkanalproteinen: Die Zellen werden mit ODQ (Guanylatcyclasehemmer) vorinkubiert. Durch die folgende sequentielle pharmakologische Intervention mit a) NO-Donoren (SIN1 oder SNAP), b) NEM (N-Ethylmaleimid, führt zu irreversiblen Alkylierung von SH-Gruppen und verhindert die Nitrosylierungsreaktion am Kanalprotein) und c) abschließender erneuter externer NO-Erhöhung kann der cGMP-unabhängige Gesamteffekt von NO auf die Leitfähigkeiten sowie der SH-Gruppen abhängige Anteil untersucht werden. Die relevanten elektrophysiologischen Meßparameter sollen wiederum mit Hilfe

von cell-attached Ableitungen bzw. Ableitungen von perforated patches charakterisiert werden.

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 4 unterschiedliche Einzelstudien (ODQ+SIN1+NEM+SIN1, ODQ+SNAP+NEM+SNAP in jeweils Ganzzellaableitungen und Einzelkanalableitungen), Gesamtanzahl: n = 20

- Untersuchungen zum Einfluß von NO auf die Kaliumsensitivität von Kaliumleitfähigkeit(en): An der intakten Zelle (perforated patch) wird der NO-Spiegel durch extrazelluläre Applikation eines NO-Donors (SIN1 oder SNAP) erhöht. Unter fortdauernder NO-Applikation wird $[K^+]_o$ schrittweise variiert und dabei Stromamplituden und kinetische Eigenschaften der Kaliumleitfähigkeiten bestimmt.

Anzahl der Tiere: je 5 Tiere zur Herstellung der Zellkultur (Aufteilung in Gefäßmuskelzellen aus den oben beschriebenen 3 Gefäßabschnitten), 2 unterschiedliche Einzelstudien (SIN1, SNAP in Ganzzellaableitungen), Gesamtanzahl: n = 10.

Studie B: Charakterisierung des Zusammenwirkens von Kalium und NO unter pathophysiologischen Bedingungen nach CSD und Ischämie

Studie B1: isolierte Zerebralarterien

Aufgrund der Ergebnisse aus Studie A1 werden hier nur solche Experimente durchgeführt, die zur Aufklärung der Ursache für die veränderte zerebrovaskuläre Reaktion auf die Kalium vermittelten Dilatation nach CSD, nach globaler Ischämie und nach fokaler Ischämie dienen. Welche Ansätze hier im einzelnen sinnvoll erscheinen, läßt sich erst nach Abschluß von Studie A1 entscheiden.

Der Ablauf der Experimente bleibt prinzipiell gleich, doch stammen nun die Arteriensegmente aus Tieren, die zuvor einer Reihe von CSDs, einer globalen Ischämie oder einer fokalen Ischämie ausgesetzt waren. Es werden in Halothan/Lachgas-anästhesierten männlichen Wistar Ratten (240-260 g) entweder CSDs im Abstand von 10 Minuten 1 Stunde lang ausgelöst, bei den Tieren 10 Minuten globale Ischämie mit Reperfusion oder aber 60-90 Minuten fokale Ischämie mit oder ohne Reperfusion durchgeführt. Die Dekapitation mit nachfolgender Arterienpräparation erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CSD oder Ischämie, um die Kinetik der sich entwickelnden veränderten Gefäßreaktivität herauszuarbeiten.

Es ist mit einer ähnlichen Studienaufteilung sowohl in der Ischämie- als auch post-CSD Gruppe zu rechnen, sodaß sich identische Tierzahlen jeweils für die der Ischämie- als auch post-CSD Gruppe ergeben dürften (2 x 180, n = 360, auf Antragsjahr 2 und 3 verteilt).

Studie B2: isolierte glatte Muskelzellen zerebraler Gefäße

Prinzipiell handelt es sich um einen ähnlichen Versuchsplan wie in Studie A2 beschrieben, die glatten Muskelzellen der jeweiligen Gefäßsegmente werden nun jedoch aus Tieren isoliert, die zuvor einer Anzahl von CSDs bzw. globalen oder fokalen Ischämien ausgesetzt waren (siehe B1).

Es ist mit einer ähnlichen Studienaufteilung sowohl in der Ischämie- als auch post-CSD Gruppe zu rechnen, sodaß sich identische Tierzahlen jeweils für die der Ischämie- als auch post-CSD Gruppe ergeben dürften (2 x 170, n = 340, auf Antragsjahr 2 und 3 verteilt).

3.5.4 Zeitplan

Alle beschriebenen Modelle sind bereits im Labor der Experimentellen Neurologie / der Neurophysiologie etabliert, es kann deshalb unmittelbar mit den Untersuchungen begonnen werden. Im ersten Antragsjahr (2. Halbjahr 1998, 1999) soll die Studie A (A1 und A2 zeitgleich) durchgeführt werden: Studie A1 isolierte Zerebralarterien in der Experimentellen Neurologie, Studie A2 in der Neurophysiologie mit ständigem Austausch der Ergebnisse und möglicher Protokolländerung bei Bedarf. Im zweiten und dritten Antragsjahr (Rest 1999, bis 1. Halbjahr 2001) können dann die sich aus den Ergebnissen der Studie A abgeleiteten pathophysiologischen Untersuchungen (sowohl an Präparaten aus Tieren nach zerebraler globaler bzw. fokaler Ischämie, als auch aus Tieren, die einer CSD ausgesetzt waren), durchgeführt werden. Unter Berücksichtigung der Datenauswertung, dem Schreiben von Manuskripten und von Kongressbesuchen ist ein Zeitraum von einem Jahr für die physiologische Charakterisierung und von 2 Jahren für die pathophysiologischen Untersuchungen realistisch.

Perspektiven:

Die oben beschriebenen Untersuchungen konzentrieren sich auf die Rolle von NO bei der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Gefäße.

Die bisher formulierten Hypothesen lassen sich durch eine zentrale Hypothese erweitern:

Kalium und NO sind die wesentlichen Mediatoren / Modulatoren der Vasotonusregulation.

Daraus ergeben sich nun eine Reihe weiterer Studien, die sich mit der Rolle von Kalium und NO bei der Dilatation auf andere vasoaktive Substanzen / Einflüsse beschäftigen, wie z.B. CGRP, VIP, Substance P, neurogene Dilatation usw.

Neben der im Projekt beschriebenen verfügbaren Methoden würde der Einsatz der Zwei-Photonen Laser-Scanning Mikroskopie (two-photon laser-scanning microscopy, DPLSM) (Potter, 1996; Svoboda et al., 1997) zur Untersuchung der Koppelungsvorgänge auf subzellulärer Ebene in der glatten Muskelzelle allein (Darstellung von Calcium-Veränderungen und Spannungsänderungen durch Einsatz entsprechender Fluoreszenz-Farbstoffe) bzw. im Verband mit benachbarten Endothelzellen und perivaskulären Neuronen im intakten Gefäß weitere wichtige Informationen liefern.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Das vorliegende Projekt steht in engem methodischen und inhaltlichen Zusammenhang zum Projekt A1 Dreier/Dirnagl. Während sich das Projekt A1 bisher allgemein mit den Mediatoren der Blutflußantwort auf CSD befaßt hat, soll im Rahmen dieses Projektes in Zukunft das Phänomen der sogenannten "spreading ischemia" näher untersucht werden, die sich aus einer CSD unter primär erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration und NOS Blockade entwickelt und als möglicher Schadensmechanismus bei Subarachnoidalblutung (SAB) diskutiert wird (verzögerter Vasospasmus nach SAB). Durch die Gleichartigkeit der zu untersuchenden Mediatoren und Modulatoren ergeben sich hierdurch interessante Anknüpfungspunkte. Im Rahmen der pathophysiologischen Fragestellungen zur vaskulären Reaktion unter bakterieller Meningitis im Projekt A3 Weber sind auch hier inhaltliche Gemeinsamkeiten zu erkennen (Rolle von NO bei der Hyperämie unter bakterieller Meningitis).

Insofern die Aufrüstung des Konfokalen Laser Scanning Mikroskops der Experimentellen Neurologie zu einem two-photon laser-scanning microscope (DPLSM) im Rahmen des neu beantragten Projekts A? Dirnagl durchgeführt wird, würde sich perspektivisch auf methodischer Ebene eine interessante Zusammenarbeit mit diesem Projekt ergeben.

Im Projekt C3 (Eder/Heinemann: Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse) werden mit Hilfe elektrophysiologischer und histologischer Methoden u.a. Prozesse untersucht, die bei Tiermodellen der chronischen Temporallappenepilepsie (Pilocarpin-Modell, Amygdala-kindling) zu einer veränderten Pufferung extrazellulärer Kaliumionen führen. Eingriffe in den NO-Stoffwechsel beeinflussen bei verschiedenen Tiermodellen die Dauer und den Schweregrad iktaler Ereignisse in unterschiedlichem Ausmaß. Inwiefern eine inadäquate Blutflußantwort bei gleichzeitig iktal erhöhtem Zellmetabolismus für den Schweregrad der Gewebsschädigung im chronischen Zustand mitverantwortlich ist, ist z.Zt. noch nicht geklärt. Somit ergeben sich im Rahmen dieses Projektes neben methodischen Gemeinsamkeiten der Elektrophysiologie auch inhaltliche Anknüpfungspunkte im Rahmen der Rolle des NO für die erfolgende Blutflußantwort.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
 SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
 I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	An- zahl	Betrag in DM
-	-	IIa/2	1	19800	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	19800
zusammen	-	zus.	1	19800	zus.	1	39600	zus.	1	39600	zus.	1	19800
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		9000			18000			18000			9000
		515		18100									
		zusammen		27100	zusammen		18000	zusammen		18000	zusammen		9000
I		Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen ins- gesamt:		
		-			-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrich- tung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Einstu- fung in BAT ...
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Lindauer Ute Dr.med.vet. Rolf Klee Dr.med.	experimentelle Neu-rologie, Tier- medizin Neurophysiologie	Neurologische Klinik Institut für Physiologie	15 15	neues Projekt	Habilitations- stipendiatin der HU BAT IIa
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	N.N. *(Doktorand)	experimentelle Neu-rologie / Neurophysiologie	Neurologische Klinik / Institut für Physiologie	40 (20+20)	neues Projekt	BAT IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Ute Lindauer, Dr.med.vet. (Projektleiterin)

Planung und Leitung der Arbeiten unter Verwendung isolierter Zerebralarterien, Durchführung von Versuchen, Einarbeitung von Mitarbeitern / Doktoranden am Modell der isolierten Zerebralarterie, gemeinsame Planung und Auswertung der Arbeiten am Arterienmodell und der elektrophysiologischen Befunde und Zusammenführung der Befundergebnisse mit Rolf Klee (Mitantragsteller des Projekts), gemeinsame Koordinierung der Zusammenarbeit mit den anderen SFB Projekten und auswärtigen Institutionen.

Rolf Klee, Dr.med. (Projektleiter)

Planung und Leitung der elektrophysiologischen Arbeiten an der isolierten glatten Muskelzelle, Durchführung von Versuchen, Einarbeitung von Mitarbeitern / Doktoranden: Kultur zerebraler glatter Gefäßmuskelzellen sowie elektrophysiologische Messungen, gemeinsame Planung und Auswertung der Arbeiten am Arterienmodell und der elektrophysiologischen Befunde und Zusammenführung der Befundergebnisse mit Ute Lindauer (Mitantragstellerin des Projekts), gemeinsame Koordinierung der Zusammenarbeit mit den anderen SFB Projekten und auswärtigen Institutionen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

entfällt

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

NN, naturwissenschaftl. Doktorand/in

Beantragt wird ein naturwissenschaftl. Doktorand/in jeweils zur Präparation der isolierten Zerebralarterie mit Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen und zur Präparation der zerebralen Gefäßmuskelzellen mit den im Antrag dargelegten elektrophysiologischen Untersuchungen in der experimentellen Neurologie bzw. im Institut für Neurophysiologie.

Da beide Antragsteller selbst durch Einbindung in weitere wissenschaftliche Projekte sich nicht ganztägig der Durchführung der vorgeschlagenen Arbeiten widmen können, ist die Besetzung dieser Doktorandenstelle von ausschlaggebender Bedeutung für das Projekt.

Durch regelmäßige gemeinsame Besprechungen beider Antragsteller zusammen mit dem Doktoranden, in erster Linie aber auch durch die Durchführung der experimentellen Arbeiten durch den Doktoranden wird der inhaltliche Zusammenhalt des Projekts trotz der räumlichen Trennung der Projektteile gewährleistet werden.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

entfällt

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung	3000	6000	6000	3000
werden als Ergänzungsausrüstung beantragt	9000 + 18100	18000	18000	9000

Detaillierte Aufschlüsselung der beantragten Ergänzungsausrüstung:

Posten:	Betrag:
<p>Kosten für Versuchstiere (p.a.): <u>zur Gewinnung der zerebralen Arterien:</u> (Studie A1 = 1. Antragsjahr: physiologisch Charakterisierung - siehe detaillierte Aufschlüsselung unter Arbeitsprogramm 3.5.3., Studie B1 = 2. + 3. Antragsjahr: für die pathophysiologischen Untersuchungen (Ischämie + CSD) sind jeweils identische Tierzahlen pro Jahr zu erwarten) → gesamt 180 Tiere (männliche Wistar Ratten 240-260 g) pro Jahr, Preis pro Tier 20.- DM → 3600.- DM p.a <u>zur Herstellung der Kultur glatter Muskelzellen zerebraler Arterien:</u> (Studie A2 = 1. Antragsjahr: physiologisch Charakterisierung - siehe detaillierte Aufschlüsselung unter Arbeitsprogramm 3.5.3., Studie B2 = 2. + 3. Antragsjahr: für die pathophysiologischen Untersuchungen (Ischämie, CSD) sind identische Tierzahlen pro Jahr zu erwarten) → gesamt 170 Tiere (männliche Wistar Ratten 240-260 g) pro Jahr, Preis pro Tier 20.- DM → 3400.- DM p.a. <u>Kosten für Versuchstiere gesamt p.a.: 3600.- DM + 3400.- DM</u></p>	7000.- DM
<p>Verbrauchsmaterial (p.a.): <u>Chemikalien zur Durchführung der Arterien-Experimente</u> (NOS-Blocker: L-NNA, 7-NI; NO-Donoren: SIN1, SNAP; zellgängiges 8-Br-cGMP; Guanylatcyclase-Blocker ODQ; spezifische Kalium-Kanal-Blocker: Charybdotoxin, Glibenclamid, 4-AP, Ba²⁺, MOPS-Puffer) → 5000.- DM p.a. <u>Chemikalien zur Durchführung der elektrophysiol. Arbeiten</u> (NOS-Blocker: L-NNA, 7-NI; NO-Donoren: SIN1, SNAP, Herstellung von nativem NO; zellgängiges 8-Br-cGMP; Guanylatcyclase-Blocker ODQ; spezifische Kalium-Kanal-Blocker: Charybdotoxin, Glibenclamid, 4-AP, Ba²⁺; Nitrosylierungshemmstoff NEM; Proteinkinaseinhibitoren: H8, Rp-cGMPs; Messelektrolyte für die elektrophysiologischen Untersuchungen) → 5000.- DM p.a. <u>Kultur der glatten Muskelzellen</u> – Kulturmedien, Gasgemische für Brutschrank etc. → 1000.- DM p.a. <u>Kosten für Verbrauchsmaterial gesamt p.a.: 5000.- DM + 5000.- DM + 1000.- DM</u></p>	11000.-DM

Kosten Tiere + Verbrauchsmaterial pro Jahr gesamt: 18.000 DM

dazu im 2. Halbjahr 1998 Ausstattung eines Arbeitsplatzes zur Untersuchung der isolierten Zerebralarterie (Geräte mit einem Nettopreis unter 20.000 DM):

Kammer für Arterienpräparat: Arteriograph (Living systems, Burlington, VT)	ca. 3.100 DM
Lichtmikroskop invers (z.B. Leica DM IL)	ca. 4.000 DM
Videokamera mit Steuereinheit	ca. 8.000 DM
PC 486 100MHz, 500MB Platte, Monitor etc.	ca. 2.000 DM
Videokarte hierfür	ca. 1.000 DM
<u>Zusammen einmalig</u>	<u>ca. 18.100 DM</u>

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

Literatur

- Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., and Weir, E.K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* 91, 7583-7587.
- Armstead, W.M. (1996). Role of ATP-sensitive K⁺ channels in cGMP-mediated pial artery vasodilation. *Am J Physiol* 270, H423-H426
- Barfod, C., Akgoeren, N., Fabricius, M., Dirnagl, U., and Lauritzen, M. (1997). Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation. *Acta Physiol Scand* 160, 123-132.
- Bari, F., Errico, R.A., Louis, T.M., and Busija, D.W. (1996a). Interaction between ATP-sensitive K⁺ channels and nitric oxide on pial arterioles in piglets. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 1164
- Bari, F., Louis, T.M., Meng, W., and Busija, D.W. (1996b). Global ischemia impairs ATP-sensitive K⁺ channel function in cerebral arterioles in piglets. *Stroke* 27, 1874-1880.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., and Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850-853.
- Bonnet, P., Rusch, N.J., and Harder, D.R. (1991). Characterization of an outward K⁺ current in freshly dispersed cerebral arterial muscle cells. *Pfluegers Arch* 418, 292-296.
- Brayden, J.E. and Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 256, 532-535.
- Brint, S., Jacewicz, M., Kiessling, M., Tanabe, J., and Pulsinelli, W. (1988). Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8, 474-485.

- Bryan, R.M., Eichler, M.Y., Swafford, M.W., Johnson, T.D., Suresh, M.S., and Childres, W.F. (1996). Stimulation of α_2 adrenoceptors dilates the rat middle cerebral artery. *Anesthesiology* 85, 82-90.
- Bryan, R.M., Steenberg, M.L., Eichler, M.Y., Johnson, T.D., Swafford, M.W., and Suresh, M.S. (1995). Permissive role of NO in alpha 2-adrenoreceptor-mediated dilations in rat cerebral arteries. *Am.J.Physiol.* 269, H1171-H1174
- Busija, D.W. and Louis, T.M. (1995). Ischemia alters cerebrovascular K^+ channel function in piglets. *Soc Neurosci Abst* 21, 1671
- Christopherson, T.J., Milde, J.H., and Michenfelder, J.D. (1993). Cerebral vascular autoregulation and CO₂ reactivity following onset of the delayed postischemic hypoperfusion state in dogs. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 260-268.
- Cipolla, M.J., McCall, A.L., Lessov, N., and Porter, J.M. (1997). Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 28, 176-180.
- Clavier, N., Kirsch, J.R., Hurn, P.D., and Traystman, R.J. (1994). Effect of post-ischemic hypoperfusion on vasodilatory mechanisms in cats. *Am J Physiol* 267, H2012-H2018
- Cohen, R.A. and Vanhoutte, P.M. (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92, 3337-3349.
- Colonna, D.M., Meng, W., Deal, D.D., and Busija, D.W. (1994). Nitric oxide promotes arteriolar dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke* 25, 2463-2470.
- Colonna, D.M., Meng, W., Deal, D.D., Gowda, M., and Busija, D.W. (1997). Neuronal NO promotes cerebral cortical hyperemia during cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol* 272, H1315-H1322
- Dacey, R.G. and Duling, B.R. (1982). A study of rat intracerebral arterioles: methods, morphology, and reactivity. *Am.J.Physiol.* 243, H598-H606
- Dettmers, C., Young, A., ommel, T., Hartmann, A., Weingart, O., and ron, J.C. (1993). CO₂ reactivity in the ischaemic core, penumbra, and normal tissue 6 hours after acute MCA-occlusion in primates. *Acta Neurochir (Wien)* 125, 150-155.
- Dirnagl, U., Jacewicz, M., and Pulsinelli, M. (1993). The effect of MK-801 on cerebral blood flow in spontaneously hypertensive rats subjected to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* (*in press*),
- Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M., and Pulsinelli, W. (1989). Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 9, 589-596.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., Them, A., Schreiber, S., Pfister, H.-W., Koedel, U., Reszka, R., Freyer, D., and Villringer, A. (1995). Global cerebral ischemia in the rat: online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 15, 929-940.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., and Villringer, A. (1993a). Nitric oxide-synthase blockade enhances vasomotion in the cerebral microcirculation of anesthetized rats. *Microvasc Res* 45, 318-323.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., and Villringer, A. (1993b). Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci Lett* 149, 43-46.

- Dirnagl, U., Niwa, K., Lindauer, U., and Villringer, A. (1994a). Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: Role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol* 267, H296-H301
- Dirnagl, U., Niwa, K., Sixt, G., and Villringer, A. (1994b). Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in the rat is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 25, 1028-1038.
- Dirnagl, U., Thoren, P., Villringer, A., Sixt, G., Them, A., and Einhüpl, K.M. (1993). Global forebrain ischemia in the rat: controlled reduction of cerebral blood flow by hypobaric hypotension and two vessel occlusion. *Neurol Res* 15, 128-130.
- Dreier, J.P., Görner, A., Körner, K., Lindauer, U., Back, T., and Dirnagl, U. (1995a). Nitric oxide modulates the CBF response to spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 15, S155
- Dreier, J.P., Körner, K., Görner, A., Lindauer, U., Weih, M., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1995b). Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 14, 914-919.
- Duckrow, R.B. (1991). Regional cerebral blood flow during spreading cortical depression in conscious rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 11, 150-154.
- Duling, B.R. and Rivers, R.J. (1986). Isolation, cannulation, and perfusion of microvessels. In *Microcirculatory Technology*. C.H. Baker and W.L. Nastuk, eds. (Orlando, Florida: Academic Press, INC.), pp. 265-280.
- Edwards, F.R., Hirst, G.D.S., and Silverberg, G.D. (1988). Inward rectification in rat cerebral arterioles: involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol Lond* 404, 455-466.
- Fabricius, M., Akgoeren, N., and Lauritzen, M. (1995). Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol* 269, H23-H29
- Fabricius, M. and Lauritzen, M. (1994). Examination of the role of nitric oxide for the hypercapnic rise of cerebral blood flow in rats. *Am J Physiol* 266, H1457-H1464
- Faraci, F.M. and Heistad, D.D. (1993). Role of ATP-sensitive potassium channels in the basilar artery. *Am J Physiol* 264, H8-H13
- Faraci, F.M. and Sobey, C.G. (1996). Potassium channels and the cerebral circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23, 1091-1095.
- Florence, G., Bonvento, G., Charbonne, R., and Seylaz, J. (1994). Spreading depression reversibly impairs autoregulation of cortical blood flow. *Am J Physiol* 266, R1136-R1140
- Fredericks, K.T., Liu, Y., Rusch, N.J., and Lombard, J.H. (1994). Role of endothelium and arterial K⁺ channels in mediating hypoxic dilation of middle cerebral arteries. *Am J Physiol* 267, H580-H586
- Fujii, K., Heistad, D.D., and Faraci, F.M. (1990). Ionic mechanisms in spontaneous vasomotion of the rat basilar artery in vivo. *J Physiol* 430, 389-398.
- Fujii, K., Heistad, D.D., and Faraci, F.M. (1991). Flow-mediated dilatation of the basilar artery in vivo. *Circ Res* 69, 697-705.

- Goadsby, P.J., Kraube, H., and Hoskin, K.L. (1992). Nitric oxide synthesis couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Res* 595, 167-170.
- Helfaer, M.A., Kirsch, J.R., Haun, S.E., Koehler, R.C., and Traystman, R.J. (1991). Age-related cerebrovascular reactivity to CO₂ after cerebral ischemia in swine. *Am J Physiol* 260, H1482-H1488
- Hirst, G.D.S. and Edwards, F.R. (1989). Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 69, 546-604.
- Hirst, G.D.S., Silverberg, G.D., and van Helden, D.F. (1986). The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles. *J Physiol Lond* 371, 289-304.
- Hong, K.W., Yoo, S.-E., Yu, S.S., Lee, J.Y., and Rhim, B.Y. (1996). Pharmacological coupling and functional role for CGRP receptors in the vasodilation of rat pial arterioles. *Am J Physiol* 270, H323
- Iadecola, C., Zhang, F., and Xu, X. (1994). SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors. *Am.J.Physiol.* 267, R228-R235
- Kader, A., Frazzini, V.I., Solomon, R.A., and Trifiletti, R.R. (1993). Nitric oxide production during foal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24, 1709-1716.
- Kagström, E., Smith, M.L., and Siesjö, B.K. (1983). Cerebral circulatory responses to hypercapnia and hypoxia in the recovery period following complete and incomplete cerebral ischemia in the rat. *Acta Physiol Scand* 118, 281-291.
- Klee, R., Eder, C., Ficker, E., and Heinemann, U. (1997). Age-dependent variations in potassium sensitivity of A-currents in rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 9, 1970-1976.
- Kleppisch, T. and Nelson, M.T. (1995). ATP-sensitive K⁺-currents in cerebral arterial smooth muscle: Pharmacological and hormonal modulation. *Am J Physiol* 269, H1634-H1640
- Knot, H.J. and Nelson, M.T. (1995). Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol* 269, H355
- Kunz, A., Dirnagl, U., and Lindauer, U. (1997). Permissive role of nitric oxide (NO) in the relaxation of isolated rat middle cerebral artery to acidosis: involvement of ATP sensitive K⁺ (KATP) channels. *Soc Neurosci Abstr* 23, 1573
- Kuschinsky, W., Wahl, M., Bosse, O., and Thurau, K. (1972). Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats . A microapplication study. *Circ Res* 31, 240-247.
- Lacombe, P., Sercombe, R., Correze, J.L., Springhetti, V., and Seylaz, J. (1992). Spreading depression induces prolonged reduction of cortical blood flow reactivity in the rat. *Exp Neurol* 117, 278-286.
- Lauritzen, M. (1984). Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response. *J Cereb Blood Flow Metab* 4, 546-554.
- Lindauer, U. (1996). Isolated cerebral arteries - an in vitro model to study the coupling of neuronal activity to regional cerebral blood flow. *Futura* 4/96, 305-307.

- Lindauer, U. and Dirnagl, U. (1997). Nitric oxide: a modulator in the coupling of regional cerebral blood flow and increased neuronal activity during somatosensory stimulation in rats. *Am J Physiol Manuscript in Vorbereitung*,
- Lindauer, U., Megow, D., Schultze, J., Weber, J.R., and Dirnagl, U. (1996). Nitric oxide synthase inhibition does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 216, 207-210.
- Lindauer, U., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1993). Characterization of the CBF response to somatosensory stimulation: the model and influence of anesthetics. *Am J Physiol* 264, H1223-H1228
- Louis, T.M., Meng, W., Bari, F., Errico, R.A., and Busija, D.W. (1996). Ischemia reduces CGRP-induced cerebral vascular dilation in piglets. *Stroke* 27, 134-139.
- McCarron, J.G. and Halpern, W. (1990). Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol* 259, H902-H905
- McCarron, J.G., Quayle, J.M., Halpern, W., and Nelson, M.T. (1991). Cromakalim and pinacidil dilate small mesenteric arteries but not small cerebral arteries. *Am J Physiol* 261, H287-H291
- Meng, W., Colonna, D.M., Tobin, J.R., and Busija, D.W. (1995). Nitric oxide and prostaglandins interact to mediate arteriolar dilation during cortical spreading depression. *Am J Physiol* 269, H176-H181
- Nelson, M.T., Cheng, H., and Rubart, M. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270, 588-637.
- Nelson, M.T. (1993). Ca^{2+} -activated potassium channels and ATP-sensitive potassium channels as modulators of vascular tone. *Trends Cardiovasc.Med.* 3, 54-60.
- Nelson, M.T., Huang, Y., Brayden, J.E., Hescheler, J., and Standen, N.B. (1990). Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K^+ channels. *Nature* 344, 770-773.
- Nelson, M.T. and Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268, C799-C822
- Niwa, K., Lindauer, U., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1993). Blockade of nitric oxide synthesis in rats strongly attenuates the CBF response to extracellular acidosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 535-539.
- Onoue, H. and Katusic, Z.S. (1997). Role of potassium channels in relaxations of canine middle cerebral arteries induced by nitric oxide donors. *Stroke* 28, 1264-1271.
- Paterno, R., Faraci, F.M., and Heistad, D.D. (1995). Role of Ca^{++} activated K^+ channels in cerebral vasodilatation induced by activation of adenylate and guanylate cyclase. *Faseb J* 9, A263
- Peng, W., Hoidal, J.R., and Farrukh, I.S. (1996). Regulation of Ca^{2+} -activated K^+ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide. *J Appl Physiol* 81, 1264-1272.
- Peters, O., Back, T., Lindauer, U., Busch, C., Megow, D., Dreier, J., and Dirnagl, U. (1997). Increased formation of reactive oxygen species following permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* (*submitted*),

- Potter, S.M. (1996). Vital imaging: Two photons are better than one. *Current Biology* 6, 1595-1598.
- Quayle, J.M., McCarron, J.G., Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (1993). Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 265, C1363-C1370
- Robertson, B.E., Schubert, R., Hescheler, J., and Nelson, M.T. (1993). cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265, C303
- Samdani, A.F., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (1997). Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28, 1283-1288.
- Song, Y. and Simard, J.M. (1995). β -Adrenoreceptor stimulation activates large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in smooth muscle cells from basilar artery of guinea pig. *Pflügers Arch* 430, 984-993
- Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y., and Nelson, M.T. (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245, 177-180.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., and Tank, D.W. (1997). In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385, 161-165.
- Taguchi, H., Heistad, D.D., Kitazono, T., and Faraci, F.M. (1994). ATP-sensitive K⁺ channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia. *Circ Res* 74, 1008
- Taguchi, H., Heistad, D.D., Kitazono, T., and Faraci, F.M. (1995). Dilatation of cerebral arterioles in response to activation of adenylat cyclase is dependent on activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Circ Res* 76, 1057-1062.
- Wahl, M., Lauritzen, M., and Schilling, L. (1987). Change of cerebrovascular reactivity after cortical spreading depression in cats and rats. *Brain Res* 411, 72-80.
- Wahl, M., Parsons, A.A., and Schilling, L. (1994). Dilating effect of perivascularly applied potassium channel openers cromakalim and pinacidil in rat and cat pial arteries in situ. *Cardiovasc Res* 28, 1803-1807.
- Wolf, T., Lindauer, U., Obrig, H., Dreier, J., Back, T., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1996). Systemic nitric oxide synthase (NOS) inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression (CSD) in rats: A non-invasive near infrared spectroscopy (NIRS) and laser Doppler flowmetry (LDF) study. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 1100-1107.
- Wolf, T., Lindauer, U., Reuter, U., Back, T., Villringer, A., Einhüpl, K., and Dirnagl, U. (1997a). Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 950-954.
- Wolf, T., Lindauer, U., Villringer, A., and Dirnagl, U. (1997b). Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res* 761, 290-299.
- Wolf, T., Schulz, J., Peters, O., Busch, C., Wiegand, F., Dirnagl, U., and Lindauer, U. (1996). Nitric oxide (NO) is a permissive factor in the regional cerebral blood flow (rCBF) response to whisker deflection in the rat. *Soc Neurosci Abstr* 22, 1102

- Yamakage, M., Hirshman, C., and Croxton, T.L. (1996). Sodium nitroprusside stimulates Ca^{2+} -activated K^+ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270, L338-L345
- Yuan, X.-J., Tod, M.L., Rubin, L.J., and Blaustein, M.P. (1996). NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca^{2+} concentration by activating voltage-gated K^+ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10489-10494.
- Zhang, Z., Chopp, M., Maynard, K., and Moskowitz, M. (1994). Cerebral blood flow changes during cortical spreading depression are not altered by inhibition of nitric oxide synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 939-943.
- Zhang, Z.G., Chopp, M., Gautam, S., Zaloga, C., Zhang, R.L., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., and Forstermann, U. (1994). Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 654, 85-95.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A7

3.1.1 Thema:

Rolle der Microglia im Eisen-Stoffwechsel des Gehirns - Schädigung Eisen-bindender Proteine bei radikalischer Belastung

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neurobiologie
Biochemie und Molekularbiologie

3.1.3 Leiter:

Dr. Tilman Grune, 15.10.1962
Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation
Medizinische Fakultät (Charité)
Humboldt-Universität Berlin
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin
Telefon: (030) 2093 7514
FAX: (030) 2093 7204
email: grune@rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

() nein (x) ja, befristet bis zum : Oktober 1999 (Verlängerungsmöglichkeit für weitere 3 Jahre)

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen () ja (x) nein
- klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie () ja (x) nein
- Tierversuche () ja (x) nein
- gentechnologische Versuche () ja (x) nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haushaltsjahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998	19,8	32,5	-	52,3
1999	39,6	22	-	61,6
2000	39,6	22	-	61,6
1. Hj. 2001	19,8	7,3	-	27,1

3.2 Zusammenfassung

Das Gehirn ist ein Organ mit einem hohen Eisenbedarf und -gehalt. Einerseits aufgrund der Notwendigkeit von Eisen für die normale Stoffwechselfunktion des Gehirns und andererseits der Toxizität freien Eisens verfügen die neuronalen und nichtneuronalen Zellen des Gehirns über einen Proteinapparat, der die Zellen mit ausreichend Eisen versorgt und die Toxizität weitestgehend eindämmt. Störungen des Eisen-Stoffwechsels sind bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere bei der Parkinsonschen Krankheit, beschrieben.

Eisen entfaltet seine toxischen Wirkungen durch die Katalyse radikalgenerierender Reaktionen, die zu einer Oxidation von Zellbestandteilen führt.

Eine zentrale Rolle in der Regulation des Gesamt-Eisenstoffwechsels des Gehirns spielt die Microglia. Da diese Zellen einen hohen Eisengehalt besitzen und als Makrophagen Radikale erzeugen, steht in diesen Zellen insbesondere die Frage nach der radikalinitiierten Schädigung. Aufgrund dessen sind die Eisen-bindenden Proteine ein primäres Target für die Wirkung freier Radikale, zum anderen ist ihre Funktionalität aber auch essentiell für die Verhinderung der toxischen Wirkung von Eisen.

In diesem Projekt sollen die Eisen-bindenden Proteine der Microglia untersucht werden hinsichtlich ihrer Oxidation, ihres funktionellen Zustandes, ihres Abbaus und ihrer Neusynthese. Dabei werden vor allem die Proteine Ferritin, Transferrin, Transferrin-Rezeptor, die zytosolische Aconitase sowie die Häm-Oxygenase 1 betrachtet. Neben Fragen zum Proteinturnover soll vor allem geklärt werden, ob die Regulation der Neusynthese auf Transkriptions- oder Translationsebene erfolgt. Der Einfluß von radikalischem Streß auf diese Parameter soll in Zellkulturen untersucht werden.

Somit werden die Proteine des Eisen-Stoffwechsels auf Funktions-, Protein- und RNA-Ebene untersucht. Durch die Überprüfung ausgewählter Parameter in Primärkulturen bzw. an "slice"-Kulturen soll getestet werden, ob es zu Veränderungen des Eisen-Haushaltes im Gehirn kommt.

3.3 Stand der Forschung

Physiologie und Pathophysiologie des Eisenstoffwechsels im Gehirn

Das Gehirn benötigt eine ständige Zufuhr von Eisen, aber Eisen ist in seiner freien Form toxisch [Connor et al., 1995]. Aus diesem Grunde hat sich im Laufe der Evolution ein Apparat herausgebildet, der Eisen in bioverfügbarem Zustand hält, aber die Toxizität dieses Elements weitestgehend einschränkt [Connor et al., 1995; Hentze und Kühn, 1996]. Obwohl das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke einen zusätzlichen Schutz vor den toxischen Effekten vieler Substanzen aufweist, sind die unerwünschten Wirkungen vom Eisen im Gehirn vielfach beschrieben [Loeffler et al., 1995; Riederer et al., 1992]. Dies ist zum einen darin begründet, daß Eisen im Gehirn eine äußerst hohe Konzentration aufweist, die vergleichbar mit der Konzentration in der Leber ist [Gerlach et al., 1994] und für die normale Funktion des Gehirns essentiell ist [Connor et al., 1995]. Zum anderen kann man davon ausgehen, daß kein System einen hundertprozentigen Schutz vor toxischen Einflüssen gewährleisten kann.

So wird dem Faktor Eisen in der letzten Zeit verstärkt eine Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen zugewiesen. Insbesondere in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung und der Parkinsonschen Krankheit wird vermutet, daß freies Eisen die Rolle des Katalysators in radikalbildenden Reaktionen übernimmt [Ryan und Aust, 1992]. Bei der Alzheimerschen Erkrankung wird der Fenton-katalysierten, d.h. Eisen-katalysierten Radikalbildung eine Rolle bei der Bildung von vernetztem β -Amyloid und vernetztem τ -Protein zugeschrieben [Smith und Perry, 1995]. Wesentlich komplexer scheint die Rolle von Eisen als zumindest verstärkender Faktor in der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit zu sein. Neben der Beteiligung von Eisen in der Fenton-Reaktion [Ryan und Aust, 1992] kommt es zur Wechselwirkung mit Dopamin [Ben-Shachar et al., 1992; Kientzel et al., 1995; Smith und Perry, 1995], mit Neuromelanin [Kientzel et al., 1995], zu feedback-Regulationen der MAO-B [Ben-Shachar et al., 1992] und zur Regulation der Tyrosin-Hydroxylase durch Eisen [Mogi et al., 1988]. Des Weiteren wurden im Bereich der *Substantia nigra* hohe Eisen-Konzentrationen und geringe Aktivitäten der antioxidativen Schutzsysteme gemessen [Connor und Menzies, 1995; DiMonte et al., 1992; Saggi et al., 1989]. Konzentrationen von Eisen, löslichen Eisens und das Verhältnis von $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ wurden schon oft und mit widersprüchlichen Ergebnissen im Gehirn von Patienten [Dexter et al., 1992; Goto et al., 1996; Hirsch, 1992], die an der Parkinsonschen Krankheit litten, bestimmt. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen wurden aber sehr durch den methodischen Ansatz und durch mögliche Verschiebungen dieser Parameter *post mortem* beeinflusst. Aufgrund dessen ist es notwendig, funktionelle Parameter *in situ* zu untersuchen und die dort gewonnenen Ergebnisse so gut als möglich auf die *in vivo* Situation zu übertragen. Erste Ansätze zur Untersuchung der Situation des Eisen-Stoffwechsels sind in Form von immunhistologischen Studien zu Eisen-Speicher- und -Transport-Proteinen durchgeführt [Connor und Benkovic, 1992; Connor et al., 1995; Dexter et al., 1992; Goto et al., 1996; Loeffler et al., 1995]. Diese beschränken sich aufgrund des methodischen Ansatzes ebenfalls nur auf das Vorhandensein dieser Proteine und nicht auf deren Funktionalität.

Aufgrund dessen ist es das Ziel dieses Projektes, den Eisen-Stoffwechsel funktionell zu untersuchen und zu prüfen, ob sich die so gewonnenen Ergebnisse klinisch-pathologisch anwenden lassen.

Komponenten der Regulation des Eisenstoffwechsels

Der wesentliche intrazelluläre Eisen-Speicher ist das Ferritin. Ferritin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das aus 24 Untereinheiten besteht. Diese Untereinheiten bilden eine

Schale, in der das Eisen gelagert wird. Es sind zwei unterschiedliche Untereinheiten beschrieben, die H-Form (21 kDa) und die L-Form (19 kDa) [Gerlach et al., 1994; Hentze und Kühn, 1996]. Die H-Form besitzt eine Ferrioxidase-Aktivität, die die L-Form nicht besitzt [Connor und Menzies, 1995]. Funktionelle Unterschiede hinsichtlich der Eisen-Speicherung bestehen zwischen beiden Isoformen nicht, obwohl die H-Untereinheit häufiger in Organen auftritt, die einen hohen Eisen-Umsatz haben, während die L-Form in Organen zu finden ist, in denen Eisen lange gespeichert wird [Gerlach et al., 1994]. Im Gehirn treten beide Untereinheiten auf [Koeppen, 1995]. Es wird diskutiert, ob weitere, evtl. Gehirn-spezifische Ferritin-Untereinheiten existieren [Joshi et al., 1995]. Ferritin bindet den größten Anteil des Eisens im Gehirn [Yoshida et al., 1995].

Die Aufnahme von Eisen in die Zelle erfolgt hauptsächlich über Transferrin-Bindung und den Transferin-Rezeptor (TfR) [Hentze und Kühn, 1996]. Transferrin (Tf) ist in der Lage, nahezu vollständig das extrazelluläre Eisen zu binden [Hentze und Kühn, 1996]. Der Tf-Eisen-Komplex bindet an den TfR, und dieser Rezeptor-Liganden-Komplex wird von der Zelle internalisiert [Hentze und Kühn, 1996]. Im weiteren erfolgt die Ablösung des Eisens vom Tf und die Speicherung des Eisens in der Zelle bzw. sein Verbrauch im Stoffwechsel [2]. Der Prozeß der Eisen-Aufnahme unterliegt einer strengen Regulation. Dies gilt sowohl für das Gehirn als Organ, wo der Eisen-Transport durch die Blut-Hirn-Schranke kontrolliert wird [Descamps et al., 1996; van Gelder et al., 1995; Roberts et al., 1992; Roberts et al., 1993], als auch für die einzelne Zelle innerhalb des Gehirns. Eine zentrale Rolle in der intrazellulären Regulation der Proteine des Eisen-Stoffwechsels spielt die zytosolische Aconitase (cAconitase), auch bezeichnet als IRF (iron regulatory factor), IRE-BP (iron-responsive element binding protein) oder FRP (ferritin repressor protein) [Beinert und Kennedy, 1993; Hentze, 1996; Hentze und Kühn, 1996]. Bei hohen Eisen-Konzentrationen bildet dieses Protein ein 4Fe-4S-katalytisches Zentrum und besitzt damit eine Aconitase-Aktivität. Kommt es zum Abfall der Konzentration an freiem Eisen, verliert das 4Fe-4S-Zentrum mindestens ein Eisen und damit seine katalytische Aktivität [Hentze und Kühn, 1996]. Es kommt zu einer Konformationsänderung, und das so gebildete Protein ist in der Lage, an ein "iron-responsive element" (IRE) zu binden. Solch ein IRE befindet sich in der 5'-nichtkodierenden Region der mRNA des Ferritins und in der 3'-nichtkodierenden Region der mRNA des TfR. Damit kommt es bei niedrigen Konzentrationen freien Eisens zu einer Blockade der Translation der mRNA des Ferritins und zu einer Stabilisierung der mRNA des TfR [Hentze und Kühn, 1996]. Die Regulation der Proteine der Eisen-Aufnahme und -Speicherung erfolgt also weitestgehend auf Translationsebene. Einige andere mRNA-Spezies von Proteinen, die Eisen benötigen oder an der Porphyrin-Synthese beteiligt sind, besitzen ebenfalls ein IRE [Hentze und Kühn, 1996].

Wenig ist bekannt, wie dieses System auf oxidativen Streß bzw. auf eine Eisen-Belastung reagiert. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, daß ischämische Zustände das lösliche Eisen erhöhen [Oubidar, 1994]. Dies kann der Fall sein aufgrund der Freisetzung von Eisen aus Ferritin [Yoshida, 1995] oder durch einen verstärkten Häm-Abbau. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Häm-Abbaus wird durch die induzierbare Häm-Oxygenase 1 (HO-1) bzw. durch die konstitutive Häm-Oxygenase 2 (HO-2) katalysiert [Koistinaho et al., 1996]. Bei diesem Schritt werden Biliverdin, Kohlenmonoxid und freies Eisen gebildet. Die induzierbare HO-1 wird auch als HSP32 bezeichnet [Koistinaho et al., 1996; Massa et al., 1996]. HO-1 wird induziert durch oxidativen Streß, durch ischämische Zustände und durch Häm [Fukuda et al., 1996; Koistinaho et al., 1996; Massa et al., 1996; Matz et al., 1996; Takahashi et al., 1996]. Die protektive Rolle der HO-1 wird im Abbau des oxidativ-katalytischen Häms, der Freisetzung von Eisen, das durch Ferritin gebunden werden kann und in der Bildung von antioxidativ wirksamen Bilirubin gesehen [Matz et al., 1996]. Die wesentliche Induktion der HO-1 im Gehirn findet in der Microglia statt [Fukuda et al., 1996; Koistinaho et al., 1996; Massa et al., 1996; Matz et al., 1996; Takahashi et al., 1996]. Das ist ein Beispiel für die zent-

rale Rolle der Microglia bei der Regulation des Eisen-Stoffwechsels, auf die im nächsten Kapitel eingegangen wird.

Zentrale Rolle der Microglia bei der Homöostase des Eisenhaushaltes

Alle im Gehirn vorhandenen Zellen, sowohl die Glia- und Endothelzellen als auch die Neuronen, tragen zum Gesamt-Eisen-Stoffwechsel im Gehirn bei. Die Rolle der Endothelzellen liegt hierbei weitestgehend im Transport des Eisens in das Gehirn. Es wurde ein großer Pool an TfR in Endothelzellen des Gehirns beschrieben, von dem nur etwa 10% aktiv am Eisen-Transport beteiligt sind und der Rest als funktionelle Reserve anzusehen ist [Descamps et al., 1996; van Gelder et al., 1995; Roberts et al., 1992, Roberts et al., 1993]. Der Mechanismus des Eisen-Transportes durch die Blut-Hirn-Schranke ist noch nicht vollständig geklärt. Die Bindung des Eisen-Tf-Komplexes an den TfR und die Internalisierung des Komplexes ist gezeigt worden. Unklarheit besteht darin, ob Eisen vom Tf abgelöst wird und dann die Endothelzelle verläßt [Roberts et al., 1992, 1993] oder ob der Eisen-Tf-Komplex von der Endothelzelle durch Exozytose hirnseitig abgegeben wird [Descamps et al., 1996; van Gelder et al., 1995]. Innerhalb des Gehirns erfolgt der interzelluläre Eisen-Transport ebenfalls durch Tf, das hauptsächlich in den Oligodendrozyten synthetisiert wird [Connor und Benkovic, 1992; Ishimaru et al., 1996]. Diese Zellen enthalten ebenfalls größere Mengen an TfR und Ferritin [Connor und Benkovic, 1992; Ishimaru et al., 1996]. Eine zentrale Rolle in der Regulation des Eisen-Haushaltes des Gehirns wird der Microglia eingeräumt. Diese Zellen enthalten viel Ferritin [Barron, 1995; Connor und Benkovic, 1992; Koeppen, 1995; Ishimaru et al., 1996] und sind in der Lage, große Mengen an freiem Eisen aufzunehmen bzw. abzugeben. Bereits in der Ontogenese sind Makrophagen bzw. Microglia an der Eisen-Versorgung des sich entwickelnden Gehirns beteiligt [Moos, 1995]. Im Laufe der weiteren Entwicklung und des Alterns wurde ein ständig steigender Eisen- und Ferritin-Gehalt des Gehirns beobachtet [Ishimaru et al., 1996].

Neben dem hohen Gehalt an Eisen und der großen Speicherkapazität dieses Elementes in der Microglia, ist vor allem die Plastizität des Eisen-Stoffwechsels in diesen Zellen von Bedeutung. Zum einen wird in der Microglia der Eisenhaushalt auf Translationsebene durch die bei der Aktivierung freiwerdenden Superoxidanion-Radikale bzw. durch NO reguliert [Castro et al., 1994; Gardner und Fridovich, 1991, 1992; Gardner et al., 1995; Hausladen und Fridovich, 1994; Kennedy et al., 1983]. So ist beschrieben, daß in der Microglia Eisen durch Superoxid-Radikale aus Ferritin freigesetzt wird [Yoshida et al., 1995], daß sich die cAconitase-Aktivität unter NO-Einfluß ändert [Bouton et al., 1996; Castro et al., 1994; Gardner und Fridovich, 1991, 1992; Gardner et al., 1995; Hausladen und Fridovich, 1994; Kennedy et al., 1983] und die Bindungsaffinitäten des IRE-BP an das IRE durch NO moduliert werden [Bouton et al., 1996]. Zum anderen scheint es hier ebenfalls zusätzliche Mechanismen zu geben, die die Induktion von Ferritin bei Ischämie bzw. hämorrhagischen Insulten bewirken [Koeppen et al., 1995; Kondo et al., 1995; Matz et al. 1996]. Um der Akkumulation von löslichem Eisen [Oubidar et al., 1994] in solchen Situationen vorzubeugen, besitzt die Microglia ebenfalls einen TfR-unabhängigen Weg der Eisen-Aufnahme [Jeffries et al., 1996].

Offensichtlich kommt es aber unter bestimmten pathologischen Bedingungen zu einer nicht ausreichenden oder nicht adäquaten Regulation des Eisen-Stoffwechsels durch die Microglia, so daß z.B. bei der Parkinsonschen Krankheit eine Verringerung des Ferritins in der *Substantia nigra* beschrieben wurde [Dexter et al., 1992].

Radikale und Proteinoxidation

Eine der wesentlichsten Reaktionen, die in biologischen Systemen Sauerstoffradikale erzeugen, ist die Fenton-Reaktion, das heißt die Eisen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion. Da Radikalbildung mit einer ständigen Schädigung der Zellbestandteile verbunden ist, haben sich im Verlauf der Evolution eine Reihe von antioxidativen Schutzsystemen entwickelt [Davies, 1993; Halliwell, 1990; Sies, 1993]. Zu den primären antioxidativen Schutzsystemen zählt man die in der Zelle vorhandenen niedrigmolekularen Antioxidantien und Enzyme, die direkt die Umwandlung reaktiver Sauerstoffspezies katalysieren, wie z.B. Superoxiddismutasen und Katalasen. Trotz der hohen Effizienz dieser Schutzsysteme kommt es zu Fehlreaktionen, d.h. ein Teil der Oxidantien schädigt zelluläre Bestandteile. Die vorhandenen sekundären antioxidativen Schutzsysteme sind in der Lage, diese Schäden zu beseitigen, z.B. durch die Stoffwechselung toxischer Produkte, die DNA-Reparatur, den Abbau inaktiver, geschädigter Proteine und durch Reparaturprozesse. Das Wissen über die sekundären antioxidativen Schutzsysteme ist noch lückenhaft, insbesondere der Abbau oxidierter Proteine und die Kompensierung der zellulären Funktion solcherart geschädigter Proteine ist wenig untersucht.

Aufgrund der hohen Konzentration des Katalysators Eisen in der Mikro-Umgebung Eisenbindender Proteine sind diese besonders radikalischen Angriffen ausgesetzt. In der Microglia wird die Belastung dieser Proteine durch die Produktion von Radikalen, wie dem Superoxid-Radikal und NO, sowie der Bildung von Sekundärprodukten dieser Primärradikale, wie ONOO⁻, H₂O₂ und OH⁻ noch verstärkt.

Es ist bekannt, daß im *in vitro* System isolierte Proteine, die durch verschiedene Oxidantien modifiziert wurden, bevorzugt durch Proteasen hydrolysiert werden [Davies et al., 1988; Fagan et al., 1986; Grant et al., 1993; Pacifici et al., 19889; Salo et al., 1988]. Bereits 1989 wurde durch Pacifici und Mitarbeitern entdeckt, daß etwa 70-80 % des Abbaus oxidierter Proteine in roten Blutzellen durch eine einzelne Protease - das 20S Proteasom - katalysiert werden [Pacifici et al., 1989] (die Protease wurde damals als "Macroxyproteinase" bezeichnet). Weitere Studien zeigten, daß ein optimaler Schädigungsgrad des Substratproteins existiert und eine weiter anhaltende Belastung mit Oxidantien zu einer Verringerung der proteolytischen Suszeptibilität führt. Während eine mäßige Schädigung zu einem Anstieg der proteolytischen Empfindlichkeit und einem verstärkten Abbau durch das Proteasom führt, wirkt sich ein weiterer Anstieg der Oxidantien-Konzentration hemmend auf die Proteolyserate aus. Weitere Versuche gaben eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen. Die Gruppe von Davies fand eine strenge Abhängigkeit der proteolytischen Suszeptibilität von der Oberflächen-Hydrophobizität des Substrates [Giulivi et al., 1994, Pacifici et al., 1993]. Eine moderate oxidative Belastung scheint somit das Substratprotein teilweise und lokal zu entfalten und somit ein Signal für die spezifische Erkennung und den Abbau durch das 20S Proteasom zu geben [Giulivi et al., 1994, Pacifici et al., 1993]. Übermäßig starke oxidative Belastung führt zur Bildung von Aggregaten des Substratproteins, die dann schlechte Substrate für die Proteolyse werden und wahrscheinlich das Proteasom zu hemmen [Friguet et al., 1994a,b].

Zahlreiche Studien zeigten, daß oxidativ modifizierte Proteine durch das 20S Proteasom Ubiquitin- und ATP-unabhängig abgebaut wurden. In weiteren von uns durchgeführten Untersuchungen konnte demonstriert werden, daß Säugerzellen in der Lage sind, auf oxidativen Streß mit einem verstärkten Proteinabbau zu reagieren und oxidierte Proteine durch Proteolyse zu entfernen [Grune et al., 1995, 1996]. Übermäßig stark oxidierte Proteine können in Zellen, ähnlich wie in *in vitro*-Systemen, nicht abgebaut werden [59, 60]. Durch Einsatz der Antisense-Technik konnte gezeigt werden, daß das 20S Proteasom am Abbau oxidierter Proteine wesentlich beteiligt ist [Grune et al., 1995, 1996]. Dies kann als eine wichtige zellphysiologische Funktion des Proteasoms im Rahmen des sekundären antioxidativen Schutzes der Zelle angesehen werden.

Da eine Schädigung Eisen-bindender Proteine bei der Aktivierung der Microglia wie oben beschrieben wahrscheinlich ist, wird eine Neusynthese dieser Proteine essentiell für eine normale Funktion des Gehirns. Der Einfluß freier Radikale auf die Schädigung, den Abbau und die Wiederherstellung der Funktion Eisen-bindender Proteine in der Microglia ist das Objekt des hier vorgeschlagenen Projektes. Die Untersuchungen konzentrieren sich vor allem auf microgliale Zellen, die eine herausragende Bedeutung im Eisen-Stoffwechsel des Gehirns besitzen und deren Funktion bei neurodegenerativen Erkrankungen beeinträchtigt ist.

Literatur

- Barron, K.D. (1995) *J. Neurol. Sci.* 134S, 57-68.
- Beinert, H., M.C. Kennedy (1993) *FASEB J.* 7, 1442-1449.
- Ben-Shachar, D., G. Eshel, P. Riederer, M.B.H. Youdim (1992) *Ann. Neurol.* 32, S105-S110.
- Bouton, C., M. Raveau, J.-C. Drapier (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 2300-2306.
- Castro, L., M. Rodriguez, R. Radi (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 29409-29415.
- Connor, J.R., S.A. Benkovic (1992) *Ann. Neurol.* 32, S51-S61.
- Connor, J.R., S.L. Menzies (1995) *J. Neurol. Sci.* 134 (Suppl.) 33-44.
- Connor, J.R., B.S. Snyder, P. Arosio, D.A. Loeffler, P. Le Witt (1995) *J. Neurochem.* 65, 717-724.
- Davies, K.J.A. (1993) *Biochem. Soc. Transact.* 21, 346-353
- Davies, K.J.A., Lin, S.W. und Pacifici (1988) *J. Biol. Chem.* 262, 9914-9920
- Descamps, L., M.-P. Dehouck, G. Torpier, R. Cecchelli (1996) *Am. J. Physiol.* 270, H1149-H1158.
- Dexter, D.T., P. Jenner, A.H.V. Schapira, C.D. Marsden (1992) 32, S94-S100.
- DiMonte, D.A., P. Chan, M.S. Sandy (1992) *Ann. Neurol.* 32, S111-S115.
- Fagan, J.M., Waxman, L. und Goldberg, A.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 5705-5713
- Friguet, B., Stadtman, E.R. und Szweda, L.I. (1994a) *J. Biol. Chem.* 269, 21639-21643
- Friguet, B., Szweda, L.I. und Stadtman, E.R. (1994b) *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 168-173
- Fukuda, K., J.D. Richmon, M. Sato, F.R. Sharp, S.S. Panter, L.J. Noble (1996) *Brain Res.* 736, 68-75.
- Gardner, P.R., I. Fridovich (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19328-19333.
- Gardner, P.R., I. Fridovich (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 8757-8763.
- Gardner, P.R., I. Raineri, L.B. Epstein, C.W. White (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13399-13405.
- van Gelder, W., M.I.E. Huijskes-Heins, J.P. van Dijk, M.I. Cleton-Soeteman, H.G. van Eijk (1995) *J. Neurochem.* 64, 2708-2715.
- Gerlach, M., D. Ben-Shachar, P. Riederer, M.B.H. Youdim (1994) *J. Neurochem.* 63, 793-807.
- Giulivi, C., Pacifici, R.E. und Davies, K.J.A. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 329-341
- Goto, K., H. Mochizuki, H. Imai, H. Akiyama, Y. Mizuno (1996) *Brain Res.* 724, 125-128.

- Grant, A.J., Jussup, W. und Dean, R.T. (1993) *Free Rad. Res. Comms.* 19, 125-134
- Grune, T., T. Reinheckel, M. Joshi, K.J.A. Davies (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 2344-2351.
- Grune, T., T. Reinheckel, K.J.A. Davies (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 15504-15509.
- Halliwell, B. (1990) *Free Rad. Res. Commun.* 9, 1-32
- Hausladen, A., I. Fridovich (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 29405-29408.
- Hentze, M.W. (1996) *TIBS* 21, 282-283.
- Hentze, M.W., L.C. Kühn (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8175-8182.
- Hirsch, E.C. (1992) *Ann. Neurol.* 32, S88-S93.
- Ishimaru, H., K. Ishikawa, Y. Ohe, A. Takahashi, K. Tatemoto, Y. Maruyama (1996) *Brain Res.* 726, 23-30.
- Jefferies, W.A., M.R. Food, R. Gabathuler, S. Rothenberger, T. Yamada, O. Yasuhara, P.L. McGeer (1996) *Brain Res.* 712, 122-126.
- Joshi, J.G., J.T. Fleming, M. Dhar, V. Chauthaiwale (1995) *J. Neurol. Sci.* 134 (Suppl.) 52-56.
- Kennedy, M.C., M.H. Emtage, J.-L. Dreyer, H. Beiner (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11098-11105.
- Kientzl, E., L. Puchinger, K. Jellinger, W. Linert, H. Stachelberger, R.F. Jameson (1995) *J. Neurol. Sci.* 134 (Suppl.) 69-78.
- Koeppen, A.H. (1995) *J. Neurol. Sci.* 134 (Suppl.), 1-9.
- Koeppen, A.H., A.C. Dickson, J. A. Mc Evoy (1995) *J. Neurol. Sci.* 134S, 102-112.
- Koistinaho, J., S. Miettinen, R. Keinänen, N. Vartiainen, R. Roivainen, J.T. Laitinen (1996) *Eur. J. Neurosci.* 8, 2265-2272.
- Kondo, Y., N. Ogawa, M. Asanuma, Z. Ota, A. Mori (1995) *J Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 216-226.
- Loeffler, D.A., J.R. Connor, P.L. Juneau, B.S. Snyder, L. Kanaley, A.J. DeMaggio, H. Nguyen, C.M. Brickman, P.A. LeWitt (1995) *J. Neurochem.* 65, 710-716.
- Massa, S.M., R.A. Swanson, F.R. Sharp (1996) *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 8: 95-158.
- Matz, P., C. Turner, P.R. Weinstein, S.M. Massa, S.S. Panther, F.R. Sharp (1996) *Brain Res.* 713, 211-222.
- Mogi, M., M. Harada, K. Kiuchi, K. Kojima, T. Kondo, H. Narabayashi, D. Rausch, P. Riederer, K. Jellinger, T. Nagatsu (1988) *J. Neural Transm.* 72, 77-81.
- Moos, T. (1995) *Develp. Brain Res.* 87, 203-213.
- Oubidar, M., M. Boquillon, C. Marie, L. Schreiber, J. Bralet (1994) *Free Rad. Biol. Med.* 16, 861-867.
- Pacifici, R.E., Salo, D.C. und Davies, K.J.A. (1989) *Free Rad. Biol. Med.* 7, 521-536
- Pacifici, R.E., Kono, Y. und Davies, K.J.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 15405-15411
- Riederer, P., A. Dirr, M. Goetz, E. Sofic, K. Jellinger, M.B.H. Youdim (1992) *Ann. Neurol.* 32, S101-S104.

- Roberts, R.L., R.E. Fine, A. Sandra (1993) *J. Cell Sci.* 104, 521-532.
- Roberts, R., A. Sandra, G.C. Siek, J.J. Lukas, R.E. Fine (1992) *Ann. Neurol.* 32, S43-S50.
- Ryan, T.P., S.D. Aust (1992) *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 119-141.
- Saggu, H., J. Cooksey, D. Dexter, F.R. Wells, A. Lees, P. Jenner, C.D. Marsden (1989) *J. Neurochem.* 53, 692-697.
- Salo, D.C., Lin, S.W., Pacifici, R.E. und Davies, K.J.A. (1988) *Free Rad. Biol. Med.* 5, 335-339
- Sies, H. (1993) *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219
- Smith, M.A., G. Perry (1995) *J. Neurol. Sci.* 134(Suppl.), 92-94.
- Takahashi, K., E. Hara, H. Suzuki, H. Sasano, S. Shibahara (1996) *J. Neurochem.* 67, 482-489.
- Yoshida, T., M. Tanaka, A. Sotomatsu, S. Hirai (1995) *Neurosci. Lett.* 190, 21-24.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit ihrem Bestehen mit der radikalischen Schädigung von Zellen und Organen. Seit den 80iger Jahren wird von uns die Kaskade der hypoxischen Gewebsalterationen, insbesondere der Purinnukleotidmetabolismus, die Veränderungen im Glutathionsystem, Prozesse der Lipidperoxidation und ultrastrukturelle Veränderungen der Leber, des Dünndarms, der Niere und des Herzens untersucht [1-3].

Besonderes Interesse galt der Freisetzung reaktiver Aldehyde. Hierbei wurde ein breites Produktspektrum von langkettigen Alkanalen, Alkenalen und Hydroxyalkenalen bei artifiziellen radikalischen Belastungen bestimmt. Bei der Anwendung auf pathophysiologischen radikalischen Streß, wie er beim Reperfusionssyndrom auftritt, wurde von uns erstmals 4-Hydroxynonenal in posthypoxischem Gewebe nachgewiesen [1-4]. So wurde von unserer Gruppe gezeigt, daß in reoxygenierten Hepatozyten und Nierentubuluszellen und im reperfundierten Dünndarm und Herz das zytotoxische Lipidperoxidationsprodukt gebildet wird. Die Akkumulation des Aldehydes korrelierte mit Veränderungen im Glutathionsystem und der Bildung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (Malondialdehyd). Interessanterweise verlief zeitlich die Akkumulation von Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal nicht immer parallel. Eine unterschiedliche Metabolisierungsrate wäre eine mögliche Erklärung dafür [2, 3].

Untersuchungen zum Abbau von 4-Hydroxynonenal wurden in einer Reihe von Zellen und Organen von uns zeit- und konzentrationsabhängig durchgeführt [5-10]. In allen untersuchten Zellen ergab sich übereinstimmend, daß in der Initialphase ein starker 4-Hydroxynonenalabbau auftrat, der im Bereich von 8 bis 30 nmol/mg Feuchtgewicht /min lag. In den perfundierten Organen Herz und Dünndarm lagen die Abbauraten bei etwa einem Prozent der Werte von isolierten Zellen.

Bei Untersuchungen der Stoffwechselwege des 4-Hydroxynonenals wurden primäre Produkte, wie die 4-Hydroxynonenensäure, das 1,4-Dihydroxynonen und das Glutathion-Hydroxynonenal-Addukt und sekundäre Produkte, wie das Glutathion-Dihydroxynonen-Addukt und das Endprodukt Wasser, quantitativ und qualitativ erfaßt. Neben diesen Produkten konnte der Anteil an proteingebundenen 4-Hydroxynonenal quantifiziert werden [5-10].

Der Anteil des proteingebundenen 4-Hydroxynonenals unterlag starken Schwankungen in Abhängigkeit vom Zelltyp. Da dieser Anteil insbesondere für die eigentliche Zellschädigung verantwortlich ist, wurden hier weitere Untersuchungen vorgenommen. Hierzu zählen Arbeiten

zu Effekten des Aldehydes, die durch eine direkte Bindung an verschiedene regulatorisch wirksame Proteine erfolgen, wie die Hemmung der Poly-ADP-Ribosylierung und die Modifizierung der Proteinkinase C [11, 12]. Der Anstieg des Umsatzes von metabolisch markierten zellulären Proteinen nach Behandlung der Zellen mit 4-Hydroxynonenal wurde ebenfalls beschrieben. Bereits bei pathophysiologisch relevanten Konzentrationen von 1 µmol/l wurde ein Anstieg der Proteolyserate gefunden.

Zum Abbau oxidierter Proteine

In Untersuchungen zum oxidativen Streß konnte von uns die Bedeutung der Proteolyse als sekundäres antioxidatives Schutzsystem in sich teilenden Zellen gezeigt werden [13-16]. Diese Studien wurden im Rahmen eines DFG-Stipendiums (Gr 1240/1-1) in der Arbeitsgruppe von Prof. K.J.A. Davies (Albany, NY, USA) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Zelllinien über die Fähigkeit der Steigerung der Proteolyserate nach oxidativem Streß verfügen [13, 14]. Besonderer Wert wurde in unseren Untersuchungen auf die Messung des Proteinturnovers in lebenden Zellen gelegt. Eine Methode zur selektiven Hemmung des Proteasoms mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden wurde von uns etabliert und erfolgreich zur Untersuchung der Rolle dieser Protease beim Abbau oxidierter Proteine angewendet [13-16]. In weiterführenden Untersuchungen konnte die Rolle der isolierten 20S Protease beim Abbau von oxidierten Proteinen eindeutig belegt werden.

Zur Zeit wird an Problemen der Regulation der proteolytischen Kapazität von Säugerzellen unter radikalischer Belastung gearbeitet [17, 18]. Eine weitere zentrale Linie unserer Arbeit stellt die Untersuchung der Mechanismen der Änderung des Abbaus oxidierter Proteine in der Seneszenz dar.

Neben diesen Studien, die vor allem auf die Aktivität der proteolytischen Systeme gerichtet sind, werden verstärkt auch potentielle Substrate hinsichtlich ihrer Oxidierbarkeit, des Abbaus und der Wiederherstellung ihrer Funktion untersucht. So gab es Studien zur Oxidation von Serumproteinen bei entzündlichen Erkrankungen [19] und von Crystallinen bei UV-Behandlung [20]. Eisen-bindende Proteine wurden in unserem Labor bereits mehrfach untersucht. Im Mittelpunkt des Interesses standen hier vor allem die Oxidierbarkeit und der Abbau des Ferritins und der Aconitase [18, 21].

Auswahl eigener Arbeiten:

- Grune, T., W.G. Siems, W. Schneider: Accumulation of aldehydic lipid peroxidation products during postanoxic reoxygenation of isolated rat hepatocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 15 (1993) 125-132.
- Grune, T., K. Müller, S. Zöllner, R. Haseloff, I.E. Blasig, H. David: Evaluation of purine nucleotide loss, lipid peroxidation and ultrastructural alterations in post-hypoxic hepatocytes. *J. Physiol.* 498.2 (1997) 511-522.
- Blasig, I.E., T. Grune, K. Schönheit, E. Rohde, M. Jakstadt, R.F. Haseloff, W.G. Siems: 4-Hydroxynonenal, a novel indicator of lipid peroxidation for reperfusion injury of the myocardium. *Am. J. Physiol.* 269 (Heart Circ. Physiol. 38)(1995) H14-H22.
- Grune, T., O. Sommerburg, T. Petras, W. Siems: Human renal tubular cells: Increased postanoxic formation of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Rad. Biol. Med.* 18 (1995) 21-27.
- Grune, T., W.G. Siems, H. Zollner, H. Esterbauer: Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in Ehrlich mouse ascites cells at different proliferation stages. *Cancer Research* 54 (1994) 5231-5235.

- Petras, T., W.G. Siems, T. Grune: 4-Hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney. *Free Rad. Biol. Med.* 19 (1995) 685-688.
- Ullrich, O., H. Huser, W. Ehrlich, T. Grune: Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Free Rad. Biol. Med.* 22 (1997) 1153-1157.
- Kunstmann, S., K. Mertsch, I.E. Blasig, T. Grune: High metabolic rates of 4-hydroxynonenal in brain capillary endothelial cells during hypoxia/reoxygenation. *Brain Res.* 740 (1996) 353-355.
- Siems, W.G., H. Zollner, T. Grune, H. Esterbauer: Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product. *J. Lipid Res.* 38 (1997) 612-622.
- Grune, T., W.G. Siems, T. Petras: Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in in situ perfused rat kidney. *J. Lipid Res.* 38 (1997) 1660-1665.
- Ullrich, O., W.G. Siems, K. Lehmann, H. Huser, W. Ehrlich, T. Grune: Inhibition of poly(ADP-ribose) formation by 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Biochem. J.* 315 (1996) 705-708.
- Schwarzer, E., O.Müller, P. Arese, W.G. Siems, T. Grune: Increased levels of 4-hydroxynonenal in human monocytes fed with malarial pigment hemozoin. *FEBS Lett.* 388 (1996) 119-122.
- Grune, T., T. Reinheckel, M. Joshi, K.J.A. Davies: Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress - Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2344-2351.
- Grune, T., T. Reinheckel, K.J.A. Davies: Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15504-15509.
- Grune, T., T. Reinheckel, K.J.A. Davies: Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11 (1997) 526-534.
- Grune, T., K.J.A. Davies. Breakdown of oxidized proteins as part of secondary antioxidative defense in mammalian cells. *Biofactors* 6 (1997) 165-172.
- Ullrich, O., N. Sitte, E. Conradi, T. Grune: Poly-ADP-ribosylation of the nuclear 20S protease during oxidative stress. (eingereicht)
- Reinheckel, T, N. Sitte, O. Ullrich, U. Kuckelkorn, K.J.A. Davies, T. Grune: Resistance of the 20S proteasome to oxidative stress. (in Vorbereitung).
- Grune, T., P. Michel, N. Sitte, W. Eggert, H. Albrecht-Nebe, H. Esterbauer, W.G. Siems: Increased levels of 4-hydroxynonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases. *Free Rad. Biol. Med.* 23 (1997) 357-360.
- Sommerburg, O., O. Ullrich, N. Sitte, D. von Zglinitzki, W. Siems, T. Grune. Dose- and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light - Selective recognition and degradation by the 20S proteasome. (im Druck)
- Grune, T., I.E. Blasig, N. Sitte, E. Roloff, R. Haseloff, K.J.A. Davies: Peroxynitrite, but not nitric oxide, enhances susceptibility to proteolytic degradation. (eingereicht)

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Ziel der Bearbeitung dieses Themenkomplexes soll es sein, weitere Aufschlüsse über die Mechanismen der Regulation des Eisen-Stoffwechsels durch die Microglia zu erhalten. Dabei stehen die Freisetzung von Eisen und die Schädigung Eisen-bindender Proteine durch Streß im Mittelpunkt des Interesses, da dies wesentliche pathogenetische Faktoren bei neurodegenerativen Erkrankungen sein können.

- Es soll geklärt werden, ob die Oxidation Eisen-bindender Proteine mit deren Abbau und mit einer Freisetzung von Eisen verbunden ist und welche intrazellulären Proteasen beim Abbau dieser Proteine nach radikalischer Belastung beteiligt sind.
- Im nächsten Teil der Untersuchungen soll geklärt werden, ob der Turnover, d.h. Abbau und Neusynthese der Eisen-bindenden Proteine nach radikalischem Streß in der Microglia verändert ist. Es soll untersucht werden, ob die Regulation des Gehaltes Eisen-bindender Proteine auf Transkriptions- und auf Translationsebene erfolgt
- Die Wirkung von freiem und gebundenen Eisen als regulierender Faktor des Gehaltes Eisen-bindender Proteine soll im weiteren geklärt werden.
- Es soll untersucht werden, ob der Aktivierungsgrad der Microglia (astrozytenkonditioniertes Medium, MCSF, GMCSF, γ -Interferon, LPS) einen Einfluß auf die Eisenaufnahme und Eisenspeicherung besitzt. Dabei soll auf Kooperationen innerhalb des SFB zurückgegriffen werden. Es ist geplant, mit den Arbeitsgruppen Dirnagl, Kettenmann, Blasig und Heinemann zusammenzuarbeiten und Untersuchungen an der isolierten Microglia bzw. an "slice"-Kulturen durchzuführen.

3.5.2 Methoden

Biologische Modelle

Die grundlegenden biochemischen Untersuchungen in der Anfangsphase der Bearbeitung des Projektes sollen in folgenden Zelllinien durchgeführt werden: BV-2 und RAW264.7. Diese Zelllinien stehen zur Verfügung und sind schon mehrfach als Modell der Microglia verwendet worden. Des weiteren stehen für Untersuchungen RBE4-Zellen im Rahmen des SFB als Endothelzell-Modell zur Verfügung. Das Ausweichen auf Zelllinien ist notwendig, da für einige der geplanten biochemischen Untersuchungen große Proteinmengen benötigt werden. Aufgrund dessen sollen grundlegende Zeitkinetiken und Konzentrationsabhängigkeiten mit diesen Zelllinien untersucht werden. Da diese Zellen nur bedingt die Situation der Microglia widerspiegeln, sollen markante Zeitpunkte und interessierende Parameter in Primärkulturen untersucht werden. Dies wird in enger Kooperation mit den Arbeitsgruppen Kettenmann, Dirnagl und Heinemann geschehen. Weiterhin sollen einige Parameter des Eisen-Stoffwechsels mit "slice"-Kulturen in Zusammenarbeit mit der Gruppe Heinemann geprüft werden. Falls es sich dabei erweisen sollte, daß ebenfalls andere Zelltypen wesentlich an der Regulation des Eisen-Stoffwechsels beteiligt sind, stehen durch Kooperation mit der Arbeitsgruppe Kettenmann Oligodendrozyten und in der Arbeitsgruppe Blasig Gehirnkapillar-Endothelzellen und Astrozyten zur Verfügung.

Belastung der Zellen durch radikalischen Streß

Es sollen verschiedene radikalische Belastungen auf ihren Effekt auf den Eisen-Stoffwechsel untersucht werden. Dazu gehören die bereits in Experimenten in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Reagenzien: H_2O_2 , der Superoxid-Generator Menadion, NO, Xanthinoxidase/ Xanthin. Des weiteren sollen freies Eisen und Transferrin in unterschiedlichen Eisenbeladungen zum Einsatz kommen. Die Zellen werden diesen Belastungen für definierte Zeiten und mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt (Grune et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 2344-2351; Grune et al. J. Biol. Chem. 271 (1996) 15504-15509).

Bestimmung Eisen-bindender Proteine

Folgende Eisen-bindende Proteine sollen in die Untersuchungen mit einbezogen werden: Ferritin, zytosolische Aconitase, Transferrin, Transferrinrezeptor und Häm-Oxygenase 1 (HSP32). Diese sollen hinsichtlich der folgenden Parameter untersucht werden:

Untersuchung des Protein-Gehaltes. Der Protein-Gehalt soll hauptsächlich mit Hilfe von Antikörpern untersucht werden. Dabei ist sowohl an Immunoblots bzw. an ELISA-Methoden gedacht. Zur Zeit werden die dafür notwendigen Antikörper auf ihre Reaktivität getestet. Immunoblots werden in unserem Labor routinemäßig in großer Anzahl durchgeführt. ELISA-Methoden sind ebenfalls etabliert.

Proteinturnover und Abbau. Die Geschwindigkeit des totalen Proteinabbaus wird nach Markierung der Zellen mit [^{35}S]-Methionin für 20 h als Geschwindigkeit der Abgabe markierten Methionins nach einer 2 h "cold chase" Periode in das Zellkulturmedium bis zu 48 Stunden gemessen (Grune et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 2344-2351; Grune et al. J. Biol. Chem. 271 (1996) 15504-15509). Neben den Versuchen zur Bestimmung des Proteinabbaus soll die Syntheserate gemessen werden. Dies geschieht ebenfalls durch [^{35}S]-Methionin- Markierung und die Messung der inkorporierten Radioaktivität. Bei der Untersuchung spezifischer Proteine sollen diese elektrophoretisch aufgetrennt bzw. durch Immunoaffinitätsverfahren abgetrennt und danach vermessen werden.

Untersuchung der mRNA. Zur Untersuchung des Gehaltes an mRNA Eisen-bindender Proteine sollen die traditionellen Verfahren mit Hilfe der Isolation totaler RNA zur Anwendung kommen. Anschließend erfolgt die Analyse mit Hilfe der traditionellen Agarose-Gel-Elektrophorese und anschließendem Northern-Blot oder durch RT-PCR. Diese Methoden sind im Labor etabliert bzw. können durch Kooperation innerhalb des SFB schnell übertragen werden. Durch Kooperationspartner stehen die notwendigen Sonden zur Verfügung. PCR-Primer für diese Proteine sind in der Literatur beschrieben.

Bestimmung der Aktivität Eisen-bindender Proteine. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Aconitase wurde in unserem Labor schon durchgeführt (Methode: Kennedy et al. J. Biol. Chem. 258 (1983) 11098-11105.). Die Messung der Bindung von Aconitase an das IRE kann durch eine elektrophoretische Trennung analysiert werden (Bouton et al. J. Biol. Chem. 271 (1996) 2300-2306). Bei der Applikation dieses auf einen "gel mobility shift" basierenden Assays werden keine Schwierigkeiten erwartet, da in unserem Labor mit dieser Methode andere Fragestellungen bearbeitet werden. Die Bindungskapazität des Ferritins für freies Eisen wird als Maß der Funktionalität dieses Proteins benutzt. Die Funktionalität der Transferrin-Bindung an den Transferrin-Rezeptor kann durch einen neuen Assay getestet werden. Dieser basiert auf dem Einsatz von Fluoreszenz-markiertem Transferrin (Molecular Probes) und der darauffolgenden intrazellulären Fluoreszenz-Messung. Diese Methode ist von uns neu zu etablieren, da dieses Produkt bis jetzt nicht in unserem Labor verwendet wurde.

Messung der proteolytischen Systeme

Bestimmung der Aktivität. Die Aktivität der proteolytischen Enzyme wird im Zellysat aus 10^6 Zellen bestimmt und entweder auf Zellzahl oder Proteingehalt normiert. Zellen werden für diese Messungen in 1 mM DTT lysiert. Das erhaltene Lysat wird geteilt. Teil 1 wird zentrifugiert und der Überstand zur Messung der Aktivität des Proteasoms verwendet (pH 8; Substrat: suc-LLVY-MCA). Im zweiten Teil werden die entstehenden Membranvesikel mit Ultraschall zerstört. Danach werden die Aktivitäten der sauren lysosomalen Proteasen (pH 5,5; Substrat: z-FR-MCA) fluorimetrisch bestimmt.

Bestimmung des Proteasengehaltes durch Immunoblots. Die Proteine des wie oben gewonnenen Zellysates werden in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Nature 227 (1970) 680-685) aufgetrennt und mittels Immunoblot im Standardverfahren nach Towbin (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350-4354) analysiert. Antikörper zu folgenden Proteasen sind zur Zeit vorhanden bzw. können käuflich erworben werden: anti-Proteasom (Prof. Keiji Tanaka, Tokushima Universität, Japan), anti-Cathepsin B, D und G (Calbiochem, Bad Soden, Prof. H. Kirschke, Turku, Finnland). Zusätzlich soll der Gehalt an ubiquitinierten Proteinen und Ubiquitin, dem Cofaktor für die ATP-abhängige 26S Protease mit Hilfe von Immunoblots gemessen werden: Anti-Ubiquitin (Sigma, Deisenhofen).

Messung der Induktion proteolytischer Systeme. Dies kann durch die oben beschriebenen Verfahren der Aktivitätsbestimmung bzw. Bestimmung des Proteasengehaltes vermessen werden. Des Weiteren sind Sonden für die Northern-Blot-Analyse der mRNA für einige Proteaseuntereinheiten vorhanden.

Messung der Proteinoxidation. Die Proteinoxidation wird durch die Messung der proteinogenen Carbonylgruppen ermittelt. Dabei steht zur Zeit zum einen ein ELISA und zum anderen ein Verfahren mit Hilfe eines Immunoblots zur Verfügung. In beiden Methoden werden Proteine mit Dinitrophenylhydrazin modifiziert. Die Detektion erfolgt darauf mit Hilfe eines anti-DNP-Antikörpers (Sigma, Deisenhofen).

Bestimmung der Eisen-Konzentration. Die Bestimmung der Eisen-Konzentration erfolgt entweder photometrisch in einem Routine-Assay mit Hilfe von Ferrozine (Anal. Biochem. 40 (1971) 450-458). Im Laufe der Bearbeitung des Projektes soll getestet werden, inwieweit kommerziell angebotene Fluoreszenz-Farbstoffe (Molecular Probes) in der Lage sind, intrazelluläre Eisen-Konzentrationen zu bestimmen bzw. einen niedrigeren Konzentrationsbereich zu erfassen.

3.5.3 Arbeitsprogramm

Es soll an dieser Stelle noch einmal darauf verwiesen werden, daß Eisen in diesem Projekt als ein normaler Bestandteil des Stoffwechsels untersucht werden soll. Aus diesem Grunde soll versucht werden, weitestgehend auf physiologische bzw. pathophysiologische Zustände (Konzentrationen bzw. Fluxraten) zurückzugreifen. Es ist **nicht** Ziel der Untersuchungen, Eisen als Oxidanz in hohen Konzentrationen einzusetzen. Der Einreicher ist sich dessen bewußt, das Experimente mit solchem Ansatz bereits häufig durchgeführt wurden, oft ohne eine

physiologisch oder pathophysiologisch relevante Aussage zu erhalten. Der Faktor Eisen soll in diesem Projekt als regulatorischer und pathophysiologischer Faktor angesehen werden, **nicht** als Oxidationsmittel.

Da die wesentlichen Methoden für die Bearbeitung des Projektes etabliert sind, kann direkt mit der Bearbeitung der konkreten Zielstellungen begonnen werden. Lediglich einige der methodischen Voraussetzungen sind noch zu schaffen, dies kann jedoch während der laufenden Arbeiten geschehen.

Wesentliches Projektziel ist es, die Bedeutung der Microglia in der Regulation des Eisenstoffwechsels zu untersuchen.

Dabei werden folgende konkrete Fragestellungen mit den oben beschriebenen Methoden bearbeitet:

1. Oxidation Eisen-bindender Proteine und ihre Funktion

Zur Untersuchung dieses Themenkomplexes sollen die oben beschriebenen Methoden am isolierten System zum Einsatz kommen. Isolierte Eisen-bindende Proteine werden verschiedenen Radikalquellen ausgesetzt. Die zur Anwendung kommenden Radikalquellen sind ebenfalls im Methodenteil erläutert. Nach Oxidation und Entfernung der entsprechenden Radikalquellen durch Dialyse oder Ultrafiltration werden die Menge an freigesetztem und gebundenem Eisen bestimmt. Des Weiteren werden die enzymatischen Aktivitäten der Aconitase gemessen. Diese funktionellen Parameter werden mit dem Oxidationsgrad und der proteolytischen Suszeptibilität korreliert.

Da zelluläre proteolytische Systeme in Betracht kommen, soll getestet werden welche Proteasen oxidierte Eisen-bindende Proteine verstärkt abbauen. Die Proteolyseraten können durch die Bestimmung freier Amine oder durch die Messung der säurelöslichen Radioaktivität bei der Verwendung radioaktiv markierter Substrate bestimmt werden. Die Produkte dieser Reaktionen werden untersucht hinsichtlich der Bildung stabiler, akkumulierender Endprodukte.

Der inhibitorische Einfluß von Eisen auf die proteolytischen Systeme soll durch den Einsatz von freiem Eisen, Eisenchelatoren und Transferrin-gebundenem Eisen getestet werden.

2. Turnover Eisen-bindender Proteine in der Microglia

Bei der Beantwortung dieser Fragestellungen wird die Microglia mit verschiedenen radikalbildenden Systemen belastet und der Zeitverlauf der Regulation der Neubildung Eisenbindender Proteine verfolgt.

Die Eisen-bindenden Proteine der Microglia werden metabolisch markiert ($[^{35}\text{S}]$ -Methionin). Anschließend werden die Zellen mit radikalgenerierenden Substanzen belastet. In der darauffolgenden Phase des Experimentes wird der Abbau der Eisen-bindenden Proteine untersucht.

In weiteren Experimenten wird die Neusynthese von Eisen-bindenden Proteinen nach radikalischem Streß durch den Einbau von radioaktiven Aminosäuren gemessen.

So werden Aufschlüsse über den Umsatz Eisen-bindender Proteine gewonnenen.

Um zu unterscheiden, ob die Neusynthese der Eisen-bindenden Proteine auf Transkriptionsebene oder Translationsebene erfolgt werden unter analogen experimentellen Bedingungen die mRNA-Gehalte dieser Proteine bestimmt.

Die Freisetzung von Eisen während der radikalischen Belastung und die Eisen-Bindungskapazität der Microglia wird ebenfalls gemessen. Die Funktionalität des IRE wird durch "gel mobility shift"-Assays bestimmt.

3. Einfluß des Aktivierungsgrades der Microglia auf den Eisenhaushalt

In diesem Abschnitt soll untersucht werden in wie weit der Aktivierungsstatus der Microglia den Eisen-Haushalt beeinflusst. Dabei wird die Microglia mit astrozytenkonditioniertem Medium, MCSF, GMCSF, γ -Interferon und LPS behandelt.

Mit den oben beschriebenen Methoden wird anschließend der Effekt auf die Speicherkapazität von Eisen und die Eisen-Aufnahme gemessen. Dabei soll insbesondere geklärt werden ob die oben untersuchte Regulation des Gehaltes Eisen-bindender Proteine während der Aktivierung der Microglia noch intakt ist.

Des weiteren soll die Frage untersucht werden inwieweit bei der Aktivierung der Microglia Eisen aus den intrazellulären Speichern dieser Zellen freigesetzt wird.

Im weiteren soll geklärt werden inwieweit eine radikalische Belastung in der aktivierten Microglia eine Veränderung der Möglichkeit der Eisen-Aufnahme bzw. Eisen-Speicherung hervorruft.

Die Untersuchungen sollen mit der Klärung des Eisen-Turnovers in "slice"-Kulturen beendet werden. Dabei sollen diese radikalischer Belastung ausgesetzt werden und anschließend der Gehalt an Eisen-bindenden Proteinen und der Gehalt an freiem Eisen untersucht werden.

Diese Untersuchungen werden in Zusammenarbeit mit der Gruppe Heinemann, Kettenmann und Dirnagl durchgeführt. Von diesen werden die primären Zellkulturen und die "slice"- Kulturen bereitgestellt bzw. die etablierten Methoden zur Anzucht der Zellen übernommen.

3.5.4 Zeitplan

Da die wesentlichen Methoden, die in diesem Projekt verwendet werden, bereits im Labor etabliert sind, ist es möglich, direkt mit den Untersuchungen zu den einzelnen Fragestellungen zu beginnen. Die Untersuchungen zum Protein-Turnover und zu den funktionellen Parametern der Eisen-bindenden Proteine sollen im ersten Jahr der Laufzeit des Projektes im wesentlichen abgeschlossen sein. Parallel dazu soll mit den Untersuchungen zur Regulation der Neusynthese Eisen-bindender Proteine begonnen werden. Diese Untersuchungen werden in etwa das zweite Beantragungsjahr umfassen. Im weiteren, also im letzten Jahr der Projektbearbeitung, soll verstärkt an der Überführung der in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse auf Primärkulturen und auf "slice"-Kulturen gearbeitet werden. Davon wird erwartet, daß man mit ausgewählten Parametern ein relativ komplexes Bild über die pathophysiologischen Zusammenhänge erhält. Im dritten Antragsjahr bleibt so noch etwas Spielraum, um ungeklärte Teilfragen bzw. evtl. auch Fragen, die sich mit der Rolle anderer nichtneuronaler Zellen im Eisen-Stoffwechsel ergeben, zu bearbeiten.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Das vorliegende Projekt wird neu in den SFB eingefügt, steht aber trotzdem in engem Zusammenhang mit einer Reihe von Projekten des bereits existierenden SFB. Die zentrale Rolle des Eisens als Radikalbildner im vorgeschlagenen Projekt prädestiniert die Arbeitsgruppen Dirnagl (A1), Blasig (A2) und Heinemann (C3) für eine inhaltliche Zusammenarbeit. Mit der Arbeitsgruppe Blasig existiert bereits eine mehrjährige Zusammenarbeit zur radikalischen Schädigung von Zellen der Blut-Hirn-Schranke und zur Proteinoxidation. Es ist davon auszugehen, daß Eisen bei einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. bei der

"Spreading Depression" (Arbeitsgruppe Dirnagl, A1), der bakteriellen Meningitis (Arbeitsgruppe Einhäupl/Weber, A3) und ebenfalls in den von der Arbeitsgruppe Heinemann untersuchten Schadenskaskaden (C3, C4) eine mehr oder weniger zentrale Rolle spielt. Aufgrund dessen ergeben sich eine Reihe von Anknüpfungspunkten für gemeinsame Untersuchungen. Weiterhin kommt es zu Kooperationen mit den Arbeitsgruppen Dirnagl (A1), Heinemann (C3, C4), Kettenmann (B1) und Blasig (A2) hinsichtlich der zu nutzenden primären Zellkulturen. Es ist vorgesehen, die dort im SFB bereits etablierten Methoden der Zellisolierung und -kultivierung in unser Labor zu überführen bzw. innerhalb der genannten Arbeitsgruppen zu nutzen. Zusätzlich ist geplant, die Experimente unter Benutzung von "slice"-Kulturen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Heinemann (C3, C4) durchzuführen. Bei der Untersuchung von aktivierten Microglia kann ebenfalls auf die Erfahrung der Gruppe Heinemann (C3, C4) zurückgegriffen werden. Falls es sich erforderlich machen sollte, Experimente an Tieren durchzuführen, sind diese in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dirnagl (A1) geplant. Es ist wahrscheinlich, daß sich im Laufe der Bearbeitung des Projektes weitere Kooperationen mit anderen Gruppen des SFB, insbesondere auf methodischem Gebiet ergeben.

Eine Kooperation besteht mit der Arbeitsgruppe Kloetzel (Institut für Biochemie der Charité), der sich mit Problemen der Antigenpräsentation u.a. in der Microglia beschäftigt.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
 SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
 I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997 Verg.-Gr.	Anzahl	2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
		Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
		IIa/2	1	19800	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	19800
zusammen		zus.	1	19800	zus.	1	39600	zus.	1	39600	zus.	1	19800
	SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		14700			22000			22000			7300
		515		17825			-			-			-
		zusammen		32525	zusammen		22000	zusammen		22000	zusammen		7300
	I	Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		-			-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	Grune, Tilman Dr. med.	Biochemie	Klinik für Physikali- sche Medizin und Rehabilitation	15 h/Woche	-	C1-O
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Jakstadt, Manuela	MTA	Klinik für Physikali- sche Medizin und Rehabilitation	10 h/Woche	-	IVb
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	N.N.*	Dipl. Biochem. oder Humanmediziner	Klinik für Physikali- sche Medizin und Rehabilitation	40 h/Woche	-	IIa-O/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

1. Grune, Tilman, Dr. med.: Als Leiter der Forschungsabteilung der Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation wird sich Herr G. mit der Planung und Leitung der Versuche im Rahmen des Projektes befassen. Herr G. ist mit der organisatorischen und inhaltlichen Leitung des Forschungslabors der Klinik, der Durchführung von Seminaren und Vorlesungen im Fach Biochemie und der Ausbildung von Doktoranden betraut und in andere Projekte und klinische Untersuchungen eingebunden. Er beherrscht alle im Projekt vorgeschlagenen Techniken und kann diese inhaltlich betreuen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

2. Jakstadt, Manuela, MTA: Frau J. ist eine erfahrene MTA, die mit den grundsätzlichen Techniken der Zellkultur, der Elektrophorese und analytischer Arbeiten (photometrische, fluorometrische Meßverfahren, HPLC) vertraut ist. Da sie ebenfalls in anderen Projekten und in klinischen Untersuchungen eingesetzt ist, kann sie im Projekt etwa 10h/Woche eingesetzt werden.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1. N.N. (BAT Iia/2 Stelle für Diplom-Biochemiker, Diplom-Biologen oder Humanmediziner) Der Doktorand soll die Verfahren zur Messung der enzymatischen Aktivitäten, des Turnovers und die Quantifizierung der Eisen-bindenden Proteine durchführen. Die Messung der Aktivitäten und funktionellen Eigenschaften der intrazellulären Proteasen fällt ebenfalls in sein Aufgabengebiet, wie die Durchführung des ELISA zur Messung oxidiertes Proteine. Der mRNA-Gehalte Eisen-bindender Proteine soll ebenfalls durch diesen Doktoranden bestimmt werden.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

-

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

Versuchstiere (Ratten, Stück a 20,- DM)	500,- DM
<u>(Begründung:</u> Die Tiere werden bezogen und dann kurzzeitig im Tierstall der Charité gehalten. Die Tiere sind für die Isolation von Primärzellen und der "slice"- Kulturen vorgesehen.)	

Antikörper gegen Ferritin, Tf, TfR	2.500,- DM
<u>(Begründung:</u> Der Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern im Immunoblot und mit Hilfe von Immunopräzipitation ist eine der tragenden Methoden des Projektes.)	

Zellkultur	
- Verbrauchsmaterial	4.000,- DM
- Medien und Seren	2.500,- DM

(Begründung: Diese Materialien sind für die Durchführung der Zellkultur notwendig. Dabei ist davon auszugehen, daß für die Messung der enzymatischen Aktivitäten und des Proteinturnovers größere Mengen an BV-2, RAW264.1 und primären Zellen benötigt werden.)

Aktivierungsfaktoren 2.000,- DM
(Begründung: Diese Faktoren sind für die Aktivierung der Microglia in den Primärkulturen bzw. in den "slice"-Kulturen erforderlich.)

Radioaktive Substanzen und Szintillationsmessung 2.500,- DM
(Begründung: Die metabolische Markierung der Eisen-bindenden Proteine ist notwendig für die Messung ihres Umsatzes. Für diese Messungen ist sowohl [³⁵S]-Methionin als auch Szintillations-Vials und Szintillator notwendig.)

Elektrophorese- und PCR-Materialien 3.000,- DM
(Begründung: Diese Mittel werden benötigt, um die verschiedenen Elektrophorese-Techniken, also nichtdenaturierende und reduzierend-denaturierende Proteinelektrophorese, die Agarose-Gelelektrophorese, sowie die zugehörigen Blot-Verfahren, also Western- und Northern-Blots, durchzuführen. Diese werden durch die RT-PCR ergänzt. Die verschiedenen Grundchemikalien, Enzyme, Detektionskits und Sonden sollen durch diese Mittel beschafft werden.)

Grundbedarf
 - Chemikalien 2.000,- DM
 - Labormaterial 3.000,- DM

(Begründung: Diese Materialien werden benötigt, um die enzymatischen Bestimmungen, die Eisen-Messungen sowie den ELISA durchzuführen. Des weiteren sind die Chemikalien des Grundbedarfs, wie Salze, Säuren, Laugen und Lösungsmittel, sowie Hilfsenzyme und Kofaktoren in dieser Summe enthalten. Die erforderlichen Labormaterialien bestehen aus den üblichen Glasgeräten, und Einweg-Material.)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	1.000,- DM	2.000,- DM	2.000,- DM	1.000,- DM
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	32525,- DM	22.000,- DM	22.000,- DM	7.300,- DM

Anschaffung von Kleingeräten:

2. Hj. 1998

Benchmark Microplate Reader (Bio-Rad)	15.500,00 DM
zzgl. 15% MWSt.	2.325,00 DM
Summe:	17.825,00 DM

Begründung: Dieses Gerät ist für eine Vielzahl von Untersuchungen im Rahmen des Projektes notwendig. Dies beinhaltet die fast täglich notwendigen Proteinbestimmungen und die Quantifizierungen mit ELISA-Techniken. Durch die Adaptation der Messungen der Aktivitäten

von Enzymen und der Quantifizierung von Eisen auf Mikrotiterplatten ist es möglich, große Mengen an Chemikalien zu sparen. Durch die eingebaute Thermostat-Funktion ist mit diesem Gerät die Messung von Enzymkinetiken möglich. Aufgrund der kleinen Volumina, die bei der Messung in Mikrotiterplatten benötigt werden, ist es möglich, die Menge der eingesetzten Zellen stark einzuschränken. Dies macht eine Messung von Enzymaktivitäten in primären Zellkulturen überhaupt erst mit einem vertretbaren Aufwand möglich.

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

PROJEKTBEREICH B
Entzündung und Tumoren
(Projektbereichsleiter: Prof.Dr.H.Kettenmann)

- B 1** Physiologische Eigenschaften glialer Tumore
Kettenmann

- B 2** Intrazelluläre Signalverarbeitung bei mikroglialer Aktivierung: Beteiligung von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen der JAK/STAT und ERK/MAPK Kaskaden
Hanisch

- B 5** In vivo MR-Bildgebung der aktivierten Mikroglia
Zimmer

- B 6** Gliaktivierung - Ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis
Weber/Einhäupl

- B 7** Signalkaskade der Differenzierung und Aktivierung monozytärer Zellen unter dem Einfluß von Astrozyten
Hass

- B 8** Schmerz inhibition durch Migration Opioid-enthaltender Immunzellen in entzündetes Gewebe
Stein / Welte

3.0 Zusammenfassende Darstellung des Projektbereiches B

Der Projektbereich B setzt sich aus zwei Schwerpunkten zusammen, Untersuchungen zu Eigenschaften und Beeinflussung von Gliomen und zum anderen die Beteiligung nichtneuronaler Zellen bei entzündlichen Prozessen im Nervensystem. Im Projektbereich B1 werden zelluläre Eigenschaften von Gliomzellen charakterisiert. Es geht um die Frage, inwieweit die verschiedenen Gliome - Glioblastome, Oligodendrogliome und Astrozytome - Ähnlichkeiten mit normalen Gliazellen, Astrozyten, Oligodendrozyten oder glialen Vorläufern aufweisen. Zum anderen sucht die Arbeitsgruppe nach Möglichkeiten, die Proliferation und Migration dieser Zellen zu beeinflussen. Einer der Stärken des Ansatzes ist es, daß die Experimente an akut isolierten, menschlichem Material nach Tumoroperation ausgeführt werden. Dies ist ein Fortschritt im Vergleich zu früheren Untersuchungen, die bisher entweder Eigenschaften der Tumore im Tiermodell oder in der Zellkultur charakterisiert haben. Wie aus dem Arbeitsbericht ersichtlich konnte gezeigt werden, daß viele der Tumorzellen neuronale Eigenschaften besitzen. Basierend auf diesen Daten soll in der nächsten Antragsperiode zusätzlich ein Tiermodell entwickelt werden, das die Eigenschaften der menschlichen Gliomzellen widerspiegelt. Diese Erweiterung hat zum Ziel, in der Randzone die infiltrierenden Zellen zu charakte-

Projektbereich B

risieren. Dies ist leider mit dem sehr unregelmäßig anfallenden Tumormaterial nicht möglich. Hier ergibt sich direkt eine Verbindung zu dem Projekt B5, in dem in einem Tiermodell mit bildgebenden Verfahren (MRT) die Grenzen eines Tumors genau beschrieben werden. Soll der Hirntumor stark infiltrierend wachsen, ist die Grenze eines Tumors morphologisch schwer definierbar. Die zu Grunde liegende Idee dieses Projektes besteht darin, aktivierte Mikroglia als ein Marker für den Schädigungsbereich heranzuziehen. In Vorversuchen soll untersucht werden, welche Zellen preferentiell paramagnetische Partikel aufnehmen. Da Mikroglia die am stärksten phagozytotisch aktiven Zellen des Zentralnervensystems sind, ist die Aufnahme durch diese Zellen höchst wahrscheinlich. Es besteht somit die Möglichkeit, die Grenzen eines Tumors neu zu definieren. In Interaktion mit der Gruppe Kettenmann (B1) können die MRT-Daten auf zellulärer Ebene (Hirnschnitte) überprüft werden. Bei der Untersuchung der Mikroglia ergibt sich direkt eine Brücke zu den weiteren Projekten innerhalb des Projektes B. Im Projekt B2 sollen die Signalkaskaden aufgeklärt werden, die die Aktivierung der Mikroglia kontrollieren. Insbesondere sollen die beteiligten Kinasen und Phosphatasen der JAK/STAT und ERK/MAPK-Kaskaden untersucht werden. Mikrogliazellen könnte durch verschiedene Stimuli aktiviert werden (Exposition von bakteriellen Erregern, Kontakt mit Tumorzellen,) und die Gruppe B2 plant in der Hauptsache mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden die Signalwege der Aktivierung zu charakterisieren. Es besteht auch die interessante Möglichkeit, daß die Konfrontation mit unterschiedlichen Stimuli nicht nur einen einzigen definierten Signalweg bei der Mikroglia einschaltet, sondern daß verschiedene Kaskaden je nach Stimulus bzw. Krankheitstyp unterschiedlich eingeschaltet werden. Da es eine ganze Reihe ausgewählter Inhibitoren mit hoher Spezifität für die oben erwähnten Signalwege gibt, besteht hier die Möglichkeit, in den Aktivierungsprozess einzugreifen. Diese Untersuchungen werden wiederum Bedeutung für viele andere Projekte haben, da solche Inhibitoren dann auch in Tumormodellen oder in Modellen von Meningitis untersucht werden können. Das Projekt B7 dehnt die Untersuchung von Mikrogliazellen (Hirnmakrophagen) auf Monozyten generell aus. Dabei fiel auf - wie bei fast allen Schädigungen des Zentralnervensystems - daß die Blut-Hirn-Schranke sich kurzfristig öffnet, und so können Monozyten aus dem Blutsystem in das Gehirnparenchym einwandern. Dort können sie mit andern intrinsischen Zellen des ZNS interagieren. Das Projektteam B7 konzentriert sich auf die Interaktion von Monozyten und Astrozyten. Zum einen stellt sich die Frage, über welche Signalwege Monozyten und Astrozyten miteinander kommunizieren. Hier könnten Integrine eine wichtige Rolle spielen. Desweiteren ist natürlich wichtig, wie eine Aktivierung im Zellinnern umgesetzt wird - ähnlich wie beim Projekt B2. Hier sollen im Projekt B7 Kinasen und Isoenzyme der Proteinkinase C sowie die Expression von Transkriptionsfaktoren im Vordergrund stehen. Ein weiteres wichtiges funktionelles System für eine mögliche Interaktion von Astrozyten und Monozyten ist die Sekretion von Zytokinen und die Expression der entsprechenden Rezeptoren auf diesen Zellen. Das Projekt B6 bringt eine wichtige Fragestellung für die akute Interaktion von Hirnzellen und Zellen aus dem Blutsystem ein. Bakterielle Meningitis ist auch heute noch ein bedeutendes klinisches Problem. In dem Projekt stehen sowohl ein Tiermodell als auch gerade in Interaktion mit der Gruppe B2 *in vitro* Methoden zur Verfügung. Ein wichtiger erster Kontaktpunkt sind die Endothelzellen. Eine bakterielle Meningitis geht immer mit einem Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke einher. Hier sind die Interaktionen von Leukozyten und Endothelzellen zentrale Forschungsschwerpunkte. Hier sind wiederum Zytokine (TNF und IL-6) wichtige Signalsubstanzen und Rezeptorsysteme, die eine Interaktion zwischen den immunkompetenten Zellen des ZNS vermitteln. Der Bereich B hat damit zwei komplementäre Ansätze, nämlich die Untersuchungen am Tiermodellen für die beiden Krankheiten Meningitis und Tumore und die Studien in den Zellkulturmodellen, die sich mehr auf die zu Grunde liegenden Signalkaskaden nach Aktivierungsprozessen konzentrieren. Die beiden Krankheitsbilder haben auf zellulärer Ebene Gemeinsamkeiten wie z. B.

Projektbereich B

die Infiltration von fremden Zellen ins Hirnparenchym, zum einen als Tumorzellen und zum anderen, im Fall der bakteriellen Meningitis, die Einwanderung von Zellen aus dem Blutssystem. Mikrogliazellen könnten dabei eine wichtige Rolle für die Interaktion dieser infiltrierenden Zellen mit den intrinsischen Hirnparenchymzellen spielen.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B1

3.1.1 Thema:

Physiologische Eigenschaften glialer Tumore

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Zelluläre Neurowissenschaften

3.1.3 Leiter/in:

Prof. Dr. Helmut Kettenmann, geb. 12. Januar 1955

Max-Delbrueck-Centrum

Robert-Roessle-Str. 10

13122 Berlin

Tel.+49 30 94 06 33 25

FAX +49 30 94 06 38 19

email: hk@nero.glia.mdc-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

(X) nein () ja, befristet bis zum :

3.1.4 Das Projekt wird derzeit in keinem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen (x) ja () nein
- klinische Studien im Bereich der
 somatischen Zell- oder Gentherapie () ja () nein
- Tierversuche (x) ja () nein
- gentechnologische Versuche () ja () nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Bewilligte BAT Iia und BAT Iia/2 Stelle werden erneut beantragt.

Haushaltsjahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
bis 1995	57.9	14.9		72.8
1996	121.9	29.8		145.6
1997	121.9	29.8		145.6
1. Hj. 1998	62.4	14.9		72.8
Zwischensumme	364.1	89.4		436.8
2. Hj. 1998	62.4	15.6		78.0
1999	124.8	31.3		156.1
2000	124.8	31.3		156.1
1. Hj. 2001	62.4	15.6		78.0

3.2 Zusammenfassung

In diesem Projekt werden Zellen von humanen Gliomen physiologisch mittels der Patch-clamp-Technik und Imaging-Methoden untersucht. Durch den methodisch neuen Ansatz, diese Messungen auch an akuten Schnitten des Gliomgewebes durchzuführen, können wir physiologische Eigenschaften von Gliomen unterschiedlichen Subtyps und Malignitätsgrades *in situ* mit charakteristischen Merkmalen normaler Glia vergleichen. Die Kultivierung eines anderen Teils des Gewebes ermöglicht es uns, mit Hilfe von Proliferationsmessungen einen Zusammenhang zwischen den gefundenen Membraneigenschaften und der Proliferation der Tumorzellen herzustellen. In einem neuen Ansatz versuchen wir ein Tiermodell zu etablieren, das die Eigenschaften der humanen Gliazellen widerspiegelt.

Ziele des Projektes:

- 1) die physiologische Charakterisierung der Gliatumorzellen über die Identifizierung ihrer Ionenkanäle, speziell des Kaliumkanalexpressionsmusters und die Untersuchung des Einflusses der Aktivität dieser Kanäle auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen;
- 2) die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der funktionellen Expression von GABA_A-Rezeptoren und der Proliferation von Gliomzellen, um Aufschluß über den von uns bereits ermittelten Zusammenhang zwischen der Malignität der Tumoren und der Expression von GABA_A-Rezeptoren in ihren Zellen zu gewinnen;
- 3) die Untersuchung des Expressionsmusters von Neurotransmitter- und anderen Neuroligandenrezeptoren in Gliomzellen, sein Vergleich mit dem in normalen Gliazellen gefundenen, die Ermittlung charakteristischer Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorsubtypen und Malignitätsgraden sowie Messungen der Auswirkung der Aktivität dieser Rezeptoren auf die Proliferation der Tumorzellen.

4) Es ist vorgesehen, diese Experimente auch auf ein Tiermodell auszudehnen, um eine größere Reproduzierbarkeit der Befunde zu gewährleisten, um gesundes Hirngewebe für Kontrollversuche zur Verfügung zu haben und um gezielt in bestimmten Regionen des Tumors, besonders seiner Randzone, Experimente durchführen zu können. Um das bestmögliche Modell zu finden, werden wir Versuche zur Bewertung verschiedener Tiermodelle hinsichtlich der Übertragbarkeit der Befunde von humanen Gliomen durchführen.

3.3 Stand der Forschung

Im Arbeitsbericht wird schon einleitend auf die Fragestellungen eingegangen, die Grundlage des ersten Antrages sind. Im nachfolgenden führen wir nur die Probleme ein, die neu in den Antrag eingebracht werden.

Bedeutung von K^+ -Kanälen und Membranpotential für Wachstum und Malignität von Zellen: Die ersten Befunde über den Zusammenhang zwischen der Ausstattung von Zellen mit Kaliumkanälen und ihrer Proliferation stammen von Untersuchungen an T-Lymphocyten. Es wurde festgestellt, daß in der G1-Phase des Zellzyklus die Anzahl von K^+ -Kanälen zunimmt. Wurden diese K^+ -Kanäle spezifisch gehemmt, fand keine DNA-Synthese mehr statt (1). Ähnliches wurde auch über braune Fettzellen berichtet (14). Für uns sind in diesem Zusammenhang jedoch vor allem Zellen aus dem Nervensystem interessant. Schwann-Zellen, die mit mitogen wirkenden Substanzen behandelt werden, zeigen ein erhöhte Amplitude des auswärts rektifizierenden Kaliumstroms, die mit der Beschleunigung der Zellteilung parallel einhergeht. Blockierung der Kaliumkanäle führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Proliferationsrate (20). Auch in Kulturen von Astrozyten aus dem Rattenrückenmark ist die Zellteilungsrate signifikant niedriger in Gegenwart spezifischer Kaliumkanalblocker (13). Die antiproliferative Wirkung der Aktivierung des Glutamatrezeptors in O-2A-Zellen wird auf den Anstieg der intrazellulären Natrium-Konzentration und die darauf folgende Blockierung des auswärts rektifizierenden Kaliumstroms zurückgeführt (7). Die Kaliumleitfähigkeit der Membran beeinflußt jedoch nicht nur die Zellteilung, sondern auch die Differenzierung von Vorläuferzellen. So wurde, ebenfalls an O-2A - Zellen, gefunden, daß Glutamat ihre Differenzierung zu Oligodendrozyten durch Modulation der Kaliumkanalaktivität reguliert (4). Dieser Zusammenhang scheint eine Rolle bei pathologischen Vorgängen im ZNS zu spielen. In einem Modell zur reaktiven Gliosis nach mechanischer Verletzung zeigten teilungsaktive Astrozyten im Vergleich zu sich nicht teilenden nur ein Drittel des einwärts rektifizierenden Kaliumstroms, aber einen doppelt so hohen auswärts rektifizierenden Kaliumstrom (9).

Tumorzellen weisen oft eine erhöhte Leitfähigkeit der Membran für Kalium im Vergleich zu normalen Zellen auf ((16) und (5)) - ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Transformation, verstärktem Wachstum und Kaliumkanalexpression. So konnte an Zellen des menschlichen Mammakarzinoms ((17) und (22)) und der Melanomzelllinie IGR 1 (11) gezeigt werden, daß die Aktivierung von Kaliumkanälen notwendig ist, um von der G_0/G_1 - zur S-Phase des Zellzyklus übergehen zu können. In den Zellen verschiedener Zelllinien wurde eine Korrelation zwischen Blockierung von Kaliumkanälen und Proliferationshemmung gefunden ((12), (18), (8) und (2)). Auch die Differenzierung von O-2A-Vorläuferzellen geht mit einer Änderung der Kaliumkanalausstattung einher (12).

Bisher gibt es keine übereinstimmenden Befunde darüber, ob ein spezifischer Kaliumkanal verantwortlich ist für die Regulation der Proliferation und welcher das sein könnte. Es deutet jedoch mehr darauf hin, daß spannungsaktivierte Kaliumkanäle und nicht Ca-aktivierte Kaliumkanäle eine Rolle dabei spielen ((14) und (2)). Auch ATP-sensitive Kaliumkanäle werden als Kandidaten dafür in Betracht gezogen (17).

Nicht nur der konkrete Kaliumkanal, dessen Aktivierung Voraussetzung für die DNA-Replikation ist, sondern auch der Mechanismus, über den eine Verbindung zwischen Kaliumleitfähigkeit und Zellteilung hergestellt wird, sind unbekannt. Hypothetisch wurden eine Änderung des intrazellulären pH-Werts (13), der intrazellulären Kalziumkonzentration (11) oder des Membranpotentials, die durch eine Änderung der Kaliumleitfähigkeit verursacht werden, als Auslöser für eine Änderung der Proliferationsrate in Erwägung gezogen (21),(8). Der Einfluß der Kaliumkanalexpression auf die Proliferationsrate wurde bisher nicht an primärem humanem Material untersucht, weder *in vitro* noch *in situ*.

Literatur

1. S. Amigorena, D. Choquet, J. D. Teillaut, H. Korn, W. H. Fridman, *J. Immunol.* 144, 2038 (1990).
2. L. S. Chin et al. , *J. Neurosci. Res.* 48, 122 (1997).
3. J. Feindt, R. Mentlein, B. Krisch, *Brain Res.* 746, 309 (1997).
4. V. Gallo et al. , *J. Neurosci.* 16, 2659 (1996).
5. Y. Huang, S. G. Rane, *J. Physiol. (Lond.)* 461, 601 (1993).
6. R. Kaufmann, P. Henklein, G. Nowak, *Neuropeptides* 29, 241 (1995).
7. P. Knutson, C. A. Ghiani, J. M. Zhou, V. Gallo, C. J. McBain, *J. Neurosci.* 17, 2669 (1997).
8. A. Lepple-Wienhues et al. , *J. Membr. Biol.* 151, 149 (1996).
9. S. N. MacFarlane, H. Sontheimer, *J. Neurosci.* 17, 7316 (1997).
10. A. Merzak, S. Koochekpour, M. P. Fillion, G. Fillion, G. J. Pilkington, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 41, 1 (1996).
11. B. Nilius, W. Wohlrab, *J. Physiol. (Lond.)* 445, 537 (1992).
12. J. J. Pancrazio, I. A. Tabbara, Y. I. Kim, *Anticancer Res.* 13, 1231 (1993).
13. C. A. Pappas, N. Ullrich, H. Sontheimer, *NeuroReport* 6, 193 (1994).
14. P. A. Pappone, S. I. Ortiz-Miranda, *Am. J. Physiol.* 264, C1014 (1993).
15. J. Pinski, A. V. Schally, G. Halmos, K. Szepeshazi, K. Groot, *Cancer Res.* 54, 5895 (1994).
16. S. G. Rane, *Am. J. Physiol.* 260, C 104 (1991).
17. J. S. Strobl, W. F. Wonderlin, D. C. Flynn, *Gen. Pharmacol.* 26, 1643 (1995).
18. H. Ulrich, A. Tárnok, H. C. Schaller, *J. Physiology (Paris)* 90, 85 (1996).
19. L. T. Van der Ven et al. , *Br. J. Cancer* 68, 475 (1993).
20. G. F. Wilson, S. Y. Chiu, *J. Physiol. (Lond.)* 470, 501 (1993).
21. W. F. Wonderlin, K. A. Woodfork, J. S. Strobl, *J. Cel. Physiology* 165, 177 (1995).
22. K. A. Woodfork, W. F. Wonderlin, V. A. Peterson, J. S. Strobl, *J. Cell. Physiol.* 162, 163 (1995).

3.4. Eigene Vorarbeiten

siehe Arbeitsbericht

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

- Labrakakis, C., S. Patt, J. Hartmann and H. Kettenmann (1997) Glutamate acts as an excitatory neurotransmitter in glioma cells, *Eur. J. Neurosci.*, im Druck.
- Labrakakis, C., S. Patt, P. Weydt, J. Cervós-Navarro, R. Meyer and H. Kettenmann (1997) Action potential generating cells in human glioblastoma, *J Neuropathol. Exp. Neurol.*, 56:243-254.
- Labrakakis, C., S. Patt, P. Weydt, J. Hartmann and H. Kettenmann (1997) Functional GABA_A receptors on glioma cells, *Eur. J. Neurosci.*, im Druck.
- Patt, S., C. Labrakakis, M. Bernstein, P. Weydt, J. Cervós-Navarro, G. Nisch, and H. Kettenmann (1996) Neuron-like properties of human neoplastic oligodendroglial cells, *Neurosci.*, 71:601-611.
- Patt, S., H. Schmidt, C. Labrakakis, P. Weydt, G. Nisch and H. Kettenmann (1996) Human central neurocytoma cells show neuronal physiological properties in vitro, *Acta Neuropath.*, 91:209-214.
- Patt, S., Labrakakis, C., Weydt, P. and H. Kettenmann (1995) The physiological approach to neurooncology, *J. Neuropathol. Exp. Neurology*, Suppl. 42-43.
- Weydt, P., T. Möller, S. Patt, C. Labrakakis and H. Kettenmann (1997) Neuroligand-triggered calcium signalling in cultured human glioma cells, *Neurosci. Lett.*, 228:91-94.

Publikationen, die aus der Interaktion im SFB entstanden sind:

- Hanisch, U. - K., J. Neuhaus, R. Quirion, and H. Kettenmann (1996) Neurotoxicity induced by interleukin-2: Involvement of infiltrating immune cells, *Synapse*, 24:104-114.
- Hanisch, U.-K., S. Lyons, C. Nolte, M. Prinz, J. R. Weber, H. Kettenmann and F. Kirchhoff (1997) Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to janus kinase activity, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- Hanisch, UK., J. Neuhaus, W. Rowe, D. van Rossum, T. Möller, H. Kettenmann and R. Quirion (1997) Neurotoxic consequences of central long-term administration of interleukin-2 in rats, *Neurosci.*, 79:799-818.
- Möller, T., O. Kann, M. Prinz, F. Kirchhoff, A. Verkhratsky and H. Kettenmann (1997) Endothelin induced calcium signalling in cultured mouse microglial cells is mediated through ET_B receptors, *Neuroreport* 8: 2127-2131.
- Tuschik, S., S. Kirischuk, F. Kirchhoff, L. Liffield, M. Paul, A. Verkhratsky and H. Kettenmann (1997) Bergmann glial cells in situ express ET_B endothelin receptors linked to cytoplasmic calcium signals, *Cell Calcium*, 21:409-419.

Weitere Publikationen mit Bezug auf das Antragsthema:

- Bernstein, M., S. A. Lyons, T. Möller and H. Kettenmann (1996) Receptor-mediated Ca^{2+} signalling in glial cells from the corpus callosum, *J. Neurosci. Res.*, 46:152-163.
- Blankenfeld, G. v., J. Turner, G. Bodewitz, G. Ahnert-Hilger, M. John, M. O. K. Enkvist, F. Stephenson, H. Kettenmann and B. Wiedenmann (1995) Expression of functional GABA_A -receptors in neuroendocrine gastropancreatic cells, *Pflügers Arch.*, 430:381-388.
- Borges, K. and H. Kettenmann (1995) The blockade of K^+ channels induced by kainate/AMPA receptor activation in mouse oligodendrocyte precursor cells is mediated by Na^+ entry through the receptor pore, *J. Neurosci. Res.*, 42:579-593.
- Borges, K., G. Wolswijk, C. Ohlemeyer and H. Kettenmann (1995) Adult rat optic nerve oligodendrocyte progenitor cells express a repertoire of voltage- and ligand-gated ion channels that is distinct from their perinatal counterparts, *J. Neurosci. Res.*, 40:591-605.
- Brockhaus, H., T. Möller and H. Kettenmann (1996) Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia*, 16:81-90.
- Chvátal, A., A. Pastor, M. Mauch, E. Syková and H. Kettenmann (1995) Distinct Populations of Identified Glial Cells in the Developing Rat Spinal Cord Slice: Ion Channel Properties and Cell Morphology, *Eur. J. Neurosci.*, 7:129-142.
- Chvatal, A., T. Berger, I. Vorisek, R. K. Orkand, H. Kettenmann and E. Sykova (1997) Changes in glial K^+ currents with decreased extracellular volume in developing rat white matter, *J. Neurosci. Res.*, 49:98-106.
- Fraser, D. D., S. Duffy, K. J. Angelidis, H. Kettenmann, and B. A. MacVicar (1995) GABA /Benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes, *J. Neurosci.*, 15:2720-2732.
- Haas, S., J. Brockhaus, A. Verkhratsky and H. Kettenmann (1996) ATP-induced membrane currents in ameboid microglia acutely isolated from mouse brain slices, *Neurosci.*, 75:257-261.
- Ilschner, S., C. Nolte and H. Kettenmann (1996) Complement factor C5a and epidermal growth factor trigger the activation of outward potassium currents in cultured murine microglia, *Neurosci.*, 73:1109-1120.
- Ilschner, S., C. Ohlemeyer, G. Gimbl and H. Kettenmann (1995) Modulation of K^+ currents in cultured murine microglial cells by ions, second messengers and receptor activation, *Neuroscience*, 66:983-1000.
- Kettenmann, H. (1996) Beyond the neuronal circuitry, *Trends Neurosci.*, 19: 305-306.
- Kettenmann, H. (1997) Alexander von Humboldt and the concept of animal electricity, *Trends Neurosci.*, 20:239-242.
- Kirchhoff, F., C. Mülhardt, A. Pastor, C.-M. Becker and H. Kettenmann (1996) Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord, *J. Neurochem.*, 66:1383-90.
- Kirchhoff, F., C. Ohlemeyer and H. Kettenmann (1997) Expression of MAG transcripts in murine oligodendrocytes, *Neurosci.*, im Druck.

- Kirischuk, S., H. Kettenmann and A. Verkhratsky (1997) Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity strongly modulates kainate triggered Ca²⁺ signalling in Bergmann glial cells, *FASEB J.*, 568: 566-572.
- Kirischuk, S., J. Neuhaus, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1995) Preferential localization of active mitochondria in process tips of immature retinal oligodendrocytes, *Neuroreport*, 6: 737-741.
- Kirischuk, S., J. Scherer, T. Möller, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1995) Subcellular heterogeneity of voltage-gated calcium channels in cells of the oligodendrocyte lineage, *Glia*, 13:1-12.
- Kirischuk, S., S. Tuschick, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1996) Calcium signalling in mouse Bergmann glial cells mediated by α_1 -adrenoreceptors and H₁ histamine receptors, *Eur. J. Neurosci.* 8:1198-1208.
- Kirischuk, S., Scherer, J., Kettenmann, H. and A. Verkhratsky (1995) Activation of P₂-Purinoreceptors triggered Ca²⁺ release from InsP₃-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes, *J. Physiol.* 483.1:41-57
- Kirischuk, S., T. Möller, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1995) ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells, *J. Neurosci.* 15:7861-7871.
- Labrakakis, C., T. Müller and H. Kettenmann (1997) GABA_A receptor activation triggers a Cl⁻ conductance increase and a K⁺ channel blockade in cerebellar granule cells, *Neurosci.*, 79:177-189.
- Möller, T., C. Nolte, R. Burger, A. Verkhratsky and H. Kettenmann (1997) Mechanisms of C5a and C3a complement fragments induced [Ca²⁺]_i signalling in microglia: intracellular Ca²⁺ release and capacitative Ca²⁺ entry, *J. Neurosci.*, 17:615-624.
- Müller, T., T. Möller, J. Neuhaus and H. Kettenmann (1996) Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation, *Glia*, 17:274-284.
- Nolte, C., F. Kirchhoff and H. Kettenmann (1997) Epidermal growth factor is a motility factor for microglial cells *in vitro*: evidence for EGF receptor expression, *Eur. J. Neurosci.*, im Druck.
- Nolte, C., T. Möller, T. Walter and H. Kettenmann (1996) Complement 5a controls motility of murine microglial cells *in vitro* via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton, *Neurosci.*, 73:1091-1107.
- Oland L. A., T. Müller, H. Kettenmann and J. Hayashi (1996) Preparation of primary cultures and acute slices of the nervous system of the moth *Manduca sexta*, *J. Neurosc. Methods* 69:103-112.
- Pastor, A., A. Chvatal, E. Sykova, and H. Kettenmann (1995) Glycine- and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord., *Eur. J. Neurosci.*, 7:1188-1198.
- Rufer, M., S. B. Wirth, A. Hofer, R. Dermietzel, A. Pastor, H. Kettenmann and K. Unsicker (1996) Regulation of connexin-43, GFAP, and FGF-2 is not accompanied by changes in astroglial coupling in MPTP-lesioned, FGF-2-treated Parkinsonian mice, *J. Neurosci. Res.*, 46:606-617.

- Schmidt, C., C. Ohlemeyer, C. Labrakakis, T. Walter, H. Kettenmann and J. Schnitzer (1997) Analysis of motile oligodendrocyte precursor cells in vitro and in brain slices, *Glia*, 20: 284-298.
- Verkhatsky A., and H. Kettenmann (1996) Calcium signalling in glial cells, *Trends Neurosci.*, 346-351.
- Verkhatsky, A., R. K. Orkand and H. Kettenmann (1997) Glial Ca^{2+} : homeostasis and signalling function, *Physiol. Rev.*, im Druck.
- Zahn, J. v., Möller, T. , Kettenmann H.. and Nolte, C.(1997) Microglial phagocytosis is modulated by pro- and anti-inflammatory cytokines, *NeuroReport* 8: 3851-3856.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Das Ziel dieses Antrages besteht darin, (1) die physiologischen Eigenschaften von Gliomzellen zu charakterisieren, (2) diese durch externe Faktoren wie z. B. Neurotransmitter oder -hormone zu modulieren und (3) damit die proliferativen und migratorischen Eigenschaften der Tumorzellen zu beeinflussen. Einige der Ziele ergeben sich direkt aus den Arbeiten der letzten Antragsperiode:

1. Die Expression von GABA Rezeptoren und der Zusammenhang zu Proliferationsaktivität

Unsere Arbeiten haben gezeigt, daß es einen klaren Zusammenhang gibt zwischen der Malignität des Tumors und der Expression von $GABA_A$ -Rezeptoren gibt. Wir wollen nun herausfinden, ob dieser Zusammenhang kausal oder nur zufällig ist. Dazu eignet sich eine Herangehensweise von zwei Seiten. Zum einen wollen wir untersuchen, wie sich die Aktivierung bzw. Blockierung des Rezeptors auf das Wachstum von Tumorzellen auswirkt, die den Rezeptor funktionell exprimieren, zum anderen wollen wir testen, welche Auswirkung eine Transfektion des Rezeptors auf die Proliferation von Zelllinien hat, die den Rezeptor normalerweise nicht (mehr) exprimieren. Darüber hinaus wollen wir eine immunhistochemische Färbung der $GABA_A$ -Rezeptoren etablieren, die möglicherweise Anwendung in der klinischen Praxis zu differentialdiagnostischen Zwecken bekommen kann.

2. Neurotransmitter- und Hormonrezeptoren bei Gliomzellen in situ

Studien an Gliom-Zellkulturlinien deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression bzw. -stimulation und Proliferation der Gliomzellen hin. So scheinen insbesondere Cholezystokinin (6), Serotonin (10), Somatostatin ((15) und (3)) und Histamin (19) einen signifikanten Einfluß auf die Proliferation der Gliomzellenlinien zu haben bzw. scheint ein Zusammenhang zwischen Expression der entsprechenden Rezeptoren und dem Grad der Malignität der Gliome zu bestehen. Unsere eigenen Ergebnisse zeigen auf, daß Ziellinien abstammend von Gliomen kein gutes Modell für die zellulären Eigenschaften von Gliomzellen *in situ* sind. Aus diesem Grund haben wir vor, die Rezeptoren für Neurotransmitter und ande-

re Neuroliganden mittels Ca-Imaging und der Patch-clamp-Technik *in situ*, d.h. im akuten Gewebeschnitt zu charakterisieren. Wir wollen dabei zwischen den verschiedenen Tumoren differenzieren, wie niedergradiges Astrozytom oder Glioblastom. Das Spektrum der getesteten Substanzen soll alle Rezeptorsysteme umfassen, die bisher an normaler und neoplastischer Glia beschrieben sind. Somatostatin und Cholezystokinin ist daher von besonderem Interesse, da die Zellkulturdaten auf einen Zusammenhang zwischen Rezeptoraktivierung und Proliferation hindeuten.

3. Interaktion zwischen Rezeptoren, Kaliumkanälen bzw. Membranpotential und Proliferation

Dieser Antragsteil basiert auf zwei Befunden: (1) Zum einen wissen wir auf Grund unserer eigenen Daten, daß es einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von Kaliumkanälen bzw. der Höhe des Membranpotentials einerseits und der Proliferationsrate der Tumorzellen andererseits gibt. Zum anderen wissen wir, daß die Aktivierung von Transmitter- und Hormonrezeptoren bei Gliazellen die Aktivität von Kaliumkanälen beeinflusst.

Ziel der geplanten Untersuchungen soll sein, folgende Fragen zu beantworten: Welcher Zusammenhang existiert zwischen der Expression bestimmter Kaliumkanäle und der erhöhten Proliferationsrate in Tumorzellen? Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Malignität des Tumors und funktioneller Expression bestimmter Kaliumkanäle? Beeinflusst die Aktivierung von Transmitter- und Hormonrezeptoren die Aktivität von Kaliumkanälen? Können wir durch diese Interaktion zwischen Rezeptoraktivierung und Kaliumkanalaktivität die Proliferation beeinflussen?

In diesem Fortsetzungsantrag wollen wir auch neue Experimentansätze verfolgen.

4. Entwicklung und Validierung eines Tiermodells

Unsere bisherigen Untersuchungen haben sich auf menschliches Tumormaterial konzentriert. Dies scheint im ersten Moment natürlich den Tiermodellen überlegen zu sein, da wir mit den humanen Zellen bessere Aussagen über den Krankheitsverlauf beim Menschen machen können. Dem steht gegenüber, daß sich bei dieser Vorgehensweise dennoch einige Probleme auf-tun:

1. Die Versorgung mit Tumormaterial ist leider oft sehr sporadisch. Es gibt Zeiten, bei denen an den Universitätsklinken bzw. am Städtischen Klinikum Berlin-Buch über Zeiträume von weit länger als einer Woche keine Operation erfolgt, dann wiederum häufen sich OP-Termine, und wir können das Material nicht ausreichend verarbeiten. Zudem besteht eine große Variabilität der Tumore: Es kommen alle Arten der Gliome vor, es handelt sich um Erstoperationen und z.T. mehrfache Rezidive, das Alter der Patienten schwankt sehr stark, um nur einige Faktoren zu nennen. Aus diesem Grund ist unser Ausgangsmaterial auch sehr heterogen.

2. Wir wissen sehr wenig über eines der interessantesten Gebiete im Tumor, nämlich die Tumorrundzone, dem Gebiet, in dem sich der Tumor in das Nervensystem ausbreitet, das heißt dieses infiltrierte. Es ist unmöglich reproduzierbar, aus diesem Gebiet Operationsmaterial zu erhalten. Bezüglich dieses Areals ergeben sich jedoch sehr wichtige und interessante Fragen:

- Wie interagieren Tumorzellen mit Nervenzellen?
- Kann eine elektrisch erregbare Tumorzelle das neuronale Netzwerk aktivieren?
- Wirkt neuronale Aktivität zurück auf Tumorzellen?

Aus naheliegenden Gründen können wir nicht reproduzierbar Gewebe aus dem Randzonen-gebiet nach der OP erhalten. Wir wissen eigentlich nichts über die Lage der Tumorzellen bzw.

des Gewebestückes nach der OP. Mit anderen Worten: Wir können in diesem Falle nicht die Frage der Eigenschaften von Tumorzellen in der Tumorrandozone angehen.

3. Für Proliferationsstests sind wir auf die kultivierten Zellen angewiesen. Hier wäre es wünschenswert, auch die *in vitro* Daten vergleichend in einem Tiermodell zu untersuchen.

Aus diesen Überlegungen heraus ist es für uns ein wichtiges Vorhaben, neben der Vorgehensweise mit humanem Material parallel ein Tiermodell aufzubauen. Dies soll in keiner Weise den humanen Ansatz ersetzen, sondern als eine Ergänzung gesehen werden.

3.5.2 Methoden

Die in unserer Arbeitsgruppe verfügbaren Methoden (patch-clamp, Imaging von Kalzium- und anderen Ionen sowie des pH-Werts, Zellkultur, Immunhistochemie, Proliferationsmessungen u.a.) bieten sehr gute Voraussetzungen, um die oben formulierten Fragestellungen komplex und umfassend zu bearbeiten. Das Tiermodell soll in Interaktion mit Dr. Claus Zimmer (Charité) aufgebaut werden. Die molekularbiologische Expertise zur stabilen Transfektion der Tumorzellen ist durch die Interaktion mit Dr. Frank Kirchhoff gegeben.

3.5.3 Arbeitsprogramm

1. Die Expression von GABA Rezeptoren und der Zusammenhang zu Proliferationsaktivität

Wir haben vor, diese Fragestellung ausgehend von zwei komplementären Ansätzen aus zu bearbeiten. Zum einen werden wir Proliferationsassays mit GABA_A-Rezeptor-Agonisten und -antagonisten an Primärkulturen von Gliomen durchführen, an denen eine Expression des Rezeptors immunhistochemisch oder in Patch-clamp-Versuchen nachgewiesen wurde. Davon erwarten wir eine Antwort auf die Frage, wie sich die Aktivierung bzw. Inhibition auf die Proliferation GABA_A-rezeptorexprimierender Gliomzellen auswirkt. Zum anderen wollen wir Zelllinien, von denen wir bereits wissen, daß sie den Rezeptor nicht exprimieren, mit dem GABA_A-Rezeptor transfizieren, um untersuchen zu können, wie sich die resultierende Expression des Rezeptors und seine Aktivierung bzw. Hemmung auf das normalerweise unbegrenzte Wachstum der Zelllinien auswirken.

Desweiteren haben wir vor, die Hypothese zu prüfen, ob ein möglicher Effekt von GABA auf die Proliferation der Gliomzellen mit der Chloridkanalaktivität des Rezeptors zusammenhängt. Zu diesem Zweck werden wir die gleichen Wachstumsuntersuchungen auch an Zellen durchführen, die mit dem Glycinrezeptor transfiziert wurden. Dieser Rezeptor ist wie der GABA_A-Rezeptor mit einem Chloridkanal gekoppelt. Das molekularbiologische Know-how ist durch die Zusammenhang mit Dr. Frank Kirchhoff aus unserer Arbeitsgruppe gegeben.

In einem dritten Ansatz planen wir, die Rezeptoren *in situ* mit Antikörper nachzuweisen. Dies kann uns Informationen darüber geben, wie die GABA_A-Rezeptor-positiven Zellen innerhalb des Tumors verteilt sind. Falls dieses Verfahren routinemäßig einsetzbar wäre, könnte es zu einem diagnostischen Werkzeug entwickelt werden.

2. Neurotransmitter- und Hormonrezeptoren bei Gliomzellen *in situ*

Wie wir bereits nachweisen konnten, verändern sich Zellen humaner Gliome in Kultur sehr schnell. Aus diesem Grund haben wir vor, die Rezeptoren für Neurotransmitter und andere Neuroliganden mittels Ca-Imaging und der Patch-clamp-Technik *in situ*, d.h. im akuten Gewebeschnitt zu charakterisieren. Das Spektrum der getesteten Substanzen wird dabei erweitert, und zwar um Liganden der cholinergen Rezeptoren sowie Oxytocin, Vasopressin, Somatostatin und Cholezystokinin. Besonders Somatostatin und Cholezystokinin scheinen von Interesse in Gliomen zu sein (s.o.). Parallel dazu wollen wir alle Substanzen, deren spezifische Rezeptoren wir im Gliomgewebe nachweisen können, bezüglich ihres Einflusses auf das Wachstum der Gliomzellen in der Primärkultur untersuchen. Um sicherzugehen, daß die Rezeptoren tatsächlich auch in der Primärkultur noch funktionell exprimiert werden, werden wir auch diese in derselben Weise wie die Schnitte charakterisieren.

3. Interaktion zwischen Rezeptoren, Kaliumkanälen bzw. Membranpotential und Proliferation

Zunächst sind folgende Experimente geplant:

Zur Ermittlung einer möglichen Korrelation zwischen aktiver Zellteilung und Expression von Kaliumkanälen: Kultivierte Gliomzellen werden mit BrdU vorinkubiert. Danach werden elektrophysiologische Messungen zur Charakterisierung der Kaliumkanalausstattung der Zellen durchgeführt, während derer die untersuchten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow markiert werden. Anschließend erfolgt eine immunhistochemische Färbung der Zellen mit einem anti-BrdU-Antikörper. Die Zellen, von denen elektrophysiologische Befunde vorliegen, können unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer Färbung mit Lucifer Yellow identifiziert werden. Zellen, die sich während des Inkubationszeitraumes in der S-Phase des Zellzyklus befanden, weisen eine Färbung des Zellkerns mit dem an den anti-BrdU-Antikörper gekoppelten Farbstoff auf. Dadurch können teilungsaktive Zellen von ruhenden unterschieden werden und ihre Ausstattung mit Kanälen kann verglichen werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von Mitogenen auf die Expression von Kaliumkanälen: Dazu sind zwei Herangehensweisen denkbar. Zum einen können kultivierte Gliomzellen sowie Gliomzellen im Schnitt während elektrophysiologischer Untersuchungen in der whole-cell-Konfiguration mit Mitogenen (Serum, Wachstumsfaktoren, Rezeptorliganden usw.) perfundiert werden, um schnell auftretende Leitfähigkeitseffekte verfolgen zu können. Zum anderen ist es möglich, durch Inkubation der Zellen in der Kultur mit diesen Substanzen zu ermitteln, ob parallel zum Anstieg der in Proliferationsassays ermittelten Teilungsrates sich auch das Kaliumkanalexpressionsmuster ändert.

Zur Untersuchung der Rolle bestimmter Kaliumkanäle für Proliferation und Malignität: Dazu sind Proliferationsassays mit spezifischen Kaliumkanalblockern vorgesehen.

4. Entwicklung und Validierung eines Tiermodells

Validierung des Modells

Aus unseren vorangegangenen physiologischen Untersuchungen zu den drei Gliomen - Astrozytomen, Oligodendrogliomen und Glioblastomen - kennen wir sehr gut die physiologischen Eigenschaften dieser Tumorzellen. Wir suchen daher nach einem Tiermodell, das diese Eigenschaften widerspiegelt, mit andern Worten, einen Tumor, der im ZNS wächst und der Zellen enthält, die Aktionspotentiale generieren. Wir haben Kontakt mit Dr. Claus Zimmer der Abteilung Neuroradiologie der Charité aufgenommen, der ein Tumormodell an der Ratte

etabliert hat. An einem solchen Rattenmodell kann man natürlich akute Hirnschnitte anfertigen und Zellen sowohl im Zentrum des Tumors untersuchen als auch mit denen in der Randzone vergleichen. Wir können daher untersuchen, wie sich die Zellen in der Randzone im Vergleich zu denen im zentralen Bereich des Tumors verhalten.

Zur Generierung des ZNS-Tumors werden Zellen aus einer Tumorzelllinie ins Hirnparenchym injiziert. Diese Zellen entwickeln dann innerhalb von wenigen Tagen einen Tumor in der Größe von einigen Millimetern. Man kann sich nun die Frage stellen, welche Tumorzelllinie man idealerweise zur Injektion verwendet. Durch Vergleich der Tumore, die man nach Injektion verschiedener Tumorzelllinien erhält, können wir mit unseren physiologischen Methoden prüfen, welches Modell am besten die Eigenschaften des menschlichen Glioms widerspiegelt.

Markierung der Tumorzellen

Um die Tumorzellen eindeutig von dem intrinsischen Hirnparenchym zu unterscheiden und sie auch schon während eines physiologischen Experimentes zu erkennen, sollen die Tumorzellen zuvor mit dem Markerprotein GFP ("green fluorescence protein") transfiziert werden. Durch Kombination mit einem geeigneten Promotor exprimieren diese Zellen alle das fluoreszierende Protein. Wir können daher akut während der Hirnschnittuntersuchungen diese Zellen durch ihre Eigenfluoreszenz erkennen und sie gezielt mit unseren Einzelzellmethoden charakterisieren. Dadurch können wir auch die Frage angehen, wieweit die Tumorzellen in das Gehirnparenchym infiltrieren und umgekehrt, inwieweit Zellen des Empfängers in den Tumor einwandern. Wir stellen uns vor, daß insbesondere Mikroglia aus dem normalen Hirnparenchym in das Tumorgewebe einwandern könnte. Diese im Tumor nicht fluoreszenten Zellen können wir somit von den Tumorzellen unterscheiden.

Anwendung unserer Proliferationsdaten auf das Tiermodell

Derzeit screenen wir sehr intensiv Hirntumorzellen nach möglichen Rezeptorsystemen für Neurohormone und Neurotransmitter. Bekannt ist zum Beispiel, daß eine Gliomzelllinie Bradykinin-Rezeptoren exprimiert und daß die Aktivierung dieser Rezeptoren mit der proliferativen Aktivität interagiert. Wir erwarten, daß wir in der nächsten Zeit ausreichende Daten haben, um das Rezeptorrepertoire der verschiedenen Tumore zu kennen. Hier wiederum ist unsere besondere Stärke, daß wir diese Screens an akuten Hirnschnitten aus Patientenmaterial durchführen. Die Proliferationsmessungen müssen wir natürlich an den danach kultivierten Zellen durchführen. An dieser Stelle können wir das Tiermodell heranziehen, um mögliche Substanzen zu testen, die die Proliferation des Tumors beeinflussen.

Auch hinsichtlich der GABA_A-Rezeptorexpression und der Kontrolle des Tumorstwachstums denken wir an weiterführende Experimente am Tiermodell. Es gilt zum Beispiel herauszufinden, ob Zellen, die den Rezeptor in der Kultur eingebüßt haben, nach Transplantation unter den Bedingungen *in vivo* wieder zu einer Rezeptorexpression angeregt werden können. Außerdem wollen wir mit dem Rezeptor transfizierte Zelllinien transplantieren, um beobachten zu können, wie diese Zellen sich im Vergleich zu nicht-transfizierten verhalten.

3.5.4 Zeitplan

In der ersten Phase des Antrages konzentrieren wir uns auf die Weiterführung der schon begonnenen Experimente. Das umfaßt die Aktivität von Kanälen und den Einfluß auf das Proliferationsverhalten der Tumore, den Zusammenhang zwischen GABA-

Rezeptorexpression und Proliferation und der Untersuchung des Expressionsmusters von Neurotransmitterrezeptoren. Parallel dazu werden wir in Zusammenarbeit mit Dr. Zimmer, Charité, beginnen ein Tiermodell aufzubauen. Ein wichtiger Schritt ist die Validierung des Modells, das heißt, wir erwarten, daß die Zellen im Gewebe des Modells ähnliche Eigenschaften haben wie die humanen Gliazellen. Dazu könnte es notwendig sein, verschiedene Linien zu injizieren und deren Eigenschaften zu charakterisieren. Daher wird dieses Projekt am Anfang sehr langsam anlaufen, da wir immer jeweils die Ergebnisse eines Versuches abwarten müssen, um dann zur nächsten Variation des Tumormodells überzugehen.

3.5.5 Untersuchungen am Menschen

Bei dem Tumorgewebe handelt es sich um Material, das bei den neurochirurgischen Operationen ohnedies anfällt, das heißt es wird nicht eigens für die Untersuchungen entnommen. Einverständniserklärungen der Patienten sind daher nicht erforderlich. Im Rahmen der Vorarbeiten (vgl. 3.4.2 - 3.4.4) wurden jedoch der Absicherung wegen Stellungnahmen der zuständigen Ethik-Kommissionen eingeholt. Unsere Studien wurden sämtlich gebilligt.

3.5.6

Tierversuche werden am MDC beantragt und Genehmigungen dazu bei Arbeitsbeginn vorgelegt.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Unser Antrag ist im Bereich *Entzündungen und Tumore* angesiedelt. Innerhalb dieses Bereiches wird es sehr enge Interaktionen mit Herrn Zimmer, Charité, geben, mit dem wir schon eine Kollaboration verabredet haben. Unsere Publikationsliste zeigt auch auf, daß in letzter Zeit die Gruppen Kettenmann/Weber/Hanisch sehr eng interagiert haben. Erste gemeinsame Arbeiten sind publiziert und weitere in Vorbereitung. Mit der Arbeitsgruppe von Dr. Dirnagl haben wir gemeinsam die Reaktion von Mikrogliazellen in der MCAO-Ratte untersucht. Auch eine Arbeit dazu ist in Vorbereitung. In Zusammenarbeit mit Robert Nitsch haben wir das akute Verhalten von Mikrogliazellen nach enthogether Läsion charakterisiert. Auch hier sind Daten, die nach einigen weiteren Zusatzexperimenten für die Veröffentlichung geplant sind. Neben diesen sehr konkreten Interaktionen, die in gemeinsamen Publikationen resultieren, profitieren wir sehr von dem Umfeld des SFB, das uns die wichtige Interaktion mit klinischen Partnern eröffnet.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr. IIa	Anzahl 1	Verg.-Gr. IIa	Anzahl 1	Betrag in DM 42600	Verg.-Gr. IIa	Anzahl 1	Betrag in DM 85200	Verg.-Gr. IIa	Anzahl 1	Betrag in DM 85200	Verg.-Gr. IIa	Anzahl 1	Betrag in DM 42600
IIa/2	1	IIa/2	1	19800	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	39600	IIa/2	1	19800
zusammen		zus.	2	62400	zus.	2	124800	zus.	2	124800	zus.	2	62400
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		15650	522		31300	522		31300	522		15650
		zusammen		15650	zusammen		31300	zusammen		31300	zusammen		15650
I		Mittel für Investitionen insge- samt: keine			Mittel für Investitionen insge- samt: keine			Mittel für Investitionen insge- samt: keine			Mittel für Investitionen insge- samt: keine		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	1. Kettenmann, Hel- mut Prof. Dr.	Neurobiologie	MDC	8	7/95	C4
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	2. Kirchhoff, Frank Dr.	Neurobiologie	MDC	4		BAT IIa
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Horst Kagelmaker Brigitte Hunger Gerda Müller		MDC MDC MDC	5 3 15		BAT IVa BAT IVa BAT IVb
Ergänzungsausstattung	*Jana Hartmann, Dr. *Anke Witting	Neurobiologie Neurobiologie	MDC	40 20		BAT IIa BAT IIa/2
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Der Projektleiter wird sich wesentlich bei der Konzeption der Experimente, der Auswertung und bei der Zusammenfassung der Ergebnisse zu Publikationen einbringen. Wichtig ist in diesem Projekt auch, die vielfältigen Interaktionen mit den Klinikern (Bereitstellung des menschlichen Tumormaterials) und den anderen Partnern innerhalb des SFB zu koordinieren. Frank Kirchhoff wird maßgeblich die molekularbiologische Seite betreuen. Er hat uns schon im Vorfeld sehr geholfen, Tumorzellen zu transfizieren. In einem ersten Ansatz haben wir das fluoreszente Protein green fluorescence protein zur Expression in Tumorzellen gebracht. Dabei hilft uns sehr ein neues Gerät, daß wir in der Abteilung angeschafft haben, die Gen Gun. Während des Schreibens des Antrages laufen die erste Versuche, mit Hilfe dieses Gerätes green fluorescence protein in Kombination mit GABA-Rezeptor-Untereinheiten zu transfizieren. Frank Kirchhoff hilft hier, bei der Erstellung der Transfektion und der Verifizierung der Expression des Genproduktes.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Herr Horst Kagelmaker ist für die gesamte Abteilung für Technik, Wartung und Service zuständig. Er wartet ständig die elektrophysiologischen und Imaging-Meßstände, baut z. B. neue Ableitkammern und ist für alle mechanischen und elektronischen Probleme zuständig. Im Schnitt bringt er sich in der Woche mit 5 Stunden in dieses Projekt ein.

In der Regel erhalten wir ein- bis zweimal in der Woche Tumormaterial aus den Kliniken in Berlin-Buch, Wedding oder Steglitz. Dies ist immer auch eine sehr intensive Arbeitsphase, bei der alle technischen Kräfte der Abteilung mithelfen (Anlegen von Kulturen; Anfertigen frischer Hirnschnitte; Vorbereitung des Slice-Versuches). In dieser Phase haben sich Gerda Müller und Brigitte Hunger immer entscheidend eingebracht.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung

Dr. Jana Hartmann ist während der Laufzeit des Projektes dazugestoßen und hat die Experimente im wesentlichen durchgeführt. Sie wird auch in dem neuen Antrag ihre gesamte Arbeitskraft auf dieses Projekt konzentrieren. Eine wissenschaftliche Assistentin ist in diesem Projekt notwendig, da die Projektteile ein hohes Maß an Organisation und Erfahrung verlangen.

Als Doktorand hat Charalampos Labrakakis in diesem Projekt wesentliche Impulse gegeben. Er hat 1997 seine Doktorarbeit abgeschlossen. In der nächsten Antragsperiode soll sich die Doktorandin Anke Wittig im wesentlichen auf die Charakterisierung der Rezeptoren im Schnitt konzentrieren und - falls wir klare Muster bei den verschiedenen Gliomen erkennen können - soll er die Experimente durchführen, die Proliferation der kultivierten Gliomzellen im Kultursystem beeinflussen.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung

keine

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben				
Stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	2 500	5 000	5 000	2 500
Werden als Ergänzungsausstattung beantragt	15650	31300	31300	15650

Neuanschaffung von Kleingeräten

keine

Verbrauchsmaterial

DM/Jahr

Chemikalien inklusive Neurotransmitter und -modulatoren	5 000
Zellkultur-Materialien (Pipetten, Kulturflaschen, Multiboxen)	9 000
Zellkulturmedien	7 000
Antikörper, Reagenzien für die Immunohistochemie	7 000
Sonstige Chemikalien (z B. Fluo3AM)	800
Versuchstiere	2 500
Summe	31 300

Begründung für den Sachmittelbedarf

Es handelt sich um ein Projekt, das insbesondere Zellkultur-Untersuchungen in großem Umfang vorsieht. Hier sind Spezialmedien und die sonstigen Materialien teure Posten. Nicht unerhebliche Kosten kommen durch die Neurotransmitter-Experimente hinzu. Die Grundaustattung der Labore ist gewährleistet.

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B2

3.1.1 Thema:

Intrazelluläre Signalverarbeitung bei mikroglialer Aktivierung: Beteiligung von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung

Neurobiologie, Neuroimmunologie

3.1.3 Leiter

Dr. Uwe-Karsten Hanisch
06.05.1961
Zelluläre Neurowissenschaften
Max-Delbrück-Centrum (MDC)
Robert-Rössle-Straße 10
13122 Berlin-Buch
TEL: 030/9406-3503
FAX: 030/9406-3819
E mail:UH@nero.glia.mdc-berlin.de

Die Stelle des Leiters ist befristet: (x) ja () nein

3.1.4 Aktenzeichen der Förderung in einem anderen Verfahren der DFG

Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen () ja (x) nein
- klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie () ja (x) nein
- Tierversuche () ja (x) nein
- gentechnologische Versuche () ja (x) nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereiches

(Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998	30,6	12,5	0	43,1
1999	61,2	25	0	86,2
2000	61,2	25	0	86,2
1. Hj. 2001	30,6	12,5	0	43,1

3.2 Zusammenfassung

In den 1990er Jahren haben vornehmlich molekularbiologische Ansätze neue intrazelluläre Signalwege aufgedeckt, die auf Kaskaden von Proteinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen beruhen. Diese Kaskaden sind in verschiedensten Zellen an der Steuerung von Proliferation, Migration, Adhäsion, Exozytose (Sekretion), aber auch Apoptose und maligner Transformation beteiligt. Die Rolle dieser Kaskaden für Zellen des ZNS und insbesondere die Physiologie seiner gewebetypischen Makrophagen (Mikroglia) ist noch kaum bekannt. Das Projekt soll die Beteiligung von Kinasen und Phosphatasen der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden an der Aktivierung von Mikroglia untersuchen. Schwerpunkt dabei ist die Einbeziehung dieser Signalwege während und nach rezeptorvermittelter Mikroglia-stimulationen, wie sie beispielsweise durch Kontakt mit bakteriellen Zellwänden ausgelöst und vermutlich durch bestimmte Zytokine moduliert werden können. In etablierten Modellen werden dazu Maus-Mikrogliazellen *in vitro* löslichen und partikulären Zellwandbestandteilen sowie definierten Substanzen ausgesetzt. Nachfolgend werden aktivierungsabhängige mikrogliale Reaktionen, wie die (1) Freisetzung bestimmter Zytokine und Chemokine, die (2) Induktion von Ionenkanälen, (3) aber auch charakteristische morphologische Veränderungen sowie die (4) Expression ausgewählter Oberflächenantigene gemessen bzw. erfaßt. Lipopolysaccharid (LPS) wird als Modellschubstanz für Mikrogliakontakte mit Gram-negativen Bakterien eingesetzt, Präparationen gereinigter Pneumokokken-Zellwände dienen der Simulation Gram-positiver Infektionen. Für ausgewählte Faktoren, wie Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor- α oder Interferon- γ , soll eine Einflußnahme als Kostimulus bzw. Modulator berücksichtigt werden. Mikroglia-stimulationen in Gegenwart membranpermeabler Enzym-inhibitoren (und -aktivatoren) sollen es dann ermöglichen, für verschiedene Stimuli und Situationen den Signalfluß von der Rezeptoraktivierung über Proteinkinase-Kaskaden und Proteinphosphatasen bis hin zur meßbaren zellulären Antwort aufzuzeigen. Ausgewählte Inhibitoren mit hoher Spezifität für 'diagnostische' Signalelemente (z.B. Kinaseinhibitoren der Tyrosinkinaseklasse) werden zunächst dazu verwendet, den jeweiligen Beitrag von Hauptwegen der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Systeme zu bestimmen. Daran anschließend sollen durch kombinierte pharmakologische Interventionen und biochemische Ansätze nähere Einblicke in die 'hierarchische' Organisation individueller Signalwege der Mikroglia gewonnen werden. Unter Berücksichtigung einer zunehmend akzeptierten Beteiligung der Mikroglia an nahezu allen pathophy-

logischen Geschehnissen im ZNS könnte das Verständnis der intrazellulären Signalumsetzung und Interpretation extrazellulärer Stimuli von breitem klinischen Interesse sein. So wird eine Aktivierung von Makrophagen/Mikroglia nicht nur während viraler und bakterieller ZNS-Infektionen erfolgen; aktivierte Mikroglia ist vermutlich auch an Gewebeschädigungen nach Hirntrauma und Rückenmarksverletzung sowie an postischämischen Prozessen beteiligt.

3.3 Stand der Forschung

Mikroglia als zelluläre Sensoren und Effektoren pathophysiologischer Prozesse

Als Gewebemakrophagen und wichtigste immunkompetente Zellen des ZNS reagieren Mikrogliazellen sehr schnell auf alle pathologischen Veränderungen im Gehirn, wobei schon geringe Störungen der Gewebemöostase registriert werden können (Perry, 1994; Gehrman et al., 1995; Kreutzberg, 1996). Ausgelöst durch Kontakt mit bakteriellen Zellwandbestandteilen (z.B. Lipopolysaccharide, LPS), durch definierte molekulare Faktoren (Zytokine) oder durch teilweise noch nicht näher charakterisierte Stimuli (z.B. in Folge von Hirngewebeläsionen) gehen Mikrogliazellen rasch von einem "ruhenden" in einen "aktivierten" Zustand über. Diese Aktivierung erfolgt in Stufen und ist mit einer Zunahme der migratorischen, phagozytischen und zytotoxischen Aktivität der Zellen verbunden. Veränderungen im funktionellen Status der Mikroglia werden außerdem von charakteristischen Veränderungen im Muster exprimierter Oberflächenantigene begleitet.

Nach Stimulierung mit (beispielsweise) LPS oder Interferon- γ (IFN γ) exprimieren Mikrogliazellen (verstärkt) nicht nur bestimmte Rezeptoren, die in Beziehung zu Immunkompetenz und Makrophagenaktivität stehen, sondern auch Ionenkanäle (Kettenmann et al., 1990; Nörenberg et al., 1994). Die induzierbaren spannungsabhängigen K⁺-Auswärtsströme dienen vermutlich *in vivo* einer raschen Repolarisierung des Membranpotentials der Mikroglia nach Fc- oder ATP-Rezeptor-vermittelter Depolarisierung. Immunglobuline und ATP werden z.B. in Läsionsbereichen des ZNS in größeren Mengen vorgefunden bzw. freigesetzt und die entsprechenden Rezeptoren auf aktivierter Mikroglia in größerer Dichte nachgewiesen (Vedeler et al., 1994). Alternativ gehen Hypothesen davon aus, daß die Induktion von Ionenkanälen die Mikrogliaaktivierung nicht nur 'begleitet', sondern auch mechanistisch an bestimmten zellulären Reaktionen der Mikroglia beteiligt ist. Als Kandidat einer Kaliumkanal-abhängigen Sekretion von Zytokinen wird Interleukin-1 β (IL-1 β) diskutiert (Walev et al., 1995).

Zytokine sind an den Wechselwirkungen aktivierter Mikroglia mit Astrozyten, Endothel- sowie Immunzellen beteiligt. Mikrogliazellen synthetisieren u.a. IL-1, IL-5, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und transforming growth factor- β (TGF- β) und reagieren auf IL-3, GM-CSF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), TGF- β und IFN γ . Aktivierte Mikroglia gilt als die wesentlichste hirneigene Quelle proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α (Benveniste, 1992). Dieses pluripotente Zytokin ist nicht nur ein zentraler Faktor innerhalb der Immunmodulation, der Tumorumwehr oder bei Entzündungen. Es vermittelt auch zahlreiche (neuro)toxische Effekte, die u.a. durch bakterielles 'Endotoxin' (LPS) ausgelöst werden, und spielt beim septischen Schock eine wichtige, klinisch relevante Rolle.

Einerseits kann aktivierte Mikroglia somit auf Zytokin-Signale reagieren, die von T-Zellen und Astrozyten ausgehen oder als autokrine Faktoren auf Mikrogliafunktionen zurückwirken. Andererseits können Mikrogliazellen über eine Zytokinfreisetzung die funktionellen Eigenschaften von Astrozyten, Neuronen, Endothel- und infiltrierenden T-Zellen in ihrer Umgebung modulieren. Neben potentiell toxischen Syntheseprodukten, zu denen u.a. Glutamat und

reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen zählen, scheinen mikrogliale Zytokine – in großen Mengen oder chronisch freigesetzt – auch an pathologischen Prozessen beteiligt zu sein, bei denen Mikrogliaaktivierung beobachtet wird. Prädestiniert für eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der ZNS-Homöostase führen vermutlich inadäquate Reaktionen der Mikroglia, wie eine exzessive TNF α -Freisetzung, im Extremfall zu Schädigungen des ZNS. Mikrogliale Überreaktionen könnten damit sekundär zu Umfang und Schwere primärer Ereignisse beitragen. Beispiele dafür wären die sich ausweitenden Gewebeschädigungen nach Hirntrauma und Rückenmarksverletzung sowie Prozesse bei Ischämie oder in Folge von Hirnhautentzündungen.

Auf der Kenntnis der unmittelbaren und vermutlich für den Verlauf vieler Erkrankungen wesentlichen Reaktionen der Mikroglia könnte langfristig ein gezielter pharmakologischer Zugriff aufbauen. Ansätze in dieser Richtung mögen auf die für Mikrogliaaktivierung zuständigen Rezeptorproteine oder (im weitesten Sinne) Membranmoleküle orientieren, deren Stimulation nachgeschaltete intrazelluläre Signalprozesse einleitet. Alternativ können Interventionen mit exekutiven Leistungen der Mikroglia oder mikroglialen Syntheseprodukten, so beispielsweise mit Motilität, Phagozytose oder sezernierten Faktoren, einen Zugriff auf nachfolgende Ereignisse und Schadenskaskaden erlauben. Ein wichtiges Bindeglied zwischen der sensorischen und der exekutiven Komponente mikroglialer Physiologie ist die intrazelluläre Signalverarbeitung, die bisher nur teilweise verstanden wird. Weitgehend unbekannt ist dabei auch die Rolle von Proteinphosphorylierungen an Ser-, Thr- und Tyr-Resten, wie sie durch eine Reihe von Proteinkinasen vermittelt und durch Proteinphosphatasen revertiert werden.

Proteinphosphorylierung innerhalb multipler Signalkaskaden

Rezeptorvermittelte Änderungen des Phosphorylierungszustandes membranassoziierter, zytosolischer und nukleärer Proteine werden schon seit einiger Zeit als Prozesse der Signalverarbeitung angesehen. Gerade innerhalb der letzten fünf Jahre wurde aber in kombiniert physiologisch-molekularbiologischen Untersuchungen eine Vielzahl von Kinasen, und G-Protein-ähnlichen Faktoren beschrieben, die zu Proteinphosphorylierungskaskaden zusammentreten (van der Geer und Hunter, 1994; Seger und Krebs, 1995; Denhardt, 1996; Heim, 1996; Ihle, 1996). Diese Kaskaden modulieren dabei die Eigenschaften von Rezeptoren (und vermutlich auch Ionenkanälen), zytoskelettalen Proteinen, zytosolischen Enzymen sowie Transkriptionsfaktoren. Verwoben mit 'klassischen' second messenger-Systemen scheinen sie dadurch wesentlichen Einfluß auf verschiedene zelluläre Funktionen zu nehmen. Den allein für den Menschen geschätzten 2000 Proteinkinasen steht vermutlich eine ähnlich große Zahl an Proteinphosphatasen gegenüber, die in einem fein geregelten Wechselspiel den Phosphorylierungszustand entsprechender Substrate - die wiederum selbst Enzyme sein können - regulieren (Hunter, 1995). Die Spezifität der teilweise auch multiplen Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsreaktionen an Ser-, Thr- und Tyr-Resten ist durch eine Einbettung dieser Aminosäuren in einen Sequenzkontext garantiert. Durch Phosphorylierung (aber auch Dephosphorylierung) können in membranassozierten oder löslichen Proteinen Bindungsstellen und Aktivierungsdomänen für nachgeschaltete Enzyme entstehen. Adapterproteine können, ebenfalls phosphorylierungsabhängig, weitere Faktoren rekrutieren und dabei Signalkaskaden parallelschalten oder aufzweigen. Regulierende Schleifen (feed-backs) erlauben den Rückgriff von intrazellulären downstream-Elementen auf upstream-Komponenten ebenso, wie die Einbeziehung primär sezernierter Faktoren, die auto- oder parakrin das intrazelluläre Signalgeschehen über sekundäre Rezeptoraktivierung modulieren (Denhardt, 1996)

Durch die Beteiligung von Schlüsselenzymen lassen sich vier große Kaskaden unterscheiden (Abbildung 1). Einerseits durch bestimmte Stimuli bevorzugt aktiviert oder parallel ange-

schaltet, stehen diese Kaskaden andererseits in einem reziproken Informationsaustausch. Der wohl bekannteste der drei Ras/Rho-Signalwege ist die Kaskade Ras → Raf → MEK → ERK, wobei Ras-Proteine eine Familie GTP-bindender Proteine und Raf, MEK und ERK Elemente eines hierarchisch angeordneten Systems von Proteinkinasen, -kinasekinasen und -kinasekinasekinasen darstellen (Seger und Krebs, 1995; Denhardt, 1996). Bei der 'diagnostischen' Klassifizierung der einzelnen Aktivierungswege wird grob von der Zuordnung zu jeweils aktivierten Typen von MAPK-Enzymen (mitogen-activated protein kinases) ausgegangen. Neben dem Ras-aktivierbaren pathway, der über die Einschaltung von extracellular signal-regulated kinases (ERK) charakterisiert ist, werden zwei weitere Signalkaskaden über eine proximale Beteiligung der Ras-verwandten Rho-Protein-Familienmitglieder Rac-1 und CDC42 aktiviert, die nachfolgend und über weitere Zwischenschritte zur Aktivierung von SAPK/JNK-MAPKs oder p38/CSBP/RK-verwandten Kinasen führen. Im Ergebnis lösen diese Aktivierungskaskaden in Zellen vielfältige zytosolische und expressionsvermittelte Reaktionen aus, die von Veränderungen in der sekretorischen Leistung und im Zytoskeletton, der Ausbildung von Filopodien sowie des membrane ruffling, über Aktivierungen des oxidativen burst und exozytotischer Vesikel bis hin zur Induktion oder Inhibition apoptotischer Prozesse und maligner Transformation reichen (Seger und Krebs, 1995; Denhardt, 1996). Es sind inzwischen Ras-regulierende Faktoren bekannt, die exklusiv im Nervensystem exprimiert werden.

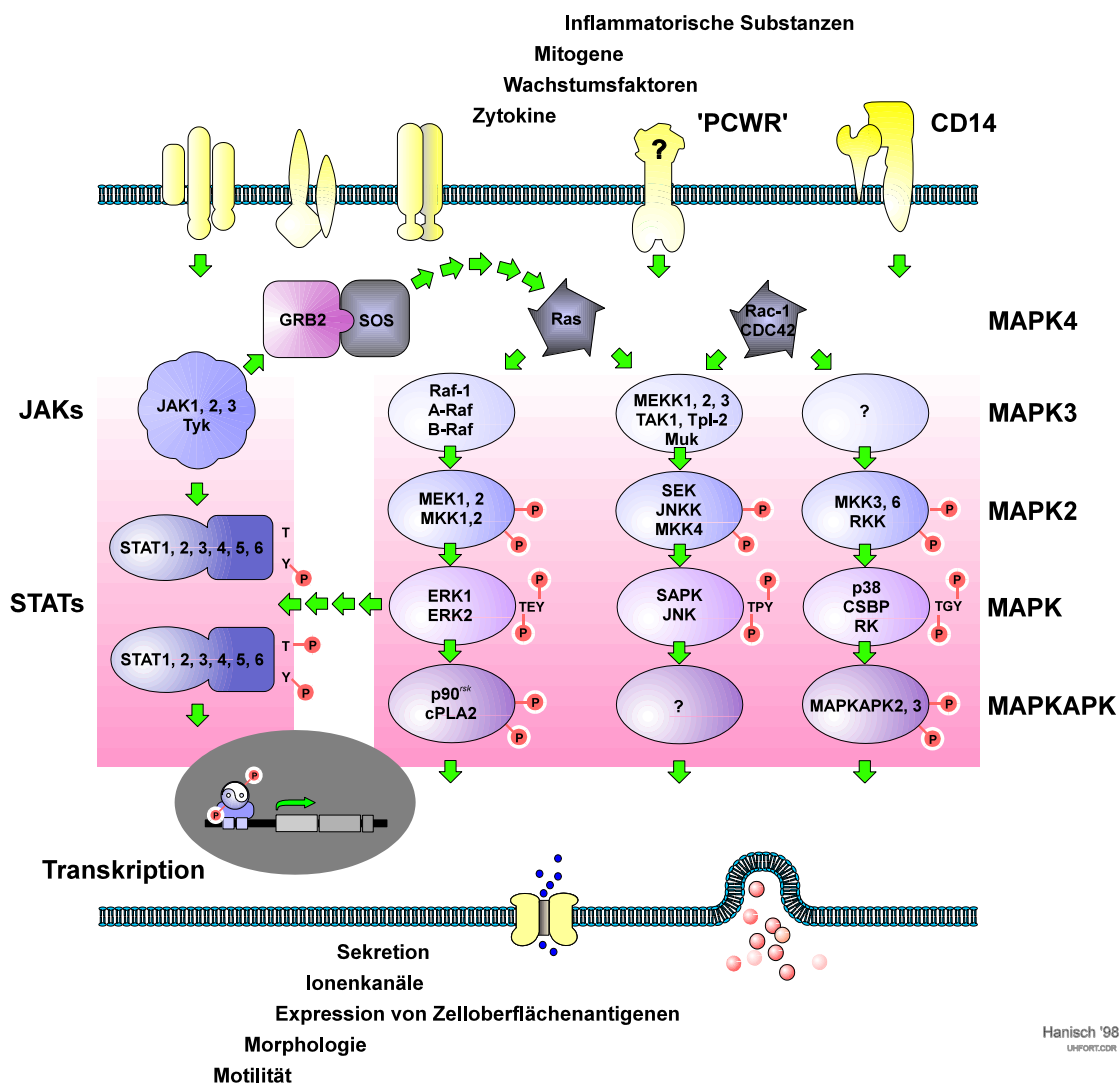
Neben diesen mehr oder minder Ras/Rho-Protein-kontrollierten Kaskaden wurde in letzter Zeit ein Signalsystem bekannt, bei dem rezeptoraktivierte zytosolische Proteinkinasen des Janus-Typs (JAKs) zur Tyr-phosphorylierungsabhängigen Aktivierung sogenannter STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription) führen (Abbildung 1). Phosphorylierte STATs bilden daraufhin Homo- und Heterodimere, die in den Kern einwandern und dort als Induktoren bzw. Helfer von Transkriptionsprozessen wirken (Heim, 1996; Ihle, 1996; Darnell, 1997). JAK- und Ras/Rho-aktivierbare Kaskaden stehen vermutlich in enger Beziehung. Adapterkomplexe, wie GRB2/SOS, erlauben einerseits eine relativ proximale Querverbindung der JAKs zu Signalereignissen in Ras-Umgebung. Andererseits können Kinasen des ERK/MAPK-Bereiches durch Ser- und Thr-Phosphorylierung der bereits Tyr-phosphorylierten STATs deren Bindungsspezifität und -affinität für respektive DNA-Sequenzen feinmodulieren.

Mit den JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden wurden in kurzer Zeit nicht nur neue Mechanismen der Signalumsetzung bekannt, die für Wachstumsfaktoren und Mitogene, Zytokine und Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Entzündungsmediatoren oder zellulären Stress (UV- und radioaktive Strahlung, Hyperosmolarität) eine Rolle spielen. Es wurde erstmals deutlich, daß Ligand-Rezeptor-kodierte Informationen über Protein-Protein-Wechselwirkung oder bevorzugte Phosphorylierung von der Plasmamembran in den Kern gelangen und dort ligandspezifische Genaktivierung auslösen können (Heim, 1996). Im Sinne einer parallelen und integrativen Signalverarbeitung (multiplex signaling) wird darüber hinaus der Aktivierungsfluß nicht nur innerhalb dieser Phosphorylierungskaskaden 'verrechnet' und reguliert (downstream/upstream amplification, ~ inhibition, ~ merge of signaling), es bestehen auch zahlreiche Verbindungen zu mehr klassischen Signalelementen, insbesondere molekularen Formen der Proteinkinase C und Phospholipidkinasen, Phospholipasen, α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine sowie zum intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel.

Zelluläre Funktionen, die durch den Phosphorylierungszustand von Proteinen gesteuert werden, unterliegen einem sensiblen Wechselspiel zwischen Kinasen einerseits und Proteinphosphatasen (PP) andererseits (Sun und Tonks, 1994; Cohen, 1997; Fearson und Alexander, 1997). Innerhalb der letzten zehn Jahre wurde eine enorme Zahl dieser Enzyme kloniert, und Schätzungen für das menschliche Genom belaufen sich zur Zeit auf gut 1000 PP-Gene. Ihre

Einteilung erfolgt neben strukturellen Gesichtspunkten der Proteine selbst nach Substratspezifität, Abhängigkeit von Metallionen oder der Sensitivität gegenüber Inhibitoren. Proteinphosphatase-Typen, wie PP1, PP2A, PP2B, PP2C oder PTP, unterscheiden sich zudem nach der bevorzugten Lokalisation innerhalb zellulärer Kompartimente. Die Stellung der Proteinphosphatasen im zellulären Signalgeschehen ist dabei komplex und kann nicht auf eine bloße Umkehrung der kinasevermittelten Phosphorylierungen an Ser-, Thr- oder Tyr-Resten reduziert werden (Hunter, 1995). Für einige Kinasen scheint eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen ein notwendiges Ereignis auf dem Weg zu ihrer Aktivierung zu sein. Im Gegenzug wird die Aktivität bestimmter Phosphatasen durch Kinasereaktionen kontrolliert.

Trotz eines immensen Interesses an den zellbiologischen Mechanismen und physiologischen Funktionen der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Systeme sind bislang erst relativ wenige Kenntnisse zu deren Rolle in ZNS-Zellen und speziell in der Mikroglia(-Aktivierung) verfügbar.



Hanisch '98
UNIPORT.CO.RU

Abbildung 1: JAK/STAT- und ERK/MAPK-Signalkaskaden, die an der Steuerung von zellulären Prozessen durch Wachstumsfaktoren, Mitogene oder Zytokine teilnehmen. Rezeptorstimulationen führen einerseits zur Rekrutierung von JAK-Kinasen, andererseits zur Aktivierung von ERK/MAPK-Kaskaden. Stimulierte Rezepto-

ren assoziieren dabei mit JAKs, die anschließend STAT-Protein an Tyr-Resten (Y) phosphorylieren. Phosphorylierte STATs dimerisieren und wandern in den Kern ein, wo sie die Ablesung bestimmter Gene oder Gensätze auslösen. Rezeptoraktivierungen können auch über Ras- oder Ras-ähnliche Faktoren (Rac-1, CDC42) Proteinkinase-Kaskaden anschalten, die ebenfalls zytosolische oder Transkriptionsprozesse auslösen. Die Beteiligung charakteristischer Enzyme des MAPK-Niveaus (ERKs, SAPK/JNK oder p38/RK) erlaubt zur Zeit die Einteilung des ERK/MAPK-Systems in drei Hauptbahnen. Querverbindungen und Schleifen innerhalb dieses, hier hierarchisch dargestellten Systems sind mittlerweile ebenso bekannt, wie Interaktionen zwischen dem JAK/STAT-System und dem ERK/MAPK-System. So kann JAK-Aktivierung über GRB2/SOS-Komplexe und deren Effekte auf Ras Einfluß auf die pathways der ERK/MAPK nehmen. Im Gegenzug können MAPK die DNA-Bindungseigenschaften von STAT-Proteinen durch zusätzliche Phosphorylierung von Ser- und Thr-Resten modulieren. MAPK2 entspricht hier den MAPK-Kinasen. MAPK3 und MAPK4 repräsentieren die jeweils übergeordnete Kinasestufe. Für weitere Erklärungen siehe Text.

Literatur

- Benveniste, E.N. (1992) Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am. J. Physiol.*, 263: C1-C16.
- Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 245-251.
- Darnell, J.E. (1997) STATs and gene regulation. *Science*, 277: 1630-1635.
- Denhardt, D.T. (1996) Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.*, 318: 729-747.
- Frearson, J.A. und Alexander, D.R. (1997) The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction. *Bioessays*, 19: 417-427.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y. and Kreutzberg, G.W. (1995) Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.*, 20:269-287.
- Heim, M.H. (1996) The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus. *Eur. J. Clin. Invest.*, 26: 1-12.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80: 225-236.
- Ihle, J.N. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331-334.
- Kettenmann, H., Hoppe, D., Gottmann, K., Banati, R. and Kreutzberg, G.W. (1990) Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J. Neurosci. Res.*, 26:278-287.
- Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathologic events in the CNS. *Trends Neurosci.*, 19(8):312-19.
- Nörenberg, W., Gebicke-Haerter, P.J. and Illes, P. (1994) Voltage-dependent potassium channels in activated rat microglia. *J. Physiol.*, 475 (1): 5-32.
- Perry, V.H. (1994) Macrophages and the nervous system. *Molecular Biology Intelligence Unit*, R.G. Landes Company, Austin.
- Seeger, R. und Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 9: 726-735.

- Sun, H. und Tonks, N.K. (1994) The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 480-485.
- van der Geer, P. und Hunter, T. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10: 251-337.
- Vedeler, C., Ulvestad, E., Grundt, I., Conti, G., Nyland, H., Matre, R., Pleasure, D. (1994) Fc receptor for IgG (FcR) on rat microglia. *J. Neuroimmunol.*, 49: 19-24.
- Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A. and Bhakdi, S. (1995) Potassium-inhibited processing of IL-1 β in human monocytes. *EMBO J.*, 14: 1607-1614.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Mikrogliale Expression des IL-2/IL-15-Systems und Kopplung des IL-2/IL-15-Rezeptorkomplexes an JAK-Aktivität

Für eine Reihe von Zytokinen ist die Expression funktionsfähiger Rezeptoren auf Mikrogliazellen dokumentiert. Kaum bekannt war, inwieweit diese Zellen auch Rezeptoren für den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 und das mit ihm aktivitätsverwandte IL-15 besitzen (Hanisch und Quirion, 1996). Mit einer Reihe von molekularen und funktionellen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß IL-2, IL-15 und alle erforderlichen molekularen Komponenten für di- und trimere IL-2- bzw. IL-15-Rezeptoren im Maus-ZNS sowie in kultivierter Mausmikroglia exprimiert werden (Hanisch et al., 1997a; Prinz et al., eingereicht). Transkripte für IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ und IL-15R α sowie die Liganden IL-2 und IL-15 ließen sich in Präparationen von Zellkulturen und Gewebearealen des Maushirns verschiedener Altersstufen mittels RT-PCR (und Sequenzierung der Amplimere) darstellen. Diese Befunde sind durch Analysen auf Einzellzellniveau unterlegt. Dabei wurde zunächst RNA-Material aus einzelnen, elektrophysiologisch charakterisierten Mikrogliazellen über patch clamp-Pipetten isoliert und in cDNA überschrieben. Nachfolgend erlaubten Zwei-Stufen-PCR-Reaktionen unter Einsatz von ineinandergeschachtelten (semi-nested) Primerpaaren die Amplifikation dieser extrem geringen RNA/cDNA-Mengen bis zur Detektierbarkeit im Gel.

Die Expression von mRNA ist speziell im Fall des IL-15 noch kein eindeutiger Beweis für erfolgreiche Translation und Proteinsekretion. Multiple Startcodons im nichttranslatierten Anteil der IL-15-mRNA und eine ungewöhnlich lange Signalsequenz im IL-15-Protein scheinen - somit auf zwei Stufen - die Produktion und Sekretion des IL-15 zu verhindern oder zu kontrollieren. Mittels Immunpräzipitationen und Western-Blot-Analysen konnten wir jedoch IL-15-Produktion und -freisetzung in Mikroglia *in vitro* bzw. an Hirnpräparationen demonstrieren.

In ersten Ansätzen zur Charakterisierung der Signalereignisse, die der Bindung des IL-15 (und IL-2) an mikroglialen IL-2/IL-15-Rezeptoren folgen, wurde nicht nur die Expression von JAK-mRNA und JAK1-Protein, sondern auch die rasche, Zytokin-induzierbare Phosphorylierung von JAK1 an Tyr-Resten in Mikroglia dargestellt. Interessanterweise wurden Hinweise darauf erhalten, daß auch IL-15R α und ein noch nicht näher charakterisiertes, anscheinend IL-15R α -assoziiertes Protein ebenfalls Tyr-phosphoryliert sein können. Analoge Untersuchungen konzentrierten sich inzwischen - mit ersten Erfolgen - auf den Nachweis von JAK-Molekülen des Typs JAK3 im ZNS der Maus. Während JAK1 vermutlich nicht nur in Immunzellen durch IL-2R β aktiviert wird, soll das auf das hämatopoietische System beschränkte JAK3 vorwiegend mit IL-2R γ assoziiert sein. Unter Berücksichtigung der ontogenetischen

Herkunft der Mikroglia sprechen unsere Ergebnisse zur JAK3-Expression im ZNS für eine mikrogliale Lokalisation dieser Kinase.

Unsere funktionellen Untersuchungen zeigen, daß IL-15 ein autokriner Überlebens/Wachstumsfaktor für Mikroglia sein könnte. Darüber hinaus wird z.B. die (LPS-induzierbare) mikrogliale NO-Produktion von IL-15 und IL-2 in gegensätzlicher Weise moduliert. Unter Berücksichtigung der einerseits extrem geringen und anscheinend regional begrenzten ZNS-Expression von IL-2(-Protein) und der andererseits auch literaturdokumentierten Vielfältigkeit IL-2-induzierbarer ZNS-Effekte haben wir die Vermutung geäußert, daß endogenes IL-15 für zumindest einige der Zytokinwirkungen in neuronalen und glialen Zellen verantwortlich sein könnte, die bisher experimentell und klinisch mit exogen zugeführtem (rekombinantem) IL-2 ausgelöst werden konnten (Hanisch und Quirion, 1996; Hanisch et al., 1994, 1996a, 1996b, 1997b).

Ein wesentlicher funktioneller Unterschied zwischen IL-2 und IL-15 besteht darin, daß IL-15 (a) ein chemoattraktiver Faktor für T-Zellen ist, jedoch (b) nicht von diesen gebildet werden kann. Mikrogliales IL-15 könnte somit ein wichtiges Element sein, daß Mikrogliaaktivierung und Lymphozyteninfiltration bei Hirntrauma oder während ZNS-Inflammation verbindet. Gemeinsame Experimente mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Rémi Quirion und Prof. Dr. Michael M. Meaney am Douglas Hospital Research Centre, McGill University Montreal, mit denen schon mehrjährige Zusammenarbeit nicht nur bei der Untersuchung von IL-2-Aktivitäten im ZNS besteht (siehe auch van Rossum et al, 1997; Kar et al., 1998), sollen erste Anhaltspunkte liefern, inwieweit erhöhte IL-15-Spiegel im ZNS zur Extravasation von T-Zellen im ZNS führen.

Differenzielle Aktivierung von Mikroglia durch Zellwandkomponenten Gram-positiver und -negativer Bakterien

In vergleichenden Studien zur Mikrogliaaktivierung durch bakterielle Zellwandbestandteile wurde in Kooperation mit der Neurologischen Klinik der Charité (insbesondere Dr. Jörg Weber) und der Abteilung Biologische Forschung der Boehringer Ingelheim KG (Dr. Henning Draheim) umfassend die Induktion von spannungsabhängigen K^+ -Auswärtsströmen charakterisiert (Draheim et al., eingereicht). Dabei zeigte eine elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung, daß LPS-Kontakt (als Modell Gram-negativer Infektionen) und Behandlung mit Pneumokokken-Zellwandpräparationen (PCW, als Modell Gram-positiver Infektionen; Angstwurm et al., 1998) in Mikroglia gleichermaßen zur Expression von Leitfähigkeiten führen, die anscheinend vollständig von $Kv1.3$ -Kanälen getragen werden. Interessanterweise erlaubten Experimente auf der Grundlage von Mikrogliapräparationen verschiedener ontogenetischer Stufen erstmalig, die selektive Beteiligung von Rezeptor/Effektorsystemen eindeutig nachzuweisen. Während Zellen von perinatalen Mausgehirnen sowohl auf LPS, als auch auf PCW reagieren, ist eine Sensibilität gegenüber diesen Komponenten in embryonaler Mikroglia nur für LPS festzustellen.

Für beide Modellkomponenten besteht eine ausgeprägte Serumabhängigkeit, die im Fall des LPS - übereinstimmend mit der Literatur - auf das LPS-bindende Protein (LBP) bezogen werden kann. Allerdings zeigten Substitutionsexperimente auch, daß LBP nicht als Serumfaktor für PCW in Frage kommt und bei LPS nur teilweise das Fehlen von Serum kompensieren kann.

Die Sekretion von Zytokinen wird als eine wichtige exekutive Leistung der (aktivierten) Mikroglia angesehen. Die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aus aktivierter Mikroglia spielt vermutlich eine frühe und entscheidende Rolle bei Infektionen

des ZNS. Wir haben in umfangreichen experimentellen Ansätzen das Zytokininduktionsmuster für LPS und PCW untersucht, wobei neben Zytokinen auch Chemokine Berücksichtigung fanden. Die Liste der dabei untersuchten Substanzen umfaßt bisher IL-1 α , IL-1 β , IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra), IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 (total) und IL-12p70 (und damit IL-12p40), TNF α , IFN γ , MIP-1 α , MIP-2 und KC, das Mausäquivalent des GRO- α /MGSA, ein am IL-8-Rezeptor (Typ B) bindendes Chemokin, sowie die potentiell als endogene TNF α -Antagonisten wirkenden löslichen Formen der TNF α -Rezeptoren I und II. Vergleichende Studien, auch unter Berücksichtigung des Zeitverlaufes und der Dosis- sowie Serumabhängigkeit, erlauben erste Rückschlüsse auf quantitative und qualitative Unterschiede im Induktionsprofil.

Der zur Zeit von uns am intensivsten verfolgte Projektanteil bezieht sich auf das durch LPS und PCW in Mikroglia ausgelöste Signalgeschehen. Anscheinend lassen sich dabei erste Trennungen der Signalwege aufzeigen, die vom Kontakt mit den bakteriellen Zellwandbestandteilen zur Freisetzung von Zytokinen führen. Der Einsatz verschiedener, seit einiger Zeit zugänglicher, hochspezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren vom Tyrphostin-Grundtyp erlaubt u.a. eine selektive Blockade der IL-6- oder TNF α -Induktion durch PCW. Diese Arbeiten werden zur Zeit auf die Induktion von Ionenkanälen ausgedehnt, wobei gleichzeitig weitere pharmakologische Manipulationen die Aufzweigung der bisher als ähnlich angesehenen Signalereignisse für LPS und PCW detaillierter entschlüsseln sollen.

Insgesamt versprechen wir uns von diesen Ansätzen ein besseres Verständnis des Signalgeschehens (a) während mikroglialer Aktivierung allgemein und (b) bei bakteriellen Infektionen des ZNS im besonderen. So könnten qualitative und quantitative Unterschiede in mikroglialen Reaktionen auf Kontakt mit den jeweiligen bakteriellen Zellwandbestandteilen durchaus am sehr unterschiedlichen Verlauf Gram-negativer und Gram-positiver Meningitiden beteiligt sein.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema

Angstwurm, K., Freyer, D., Dirnagl, U., Hanisch, U.K., Schumann, R., Einhüpl, K.M., Weber, J.R. (1998) Tumor necrosis factor α induces only minor inflammatory changes in the CNS, but augments experimental meningitis. *Neuroscience* (im Druck).

Draheim, H., Prinz, M., Weber, J.R., Weiser, T., Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Induction of K⁺ channels in mouse brain microglia: Cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Glia* (eingereicht).

Hanisch, U.K., Rowe, W., Sharma, S., Meaney, M.J., Quirion, R. (1994) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity during chronic central administration of interleukin-2. *Endocrinology*, 135: 2465-2472.

Hanisch, U.K., Quirion, R. (1996) Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. *Brain Res. Rev.*, 21: 246-284.

Hanisch, U.K., Rowe, W., van Rossum, D., Meaney, M.J., Quirion, R. (1996a) Phasic hyperactivity of the HPA axis resulting from chronic central IL-2 administration. *Neuroreport*, 7: 2883-2888.

Hanisch, U.K., Neuhaus, J., Quirion, R., Kettenmann, H. (1996b) Neurotoxicity induced by interleukin-2: involvement of infiltrating immune cells. *Synapse*, 24: 104-114.

- Hanisch, U.K., Lyons, S., Nolte, C., Prinz, M., Weber, J., Kettenmann, H., Kirchhoff, F. (1997a) Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 272: 28853-28860.
- Hanisch, UK, Rowe, W., Neuhaus, J., van Rossum, D., Möller, T., Kettenmann, H., Quirion, R. (1997b) Neurotoxic consequences of chronic central administration of interleukin-2 in rats. *Neuroscience*, 79: 799-818.
- Kar, S., Seto, D., Dore, S., Hanisch, U.K., Quirion, R. (1998) Insulin-like growth factors I and II differentially regulate endogenous acetylcholine release from rat hippocampal formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (im Druck).
- Prinz, M., Hanisch, U.K., Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5. *J. Immunol.* (eingereicht).
- van Rossum, D., Hanisch, U.K., Quirion, R (1997) Neuroanatomical localisation, pharmacological characterisation and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21: 649-678.
- Zhu, J., Zhang, L., Hanisch, U.K., Felgner, P.L., Reszka, R. (1996) In vivo gene therapy of experimental brain tumors by continuous administration of DNA-liposome complexes. *Gene Ther.*, 3: 472-476.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Mit dem Projekt soll der Beitrag von Proteinphosphorylierungskaskaden der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Systeme zur Regulation physiologischer Eigenschaften der Mikroglia untersucht werden. Dabei steht die Beteiligung ausgewählter Signalkomponenten (Kinasen und Phosphatasen bzw. deren Substrate) an der Auslösung bestimmter zellulärer Reaktionen im Vordergrund, wie sie bei einer Aktivierung der Mikroglia beobachtet und durch Zellwandkomponenten Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien hervorgerufen werden können. Ebenfalls berücksichtigt wird der Einfluß von Kostimulationen auf das Muster aktivierter Signalwege.

Zur Mikroglia stimulation werden eingesetzt:

- LPS als Modellschubstanz für Mikroglia kontakt mit Gram-negativen Bakterien
- Pneumokokken-Zellwandpräparationen (PCW) als Modellschubstanz für Infektionen mit Gram-positiven Bakterien.

Damit werden *in vitro* einerseits die speziellen Situationen bei bakteriellen ZNS-Infektionen mit Gram-negativen und -positiven Keimen simuliert bzw. in Aspekten nachgestellt. Andererseits sollen diese Modellschubstanzexperimente helfen, allgemeine Mechanismen der Mikrogliaaktivierung aufzudecken, wie sie auch bei und nach Hirntrauma, Ischämie oder neurodegenerativen Prozessen angetroffen werden kann.

Als modulierende Faktoren einer Stimulation mit LPS oder PCW werden untersucht:

- TNF α
- IL-1 β
- IFN γ

Situationen, bei denen Mikrogliaaktivierung beobachtet oder erwartet wird (Entzündungen, Läsionen, Infektionen), sind auch gleichzeitig durch erhöhte Gewebespiegel dieser Zytokine gekennzeichnet. Es muß davon ausgegangen werden, daß die Mikrogliaaktivierung durch einen gegebenen Stimulus 'kontextabhängigen' Variationen unterliegt, die sich zuerst in einem veränderten Signalgeschehen darstellen.

Als aktivierungsabhängige mikrogliale Reaktionen werden untersucht:

- Die Freisetzung bestimmter Zytokine (TNF α , IL-6, IL-12) und Chemokine (KC, MIP-1 α , MIP-2)
- Die Induktion von K⁺-Kanälen (Kv1.3)
- Morphologische Veränderungen
- Die Expression ausgewählter Oberflächenantigene (Komplementrezeptor, MHC-II-Komplex)

TNF α , IL-6, und IL-12 sowie KC, MIP-1 α und MIP-2 werden u.a. von aktivierten Makrophagen während viraler und bakterieller Infektionen freigesetzt. Diese Faktoren sind an der Regulation der zellulären und humoralen Immunabwehr, an Akutphasenreaktionen sowie der Chemoattraktion von Lymphozyten und Granulozyten beteiligt. Induzierbare K⁺-Kanäle und morphologische Veränderungen begleiten den Übergang von 'ruhender' Mikroglia in sekretorisch und zytotoxisch aktive Phagozyten. Die (verstärkte) Expression von Komplementrezeptor und MHC-II-Komplex steht dabei in Beziehung zur Makrophagenaktivität und potentiellen Antigenpräsentation durch Mikroglia. Mit der Erfassung dieser Parameter stehen somit mehrere 'Aktivierungsreporter' zur Verfügung, die verschiedene Aspekte mikroglialer Funktionen während Störungen der ZNS-Homöostase widerspiegeln.

Zwei experimentelle Ansätze werden gewählt, um die Beteiligung bestimmter Signalelemente (Kinasen, Phosphatasen, Substrate) bei der Umsetzung einer mikroglialen Stimulation in mikrogliale Reaktionen aufzuzeigen:

- Die quantitative bzw. qualitative Charakterisierung des Einflusses spezifischer Enzyminhibitoren (bzw. -aktivatoren) auf die jeweilige mikrogliale Reaktion (z.B. die Freisetzung eines Zytokins, die Induktionsrate für K⁺-Auswärtsströme oder das Auftreten morphologischer Veränderungen der Zellen *in vitro*)
- Der Nachweis von Enzymaktivierungen (Messung von Phosphorylierungsaktivitäten der p38, p42/p44, SAPK/JNK) und die Darstellung aktivierter (phosphorylierter) Molekülformen (z.B. eine Tyr-Phosphorylierung der JAK1 oder des STAT5).

Als zentrale Fragen werden formuliert:

- Welche (Haupt)Kaskaden und Komponenten der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Systeme sind an der Aktivierung mikroglialer Reaktionen durch ausgewählte Stimuli (LPS, PCW) bevorzugt oder gleichzeitig beteiligt
- Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Signalgeschehen lassen sich bei mikroglialer Aktivierung durch Modellsubstanzen Gram-negativer (LPS) und Gram-positiver (PCW) Bakterien darstellen
- Werden charakteristische induzierbare Mikrogliafunktionen und Aktivierungsmarker, wie Zytokinfreisetzung oder K⁺-Auswärtsströme, über gekoppelte Signalmechanismen oder separat reguliert
- Wie wird der Signalweg und der output eines gegebenen Stimulus (LPS, PCW) durch weitere Rezeptoraktivierungen (LPS bzw. PCW, IL-1, TNF α , IFN γ) moduliert

- Inwieweit, für welche Substanzen und in welcher kausalen Beziehung bedingen mikrogliale Sekretion von Zytokinen und Ionenkanalexpression einander
- Lassen sich bestimmte exekutive Leistungen (Sekretion) oder Aktivierungskonsequenzen selektiv unterbinden

3.5.2 Methoden

Kulturen und Gewebe

Grundlage der Arbeiten *in vitro* sind die in unserem Labor routinemäßig hergestellten Mikroglia-Primärkulturen von NMRI-Mäusen verschiedener Entwicklungsstufen (P0, E14), wobei zunächst Kulturen aus P0-Gehirnen (neugeborener Tiere) als Standardsystem verwendet werden sollen (siehe Abschnitt 3.4). Dazu werden die Zellen auf Deckgläschen angesiedelt (50.000 Zellen pro Glas) oder in 96-Well-Platten bzw. Petrischalen ausgebracht (10.000 Zellen pro well bzw. 3 bis 6×10^6 Zellen pro Schale). Zu einem späteren Zeitpunkt ist auch der Einsatz von Kulturen vorgesehen, die sich von embryonalen Mäusen (Gestationstag E14) oder Mäusestämmen/mutanten mit defekten Rezeptor- bzw. Effektorcomponenten ableiten (z.B. SCID- oder LPS-resistente C3H/HeJ-Mäuse), um entwicklungsabhängige Unterschiede bei der Aktivierung von Mikroglia bzw. Unterschiede zwischen LPS- und PCW-vermittelter Aktivierung zu charakterisieren. Hirn- bzw. Milzgewebekomponenten für molekulare Nachweise (Positivkontrollen) bzw. entsprechende Gewebeschnitte werden von perfundierten (blutfreien) bzw. perfusionsfixierten Tieren präpariert.

Mikrogliastimulationen

Als Modelle zur Aktivierung von Mikroglia in Kultur werden LPS (*E.coli* K-235, Sigma, als Modell für den Kontakt von Mikroglia mit Gram-negativen Bakterien) und gereinigte, nicht-infektiöse Zellwand-Präparationen (PCW) von *Streptococcus pneumoniae* (Stamm PnR-527, Arbeitsgruppe von Dr. Jörg Weber, Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, als Modell für ZNS-Infektionen mit Gram-positiven Keimen) verwendet. Rekombinantes Maus-TNF α , -IL1 β und -IFN γ (R & D Systems; Pharmingen) werden als Kostimuli bzw. Modulatoren der LPS/PCW-Stimulation eingesetzt. Diese Modelle sind in unserem Labor etabliert (siehe auch Draheim et al. in Abschnitt 3.4).

Dabei sind wir uns des Umstandes bewußt, daß Mikroglia in Kultur kein Modell für 'ruhende' Mikroglia *per se* sein kann und daß mit einer Stimulation dieser Zellen *in vitro* nicht die volle Kaskade bzw. alle Stufen einer mikroglialen Transformation erfaßt werden können. Allerdings haben auch eigene Arbeiten im Vorfeld gezeigt, daß eine ansonsten unbehandelte Mikroglia-Präparation unter unseren Kulturbedingungen keine Zytokine freisetzt oder Expression von K⁺-Auswärtsströmen aufweist und daß diese Aktivierungsmarker einer Stimulation durch LPS oder PCW (a) bedürfen und (b) zugänglich sind.

Nach einer Behandlung mit LPS und PCW werden die stimulierten und Kontroll-Zellen elektrophysiologisch auf die Induktion von Ionenkanälen hin vermessen bzw. Sekretionsprodukte und induzierte Proteine im Überstand bzw. im Zellaufschluß mittels ELISA oder Immunpräzipitation bestimmt. Alternativ werden Zellen, die auf Deckgläschen ausgebracht waren, immunzytochemisch aufgearbeitet und mikroskopisch untersucht. LPS wird in Dosen zwischen 10^{-10} und 10^{-5} g/ml eingesetzt (Standardkonzentration 100 ng/ml). PCW wird ausgehend von einer Stammpräparation von 10^7 CFU/ml in Verdünnungen von 1:25 bis 1:400 eingesetzt (Standardverdünnung 1:50). Kostimulationen mit TNF α , IL-1 β oder IFN γ werden bei Zyto-

konzentrationen zwischen 0.1 und 100 ng/ml ausgeführt. Stimulationen sollen durch Zugabe der betreffenden Substanzen zum Kulturmedium im Zeitbereich von ≤ 1 bis zu 48 h ausgeführt werden (Standardstimulationen für 6, 12 und 24 h). Bei kurzzeitiger Stimulation wird das Medium nach der entsprechenden Stimulationsphase abgenommen, die Zellen mit frischem Medium gewaschen und anschließend frisches Medium zur weiteren Inkubation zugesetzt. (Insbesondere bei Kostimulationsexperimenten und nachfolgender Bestimmung von Zytokinfreisetzung wird durch die Trennung von Stimulations- und 'Sammel'-Phase gewährleistet, daß die Messung nicht durch das zugesetzte Zytokin selbst beeinflusst wird.) Als Kontrollen dienen jeweils unbehandelte Kulturen.

Messung von Zytokinfreisetzungen

Zytokinfreisetzungen werden in Zellüberstandsproben bestimmt, die zu definierten Zeitpunkten während oder nach einer Stimulation bzw. Behandlung der Zellen mit LPS, PCW oder Zytokinen entnommen wurden. Zytokininduktionen werden außerdem in Lysaten von Mikrogliazellen gemessen. Zytokinbestimmungen in Zellüberständen und Lysaten werden unter Verwendung von hochsensitiven ELISA-Systemen mit Mauszytokinen als Standard vorgenommen (siehe Abschnitt 3.4). Für die Bestimmung von $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-12 sowie KC und MIPs stehen einerseits kommerzielle Kits (R & D Systems, Biosource, Genzyme), andererseits ELISA-fähige Antikörperpaare und Standards (R & D Systems, Biosource) zur Verfügung. In ausgewählten Fällen, bei denen noch keine ELISAs für Mausprotein erhältlich sind (z.B. bei IL-1ra) oder die Freisetzung nur in geringsten Mengen erfolgt (molekulare Formen des IL-12), werden die entsprechenden Komponenten über Immunpräzipitation dargestellt. Immunpräzipitationen werden ebenfalls zur Unterscheidung molekularer Formen des IL-12 (p35/70, p40, p40₂) angewandt. Gesamtzellproteine werden über die BCA-Proteinbestimmung gemessen.

Molekulare Nachweise von Proteinen und ihrer mRNA

Ausgewählte Proteine (wie molekulare Formen des IL-12, IL-1ra, JAKs, p42/p44^{MAPK}, STATs) werden aus Überständen oder Zell-Lysaten stimulierter Kulturen (bzw. aus Gewebekomogenaten für Positivkontrollen) mittels Immunpräzipitation isoliert, nachfolgend in SDS-PAGE aufgetrennt und über Western-Blot-Detektion und hochsensitive ECL (Pierce Ultra-Signal) nachgewiesen. Die experimentellen Voraussetzungen dafür sind in unserem Labor gegeben und fanden bereits Anwendung bei der Darstellung des mikroglialen IL-2/IL-15-Rezeptorsystems sowie beim Nachweis einer IL-15-induzierten JAK1-Aktivierung in Mausmikroglia (siehe Hanisch et al., 1997a, in Abschnitt 3.4). Proteinphosphorylierungen können unter Verwendung von Antikörpern gegen PTyr, P_{Ser} oder P_{Thr} nachgewiesen werden. Inzwischen stehen auch Antikörper zur Verfügung, die phosphorylierte Aminosäurereste sequenzabhängig erkennen und damit eine Unterscheidung von MAPK-Klassen oder aktivierten Molekülformen (zweifach phosphorylierte p42^{MAPK}/p44^{MAPK}) zulassen. RNA wird in unserem Labor über RT-PCR-Techniken nachgewiesen. Wie im Abschnitt 3.4 beschrieben, sind in unserem Labor die technischen Voraussetzungen gegeben, mRNA auch auf Einzelzellniveau nachzuweisen. Dazu wird mRNA aus elektrophysiologisch identifizierten Zellen über die Patch-Pipette isoliert, sofort in cDNA umkopiert und über ineinandergeschachtelte ('nested' oder 'semi-nested') Primerpaare in zwei RT-PCR-Stufen amplifiziert (Hanisch et al., 1997a; Prinz et al., Abschnitt 3.4).

Messung von Kinaseaktivitäten

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten mikroglialer p38, p42^{MAPK}/p44^{MAPK} und SAPK/JNK nach Stimulation der Kulturen mit LPS, PCW und/oder TNF α , IL-1 β und IFN γ werden kommerzielle Assaysysteme (New England BioLabs) auf der Grundlage von Substratphosphorylierung und Immunoblotnachweis eingesetzt.

Manipulationen von Enzymen und Komponenten der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden

Die Beteiligung von Komponenten der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden sowie nahestehender Enzyme an der Mikrogliaaktivierung wird mittels gezielter pharmakologischer Intervention charakterisiert. Dafür steht eine breite Palette potenter niedermolekularer und membranpermeabler Inhibitoren und Aktivatoren zur Verfügung, die (teilweise konzentrationsabhängig) Spezifität für bestimmte Enzyme oder Enzymklassen aufweisen, wie p42^{MAPK}, p38, SAPKs oder inzwischen auch JAKs. Ebenso stehen Modulatoren für Proteinphosphatasen verschiedener Typen bereit (Tabelle 1). Dazu wird der betreffende Inhibitor bzw. Aktivator in (a) verschiedenen Konzentrationen und über (b) variierende Zeiträume Mikroglia-kulturen zugesetzt, bevor, während oder nachdem die Zellen mit LPS und PCW (in Gegenwart oder Abwesenheit weiterer Kostimuli) behandelt werden/wurden. Nachfolgend werden in den Kulturüberständen (bzw. Zell-Lysaten) synthetisierte bzw. sezernierte Zytokinmengen bestimmt oder die Zellen elektrophysiologischen oder morphologischen Charakterisierungen unterzogen. Die pharmakologischen Manipulationen sollen zu einem späteren Zeitpunkt durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden zur Unterdrückung einzelner Enzymaktivitäten bereichert werden. Ebenfalls vorgesehen ist - in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Regina Reszka - rekombinante, voraktivierte Enzyme (z.B. p42^{MAPK}, phosphoryliert) über lysosomale Verkapselung in kultivierte Mikrogliazellen einzubringen, um damit eine Signalkaskade mehr distal vom Rezeptor zu aktivieren. Manipulationen des LPS-Rezeptors (CD14) werden mit spezifischen (inhibierenden) Antikörpern vorgenommen (z.B. My4), um dessen Beitrag an PCW-auslösbaren Signalereignissen und Mikrogliaereaktionen zu bestimmen. Darüber hinaus ist für eine spätere Etappe des Projekts der Einsatz von Zellkulturen geplant, die sich von Mäusen mit genetisch bedingten Defekten ableiten (z.B. C3H/HeJ-Maus).

Tabelle 1: Ausgewählte Kinase- und Phosphataseinhibitoren und -aktivatoren

Inhibitor/Aktivator* für	Name der Verbindung	Bevorzugter Angriff auf
PTK	Aminogenistein	p56 ^{lck}
	Genistein	
	Orthovanadat	
	PP1	p56 ^{lck} , JAK2
	Tyrphostin A25	
	Tyrphostin AG1288	p42 ^{MAPK}
	Tyrphostin B42	JAK2

MAPK	Apigenin	p44 ^{MAPK}
	SB 202190	p38
	SB 203580	p38
MAPK*	Anandamid	
MAPKK	PD 98059	
PI3K	Wortmannin	
PP	α -Naphthylacidphosphat	
	Tautomycin	PP1>PP2A>PP2B
	Calyculin A	PP2A
	Cypermethrin	PP2B
PP*	NAc-D-Erythrosphingosin	PP2A
PTP	Dephostatin	
	mpV	

MAPK, mitogen activated protein kinase; MAPKK, MAPK-Kinase; PP, Proteinphosphatasen; PTK, Proteintyrosinkinase; PTP, Proteintyrosinphosphatasen

Elektrophysiologie

Die LPS-, PCW- und IFN γ -vermittelte Aktivierung von K⁺-Kanälen in kultivierter Mikroglia wird über die patch clamp-Technik im whole cell-Modus bestimmt (Hanisch et al., 1997a; Prinz et al., Abschnitt 3.4). Dabei wird die aktivierungsabhängige Induktion von K⁺-Kanälen des Typs Kv1.3 als Prozentsatz der Zellen mit dieser Leitfähigkeit pro Gesamtzahl untersuchter Zellen gemessen. Zusätzlich kann, wie kürzlich beschrieben (Draheim et al., Abschnitt 3.4), aus dem Stromprofil der Zellen die LPS- und PCW-induzierte Reduktion der Amplitude des K⁺-Einwärtsstromes als elektrophysiologischer Parameter bestimmt werden.

Morphologie und Nachweis von Zelloberflächenantigenen

Die aktivierungsabhängige Expressionen von Zelloberflächenantigenen sowie Darstellungen der Mikroglia selbst werden über geeignete immunzytochemische Verfahren bzw. Lektinfärbung nach Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung vorgenommen, wie sie als Standardtechniken im Labor etabliert sind (siehe auch Draheim et al., Abschnitt 3.4). Die Untersuchung charakteristischer Veränderungen der mikroglialen Zellmorphologie, wie sie nach LPS- und PCW-Stimulationen zu beobachten sind, wird an Kulturen vorgenommen, die mit fluoreszenzmarkierten *Griffonia simplicifolia*-Isolektin B4 gefärbt sind. Als Oberflächenmoleküle mit aktivierungsinduzierter Expression werden in diesem Projekt der Komplementrezeptor 3 und das MHC-II-Antigen berücksichtigt. Entsprechende Färbungen erfolgen mit Primärantikörpern, die anschließend mittels fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper visualisiert werden (Hanisch et al., 1997b, Abschnitt 3.4).

Mikrogliale Motilität, Phagozytose und NO-Produktion

Als weitere mikrogliale Reaktionen auf Stimulation können in unserem Labor Motilität und Phagozytose von Zellen gemessen werden. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Christiane Nolte besteht am MDC die Möglichkeit, Veränderungen im Motilitäts- und Phagozytoseverhalten der Mikroglia über computergestützte Videomikroskopie zu messen. Zur Messung von NO-Freisetzung durch Mikroglia wird routinemäßig die Nitritbestimmung nach Griess eingesetzt (Hanisch et al., 1997a; Abschnitt 3.4). Neben der Zytokinfreisetzung, der Induktion von K^+ -Kanälen, morphologischen Veränderungen bzw. erhöhter Expression von Oberflächenmarkern könnte gegebenenfalls das Projekt um diese exekutiven Mikroglialeistungen erweitert werden.

Tierversuche

Die im Teilprojekt zu einem späteren Zeitpunkt vorgesehenen Arbeiten zur Beeinflussung der Mikrogliaaktivierung *in vivo* während einer experimentell induzierten Meningitis im Ratten-Modell werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jörg Weber, Neurologische Klinik der Charité, Humboldt-Universität Berlin (Teilprojekt B6) ausgeführt. Für diese Tierversuche liegt eine behördliche Genehmigung vor. Darüber hinaus werden im eigenen Teilprojekt keine Tierversuche vorgenommen.

3.5.3 Arbeitsprogramm

Rolle der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden bei der induzierten Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen

In etablierten Stimulationsexperimenten werden kultivierte Maus-Mikrogliazellen bis zu 48 Stunden mit entweder LPS (als Modell Gram-negativer Infektionen) oder PCW (als Modell Gram-positiver Infektionen) verschiedener Konzentrationen behandelt. Zu bestimmten Zeiten werden Proben der Überstände gesammelt bzw. die Zellen selbst aufgeschlossen. In den Überständen und Lysaten werden dann synthetisierte bzw. sezernierte Zytokine und Chemokine vermessen. Wie sich aus den Vorarbeiten zu diesem Projekt ableitet, wird durch beide bakterielle Zellwandpräparationen die mikrogliale Freisetzung von $TNF\alpha$, IL-6, IL-12, KC, MIP-1 α und MIP-2 induziert. Diese Zytokine und Chemokine werden daher als zentrale 'Reporter' mikroglialer Zytokin/Chemokinfreisetzung untersucht.

Neben einer Erfassung des qualitativen Zytokin/Chemokinmusters nach LPS- und PCW-Stimulation soll die über ELISA quantifizierbare Freisetzung der 'Reporterzytokine' dazu herangezogen werden, den Einfluß von Inhibitoren oder Aktivatoren der Kinasen und Phosphatasen des JAK/STAT- und ERK/MAPK-Systems zu untersuchen. Es wird letztlich mit diesen Experimenten angestrebt, herauszufinden, welche Hauptbahnen und Komponenten der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Pathways durch die verschiedenen Stimuli bei der Induktion eines jeweiligen Zytokins oder Chemokins benutzt werden. Dazu werden Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Kombinationen dieser Modulatoren (Tabelle 1) stimuliert und der Release an Zytokinen/Chemokinen mit dem der unbehandelten Zellen verglichen. Neben der Zugabe von Hemmern und Aktivatoren von Kinasen oder Phosphatasen können auf diese Weise auch andere Interventionsansätze und Manipulationen ausgeführt werden: (a) der Zusatz von $TNF\alpha$, IL-1 β und $IFN\gamma$, die *in vivo* bei bakteriellen Infektionen, Entzündungen

oder nach Trauma ebenfalls auf (aktivierte) Mikrogliazellen einwirken, (b) der Einsatz rezeptorblockierender Antikörper, (c) die Verwendung verschiedener Kulturmedien zur Untersuchung der Beteiligung von Serumfaktoren bei LPS- und PCW-Stimulation oder (d) die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden zur Unterdrückung der Expression bestimmter Enzyme. In einem späteren Abschnitt des Projektes soll so auch eine liposomale Beschickung von Kulturen mit aktivierten Signalelementen (z.B. phosphorylierte ERKs) vorgenommen werden.

Rolle der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden bei der induzierten Expression von K^+ -Auswärtsströmen

Als weiterer, quantifizierbarer Aktivierungsmarker der Mikroglia wird - neben der Zytokin/Chemokinfreisetzung - die Induktion von K^+ -Auswärtsströmen durch bakterielle Zellwandbestandteile untersucht. Diese durch LPS, PCW und $IFN\gamma$ induzierbaren Leitfähigkeiten sollen dabei, wie die Zytokinfreisetzung, als 'Reporter' herangezogen werden, um die Beteiligung von Signalelementen der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden an der Aktivierung von Mikroglia zu charakterisieren. Vergleichende pharmakologische und biochemische Interventionsexperimente mit Inhibitoren und Aktivatoren (Tabelle 1) sollen dabei zeigen, inwieweit verschiedene exekutive Leistungen der Mikroglia, die von ein und demselben Stimulus ausgelöst werden, auch über einheitliche (oder separate) Signalwege gesteuert werden. Mikrogliazellen werden dazu - wie beschrieben - mit LPS und PCW in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Inhibitoren oder Modulatoren stimuliert. Anschließend werden die Induktionsraten für K^+ -Auswärtsströme über patch clamp-Analysen bestimmt (Draheim et al., Abschnitt 3.4). Neben der Induktion von Auswärtsströmen kann auf diese Weise gleichzeitig der Effekt auf die LPS- und PCW-vermittelte Reduktion der K^+ -Einwärtsstromamplitude bestimmt werden.

Mikrogliale Expression und Aktivierung molekularer Komponenten der JAK/STAT und ERK/MAPK-Kaskaden

Bei einigen Komponenten des JAK/STAT-Systems kann nicht automatisch von einer ubiquitären Expression ausgegangen werden (z.B. JAK3). In Fortführung eigener Vorarbeiten soll daher zunächst die mikrogliale Expression von Proteintyrosinkinasen der JAK-Familie (JAK1-JAK3) und ihrer spezifischen Substrate vom STAT-Typ (STAT1, -2, -3, -4, -5A, -5B und -6) mittels RT-PCR (auch auf Einzelzellniveau) und Immunpräzipitation/Western-Blot untersucht werden. Es ist vorgesehen, parallel dazu Nachweise auch in (blutfreien) Hirngewebeextrakten bzw. - als Kontrollen - in Milzgewebeproben vorzunehmen.

Etablierte Nachweisprotokolle sollen dann nachfolgend dazu eingesetzt werden, die aktivierungsabhängige (LPS- bzw. PCW-induzierte) Ser-, Thr- oder Tyr-Phosphorylierung von Molekülen der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden mittels Immunpräzipitation und Western-Blot zu charakterisieren. Für diese Arbeiten stehen eine Reihe von geeigneten Antikörpern zur Verfügung (Santa Cruz).

Eine LPS- bzw. PCW-vermittelte Veränderung der Enzymaktivität von p38, p42/p44^{MAPK} und SAPK/JNK in Mikroglia soll über Assaysysteme gemessen werden, die auf der spezifischen Phosphorylierung entsprechender Modellssubstrate und deren anschließende Darstellung in SDS-PAGE/Western-Blot beruhen.

Rolle induzierter K^+ -Auswärtsströme für Zytokin- und Chemokinfreisetzungen

In diesem Teil soll geprüft werden, ob die Induktion der K^+ -Auswärtsströme in einem Zusammenhang mit zeitlich nachfolgenden Zytokin- oder Chemokinfreisetzungen steht. Die von uns in Vorarbeiten charakterisierten K^+ -Auswärtsströme stehen pharmakologisch den Kv1.3-Kanälen der *shaker*-Familie nahe und lassen sich sehr effektiv durch Margatoxin (Mtx) inhibieren. In Releaseexperimenten zum mikroglialen KC (bzw. zu MIPs), deren Freisetzung in großer Menge erst Stunden nach der Induktion der K^+ -Leitfähigkeiten erfolgt, soll daher der Einfluß einer Kanalblockade durch Mtx erfaßt werden.

Rolle der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden bei induzierten Veränderungen der Zellmorphologie und Expression von Zelloberflächenantigenen

Mikrogliazellen können eine enorme Vielfalt von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren synthetisieren, insbesondere nach Aktivierung. Dazu zählen Histokompatibilitätsantigene, wie MHC I und II (major histocompatibility complex I und II bei der Maus), Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1 und ICAM-1 (lymphocyte function-associated antigen 1, intercellular adhesion molecule-1), die Interaktionen mit Lymphozyten, einschließlich Antigenpräsentation erlauben, aber auch Fc-Rezeptoren (FcR) für Immunglobuline (Ig) und Rezeptoren für Komplementprotein, die einen zytotoxischen Angriff durch Mikroglia vermitteln können. Ähnlich den experimentellen Ansätzen zur induzierten Zytokinfreisetzung bzw. Ionenkanalinduktion sollen dazu Experimente vorgenommen werden, bei denen die Expression des Komplementrezeptors 3 bzw. des MHC-II-Antigens nach LPS- und PCW-Behandlung bestimmt wird. Stimulationen in Gegenwart von Inhibitoren der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden sollen klären helfen, inwieweit und wie diese Signalsysteme an der evozierten Expression von Mikrogliazellen beteiligt sind.

Die charakteristischen zellmorphologischen Veränderungen, die bei einer Aktivierung der Mikroglia auftreten, werden ebenfalls als 'Reporterreaktion' untersucht. Dazu werden mikrogliaspezifische Oberflächenzucker mit einem fluoreszenzmarkierten Lektin angefärbt und das mikroskopische Erscheinungsbild unbehandelter und stimulierter Zellen verglichen (Draheim et al., Abschnitt 3.4).

Rolle der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden bei der induzierten Steigerung mikroglialer Motilität, Phagozytoseleistung und NO-Freisetzung

Motilität kann als wichtige Voraussetzung für einige Mikrogliafunktionen angesehen werden, da sich die Zellen aktiv, beispielsweise zu einem Läsions- oder Entzündungsort bewegen müssen. Als Phagozyten spielen Mikrogliazellen sowohl während der Entwicklung des ZNS (z.B. bei der Reifung neuronaler Verschaltungen und der Beseitigung überschüssiger Axone), beim Hirntrauma (z.B. durch Beteiligung an Glianarben oder der Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix), als auch bei pathologischen Veränderungen (z.B. bei Ischämie, Multipler Sklerose, der Alzheimerschen Krankheit oder HIV-1-Infektionen) eine Rolle. Zu den bekannten löslichen Faktoren, die von Mikrogliazellen sezerniert werden, zählen neben Zytokinen, Proteasen, Proteaseinhibitoren, Komplementprotein, Fibronectin, Prostaglandinen und Leukotrienen auch freie Radikale und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, wie O_2^- , H_2O_2 oder NO. Die massive Freisetzung dieser Substanzen und großer Mengen des exzitatorischen Transmitters Glutamat wird direkt in Verbindung gebracht mit dem ausgeprägten zytotoxischen Potential aktivierter Mikroglia.

Motilität, Phagozytose und NO-Produktion sind damit wichtige, aktivierungsabhängige Mikrogliafunktionen, deren Kontrolle durch JAK/STAT- und ERK/MAPK-Kaskaden ebenfalls weitgehend unbekannt ist. Hier bestünden für das Projekt zusätzliche Erweiterungs- und Kombinationsmöglichkeiten. Es ist daher vorgesehen, in Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern am MDC Berlin gegebenenfalls und zumindest erste Experimente zu diesen Aspekten auszuführen.

3.5.4 Zeitplan

Die Arbeiten am Projekt werden sich zunächst auf die Stimulation der Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch bakterielle Zellwandbestandteile und die Beteiligung einzelner Phosphorylierungskaskaden konzentrieren (Einfluß von Inhibitoren und Aktivatoren auf Kinasen und Phosphatasen der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Systeme). Parallel dazu werden Untersuchungen zur LPS- und PCW-aktivierbaren Expression der K^+ -Auswärtsströme (und Effekte auf K^+ -Einwärtsströme) durchgeführt, die den Ergebnissen zum Release gegenübergestellt werden sollen. Morphologische Charakterisierungen werden diese Experimente begleiten.

In einem zweiten Abschnitt konzentrieren sich die Arbeiten auf die Bestimmung von Enzymaktivierungen (p38, p42/p44^{MAPK}, SAPK/JNK) und den molekularen Nachweis einzelner Komponenten der JAK/STAT- und ERK/MAPK-Systeme nach mikroglialer Stimulation. Für diesen Teilabschnitt sind auch die Experimente zur Aktivierung von Mikroglia durch verkapselte, voraktivierte Kinasen sowie Arbeiten an embryonalen Kulturen und Kulturen von LPS-resistenten Mäusen vorgesehen.

Im letzten Teil sollen die Untersuchungen zum Signalgeschehen gegebenenfalls auf weitere mikrogliale Leistungen und Reaktionen, wie die Veränderungen in Motilität und Phagozytoseaktivität bzw. die Freisetzung von NO, ausgedehnt werden.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereiches

Enge Zusammenarbeit ist räumlich, methodisch, gerätetechnisch und inhaltlich mit den Projekten B1 und B6 vorgesehen. Mit den Trägern dieser Projekte besteht bereits eine intensive Kooperation auf verschiedensten Gebieten. Ein von der Arbeitsgruppe Dr. Weber an der Charité zu Berlin etabliertes Tiermodell zur experimentellen Meningitis wird in Zusammenarbeit bereits zur Testung des *in vivo*-Effektes von Kinase-Inhibitoren herangezogen, die in eigenen *in vitro*-Experimenten potente und selektive Effekte bei der Unterdrückung mikroglialer Zytokinfreisetzung zeigten. Ergebnisse, die sich aus dem geplanten Projekt ableiten, sollen künftig auch in dieser Form umgesetzt werden.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
-	-	BAT Va/b	1	30600	BAT Va/b	1	61200	BAT Va/b	1	61200	BAT Va/b	1	30600
zusammen		zus.	1	30600	zus.	1	61200	zus.	1	61200	zus.	1	30600
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		12500	522		25000	522		25000	522		12500
		zusammen		12500	zusammen		25000	zusammen		25000	zusammen		12500
I		Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		0			0			0			0		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs:

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Hanisch, Uwe-Karsten, Dr.	Biochemie/ Neuro- biologie/ Neuroimmunologie	MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	20	-	BAT IIa
	Kirchhoff, Frank, Dr.	Biochemie/ Neuro- biologie/ Molekularbiologie	MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	3-5	-	BAT IIa
	Siehe auch 3.7.1.1!					
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Müller, Gerda	Zellkulturen	MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	8	-	BAT IVb
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	-	-	-	-	-	-
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Vogel, Anke*	Biochemie/ Neurobiologie	MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	40	-	BAT Vb

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Dr. Uwe-Karsten Hanisch wird als Leiter des Projektes vorgesehen. Als Antragsteller ist er am MDC Berlin in der AG Zelluläre Neurowissenschaften angestellt.

Dr. Frank Kirchhoff, ebenfalls in dieser Abteilung angestellt, wird an den molekularbiologischen Aspekten (RT-PCR-Analysen) des Projektes mitarbeiten. Mit Herrn Kirchhoff besteht schon seit einiger Zeit eine enge Zusammenarbeit (siehe auch Hanisch et al., 1997a; Prinz et al., Abschnitt 3.4).

Für Mitte des Jahres 1998 ist geplant, daß Herr **Georg Häusler**, zur Zeit Medizinstudent im 4. Jahr, in der AG Zelluläre Neurowissenschaften die Arbeiten an einer Doktorarbeit aufnimmt. Herr Häusler ist sehr an der Fragestellung des vorliegenden Projektes interessiert und würde das Thema seiner Promotion in diesem Gebiet ansiedeln (Mikrogliaaktivierung, Signalkaskaden). Herr Häusler beantragt daher die vorübergehende Freistellung vom Medizinstudium für den Zeitraum eines Jahres.

Neben Herrn Häusler wird zur Zeit auch mit Herrn **Panagiotis Fakitsas**, Biochemiestudent an der Universität Hannover, die Möglichkeit verhandelt, in der Abteilung eine Doktorarbeit zu einem proteinchemischen und/oder molekularbiologischen Thema anzufertigen. Herr Fakitsas hatte schon ein mehrwöchiges Praktikum in der Abteilung absolviert und danach den Wunsch ausgesprochen, in diesem Labor, voraussichtlich mit Ende 1998, die Arbeiten zur Promotion aufzunehmen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

In diesem Projekt ist die Mitarbeit von Frau **Gerda Müller** vorgesehen. Frau Müller besitzt umfangreiche Erfahrungen bei der Präparation von Zellkulturen. Sie wird die entsprechenden Arbeiten innerhalb des Projektes absichern.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung

In diesem Projekt ist vorerst keine Mitarbeit durch wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung vorgesehen.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung (BAT Va/b)

Frau **Anke Vogel** ist als erfahrene technische Assistentin der AG Zelluläre Neurowissenschaften am MDC mit ELISA-Arbeiten und Zellkulturen vertraut. Im Projekt würde sie große Teile der Stimulationsexperimente, Zytokinbestimmungen und Western-Blot-Analysen praktisch übernehmen und selbstständig ausführen.

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	5000	10000	10000	5000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt				
Verbrauchsmittel (522)	11000	22000	22000	11000
Versuchstiere (522)	1500	3000	3000	1500

Kleingeräte (515)

Eine Anschaffung von Kleingeräten aus Mitteln des Teilprojekts ist nicht erforderlich.

Verbrauchsmittel und Versuchstiere (522)

Die geplanten Arbeiten im Teilprojekt sind stark molekular(biologisch) ausgerichtet. Der vorgesehene Einsatz von insbesondere ELISA-Kits, Antikörpern und Oligonukleotiden erfordert einen Sachmittelbedarf von DM 22000.-- pro Jahr, aufgegliedert wie folgt:

	DM/Jahr
Antikörper, primäre (Proteinanalytik, Inhibition, Immunhistochemie)	3000
ELISA	8000
Oligonukleotide	1000
Reagenzien für Immunhistochemie	1000
Reagenzien für Enzyminhibition und -aktivierung	2000
Reagenzien für Proteinanalytik	2000
Reagenzien für RNA-Analytik	1000
Reagenzien für Zellkulturen	1000
Rekombinante Proteine (Chemokine, Zytokine, Enzyme)	3000
	22000

Für die Bestimmung einiger Zytokine (z.B. IL-6, TNF α) über ELISA liegen kostengünstige Angebote einzelner Firmen vor, bei denen Substanzen in größeren Mengen zum Selbstaufbau der entsprechenden Assays abgegeben werden.

Versuchstiere, soweit sie aus Mitteln des Teilprojektes finanziert werden sollen, sind hauptsächlich für die Herstellung von Zellkulturen (Mikroglia, Maus) vorgesehen. Pro Ansatz wer-

den dabei 15 Tiere benötigt, mit 20 geplanten Präparationen pro Jahr. Als Standardmodell dient die NMRI-Maus, P0 (Tierzucht Schönweide), mit einem Kaufpreis von ca. DM 2.50/Tier, wobei Haltungskosten entfallen. Für Experimente, bei denen besondere Mäusestämme benötigt werden (z.B. die LPS-resistente C3H/HeJ-Maus), wird ein Kaufpreis von ca. DM 30.-- veranschlagt, mit 5 Präparation á 15 Tieren pro Jahr.

Versuchstiere

3000

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B5

3.1.1 Thema:

"In vivo MR-Bildgebung der aktivierten Mikroglia bei experimentellen Gliomen"

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neuroradiologie, MR-Bildgebung, Neuroonkologie

3.1.3 Leiter:

Dr. med. Claus Zimmer
Institut für Röntgendiagnostik der Charité
Humboldt-Universität zu Berlin,
Schumannstr. 20-21,
D - 10098 Berlin.
Telefon: 030 - 2802-3330;
Fax: 030 - 2802-5042;
email: zimmer@rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

nein ja, befristet bis zum : 29.2.2002

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen ja nein
- klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie ja nein
- Tierversuche ja nein
- gentechnologische Versuche ja nein

3.1.6 Beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998	19,8	30,0	-	49,8
1999	36,9	21	-	57,9
2000	36,9	21	-	57,9
1. Hj. 2001	19,8	10,5	-	30,3

3.2 Zusammenfassung

Ruhende Mikroglia im Gehirn wird bereits durch den geringsten pathologischen Reiz stimuliert und so in die aktivierte Form transformiert. Obwohl aktivierte Mikroglia ein äußerst empfindlicher "Sensor" für pathologische Prozesse innerhalb des Gehirns ist, gibt es zur Zeit keine Möglichkeiten mit bildgebenden Methoden Mikroglia *in vivo* darzustellen und ihre zelluläre Aktivität unter pathologischen Bedingungen zu erfassen. Ein wesentliches Charakteristikum von Mikroglia im aktivierten Stadium im Gegensatz zur ruhenden Mikroglia ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose.

Im geplanten Projekt soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit i.v. injizierte und in das Gehirn gelangte paramagnetische Partikel unter pathologischen Bedingungen von Mikroglia aufgenommen werden und zu charakteristischen Signalveränderungen in der MRT führen. Im speziellen soll zunächst durch *in vitro* Untersuchungen das spezifische Bindungsverhalten von Eisenoxidpartikeln an Mikrogliazellen unterschiedlichen Aktivierungsgrades und an anderen phagozytierenden Zellen des Gehirns (Astrozyten, Oligodendrozyten) untersucht werden. Auch soll überprüft werden, ob die unspezifische intrazelluläre Aufnahme in Mikroglia durch chemische Modifikation der magnetischen Partikel vergrößert werden kann. Anschließend MR-Untersuchungen *in vivo* an einem experimentellen Gliommodell sollen die Frage klären, inwieweit die spezifische MR-Darstellung aktivierter Mikroglia überhaupt möglich ist und wenn, inwieweit diese dann zur Optimierung der Bildgebung von Gliomen praktisch genutzt werden kann. Insbesondere soll überprüft werden, ob eine selektive MR-Mikroglia-Darstellung an der Tumorperipherie eine genauere Demarkierung der Gliome zum umgebenden Hirngewebe erlaubt und ob Mikrogliaaktivierung zeitlich schon frühzeitig eine Tumorzellinvasion in das Hirngewebe ankündigt. Bei erfolgreicher Etablierung der Methode ist vorgesehen, dieses Modell der Bildgebung von Mikroglia auch auf andere Erkrankungen des ZNS (wie Ischämie und Entzündung) zu übertragen, bei denen Mikrogliaaktivierung ebenfalls von besonderer Bedeutung ist.

3.3 Stand der Forschung

Die diffuse Infiltration von verstreuten Tumorzellen in die Tumorumgebung ist ein Charakteristikum von Gliomen und zugleich der Hauptgrund dafür, daß Gliome nicht in toto chirurgisch entfernt werden können. Von den verstreuten infiltrierenden Tumorzellen geht nach

radikaler Tumorexstirpation das neue Tumorstadium aus. Ohne raumfordernde Wirkung zu haben, können solche singulären Tumorzellen bereits zu neurologischen Ausfällen führen, wobei der Mechanismus dafür bislang noch unklar ist (Silbergeld et al., 1990). Eine Visualisierung dieser Tumorbezirke ist bisher *in vivo* nicht möglich.

Die Migration von Gliomzellen erfolgt entlang von vorgegebenen, extrazelluläre Matrix (ECM) - Protein enthaltenden, anatomischen Strukturen wie den myelinisierten Bahnsystemen der weißen Substanz oder vaskulären und leptomeningealen Basalmembranen (Laws et al., Giese et al., 1996a; Giese et al., 1996b). Die Potenz zur Invasion korreliert nicht mit dem Grad der Malignität. Auch niedrig gradige Gliome können häufig diffus infiltrierend wachsen (Guthrie et al., 1990). Neben der Gewebebeschaffenheit der extrazellulären Matrix wird die Gliominvasion zusätzlich auch durch eine enzymatische Beeinflussung des Extrazellulärraumes durch die Tumorzelle selbst begünstigt (Giese et al., 1996). Die Tumorzellinvasion vollzieht sich in drei Stufen: eine Rezeptor vermittelte Adhäsion der Tumorzelle zu Matrixproteinen, die Auflösung der Extrazellulärmatrix durch Metallproteinasen und die Reorganisation der zytoskeletalen Elemente (Liotta 1986). Inwieweit eine Zelle invasive Eigenschaften hat, wird nicht bestimmt durch ein einzelnes Gen oder Protein, sondern ist das Produkt eines Ungleichgewichtes in der Regulierung des existierenden physiologischen Zellprogrammes (Kohn et al., 1995). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, daß insbesondere Zytokine, Proteasen und Adhäsionsmoleküle wie CD 44, transforming growth-factor- β 1, Matrix Metallproteinasen und Integrine von funktioneller Bedeutung bezüglich der Veränderungen der Extrazellulärmatrix sind (Paulus et al., 1995; Paulus et al., 1996; Koochekpour et al., 1995; Friedlander et al., 1996).

Eine Besonderheit des Gehirns bezüglich der Tumorzellinvasion im Vergleich zu anderen Regionen des Körpers stellen die im Gehirn ansässigen Mikrogliazellen dar. Mikroglia-Zellen als immunkompetente Zellen des ZNS werden, wie sich auch experimentell zeigen ließ, von Gliomen aktiviert (Moffett et al., 1997). Aktivierte Mikrogliazellen bilden um die Gliomperipherie eine schmale Randzone, zum Teil infiltrieren sie den Tumor auch. Von Bedeutung ist, daß Mikroglia-Zellen die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMPS) modulieren, denen eine Schlüsselrolle für Invasion und Metastasierung von Tumoren zugeschrieben wird. (Maeda et al. 1996; Yoneda et al., 1997). Ein verändertes Verhältnis von Metalloproteinasen und ihren Gewebseinhibitoren in der Extrazellulärmatrix (TIMPs) ist an der zerebralen Invasion der Gliome beteiligt (Mohanam et al.; 1995, Maidment et al., 1997). Aktivierte Mikroglia-Zellen in der Randzone von Gliomen stören die physiologische, kontrollierte Proteolyse in Richtung einer verstärkten Spaltung der Extrazellulärsubstanz und tragen somit wesentlich zur Gliomausbreitung bei. Interessant ist auch, daß aktivierte Mikroglia durch die Produktion spezifischer Signalmoleküle des Immunsystems wie Zytokine (Interleukine 1-6, Interferone- α/β , - γ , Tumornekrosefaktor u.v.a.) sowie der Expression co-stimulierender Adhäsionsmoleküle (IMAC-1) die Infiltration peripherer T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn stimulieren (Kreutzberg et al., 1996). Durch die dabei wechselseitig ausgelösten immunmodulatorischen Prozesse spielt die Präsenz aktivierter Mikroglia im Hirnparenchym damit die Rolle eines frühzeitigen, empfindlichen Sensors für pathologische Vorgänge innerhalb des Gehirns. (Kettenmann et al., 1996). Dies trifft auch für Gliome zu, wobei davon ausgegangen wird, daß die Mikrogliaaktivierung der eigentlichen Tumorabsiedlung im infiltrierten Hirnparenchym zeitlich vorangeht. Systematische Untersuchungen gibt es dazu jedoch nicht.

Eine exakte Darstellung des Tumorrandes und der genauen Infiltrationszone ist mit zur Zeit verfügbaren Methoden der Bildgebung aus vielerlei Gründen unbefriedigend. In der konventionellen Bildgebung (MRT, CT) besteht ein Gliom aus zwei Fraktionen: der Tumormasse, welche in der MRT meist durch den kontrastmittelanreichernden Teil repräsentiert

wird und andererseits dem infiltrierenden Tumoranteil der gegenwärtig mit keiner bildgebenden Methode visualisiert werden kann. Obwohl dieser infiltrierende Tumoranteil zur Zeit nicht therapierbar ist, ist eine genaue Visualisierung dieses Tumoranteiles schon jetzt unbedingt notwendig: bei der Bestrahlungsplanung von Gliomen ist die Bestimmung der Größenausdehnung dieses Areals von Bedeutung, um nicht gesunde Hirnareale unnötig mitzubestrahlen; im Rahmen von neuen funktionellen MR-Untersuchungen ist die genaue Tumordemarkation wichtig mit der Frage, inwieweit der Tumor in funktionell wichtige Hirnareale hinein wächst. Auch bei neuen, zu entwickelnden und zugleich vielversprechenden Therapieformen (wie zum Beispiel Immuntherapie, Gentherapie und antiangiogenetische Therapie) ist diese Tumorregion von außerordentlicher Bedeutung: hier gilt es, gerade die infiltrierenden Zellen in ihrem Wachstum zu hemmen, da von ihnen das neue Tumorwachstum ausgeht. Dafür ist eine Voraussetzung ihre genaue Visualisierung zuvor. Konventionelle MRT- und CT-Untersuchungen tragen wenig zur Gliomdemarkation bei: anhand von T2-gewichteten MR-Aufnahmen wird die eigentliche Tumorausbreitung meist unterschätzt (van-den-Hauwe et al., 1995). Die Anreicherung nach Kontrastmittelgabe spiegelt die Regionen gestörter Bluthirnschranke wieder, die eigentliche Tumorgrenze kann sowohl innerhalb, meist jedoch außerhalb dieser kontrastmittelmarkierten Region liegen. Auch andere Bildgebungsmethoden wie Diffusions-MR (Eis et al., 1994), PET und SPECT tragen diesbezüglich nicht zur Klärung dieser Fragen bei (Olivero et al., 1995).

Eine potentiell neue Möglichkeit, die Tumorgrenze mittels Bildgebung genauer zu definieren, stellt eine Methode dar, aktivierte Mikroglia selektiv und spezifisch zu visualisieren unter der Vorstellung, daß Mikrogliaaktivierung sowohl zeitlich als auch örtlich eng mit dem Tumorwachstum korreliert. Erste Voruntersuchungen zeigten, daß aktivierte Mikroglia um den Tumor herum i.v. injizierte paramagnetische Eisenpartikel aufnehmen, welche kernspintomographisch sichtbar gemacht werden können. Eisenoxide sind als MR-Kontrastmittel bislang für die selektive Darstellung des RES umfangreich charakterisiert, wo sie im hohen Maße von ortsständigen phagozytierenden Zellen (z.B. Kupferzellen) intrazellulär aufgenommen werden und zu charakteristischen Signalveränderungen dieser Zellen führen. Sie werden klinisch mittlerweile in der Leberdiagnostik eingesetzt, wo sich Eisenoxidpartikel-phagozytierendes normales Lebergewebe von pathologischem, nicht phagozytierendem (z.B. Tumor-) Gewebe abgrenzen läßt (Hamm et al., 1994). Das vorgesehene Projekt soll überprüfen, ob sich ein ähnliches Konzept auch zur Darstellung der Phagozytoseeigenschaften der Mikroglia auf das Gehirn übertragen läßt.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Der wissenschaftliche Schwerpunkt des Antragstellers ist die Neuroonkologie, wobei Gegenstand der Forschung zunächst die molekulare Charakterisierung von menschlichen Hirntumoren war (Zimmer et al., 1991; Grieshammer et al., 1991; Gottschalk et al., 1992; Patt et al., 1992; Zimmer et al., 1992a,b; Gottschalk et al., 1993; Zimmer et al., 1993). Inzwischen steht jetzt die in vivo Charakterisierung von Hirntumoren mittels Bildgebung im Vordergrund des Interesses (Zimmer et al., 1993; Zimmer und Traupe, 1996; Zimmer et al., 1997b)

3.4.1. Vorarbeiten allgemein

a) Tumormodell

Es wurde ein Tiermodell an der Ratte etabliert, welches erlaubt, Gliome experimentell *in vivo* kernspintomographisch zu untersuchen (Zimmer et al., 1995c). Da die Histologie immer als Grundlage für die Interpretationen häufig komplexer MR-Signalveränderungen herangezogen wird, werden Gliomzelllinien benutzt, welche mit dem *Escherichia coli lacZ* Gen transfiziert wurden. Über die β -Galaktosidase Expression der implantierten Tumorzellen kann so - nach einfacher histochemischer Färbung - neoplastische Glia immer eindeutig von reaktiver, nicht neoplastischer Glia histologisch abgegrenzt werden.

b) MR-Mikroskopie

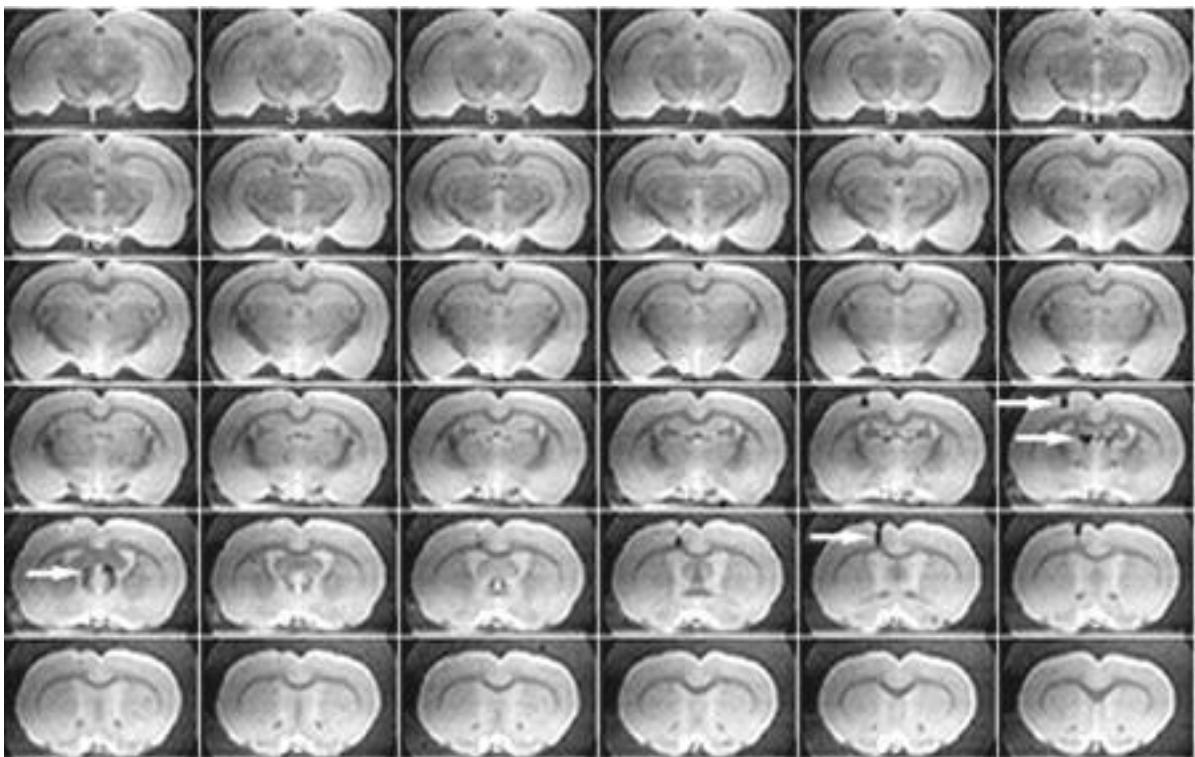


Abb. 1: MR-Mikroskopie eines Rattengehirns nach Injektion von MION (5 μ l) in den Balken. Schnittdicke 78 μ m. 3 D FSE (1000/20)

Es wurden Methoden etabliert, die es erlauben, experimentelle Gliome MR-mikroskopisch hochaufgelöst sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* zu untersuchen (Zimmer et al., 1997). Die Anwendung entsprechender Technologie und geeigneter Pulssequenzen erlaubt es, die Verteilung von superparamagnetischen MR-Markern (MION: Monokristallin Eisenoxid Nanopartikel) im Gewebe bei hoher Auflösung darzustellen und direkt mit der Histologie entsprechender Schnittdicke und Schnittrichtung zu korrelieren (Abb. 1).

c) Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Tumorzellen migrieren hauptsächlich entlang der Basalmembran von Blutgefäßen in das umgebende Gewebe. Solche neu entstandenen Tumormorzellnester haben anfangs noch eine intakte BHS und können deshalb kernspintomographisch auch mit Hilfe von Kontrastmitteln

nicht sichtbar gemacht werden. In diesem Zusammenhang wurden Untersuchungen durchgeführt, in denen der Frage nachgegangen wurde, wie weit pathologisches Gewebe von Kontrastmitteln auch dann markiert werden kann, wenn die BHS zunächst intakt ist. Es konnte gezeigt werden, daß nach artifizieller, temporärer pharmakologischer Öffnung der BHS, Kontrastmittelkonjugate auch zu versprengten sigulären Tumorzellen gelangen, wenn die Blut-hirnschranke intakt ist (Zimmer et al., 1995a; Rainov et al., 1995). Auch mittels eines (Endothelzell) - rezeptorvermittelten Mechanismus (z. B. über Transferin-konjugierte Kontrastmittel) gelingt es, die BHS für Kontrastmittel passierbar zu machen (Zimmer et al., in Vorbereitung).

d) Gene Imaging

Ausgehend von der Beobachtung, daß spezielle MR-Marker von Tumorzellen intrazellulär aufgenommen werden, wurde untersucht, inwieweit diese als Vehikel (Vektor) für den Transport von exogener rDNA in Tumorzellen benutzt werden können und ob gleichzeitig dieser Gen-Transport sich mittels MRT darstellen läßt („MR Imaging of gene delivery“). Zellkulturuntersuchungen belegten eine hohe Transfektion der angewandten PC-10-Zell-Linien nach Inkubation mit Eisenoxid-konjugierter DNA (Bogdanov et al., 1995). In vivo-Untersuchungen ergaben histologisch eine entsprechende Gen-Expression, die sich auch kernspintomographisch mit korrelierenden Signalveränderungen zeigen ließ (Zimmer et al., 1996; Zimmer et al., in preparation). Die Ergebnisse zeigen, daß die in vivo Darstellung auch molekularer Prozesse - bei entsprechender technischer Ausstattung - mit Hilfe der MRT möglich ist.

3.4.2. Unmittelbar projektbezogene Vorarbeiten

Geleistete Vorarbeiten stellen die wesentlichen Grundlagen zum beantragten Projekt dar:

- es konnte gezeigt werden, daß mit geeigneten MR-Methoden bereits kleinste Eisenoxidakkumulationen im Gewebe nachgewiesen werden können, wobei die Nachweisbarkeitsgrenze bei 62 ng Fe/mm' ermittelt wurde (Zimmer et al., 1995a).

- in einer Reihe von Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit normales Hirngewebe und die Gliomzellen selbst in der Blutbahn zirkulierende Eisenoxidpartikel phagozytieren und ob sich dies kernspintomographisch nachweisen läßt. Zellkulturuntersuchungen zeigten eindeutig, daß Gliomzelllinien in hohem Maße Eisenoxide phagozytieren. Quantitativ unterschieden sich verschiedene untersuchte Tumorzelllinien, wobei die Phagozytosepotenz mit dem Malignisierungsgrad korreliert. Einmal intrazellulär aufgenommen, werden die Eisenoxide über das lysosomale Kompartiment intrazellulär abgebaut und in den körpereigenen Eisenpool eingeschleust (Zimmer und Weissleder, 1995b). Die entsprechenden in vivo MR-Untersuchungen an implantierten Tumoren zeigten nach intravenöser Eisenoxidgabe ein charakteristisches ringförmiges Erscheinungsbild der Tumore, wobei sich zellreiches Tumorgewebe mit hoher Eisenoxidablagerung durch einen deutlichen signalarmen Ring in T2 gewichteten Aufnahmen darstellt. Histologisch ließen sich die in vitro Ergebnisse mit einer eindeutigen intrazellulären Aufnahme der Eisenoxide in das Zytoplasma der Tumorzellen bestätigen (Zimmer et al., 1995c). Während in zentralen Tumorbereichen die Eisenoxidaufnahme eher vereinzelt zu finden war, zeigten sich histologisch die höchsten Eisenoxidablagerungen in der Tumorperipherie. Dementsprechend findet man dazu korrelierend, auch kernspintomographisch, hier die stärksten Signalveränderungen in Form eines hypointensen Ringes (Abb. 2). Dies findet seine Erklärung zum einen darin, daß die implantierten Tumoren vom Rand her fächerförmig in der Tumorperipherie am stärksten vaskularisiert sind. Darüber hinaus

spielt aber hier möglicherweise auch die Mikroglia eine wesentliche Rolle, von der bekannt ist, daß sie im Rahmen der Tumorinfiltration ringförmig um den Tumor herum ein schmales Band bildet (Morioka et al., 1992). Die weitere Abklärung dieses Themenkomplexes ist Gegenstand des beantragten Projektes.



Abb. 2: GRASS (TR 100ms, TE 25 ms, 20°). C6-Gliom nach MION-Gabe mit den stärksten Signalveränderungen in der Tumorperipherie

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

Zimmer C, Figols H, Patt S, Cervos-Navarro J: Cytokeratin expression in a congenital multipotential primitive neuroectodermal tumor (PNET). *Child's Nervous System* 7: 405-409 (1991)

Grieshammer T, Zimmer C, Vogeley KT: Immunohistochemistry of primitive neuroectodermal tumors (PNET) in infants with special emphasis on cytokeratin expression. *Acta Neuropathologica* 82: 494-501 (1991)

Zimmer C, Gottschalk J, Goebel S, Cervos-Navarro J: Melanoma-associated antigens in tumors of the central nervous system. An immunohistochemical study with the monoclonal antibody HMB 45. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 420: 121-126 (1992a)

Gottschalk J, Jautzke G, Zimmer C, Paulus W, Cervos-Navarro J: HEA 125 and BerEP4 in der neuroonkologischen Differentialdiagnose. *Der Pathologe* 13: 95-99 (1992)

- Patt S, Zimmer C: Age-related immunoreactivity pattern in medulloblastoma. *Child's Nervous System* 8: 326-331 (1992)
- Gottschalk J, Goebel S, Jautzke G, Martin H, Zimmer C, Märzheuser-Brands S, Cervos-Navarro J: Influence of preoperative dexamethasone therapy on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in comparison to other parameters in meningiomas. *Histology and Histopathology* 7: 653-661 (1992)
- Zimmer C, Gottschalk J, Cervos-Navarro J, Martin H, Beil M, Jautzke G: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atypical and malignant meningiomas. *Pathology, Research and Practice* 8: 951-958 (1992b)
- Gottschalk J, Jautzke G, Zimmer C, Cervos-Navarro J: HEA-125 and Ber EP 4: two monoclonal anti-epithelial, non-cytokeratin antibodies distinguishing metastatic carcinomas from glial tumors. *Clinical Neuropathology* 12: 68-72 (1993)
- Zimmer C, Korf B, Ebel H, Traupe H: Zentrales Neurozytom - Eine Differentialdiagnose intraventrikulärer Tumore. *Aktuelle Neurologie* 20: 132-137 (1993)
- Zimmer C, Traupe H: Tumoren und tumorähnliche Erkrankungen. in: Sartor K (Hrsg) *Neuro-radiologie*. Thieme Verlag (1996)
- Rainov NG, Zimmer C, Chase M, Kramm CM, Chiocca EA, Weissleder R, Breakefield XO. Selective uptake of viral and monocrySTALLINE particles delivered intra-arterially to experimental brain neoplasms. *Hum. Gene Ther.* 6:1543-1552 (1995)
- Bogdanov A, Weissleder R, Bogdanova A, Zimmer C. Dextran Stabilized Iron Oxides allow Gene Delivery into Neuron-Like cells. In: *Seventh international Symposium on recent advances in drug delivery systems*, Salt Lake City (1995) pp. 165-166.
- Zimmer C, Weissleder R, O'Connor D, LaPointe L, Brady TJ, Enochs WS. Cerebral iron oxide distribution: in vivo mapping with MR imaging. *Radiology* 196:521-527 (1995a).
- Zimmer C, Weissleder R. Phagozytose und Metabolismus von Eisenoxiden - Untersuchungen an experimentellen Hirntumoren. *Kurt-Decker-Preis der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie, Würzburg* (1995b)
- Zimmer C, Weissleder R, Poss K, Bogdanova A, Wright SC,Jr., Enochs WS. MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas. *Radiology* 197:533-538 (1995c)
- Zimmer C, Bogdanov A, Wright C, Weissleder R. MRI von Genexpression in vivo. 1. Poster-Preis, 31. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie, Hanover (1996)
- Zimmer C, Wright SC,Jr., Engelhardt RT, Johnson GA, Kramm C, Breakefield XO, Weissleder R. Tumor cell endocytosis imaging facilitates delineation of the glioma-brain interface. *Exp. Neurol.* 143:61-69 (1997a)
- Zimmer C, Traupe H, Hamm B: Die revidierte WHO-Klassifikation der Hirntumore - Radiologische Aspekte unter besonderer Berücksichtigung von vier neuen Tumorentitäten. *Fortschr. Röntgenstr.* 166,6:522-527(1997b)
- Zimmer C, Kresse M, Berger B, Semmler W, Hamm B.:Transferrin receptor mediated transport of iron oxides to glioma cells (in preparation)
- Zimmer C, Bogdanov A, Wright C, Breakefield X, Weissleder R. MR imaging of gene delivery in experimental gliomas (in preparation)

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

- Christie RH, Freeman M, Hyman BT. Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 148:399-403 (1996)
- Eis M, Els T, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. Quantitative diffusion MR imaging of cerebral tumor and edema. *Acta Neurochir Suppl. Wien* 60:344-346 (1994)
- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382:716-719 (1996)
- Friedlander DR, Zagzag D, Shiff B, Cohen H, Allen JC, Kelly PJ, Grumet M. Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves α_v and β_1 integrins. *Cancer Res* 56: 1939-1947 (1996)
- Giese A, Kluwe L, Laube B, Meissner H, Berens M, Westphal M. Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38: 755-764 (1996a)
- Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the Central Nervous System. *Neurosurgery* 39: 235-252 (1996b)
- Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X, Kirkpatrick JB. Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J. Neurosci.* 15:7712-7726 (1995)
- Guthrie BL, Laws ER Jr. Supratentorial low-grade gliomas. *Neurosurg Clin N Am* 1:37-48 (1990)
- Hamm B, Staks T, Taupitz M, Maibauer R, Speidel A, Huppertz A, Frenzel T, Lawaczek R, Wolf KJ, Lange L. Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *J. Magn. Reson. Imaging* 4:659-668, 1994.
- Kettenmann, H. Beyond the neuronal circuitry. *Trends. Neurosci.* 19:305-306 (1996)
- Kohn EC, Liotta LA: L651582, a novel antiproliferative and antimetastasis agent. *J Cell Biol.* 127:859-866 (1995)
- Koochekpour S, Pilkington GJ, Merzak A. Hyaluronic acid/CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells in vitro. *Int J Cancer* 63: 450-454 (1995)
- Kreutzberg, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends. Neurosci.* 19:312-318 (1996)
- Laws ER Jr, Goldberg WJ, Bernstein JJ. Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain. *Scherer revisited. Int J Dev Neurosci* 11:691-697 (1993)
- Liotta LA: Tumor invasion and metastases; Role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 56:1-7 (1986)
- Maeda, A. and Sobel, R. A. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55:300-309 (1996)
- Maidment, S. L., Rucklidge, G. J., Rooprai, H. K., and Pilkington, G. J. An inverse

correlation between expression of NCAM and the matrix-metalloproteinases gelatinase-A and gelatinase-B in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett.* 116:71-77 (1997)

Moffett, J. R., Els, T., Espey, M. G., Walter, S. A., Streit, W. J., and Namboodiri, M. A. Quinolinate immunoreactivity in experimental rat brain tumors is present in macrophages but not in astrocytes. *Exp. Neurol.* 144:287-301 (1997)

Mohanam, S., Wang, S. W., Rayford, A., Yamamoto, M., Sawaya, R., Nakajima, M., Liotta, L. A., Nicolson, G. L., Stetler Stevenson, W. G., and Rao, J. S. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo. *Clin. Exp. Metastasis* 13:57-62 (1995).

Morioka, T., Baba, T., Black, L., and Streit, W.S. Response of microglial cells to experimental rat glioma. *Glia* 6:75-79 (1992).

Olivero WC, Dulebohn SD, Lister JR. The use of PET in evaluating patients with primary brain tumours: is it useful? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58(2):250-252 (1995)

Paresce, D. M., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17:553-565 (1996).

Paulus W, Baur I, Huettner C, Schmaußer B, Roggendorf W, Schlingensiepen KH, Brysch W. Effects of transforming growth factor- β 1 on collagen synthesis, integrin expression, adhesion and invasion of glioma cells. *J. Neuropathol Exp Neurol* 54:236-244 (1995).

Paulus W, Baur I, Beutler AS, Reeves SA. Diffuse brain invasion of glioma cells requires β 1 integrins. *Lab Invest* 76:819-826 (1996)

Remsen, L. G., McCormick, C. I., Roman Goldstein, S., Nilaver, G., Weissleder, R., Bogdanov, A., Hellstrom, I., Kroll, R. A., and Neuwelt, E. A. MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocrySTALLINE iron oxide nanoparticles: the potential for noninvasive diagnosis. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 17:411-418 (1996).

ShenT, Weissleder R, Papisov M, Bogdanov A Jr, Brady TJ: Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): Physicochemical Properties. *MRM* 29:599-604 (1993)

Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU: Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12: 245-258 (1994)

Silbergeld DL, Ali-Osman F: Glioblastoma-induced transformation of cultured normal endothelial cells. *J Neurosurg* 72:343A (1990)

Turner DL, Snyder EY, Cepko CL. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4:833-845 (1990).

van-den-Hauwe L, Parizel PM, Martin JJ, Cras P, De Deyn P, De Schepper AM. Postmortem MRI of the brain with neuropathological correlation. *Neuroradiology* Jul 37 (5) 343-349 (1995)

Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA, Mundy GR. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J. Clin. Invest.* 99:2509-2517 (1997)

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Gegenstand des Projektes ist es zu untersuchen, in wieweit aktivierte Mikroglia selektiv mittels MR-Bildgebung *in vivo* dargestellt werden kann. Im Vordergrund des Interesses steht in diesem Zusammenhang die Peripherie von Gliomen, da bei der Infiltration von Tumorzellen in das gesunde angrenzende Hirngewebe der Mikrogliaaktivierung eine besondere Rolle beigemessen wird und andererseits gerade diese Tumorregion mit herkömmlicher Bildgebung nicht ausreichend dargestellt werden kann. Den hier beantragten Experimenten liegt die Tatsache zugrunde, daß Mikrogliaaktivierung in zwei Schritten erfolgt: während es sich in der ersten Phase der Aktivierung um eine nicht-phagozytotische handelt, wird im zweiten Aktivierungsstadium die Transformierung der ruhenden in eine phagozytotisch aktive Mikroglia vollzogen. Phagozytose kann somit als Zeichen der fortgeschritteneren Mikrogliaaktivierung interpretiert werden. Es wird von der Hypothese ausgegangen, daß i.v. injizierte und in das Gehirn gelangte superparamagnetische Partikel (Dextran-umhüllte Eisenoxid-Nanopartikel) unter pathologischen Bedingungen intrazellulär von Mikroglia selektiv aufgenommen werden und zu charakteristischen Veränderungen des MR-Signals führen. Damit sollte es möglich sein, aktivierte Mikroglia *in vivo* kernspintomographisch zu visualisieren und von ruhender, nicht phagozytierender Mikroglia zu differenzieren. Initiale *in vitro*-Untersuchungen sollen zunächst die Frage beantworten, ob Mikroglia in ausreichendem Maße Eisenoxidpartikel aufnimmt, wie diese Eisenoxidaufnahme zum Grad der Mikrogliaaktivierung in Beziehung steht und inwieweit die Aufnahme von Eisenoxidpartikel in Mikroglia-Primärkulturen durch chemische Modifizierung der Partikel (Bindung an Mikroglia-spezifische Antikörper) vergrößert werden kann. Anschließende MR-Untersuchungen sollen überprüfen, inwieweit sich eine solche Eisenoxidpartikelphagozytose durch Mikroglia *in vivo* kernspintomographisch visualisieren läßt.

Ist die MR-Bildgebung aktivierter Mikroglia etabliert, so soll untersucht werden, ob eine solche *in vivo*- Darstellung der aktivierten Mikroglia geeignet ist, die Infiltrationszone von experimentellen Gliomen in das umgebende Hirngewebe genauer kernspintomographisch darzustellen. Außerdem soll die zeitliche Dynamik der Mikrogliaaktivierung im Rahmen der Tumorprogression untersucht werden mit der Frage, inwieweit Mikrogliaaktivierung der eigentlichen Tumorzellabsiedlung im Umgebungsgewebe vorausgeht und inwieweit diese Methode eine Möglichkeit darstellt, Tumorerkrankung in das gesunde Hirngewebe frühzeitig zu einem Zeitpunkt zu erfassen, an dem andere Methoden der Bildgebung noch einen unauffälligen Befund zeigen.

3.5.2 und 3 Methoden und Arbeitsprogramm

3.5.2.1. In vitro-Untersuchungen

Es wird untersucht ob überhaupt Eisenoxidpartikel von Mikrogliazelllinien intrazellulär aufgenommen werden, wenn ja, in welchem Maße und in welchem Aktivierungszustand der Mikroglia und ob sich die Aufnahme der Eisenoxidpartikel durch Bindung an Mikroglia-spezifische Antikörper steigern läßt. Eine weitere Frage ist, inwieweit sich Mikroglia in ihrer Phagozytosepotenz quantitativ von anderen Zellen (gereinigten Astrozyten und Oligodendrozyten, Gliomzellen) unterscheidet.

Eisenoxidpartikelsynthese

Es wird eine monokristalline Eisenoxidpartikel-Präparation (MION = "Monocrystalline-Iron-Oxid-Nanoparticle") verwendet. Die Synthese der Eisenoxidpartikel geschieht durch alkalische Fällung von divalenten und trivalenten Eisenchlorid in Gegenwart von hohen Konzentrationen Dextran (MW 1 KD; Verhältnis Dextran/Gramm : $Fe^{2+} : Fe^{3+} = 39.6 : 1.0 : 2.7$). Das Produkt wird mit einem Ultrafiltrationsgerät aufgetrennt und konzentriert. Details und physiochemische Charakteristika der Verbindung sind an anderer Stelle beschrieben [Shen et al., 1993]. Zusammengefaßt ist MION durch ein Eisen zu Dextran-Verhältnis (in Mol) von 80:1 (gewichtsmäßig 27% Eisen und 57% Dextran) charakterisiert. Der Kerndurchmesser des monokristallinen Eisenoxid Partikels ist $4,5 \pm 1,2$ nm. Der hydrodynamische MION-Durchmesser ist 20nm. R2- und R1- Relaxationen der MION -Präparationen betragen 35 (mmol/Lsec)⁻¹ und 16 (mmol/Lsec)⁻¹ (gemessen mit 0.5T bei 37°C).

Zur Quantifizierung der zellulären Eisenaufnahme in vivo wird MION mit ¹²⁵I markiert. Dazu wird gereinigtes MION mit Na¹²⁵I (574 mCi/mmol Fe) in Gegenwart von Iodo-Gen Iodierungsreagenz inkubiert, um ca. 70mCi/mmol Fe zu erhalten.

Für die Fluoreszenzmikroskopie werden gleiche Mengen MION (0,675 ml von 40.0 Fe mg/ml) mit einem bis zu 20fach molaren Überschuss von Rhodamin - Isothiocyanat, welches in Dimethylsulfoxide (4,5 mg/ml) aufgelöst wird, bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 Stunden wird das ungebundene Rhodamin von der Eisenoxidpräparation säulenchromatographisch getrennt und die Fluoreszenzbindung mikroskopisch untersucht. Gemäß früheren spektrophotometrischen Untersuchungen bei 576nm werden pro MION-Partikel ungefähr 40-60 gebundene Rhodamin- Moleküle erwartet.

Synthese der Eisenoxid-Antikörper-Konjugate

Es soll untersucht werden, inwieweit die Aufnahme von Eisenoxiden in die Mikrogliazelle durch chemische Modifizierung der paramagnetischen Partikel an ihrer Oberfläche verstärkt werden kann. Potentieller Schlüsselrezeptor für die geplanten Untersuchungen ist der für mononukleäre Phagozyten (im Rattenhirn sind 99% der mononukleären Phagozyten Mikrogliazellen!) spezifische Scavenger-Rezeptor, wobei die Rezeptordichte auf der Mikrogliazelle sehr hoch ist (El Khoury et al., 1996; Giulian et al. 1995). Diese Scavenger-Rezeptoren spielen beispielsweise bei der Alzheimer'schen Erkrankung eine große Rolle, wo die Mikroglia über diese Rezeptoren β -Amyloid Protein aufnehmen (Paresce et al. 1996). Als Liganden sollen zwei Antikörper (X-4 IgG1 und LDL) benützt werden, die beide an diesen Rezeptor spezifisch binden und kommerziell erhältlich sind (Christie et al. 1997). Sie sollen an die Eisenoxidverbindungen konjugiert werden, wobei die Kopplung von Antikörper-Proteinen an die o.g. Eisenoxidpartikeln etabliert ist (Remsen et al. 1996). Zusammengefasst werden die Eisenoxidpartikel mild oxidiert, um Aldehyd-Gruppen auf dem Dextranmantel zu generieren. Diese können mit poly-L-Lysin kovalente Iminbindungen eingehen. Die Bindung der Antikörper erfolgt schließlich über SH-Seitengruppen an poly-L-Lysin.

Die synthetisierten Konjugate werden für das Ausmaß der Gliaktivierung an Mikroglia-Primärkulturen getestet. Dazu wird der Nitritgehalt als stabiles Endprodukt der durch Mikroglia-Aktivierung induzierbaren NO-Synthase (NOS) spektrophotometrisch bei 540 nm bestimmt. Grundlage ist die Farbreaktion des gebildeten Nitrits im Kulturmedium mit Sulphanilamid (0.5%) und Naphtylethylenamid (0.05%).

Zellkultur, Fluoreszenzmikroskopie

Die Eisenoxidaufnahme *in vitro* wird in Mikroglia-Primärkulturen (Arbeitsgruppe Kettenmann) als Voruntersuchung durchgeführt und mit anderen Zelllinien (gereinigten Astrozyten, Oligodendrozyten, Gliomzelllinie C6 und 9L) verglichen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie werden Rhodamin-gekoppelte Eisenoxidpartikel (s. o.) verwendet. Zur qualitativen Beurteilung der Aufnahme der Eisenoxidpartikel durch Mikrogliazellen werden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen ein Tag vor der mikroskopischen Auswertung auf ein UV-sterilisiertes, 25 mm im Durchmesser messendes Deckglas pipettiert, welches den Boden einer Kulturplatte (6-Loch) bedeckt. Jede Einheit enthält 1,5 ml DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum. In dieser Verdünnung sollten sich am Untersuchungszeitpunkt bei 10facher Vergrößerung zwischen 5 und 50 Zellen zählen lassen. Unmittelbar vor dem Experiment wird überschüssiges Medium entnommen, anschließend werden die Zellen für 15 bis 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Rhodamin-gebundenen MION in Serumfreien DMEM inkubiert. Das Medium wird dann beseitigt und die Zellen gespült. Anschließend werden die Zellen in einem Inversionsmikroskop mikroskopiert, wobei für die Fluoreszenzmikroskopie ein Rhodamin-Filter-Set benützt wird. Zur Dokumentation werden die Zellen nach Inkubation mit MION *in vivo* fotografiert.

Zur Quantifizierung der Kontrastmittel-Phagozytose wird die Mikrogliazelllinie quantitativ *in vivo* mit anderen Zelllinien (C6, 9L, gereinigten Astrozyten, Oligodendrozyten, Mausmakrophagenzelllinie) verglichen. Dazu werden Zellen in Kulturplatten (6-Loch) pipettiert und abgewartet, bis sie zu 60% konfluieren. Das Medium wird entfernt und MION-¹²⁵I in verschiedenen Konzentrationen (2-100 µg FE) in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum hinzugegeben (1,5 ml/Loch). Die Zellen werden dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird der Lösungsüberschuss abgegossen und die Zellen dreimal in Hank's Lösung gewaschen. Anschließend wird in jede Einheit Triton-X hinzugefügt und der Protein-Gehalt mit einem BCA Protein-Essay bestimmt. Nach Erstellung einer Kalibrierungskurve für den Proteingehalt wird jede Konzentrationseinheit ausgewertet. Die quantitativen Bestimmungen werden jeweils einmal wiederholt.

Inwieweit der Aktivierungszustand der Mikroglia bei der Aufnahme von Eisenoxidpartikel eine Rolle spielt soll untersucht werden, indem unter entsprechenden Bedingungen ramifizierte Mikroglia (Sievers et al., 1994) mit experimentell voll stimulierter Mikroglia verglichen wird. Die Mikroglia-Stimulation soll sowohl durch LPS (Lipopolysaccharide) als auch durch PCW (Zellwandbestandteil gram-positiver Bakterien) erfolgen. Letztere soll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Weber/Einhäupl innerhalb des SFB durchgeführt werden.

3.5.2.2. In vivo-Untersuchungen

Es soll an einem Tiermodell untersucht werden, inwieweit *i.v.* injizierte Eisenoxidpartikel *in vivo* von Mikroglia spezifisch aufgenommen werden und inwieweit dies in hochaufgelöster MR-Mikroskopie zu spezifischen Signalveränderungen führt. Dabei soll insbesondere dem Tumorrand der Gliome besondere Beachtung geschenkt werden.

Tiermodell

In dem beantragten Projekt werden bei Ratten Gliome (C6, 9L) intrazerebral implantiert. Beide Gliomzelllinien enthalten das Escherichia coli β-Galactosidase Gen (lacZ), wodurch histologisch normale Glia leicht von neoplastischer Glia, welche sich nach X-Gal-Färbung tief blau anfärbt, abgegrenzt werden kann. Die entsprechenden Zelllinien stehen dem Antragsteller aus früheren Untersuchungen zur Verfügung. Bei einem Teil der Tiere sollen die Gliomzelli-

nien zuvor mit enhanced screened fluorescence protein transfiziert werden, womit ebenfalls eine sichere Abgrenzbarkeit neoplastischer von reaktiver, nicht-neoplastischer Glia erreicht wird. Dies wird durch die Arbeitsgruppe Kettenmann vorgenommen.

Die Versuche werden an ausgewachsenen CD-Fischer-Ratten durchgeführt. Die Tiere werden durch intraperitoneale Injektion eines Gemisches von 12.5 mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest^R, Parke-Davis, USA; 10 mg/ml) und 2.5 ml Xylazin (Rompun^R, Bayer, Deutschland; 20 mg/ml) in 0.5 ml 0.9% NaCl anästhesiert. Bei tiefer Anästhesie wird das Fell an der Kopf-oberfläche rasiert. Der Kopf des Tieres wird in einem Stereotaxieapparat immobilisiert und die Kopfhaut mit Betaisodona-Lsg (Mundipharma, Deutschland) desinfiziert. Es erfolgt ein gerader Kopfhautschnitt entlang der Fissura sagittalis mit Freipräparation der Kalotte. Mittels eines feinen Bohrers wird 3 mm rechts der Fissura sagittalis und 1 mm posterior der Fissura coronaris ein Loch von 1mm Durchmesser gebohrt. Mit einer am Stereotaxieapparat fixierten Hamilton-Spritze werden entsprechend den festgelegten Koordinaten stereotaktisch 4 mm unterhalb der Schädelkalotte 10⁵-Zellen der jeweiligen Zelllinie in einem Volumen von 5 µl NaCl über eine Dauer von 15 Minuten injiziert. Die Nadel wird anschließend über einen Zeitraum von 15 Minuten langsam zurückgezogen, das Bohrloch mit Knochenwachs (Ethicon, Deutschland) verschlossen und die Hautwunde mit einfacher Naht verschlossen.

Eine Tierversuchsgenehmigung durch die zuständige Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales) zur Durchführung der genannten Untersuchungen liegt vor (Reg 0371/97).

MR-Mikroskopie

Die MR-Untersuchungen werden an einem 2,4 T Biospec 24/40-Gerät der Firma Bruker durchgeführt. Das Gerät wurde kürzlich vom MSL-Typ zum MSLX-11-Typ aufgerüstet und steht unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation mit dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin zur Verfügung. Die MR-Untersuchungen des Gehirns werden sowohl am lebenden Tier als auch ex vivo am entnommenen Gehirn vorgenommen. Bei den ex vivo Untersuchungen wird das Gehirn zur Reduzierung von Suszeptibilitätsartefakten und zur Verhinderung von Austrocknung in Agarose-Gel in einen speziell gefertigten Plastik-Tubus eingebettet.

Für die MR-Untersuchungen werden die Tiere mit 65 mg/kg/KG Pentobarbital intraperitoneal anästhesiert. Die Eisenoxid-Konjugate (10 mg Fe/kg Körpergewicht) werden zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 1h, 3h, 9h, 24h) vor der Bildgebung mittels Katheter über die Schwanzvene i.V. injiziert. Es ist vorgesehen, zunächst coronare FSE-Aufnahmen anzufertigen (TR 1000ms, TE 25ms, Flipp-Winkel 90⁰, Matrix 512x256x256, FOVZ 44 mm, FOVY und FOVX 22mm), gefolgt von einer coronaren GRASS-Sequenz (TR 100ms, TE 25ms, Flipp-Winkel 20⁰). Mit dieser Technik kann eine räumliche Auflösung von 86 µm erzielt werden. Diese Sequenzen werden zunächst aus Voruntersuchungen übernommen, sollen jedoch weiter optimiert werden. Die Tiere werden unmittelbar nach den MR-Untersuchungen durch eine Überdosis Pentobarbital getötet und nach einer Kochsalzperfusion (250ml) zur Minimierung kapillärer Eisenoxidablagerungen mit einer Phospat-gepufferten 10%igen Paraformaldehydlösung (250ml/20min) perfundiert.

Histologie, Immunhistochemie

Zur zellulären Lokalisation der Eisenpartikel werden die Tiere unmittelbar nach der kernspintomographischen Untersuchung mit einer Überdosis Phenobarbital getötet, mit gepuffertem Formalin (250ml, 10%) perfundiert und anschließend in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die

Gehirne werden mit einem Kryostaten in 6µm dünne Scheiben geschnitten und Eisenfärbungen nach Perls' angefertigt (Inkubation in 2% HCl und 2% Potassium Ferrozyanid) mit zusätzlicher Verstärkung durch DAB (Inkubation für 30 Minuten in 0,5% Diaminobenzidine mit 1% H₂O₂). Zur histologischen Identifizierung der Mikroglia werden immunhistologische Färbungen mit Mikroglia spezifischen Antikörpern unter der Verwendung der APAAP- bzw. ABC-Methode durchgeführt, wobei von ausgewählten Schnitten auch Doppelfärbungen (Eisenfärbung und Mikroglia-Immunhistochemie) angefertigt werden sollen. Zur histologisch eindeutigen Identifizierung auch singulärer Tumorzellen werden ausgewählte Hirnareale histochemisch unter Benützung von X-Gal Substrat gefärbt [Turner et al, 1990]. β-Galaktosidase exprimierende Tumorzellen zeigen sich dann blau gefärbt, während normale Glia ungefärbt bleibt.

3.5.4 Zeitplan

	1. Halbjahr	2. Halbjahr	3. Halbjahr	4. Halbjahr	5. Halbjahr	6. Halbjahr
I. Eisenoxid-Antikörper-Konjugate Chemische Synthese der Konjugate	█					
II. Zellkulturuntersuchungen Experim. zur intrazell. KM-Aufnahme in Mikroglia Bestimmung des Aufnahmemechanismus	█			█		
III. MR-Untersuchungen Sequenzoptimierung Monitoring der aktivierten Mikroglia				█	█	
IV. Histologische Untersuchungen Bestimmung der Aufnahme von Eisenoxidpartikel in Mikroglia			█			
V. Auswertung der Untersuchungen Korellation MRT - Histologie Vorbereitung von Publikationen der Ergebnisse				█		█

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Zwischen dem beschriebenen Projekt und den verschiedenen Arbeitsgruppen innerhalb des SFB's ergeben sich zahlreiche sowohl thematische als auch methodische Querverbindungen und Kooperationsmöglichkeiten. Eine enge Kooperation wird mit dem Labor Kettenmann angestrebt, in der ebenfalls Hirntumoren im Vordegrund des Interesses stehen. Die geplanten in vitro Untersuchungen an Mikroglia-Primärkulturen sollen z.T. im dortigen Labor unter Ausnützung der dort etablierten Methodik stattfinden. In diesem Labor wird auch die Transfektion der Gliomzelllinien mit enhanced screened fluorescence protein vorgenommen, womit eine sichere Abgrenzbarkeit neoplastischer von reaktiver, nicht-neoplastischer Glia erreicht wird. Andererseits greift diese Arbeitsgruppe auf das bei uns etablierte Hirntumormodell zurück und bezieht Tiere in ihre Untersuchungen mit ein, welche zuvor schon in der Bildgebung durch unsere Arbeitsgruppe erfasst worden sind. Gelingt es mit bildgebenden Methoden Mikroglia im Stadium der Aktivierung bei Gliomen selektiv darzustellen, so würden sich inte-

ressante Aspekte auch bei anderen Erkrankungen des ZNS wie Ischämie (Arbeitsgruppe Dirnagl) und Meningitis (Arbeitsgruppe Weber) ergeben. Es ist beabsichtigt, die Untersuchungen ggf. auf diese Erkrankungen auszuweiten, wobei dann auf die in den jeweiligen Arbeitsgruppen etablierten Modelle zurückgegriffen werden soll. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Weber/Einhäupl soll auch die experimentelle Aktivierung von Mikroglia in vitro durch PCW erfolgen.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
		BAT IIa/2	1	19800	BAT IIa/2	1	39600	BAT IIa/2	1	39600	BAT IIa/2	1	19800
zusammen		zusammen	1	19800	zusammen	1	39600	zusammen	1	39600	zusammen	1	19800
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		Titel 515		19 500	Titel 522		21 000	Titel 522		21 000	Titel 522		10 500
		Titel 522		10 500									
		zusammen		30.000	zusammen		21 000	zusammen		21 000	zusammen		10 500
I		Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:		
		keine			keine			keine			keine		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	1. Zimmer, Claus; Dr. med.	Neuroradiologie	Inst. f. Röntgendiagn.	6		C 1
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	2. Lüdemann, Lutz; Dr. rer. nat.	MR-Physik	Inst. f. Röntgendiagn.	10		BAT II a
	3. Dieckmann, Clau- dia	MR-Physik	Inst. f. Röntgendiagn.	5		BAT II a/2
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	3. Höhn, Sebastian	Histologie, Im- munhistologie	Inst. f. Röntgendiagn	20		HiWi
Ergänzungsausstattung	4. NN*	Chemie	Inst. f. Röntgendiagn	38,5		BAT II/2
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

1. Zimmer, Claus; Dr. med.: Herr Zimmer übernimmt die Projektplanung und Konzeption der Versuche und arbeitet neue Mitarbeiter ein. Er beteiligt sich an den operativen Eingriffen, den Auswertungen der histologischen und kernspintomographischen Untersuchungen und an den Korrelationen der Histologie mit der MR-Bildgebung.

2. Lüdeman, Lutz; Dr. rer. nat.: Herr Lüdemann ist Physiker und wird seine Kenntnisse der MR-Technologie in das Projekt einbringen. Er wird vornehmlich die MR-Untersuchungen selbst durchführen und die erforderlichen MR-Sequenzen mit hohem zeitlichen und räumlichen Auflösungsvermögen entwickeln.

3. Dieckmann, Claudia.; Dipl. phys.: Frau Dieckmann ist ebenfalls Physikerin und promoviert zur Zeit in der Arbeitsgruppe über ein verwandtes Thema. Sie wird zusammen mit Herrn Lüdemann den Teil der MR-Untersuchungen übernehmen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

1. Sebastian Höhn: Herr Höhn arbeitet als stud. Hilfskraft in der Arbeitsgruppe. Er verfügt über umfangreiche Erfahrungen auf dem Gebiet der histologischen Aufarbeitung von Gewebe. Er wird das Gewebe im Kryostaten schneiden und die konventionellen und immunhistochemischen Färbungen durchführen. Weiterhin wird er tierexperimentell bei der Tumorentplantation mitarbeiten.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1. N.N. (BAT Iia/a)

Der/ die Inhaber(in) der beantragten wissenschaftlichen Mitarbeiterstelle hat folgende Aufgaben:

1. Durchführung der chemischen Arbeiten zur Bindung von Mikroglia-spezifischen Antikörpern an Eisenoxidpartikel
2. Durchführung sämtlicher in vitro Experimente zur intrazellulären Aufnahme von Antikörper-konjugierten Eisenoxiden durch Mikrogliazelllinien.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

-keine-

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung	3000	5000	5000	3000
werden als Ergänzungsausrüstung beantragt	10500	21000	21000	10500

Grundausrüstung:

Vom Antragsteller wurde an der Charité ein radiologisch-onkologisches Forschungslabor etabliert. Es beinhaltet die vollständige Ausstattung für Zellkulturarbeiten (Sterilraum mit steriler Werkbank, CO₂-Inkubator, Zentrifuge, Kühl- und Gefrierschrank). Für die Anfertigung der histologischen Schnitte existiert ein Kryostat zusammen mit dem übrigen für die Histologie und Immunhistochemie benötigten Equipment. Für die histologische Auswertungen der Präparate einschließlich der immunfluoreszenzmikroskopischen Auswertungen der Zellkultur-Experimente existiert ein Immunfluoreszenz-Inversions-Mikroskop (Axiovert 135, Karl Zeiss Jena) mit kompatibler Kammer, in der die Zelllinien konstant in vivo bei 37⁰ gehalten und gleichzeitig mikroskopiert werden können. Dieses Mikroskop ist über eine digitale Kamera (Nikon N90) mit einem Macintosh-Rechner verbunden. Für die Nachbearbeitung der MR- und Histologiebilder existiert ein Computerlabor mit einer Indy-Workstation, zwei Macintosh Rechnern, adaptiertem Scanner (Digitalisierung der makroskopisch-histologischen Schnittpräparate) und ausreichender Software für die Bildnachverarbeitung. Für die Tierversuche existiert ein Stereotaxierahmen (Fa. Stoelting) und mikrochirurgisches Instrumentarium einschließlich Bohrmaschine.

Dem Antragsteller steht für die MR-Untersuchungen im Rahmen einer Kooperation mit dem Klinikum Benjamin Franklin der FU Berlin ein kürzlich aufgerüsteter MR-Tomograph für Tierexperimente der Fa. Bruker (Biospec 24/40, 2,4T) mit Möglichkeiten zur hoch aufgelösten MR-Mikroskopie (Micro-Imaging Gradienten-System B-G 6) zur Verfügung. Allerdings fehlt jedoch z.Zt. ein für die beantragten Untersuchungen adäquater zylindrischer Probenkopf.

Geräte im Einzelwert bis zu DM 20.000 (ohne Fahrzeuge)

1 1H-Micro-Imaging-Probenkopf, 35 mm Innendurchmesser (Fa. Bruker) **19.500 DM**

Begründung

Für die MR-mikroskopischen Untersuchungen am Rattengehirn wird zur Erreichung einer hohen Ortsauflösung ein 1 H Mini-Imaging Probenkopf mit kleinem Innendurchmesser (Fa. Bruker) für aktive HF-Entkopelung benötigt.

Verbrauchsmaterial/ Jahr

Chemikalien (Mikroglia-Antikörper, Fe-Ak Konjugate)	8.000 DM
Zellkultur-Materialien (Kulturflaschen, Pipetten)	3.000 DM
Zellkulturmedien	3.000 DM
Reagentien für Histochemie, Antikörper	4.000 DM
Versuchstiere	3.000 DM
	21.000 DM

Begründung für Sachmittelbedarf

Bei dem Projekt verursacht vor allem die Synthese der Eisenpartikel-Antikörper-Konjugate (zB.100µg Scavenger-Rezeptor Antikörper kosten 475 DM) einen hohen Kostenaufwand. Die übrige Grundausrüstung für die Tierexperimente, die MR-Untersuchungen und das Labor ist gewährleistet.

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Keine

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B6 (war A3)

3.1.1 Thema:

Gliaaktivierung - Ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neurologie

3.1.3 Leiter:

Dr. Jörg R. Weber

Prof. Karl M. Einhäupl

Neurologische Klinik und Poliklinik

Universitätsklinikum Charité

Medizinische Fakultät der Humboldt Universität

10098 Berlin

Tel.: 2802 4588

Fax: 2802 5047

e-mail jweber@neuro.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

nein ja, befristet bis zum :

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen ja nein
- klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie ja nein
- Tierversuche ja nein
- gentechnologische Versuche ja nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs-ausgaben	Investition	gesamt
bis 1995	18,1	26,4		44,5
1996	38,3	20,0		58,3
1997	38,3	20,0		58,3
1. Hj. 1998	18,1	10,0		28,1
Zwischen-summe	112,8	76,4		189,2
2. Hj. 1998	19,8	25,4		45,2
1999	39,6	36,8		76,4
2000	39,6	36,8		76,4
1. Hj. 2001	19,8	18,4		38,2

3.2 Zusammenfassung

Die Mortalität (28 %) als auch Morbidität (50 %) der bakteriellen Meningitis hervorgerufen durch *S. pneumoniae* sind seit Jahren unverändert. Ein wesentlicher Teil der Patienten verstirbt an den intrazerebralen Komplikationen. Der Entwicklung adjuvanter Therapie, die modulierend in die Schadenskaskade eingreift, kommt große Bedeutung zu. An tierexperimentellen Modellen in Maus und Ratte und in primären Zellkultursystemen wollen wir folgende Fragestellungen untersuchen:

- 1) Welchen Einfluß hat das Fehlen von TNF- α Rezeptoren und von IL-6 auf die durch Pneumokokkenzellwandbestandteile induzierte Meningitis?
- 2a) Welche Mechanismen induzieren die Leukozyten-Endothelinteraktion bei bakterieller Meningitis. b) Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Leukozyteninvasion in den Subarachnoidalraum und NO?
- 3a) Welche Rolle spielen die von terminalen c-Fasern freigesetzten Neuropeptide bei der Leukozyten-Endothelinteraktion. b) Welchen Einfluß hat die Blockade von Substanz P Rezeptoren auf die durch Pneumokokkenzellwandbestandteile induzierte Meningitis?

Ziel dieser Untersuchungen ist es die komplexen Schritte der Entzündungskaskade besser zu verstehen und gezielte therapeutische Interventionen zu erarbeiten.

3.3 Stand der Forschung

In den letzten 40 Jahren hat sich weder die hohe Mortalität von 25-30% (Durand et al., 1993) noch die Morbidität (Bohr et al. 1984) der bakteriellen Meningitis geändert. Diese akut auftretende, relativ häufige Entzündung des zentralen Nervensystems wird vorwiegend durch den Gram-positiven Erreger *Streptococcus pneumoniae* bei Erwachsenen hervorgerufen. Die Komplikationen (Pfister et al., 1993), die für die schlechte Prognose verantwortlich gemacht werden, sind das Hirnödem, die Erhöhung des intrakraniellen Druckes und zerebrovaskuläre

Veränderungen wie Vaskulitis, Sinusvenenthrombose und septische Hirninfarkte (Pfister et al., 1992). Mehr als 90 % der Patienten, die wir verlieren, sterben an diesen intrazerebralen Komplikationen. Im deutlichen Gegensatz zur hohen Mortalität steht die rasche Entwicklung wirksamer Antibiotika, die innerhalb weniger Stunden alle Bakterien im Liquor (CSF) abtöten (Swartz 1984). Obwohl die eigentliche Krankheitsursache erfolgreich behandelt wurde, lösen durch Bakteriolyse freigesetzte Zellwandbestandteile eine Schadenskaskade (Friedland et al., 1993; zur Übersicht Quagliariello and Scheld 1992) aus, die wesentlich die schlechte Prognose der Erkrankung bestimmt.

Möglicher Ablauf der Schadenskaskade bei bakterieller Meningitis (modifiziert nach Townsend and Scheld 1993) :

- Invasion der Bakterien in den Subarachnoidalraum (SA).
- Bakterienvermehrung und Bakteriolyse.
- Auftreten hoher Konzentrationen von Zellwänden abgetöteter Bakterien. Begünstigt wird diese Entwicklung durch bakteriolytisch wirkende Antibiotika.
- Bakterien reizen nichtmyelinisierte C-Fasern des N. trigeminus und führen klinisch zu Kopfschmerz, lokal aber durch Neuropeptide zur Glia- und Endothelaktivierung und rCBF Zunahme.
- Aktivieren von Mastzellen, Endo- und Epithelzellen, Astrozyten und Mikroglia
- Histamin und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β induzieren in Endothelzellen die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen.
- Aktivierte Leukozyten rollen, haften an und überwinden die Bluthirn- und Blutliquorschranke
- Aktivierte Leukozyten setzen freie Radikale und Vasodilatoren frei und tragen zum cytotoxischen wie vasogenen Hirnödem bei.
- Leukozytenakkumulation im CSF führt zur Liquorzirkulations- und -resorptionsstörung.
- Erhöhter Intrakranieller Druck (ICP), Blutflußveränderungen, Autoregulationsverlust, Endothelschäden führen zu neuronalem Schaden und Hirntod.

Wesentliche Teile dieser Hypothesen wurden auf Grund von Ergebnissen experimenteller Untersuchungen am Kaninchen- und Rattenmodell der bakteriellen Meningitis gewonnen. Zunehmend an Bedeutung gewinnt ein auch von uns verwendetes und modifiziertes Mausmodell (Tang et al., 1996), das auch an Knock out Mäusen erlaubt einzelne Schritte der Schadenskaskade zu untersuchen.

Die Entwicklung neuer Antibiotika hat die Mortalität in den letzten 3 Jahrzehnten weder beeinflußt, noch zeichnen sich hier neue Entwicklungen ab (Durand et al., 1993). Weltweit konzentriert sich die Forschung heute auf die Aufklärung der Schadenskaskade, um möglichst gezielt in diese einzugreifen.

Wir wollen uns vorwiegend den im folgenden im Detail dargestellten Mechanismen zuwenden.

3.3.1 Bakterielle Meningitis und Rolle der Zytokine TNF- α und IL-6

Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen und einwandernde aktivierte Leukozyten produzieren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine nach Kontakt mit Zellwandbestandteilen von Pneumokokken. TNF, IL-1 und IL-6 sind vor allem kombiniert und in Verbindung mit Zellwandbestandteilen von großer Bedeutung in der Pathophysiologie der Meningitis (Angstwurm et al., 1998; Tureen 1995; Quagliariello et al., 1991; Leist et al., 1988). Die Rolle

der einzelnen Zytokine ist jedoch weitgehend unverstanden. Dennoch beruht ein wesentlicher Teil bisheriger antiinflammatorischer Strategien, z. B. mit Dexamethason, auf meist unspezifischer und nur teilweiser Hemmung der TNF Synthese.

In anderen Modellen wie bei der fokalen Ischämie (Bruce et al., 1996), insbesondere aber der Toxoplasmen Enzephalitis (Deckert-Schlüter persönliche Mitteilung), hat die Verwendung von TNF-Rezeptoren Knock out Mäusen allerdings zu unerwarteten Ergebnissen geführt, da in diesen die Infarkte vergrößert bzw. die Entzündung verstärkt wurde. Möglicherweise werden aber durch diese Rezeptoren noch andere Regulationsmechanismen aktiviert, die den Verlauf einer akuten Inflammation positiv beeinflussen.

Signaling Pathways, die zur Aktivierung von Genen durch Transkriptionsfaktoren führen, wie NF-Kappa B oder AP-1, werden durch LPS und PCW direkt angeschaltet (Schumann et al. 1998), aber auch durch TNF und Il-1 β (zur Übersicht Eder 1997). Eine Aktivierung beider entweder direkt oder indirekt könnte den synergistischen Effekt von diesen proinflammatorischen Zytokinen und Zellwänden erklären und gezielte Interventionen ermöglichen.

3.3.2 Bakterielle Meningitis und Leukozyten-Endothelinteraktion

Einer der wichtigsten Schritte in der Schadenskaskade ist die Überwindung der Bluthirn- und Blutliquorschranke durch aktivierte Leukozyten. Zum einen kommt den Leukozyten in der Elimination der Bakterien eine wesentliche Rolle zu, zum anderen aber wissen wir, daß eine überschießende Leukozyteninvasion (Friedland et al., 1993), die durch abgetötete Bakterien und deren Bestandteile hervorgerufen wird, einen wesentlichen Anteil an den folgenden Schäden hat (Bohr et al., 1983). Wesentliche Schritte in der Adhäsionskaskade (Albelda et al., 1994; Springer 1990) sind noch unverstanden.

Unklar ist, welcher Mechanismus am Anfang Leukozytenrollen (Ley et al., 1995; Gaboury et al., 1995; Asako et al., 1994) induziert. Leukozytenrollen bei bakterieller Meningitis wird vorübergehend durch einen H-1 Blocker vermindert (Weber et al., 1997a). Quelle dieses Histamins könnten meningeale Mastzellen sein, denen eine Rolle in der primären Immunabwehr zu kommen könnte (Silver et al., 1996).

Die Inhibition der Adhäsion, sowohl auf der Ebene des Leukozytenrollens, als auch der festen Adhäsion vermindert den rCBF Anstieg (Weber et al., 1997b; Angstwurm et al., 1995b; Weber et al., 1995b), aber auch Hirnödem, Hirndruckentwicklung und Leukozytenzahl im CSF (Tuomanen et al., 1989; Granert et al., 1994). Mediatoren des rCBF Anstieges wie NO scheinen nur dann aufzutreten, wenn eine ungestörte Leukozyten-Endothelinteraktion stattgefunden hat. NO ist möglicherweise ein zentraler Regulator in dieser Wechselwirkung (Kubes et al., 1991), der zum einen Leukozytenadhäsion hemmt, zum anderen aber begünstigt, zudem noch vasodilatierend wirkt. Konzepte der iNOS Inhibition haben in der Frühphase der bakteriellen Meningitis einen modulierenden Effekt auf den Entzündungsablauf (Koedel et al., 1995), werden aber wegen der vermehrten neuronalen Apoptose kontrovers diskutiert (Leib et al., 1996). Entscheidend ist die Frage, welche unterschiedliche Rolle NO von hirneigenen Zellen und von einwandernden Leukozyten haben könnte.

Völlig unklar ist aber der Verbleib und mögliche Interaktionen der Leukozyten im Liquor und Hirnparenchym. Ein möglicher Mechanismus der Regulation der Leukozytenzahl im Liquor könnte Apoptose sein, vergleichbar mit der Regulation der Leukozytenzahl in der Peritonealflüssigkeit bei experimenteller Peritonitis (Coxon et al., 1996). Möglicherweise würde dieser Mechanismus bei bakterieller Meningitis protektiv wirken.

3.3.3 Neuronale Mechanismen die zur Glia- und Endothelaktivierung führen

Die Beteiligung von nichtmyelinisierten C-Fasern an der rCBF Antwort der bakteriellen Meningitis wurde von uns gezeigt (Weber et al., 1996). Die Zunahme der Gefäßdurchmesser nach lokaler Applikation inaktivierter Pneumokokken ist teilweise Substanz P abhängig (Pfister et al., 1995). Zudem wurde gezeigt, daß ein selektiver Substanz P Rezeptorantagonist den Verlauf der *Trypanosoma brucei brucei* Meningoenzephalitis positiv beeinflusst (Kennedy et al., 1997). SP ist auch ein effektiver Trigger für mikrogliale Aktivierung in vitro. Unklar ist aber, ob SP und CGRP und andere Neuropeptide an der gesamten Entzündungsreaktion beteiligt sind und ob diese auch zum Entothelschaden bzw. der Aktivierung zerebraler Endothelzellen und damit zur Zytokin- und Chemokinproduktion sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen beitragen.

Zitierte Literatur

- Albelda SM, Smith CW and Ward PA (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8:504-512
- Asako H, Kurose I, Wolf R, DeFrees S, Zheng ZL, Phillips ML, Paulson JC and Granger DN (1994) Role of H1 receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J Clin Invest* 93:1508-1515
- Bohr V, Hansen B, Kjersem H, Rasmussen N, Johnsen N, Kristensen HS and Jessen O (1983) Sequelae from bacterial meningitis and their relation to the clinical condition during acute illness, based on 667 questionnaire returns. Part II of a three part series. *J Infect* 7:102-110
- Bohr V, Paulson OB and Rasmussen N (1984) Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* 41:1045-1049
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW and Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2:788-794
- Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, Askari S, Sharpe AH, von Andrian UH, Arnaout MA and Mayadas TN (1996) A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity* 5:653-666
- Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M and Pulsinelli W (1989) Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:589-596
- Dirnagl U, Villringer A and Einhäupl KM (1992) In-vivo confocal laser scanning microscopy of the cerebral microcirculation. *J Microscopy* 165:147-158
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr. and Swartz MN (1993) Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 328:21-28
- Eder J (1997) Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol Sci* 18:319-322

- Friedland IR, Jafari H, Ehrett S, Rinderknecht S, Paris M, Coulthard M, Saxen H, Olsen K and McCracken GHJ (1993) Comparison of endotoxin release by different antimicrobial agents and the effect on inflammation in experimental *Escherichia coli* meningitis. *J Infect Dis* 168:657-662
- Gaboury JP, Johnston B, Niu XF and Kubes P (1995) Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. *J Immunol* 154:804-813
- Granert C, Raud J, Xie X, Lindquist L and Lindbom L (1994) Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *J Clin Invest* 93:929-936
- Kennedy PG, Rodgers J, Jennings FW, Murray M, Leeman SE and Burke JM (1997) A substance P antagonist, RP-67,580, ameliorates a mouse meningoencephalitic response to *Trypanosoma brucei brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4167-4170
- Kimelberg HK and Norenberg MD (1989) Astrocytes. *Sci Am* 260:66-72, 74, 76
- Koedel U, Bernatowitz A, Paul R, Frei K, Fontana A and Pfister HW (1995) Experimental pneumococcal meningitis: Cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol* 37:313-323
- Kubes P, Suzuki M and Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651-4655
- Leib SL, Kim YS, Black SM, Ferriero DM and Tauber MG (1996) Detrimental effect of nitric oxide inhibition in experimental bacterial meningitis. *Ann Neurol* 39:555-556
- Leist TP, Frei K, Kam Hansen S, Zinkernagel RM and Fontana A (1988) Tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during bacterial, but not viral, meningitis. Evaluation in murine model infections and in patients. *J Exp Med* 167:1743-1748
- Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF and Beaudet AL (1995) Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 181:669-675
- Pfister HW, Kumpfel T and Koedel U (1995) Involvement of substance P in pial arteriolar vasodilatation during pneumococcal meningitis in the rat. *Neuroreport* 6:1301-1305
- Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr. and Scheld WM (1991) Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 87:1360-1366
- Quagliarello V and Scheld WM (1992) Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 327:864-872
- Rosl F (1992) A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucleic Acids Res* 20:5243
- Siegling A, Lehmann M, Platzer C, Emmrich F and Volk HD (1994) A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunol Methods* 177:23-28
- Silver R, Silvermann AJ, Vitkovic L and Lederhendler II (1996) Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends Neurosci* 19:25-30
- Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434

- Swartz MN (1984) Bacterial meningitis: more involved than just the meninges. *N Engl J Med* 311:912-914
- Tang T, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD and Mayadas TN (1996) Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J Clin Invest* 97:2485-2490
- Townsend GC and Scheld MW (1993) Adjunctive therapy for bacterial meningitis: rationale for use, current status, and prospects for the future. *Clin Infect Dis* 17:S537-S549
- Tuomanen EI, Saukkonen K, Sande S, Cioffe C and Wright SD (1989) Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med* 170:959-969
- Tureen J (1995) Effect of recombinant human Tumor Necrosis Factor-alpha on cerebral oxygen uptake, cerebrospinal fluid lactate, and cerebral blood flow in the rabbit: Role of Nitric Oxide. *J Clin Invest* 95:1086-1091

siehe auch eigene Arbeiten

3.4 Eigene Vorarbeiten

Unsere Arbeitsgruppe hat in den letzten 4 Jahren konsequent sowohl in vitro als auch an einem tierexperimentellen Modell der bakteriellen Meningitis gearbeitet und beide Systeme in der Ratte etabliert und durch molekularbiologische Techniken wie quantitative PCR ergänzt.

3.4.1 Bakterielle Meningitis und Astroglia

TNF- α als auch NO werden von Astrogliazellen nach Inkubation mit PCW zeit- und dosisabhängig produziert (Freyer et al., 1996). Wir konnten erstmals diesen Effekt für den relevantesten Krankheitserreger der bakteriellen Meningitis im Erwachsenenalter *S. pneumoniae* belegen. NO ist dabei unter zwei Gesichtspunkten von Bedeutung, da es einerseits ein sehr potenter Vasodilatator ist, zum anderen möglicherweise auch neuronotoxisch ist. Die durch TNF induzierte rCBF Zunahme ist zumindest teilweise NO mediiert (Angstwurm et al., 1998).

Voraussetzung dafür scheint die Aktivierung der mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) zu sein, die im Vergleich zu LPS untersucht wurden. Partiiell ist diese Aktivierung der MAPK von löslichen CD 14 abhängig (Schumann et al., 1998).

3.4.2 Bakterielle Meningitis und Leukozyten-Endothelinteraktion

In vivo konnten wir zeigen, daß Eingriffe in die Adhäsionskaskade die Zunahme des rCBF, des ICP und des Hirnödems und erwartungsgemäß der Leukozyteninvasion in den CSF hemmten. Eine Inhibition des Leukozytenrollens ist effektiver als des Leukozytenstickens und weist auf die Bedeutung des Rollens als Voraussetzung für die folgende feste Adhäsion und Migration hin (Weber et al., 1995; Angstwurm et al., 1995).

Unter Verwendung der confokalen Laser scanning Mikroskopie in vivo ist es gelungen Leukozytenrollen in vivo erstmals quantitativ darzustellen und pharmakologisch zu inhibieren (Weber et al., 1997b). Zudem konnten wir einen über den Histamin-1 Rezeptor vermittelten Pathway in der Induktion des Leukozytenrollens belegen, die auf eine mögliche Rolle von Mastzellen in der Frühphase der Erkrankung hindeutet (Weber et al., 1997a).

Heparin inhibiert die rCBF, ICP und Hirnödementwicklung sowie den Einstrom von Leukozyten in den CSF nicht nur bei einer zeitgleich mit der Meningitisinduktion durchgeführten Behandlung, sondern auch noch bei Behandlung nach 2 und teilweise auch noch nach 4 Stunden. Effektiv waren auch Heparansulfat und Fucoidin, das vorwiegend die L-Selektinfunktion inhibiert. Heparin inhibiert Leukozytenrollen an pialen Gefäßen und die nachfolgende feste Adhäsion.

Die intravenöse Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 verhindert die ICP und Hirnödementwicklung und vermindert um 70 % die rCBF Zunahme und die Leukozyteninvasion in den Subarachnoidalraum.

3.4.3 Neuronale Mechanismen, die zur Glia- und Endothelaktivierung führen

Die Zunahme des rCBF in der Frühphase der bakteriellen Meningitis ist unklar. Eine chronische Denervierung durch chirurgische Durchtrennung des N.nasociliaris führt zur Depletion von SP und CGRP in terminalen C-Fasern. Im Seitenvergleich ist der Blutflußanstieg nach chronischer Denervierung signifikant vermindert. Eine unmittelbar nach Durchtrennung des Nervs induzierte Meningitis führt allerdings zu einem unveränderten Anstieg des rCBF (Weber et al., 1996). Dieser Befund spricht für eine Beteiligung der erwähnten Neuropeptide bei der Blutflußregulation bei bakterieller Meningitis und gegen einen afferenten neurogenen Mechanismus.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

Angstwurm K, Weber JR, Segert A, Burger W, Weih M, Freyer D, Einhäupl KM and Dirnagl U (1995) Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neurosci Lett* 191:1-4

Angstwurm K, Freyer D, Dirnagl U, Hanisch UK, Schumann RR, Einhäupl KM and Weber JR (1998) Tumour necrosis factor alpha induces only minor inflammatory changes in the central nervous system, but augments experimental meningitis. *Neuroscience* in press:

Dirnagl U, Villringer A, Gebhardt R, Haberl RL and Einhäupl KM (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain cortical microcirculation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:353-360

Dirnagl U, Villringer A and Einhäupl KM (1992) In-vivo confocal laser scanning microscopy of the cerebral microcirculation. *J Microscopy* 165:147-158

Freyer D, Weih M, Weber JR, Bürger W, Scholz P, Manz R, Ziegenhorn A, Angstwurm K and Dirnagl U (1996) Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF- α in astroglial enriched cultures. *Glia* 16:1-6

Pfister HW, Borasio GD, Dirnagl U, Bauer M and Einhäupl KM (1992) Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology* 42:1497-1504

Pfister HW, Feiden W and Einhäupl KM (1993) Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol* 50:575-581

Reuter U, Weber JR, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U und Dirnagl U (1998) locally triggered release of neurotransmitters from perivascular nerves contributes to cortical spreading depression associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* (im Druck)

Schumann RR, Pfeil D, Bürger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel U and Weber JR (1998) Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p 38 in astrocytes. *Glia* in press

Weber JR, Angstwurm K, Bürger W, Einhäupl KM and Dirnagl U (1995) Anti ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 63:63-68

Weber JR, Angstwurm K, Bove GM, Bürger W, Einhäupl KM, Dirnagl U und Moskowitz MA (1996) The trigeminal nerve and augmentation of cerebral blood flow during experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1319-1324

Weber JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Bürger W, Einhäupl KM and Dirnagl U (1997a) Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis in rats. *Neurosci Lett* 226:17-20

Weber JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Freyer D, Bürger W, Busch C, Einhäupl KM and Dirnagl U (1997b) Heparin inhibits leukocyte rolling in pial vessels and attenuates inflammatory changes in a rat model of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1221-1229

Weikert S, Freyer D, Weih M, Isaev N, Busch C, Schultze J, Megow D and Dirnagl U (1997) Rapid Ca²⁺-dependent NO-production from central nervous system cells in culture measured by NO-nitrite/ozone chemoluminescence. *Brain Res* 748:1-11

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

Schumann RR, Belka C, Reuter D, Lamping N, Kirschning CJ, Weber JR and Pfeil D (1998) Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukine-1 converting enzyme, ICE) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* 98:577-584

Hanisch UK, Lyons S, Nolte C, Prinz M, Weber JR, Kettenmann H and Kirchhoff F (1997) Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to janus kinase activity. *J Biol Chem* 272:28853-28860

Valdueza JM, Weber JR, Harms L and Bock A (1996) Severe tick borne encephalomyelitis after tick bite and passive immunisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:593-594

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

Interventionen in die komplexe Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis sind ein vielversprechender Ansatz für die Zukunft. Eingriffe in die Schadenskaskade können durchaus auf der einen Seite zu Vorteilen, auf der anderen Seite aber zu möglichen Nachteilen

wie z.B. die unspezifische iNOS Inhibition führen. Knock out Modelle sind eine sehr gute Möglichkeit Teilaspekte besser zu studieren, da hier isolierte Schritte ausgeschaltet werden. Ergänzend sollten diese Erkenntnisse aber auch durch klassische Ansätze wie pharmakologische Interventionen oder den Einsatz von Antikörpern validiert werden.

3.5.1 Ziele

3.5.1.1 Zytokine und bakterielle Meningitis

Ein wesentlicher Ansatz bei der Intervention in Entzündungskaskaden ist die Verminderung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Diese spielen auch in der Aktivierung antientzündlicher Mechanismen wie der Expression der antiinflammatorischen Zytokine eine Rolle. Zudem scheinen Ergebnisse aus Modellen außerhalb des zentralen Nervensystems nicht einfach übertragbar zu sein. So führt im Maussepsismodell die Ausschaltung des TNFR1 zu einem protektiven Effekt, hingegen im ZNS eine Verstärkung des Schadens im Modell der Toxoplasmen Enzephalitis (Schlüter-Deckert persönliche Kommunikation) zu beobachten ist.

a) Welchen Einfluß hat das Fehlen der TNF-Rezeptoren auf die durch PCW induzierte Meningitis? Welche Effekt auf die Zytokinproduktion und die MAPK Aktivierung ergibt sich?

Nur unzureichend untersucht ist der Einfluß von IL-1 und IL-6 auf den Ablauf der bakteriellen Meningitis.

b) Welchen Effekt hat die genetische Ausschaltung von Il-6 auf den Ablauf der Entzündungskaskade?

3.5.1.2 Leukozyten Endothelinteraktion

Leukozyten und deren Eindringen in den subarachnoidal Raum sind von großer Bedeutung für den Ablauf der bakteriellen Meningitis. Welche Mechanismen die Adhäsionskaskade in Gang setzen, ist noch unklar. Vorstellbar wäre, daß meningeale und durale Mastzellen dabei eine wichtige Funktion haben.

a) Welchen Einfluß hat das Fehlen von Mastzellen (WS/WS Ratten) auf die Leukozyten-Endothelinteraktion und auf rCBF, ICP Hirnödem und Leukozytenzahl im CSF.

b) NO ist ein zentraler Modulator von Leukozyten-Endothelinteraktion und ein potenter Vasodilatator. Welche Strukturen allerdings wesentlich an seiner Produktion beteiligt sind, ist zu klären.

Vermindert die Blockade der β -Subunit (CD 18) Nitrit im CSF? Produzieren Leukozyten und deren Fraktionen NO nach Inkubation mit PCW?

c) Wie verläuft die Meningitis in Bezug auf Hirnödem und Leukozyteninvasion in iNOS Knock out Mäusen?

Eine völlig offene Frage ist der Verbleib der in großen Zahlen eindringenden Leukozyten in den CSF, die möglicherweise durch Apoptose reguliert werden.

d) Finden sich Hinweise auf programmierten Zelltod in Leukozyten im CSF?

3.5.1.3 Neuronale Mechanismen, die zu Glia- und Endothelaktivierung führen

Eine Ausschaltung des N. trigeminus, die zu einer Depletion von CGRP und SP an terminalen C-Fasern führt, vermindert den rCBF Anstieg nach Meningitisinduktion, nicht hingegen eine akute Denervierung, die noch zu keiner Degeneration peripherer C-Fasern geführt hat. Fraglich ist, ob eine komplette Denervierung oder auch durch die Gabe von spezifischen NK1 Rezeptoren Blocker für SP eine Modifikation der kompletten Entzündungskaskade zu erreichen ist. Möglicherweise ist SP das bedeutendere Neuropeptid in diesem Zusammenhang.

a) Vermindert die Behandlung mit einem NK 1 Rezeptorenblocker den rCBF und Hirndruckanstieg, das Hirnödem und die Leukozytenzahl im CSF?

b) Welchen Einfluß hat das Fehlen von SP (TAC-1 Knock out Maus) auf den Ablauf der Meningitis.

Da Endothelzellen in Bezug auf ihre Beteiligung an der neurogenen Inflammation nicht untersucht sind, wollen wir an Endothelzellkulturen die Zytokinexpression nach Neuropeptidgabe und in Kombination mit PCW und mögliche Interventionen in Bezug auf Zytokin- und Chemokineexpression und -produktion prüfen. Diese Untersuchungen haben über die Meningitis hinaus Bedeutung bei Krankheiten mit meningealem Reiz wie der Subarachnoidalblutung und der Sinusvenenthrombose.

3.5.2 Methoden

Tiermodelle

a) Ein Teil der vorgeschlagenen Untersuchungen werden an einem international eingesetzten und von uns modifizierten Modell der bakteriellen Meningitis der Ratte durchgeführt (Weber et al., 1995). Diese Techniken sind in unserem Labor seit Jahren etabliert und validiert. Dieses Modell zeichnet sich durch ein exaktes physiologisches Monitoring aus.

b) Mausmodell der bakteriellen Meningitis. In Anlehnung an ein publiziertes Modell (Tang et al., 1996) werden die Mäuse mit einer G 30 Nadel lumbal punktiert und 50µl PCW injiziert. Nach 8 Stunden Liquorpunktion und Gehirnentnahme zur Bestimmung von Hirnwassergehalt oder zur histologischen Bearbeitung nach Perfusionsfixierung .

Zellkultur

Als primäre Zellkulturen werden unter standardisierten Bedingungen folgende Zelltypen regelmäßig präpariert: Cortikale Kapillarendothelzellen stellen das morphologische Substrat der Blut-Hirn-Schranke dar. Astrozyten als weiterer wesentlicher Bestandteil der BHS sowie als eine der immunkompetenten Zellen im ZNS (Weikert et al., 1997). Mikroglia als die wichtigsten immunkompetenten Zellen im ZNS. Des weiteren sind Primärkulturen aus Septum,

Hippocampus und Cortex in serumfreien Systemen mit < 10% Astrozyten und < 0,1% Mikroglia, sowie Mischkulturen mit 50-70% Astrozyten und 1% Mikroglia etabliert. Alle Zellkulturen werden regelmäßig mittels immunocytochemischer Färbetechniken auf ihre Zusammensetzung überprüft. Vergleichbare Zellkultursysteme der Maus und der entsprechenden Knock out Tiere sind für Astrozyten bereits verfügbar, für Mikroglia in Aufbau und für Endothelzellen geplant.

Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) in vivo

Der Einsatz der CLSM in vivo am Gehirn wurde von uns erstmals beschrieben (Dirnagl et al., 1992; Dirnagl et al., 1991). Die CLSM (MRC 600 Bio Rad, Zeiss Jena Wasserimmersionsobjektiv 40 x) erlaubt in vivo die dynamische Untersuchung zerebraler corticaler Kapillaren. Durch mit Rhodamin 6G intravital gefärbte Leukozyten können Adhärenz und Extravasation dargestellt und verglichen werden. Unterschiedliche 100µm lange kapilläre Segmente werden in bestimmten Zeitintervallen jeweils für eine Minute untersucht und nachträglich anhand der kontinuierlichen Videoaufzeichnung ausgewertet.

Laser-Doppler Blutflußmessung (LDF):

Die LDF-Methode wurde von uns für die Messung relativer Veränderungen des rCBF des Rattenkortex unter Kontroll- und Ischämiebedingungen sowie bei bakterieller Meningitis validiert (Dirnagl et al., 1989). Die Methode mißt die mikrozirkulatorische Durchblutung (Produkt aus Blutzellgeschwindigkeit und Volumen) in einem Gewebsvolumen von ca. 1mm³ (Perimed Periflux 4001 Master). Die Messung beginnt nach Registrierung einer stabilen Baseline über 30 Minuten. Die Ergebnisse werden in % des Baselinewertes ausgedrückt.

Zytokinmessung

Mittels der etablierten Bioassays (TNF, Il-6) können freie, biologisch aktive Interleukine in Zellkulturüberständen, Blutserum sowie im Liquor quantitativ bestimmt werden. Ergänzt werden diese Methoden durch kommerzielle ELISAs für TNF- α , IL-1, IL-6, Il-10, MIP-1 und MIP-2 (Biosource). Quantitative RT-PCR für TNF- α , IL-1, IL-6, Il-10, MIP-1 und MIP-2 wird nach unten angeführten Protokoll durchgeführt.

Griess-Reaktion

Das gasförmige Radikal NO wird in Flüssigkeiten (Zellkulturüberständen) zu Nitrit oxidiert und dort als stabiles Endprodukt akkumuliert. Eine konzentrationsabhängige Farbreaktion mit dem Griess-Reagenz erlaubt über die Messung der optischen Dichte eine Quantifizierung der freigesetzten NO-Menge. Zusammen mit der Arbeitsgruppe von Herrn Paul wurde auch eine RT-PCR für iNOS etabliert.

RT-PCR (Zytokine, iNOS)

Lyse der Zellen und Isolation der Gesamt-RNA mit RNAid Kit Bio 101 (La Jolla, CA). Anschließend erfolgt die kompetitive Reverse-Transkriptase-Reaktion. Das verwendete DNA-Kontrollfragment mit Bindungsstellen für 5' und 3' zytokin-spezifische Primer wurde im Institut für Immunologie der Charité synthetisiert (Siegling et al., 1994). Die Sequenzen der

sense und antisense Primer für die verschiedenen Ratten Zytokine und b-Actin entsprechen publizierten (Kimelberg and Norenberg 1989).

Der sense Primer der iNOS ist lokalisiert zwischen den Nukleotiden 1295-1314 (5'-GCA GAA TGT GAC CAT CAT GG) und der antisense primer zwischen den Nukleotiden 1701 - 1720 (5'-ACA ACC TTG GTG TTG AAG GC) der Ratten iNOS cDNA-Sequenz. Die Länge der amplifizierten cDNA beträgt 426 bp während das Kontrollfragment eine Länge von 357 bp aufweist. Die sense Primer der GAPDH ist lokalisiert zwischen den Nukleotiden 515 - 537 (5'-ATC CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG) und der antisense Primer zwischen den Nukleotiden 980 - 1003 (5'- CAG GAA ATG AGC TTC ACA ATG TTG) der GAPDH cDNA-Sequenz. Die amplifizierte cDNA hat eine Länge von 489 bp und das Kontrollfragment von 440 bp.

Für die Quantifizierung werden die Proben auf ein einheitliches Ausgangsniveau ihres cDNA-Gehaltes, basierend auf der b-Actin bzw. GAPDH-Konzentration, eingestellt, anschließend wird die PCR mit einem CY5 markierten sense Primer durchgeführt. Dies ermöglicht die direkte Quantifizierung der PCR-Produkte mit einem Laserfluoreszenz DNasequencer (AL-Fexpress, Pharmacia, Biotech).

Dafür werden das amplifizierte Kontrollfragment und die amplifizierte cDNA des zu untersuchenden Zytokines bzw. der iNOS auf einem nicht denaturierenden 5% Polyacrylamid-Gel getrennt. Über die Integration des dabei detektierten Fluoreszenz Signals der CY5'-markierten Banden erfolgt die quantitative Analyse der PCR-Produkte.

Life/Death - Assays

Zur Beurteilung von Zellschaden in den Zellkulturen werden nachfolgend genannte Methoden angewendet: die Quantifizierung des aus toten Zellen freigesetzten zytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH). Die Quantifizierung der lebenden Zellen anhand der Bestimmung ihrer metabolischen Aktivität mittels Umsetzung von MTT. Die Zählung toter und lebender Zellen nach Trypanblaufärbung bzw. Fluorescindiacetat / Propidiumiodid-Färbung. Um einen Zelluntergang durch Apoptose nachzuweisen, werden die dabei entstehenden DNA-Fragmente über gelelektrophoretisches „Laddering“ dargestellt (Rosl 1992). Derzeit wird eine nichtradioaktive Methode zur quantitativen Beurteilung des „Laddering“ etabliert (Genzyme Apoptotic Laddering).

Tierversuchsgenehmigungen und eine Tötungsanzeige zur Durchführung der genannten Untersuchungen liegen vor (G 0123/94, G 0416/97, T 0120/97, Senatsverwaltung für Gesundheit, Berlin). Gentechnologische sowie Untersuchungen am Menschen werden nicht durchgeführt.

3.5.3 Arbeitsprogramm

3.5.3.1 Bakterielle Meningitis und Zytokine

Welchen Einfluß hat das Fehlen der TNF-Rezeptoren auf die durch PCW induzierte Meningitis?

Im Mausmodell: Lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in TNFR 1 Knock out Mäusen (Jackson Lab.). Zellzahl und Hirnödembestimmung. n = 20, 10/10.

Lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in TNFR 1 Knock out Mäusen (Jackson Lab.). Zellzahl und Hirnödembestimmung. n = 20, 10/10.

Lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in TNFR 1 Knock out Mäusen (Jackson Lab.) n = 20, 10/10. Perfusionsfixierung und Histologische Untersuchung - Astrozyten und Mikrogliaaktivierung.
Lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in TNFR 2 Knock out Mäusen (Jackson Lab.) n = 20, 10/10. Perfusionsfixierung und Histologische Untersuchung - Astrozyten und Mikrogliaaktivierung

Welchen Effekt hat die Behandlung mit Thyrosine Kinase Inhibitoren auf rCBF, ICP, Hirnödem, Leukozyteninvasion, intrathekale TNF Produktion und Mikrogliaaktivierung?

Im Rattenmodell: intrazisternale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 75 µl) oder Vehikel (75 µl NaCl) und Behandlung mit Tyrphostin AG 126; rCBF-, ICP-Messung, Hirnwassergehaltbestimmung, Liquoruntersuchung - Leukozyten, TNF, Il-6. Astro- und Mikrogliaaktivierung (OX 42, GFAP etc.), Histologische Untersuchung nach Perfusionsfixierung, n = 21, 7/7/7.

Welchen Effekt hat die Behandlung mit p38 MAPK Inhibitoren?

Im Mausmodell: Intrazisternale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 75 µl) oder Vehikel (75 µl NaCl) und Behandlung mit p 38 Hemmer (SB 202190 Calbiochem); Hirnwassergehaltbestimmung, Liquoruntersuchung; n=30, 10/10/10. Astro- und Mikrogliaaktivierung (OX 42, GFAP etc.), Histologische Untersuchung nach Perfusionsfixierung, n = 30, 10/10/10.

Welchen Effekt hat die genetische Ausschaltung von Il-6 auf den Ablauf der Entzündungskaskade?

Im Mausmodell: lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in Il-6 Protein Knock out Mäusen (Jackson Lab.). Zellzahl und Hirnödembestimmung. n = 20, 10/10.

Lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in Il-6 Protein Knock out Mäusen (Jackson Lab.) n = 20, 10/10. Perfusionsfixierung und Histologische Untersuchung - Astrozyten und Mikrogliaaktivierung.

3.5.3.2 Bakterielle Meningitis und Leukozyten-Endothelinteraktion

Welchen Effekt hat die genetische Ausschaltung von iNOS?

Im Mausmodell: Lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in iNOS Knock out Mäusen (Jackson Lab.). Zellzahl und Hirnödembestimmung n = 20, 10/10.

Welchen Effekt hat die genetische Ausschaltung von nNOS?

Im Mausmodell: lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in nNOS Knock out Mäusen (Kooperation Moskowitz, Boston). Zellzahl und Hirnödembestimmung. n = 20, 10/10.

Welchen Einfluß hat die CD 18 Blockade auf die Nitrit Konzentration im Subarachnoidalraum?

Im Rattenmodell intrazisternale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 75 µl) oder Vehikel (75 µl NaCl) und Behandlung mit monoklonalen rattenspezifischen CD 18 Antikörper (Pharmigen); rCBF-, ICP-Messung, Hirnwassergehaltbestimmung, Liquoruntersuchung (Leukozytenzahl, TNF, IL-6, Nitrit (Gries) und Citrulinmessung, Leukozytenisolierung und iNOS Aktivitätsmessung. n = 21, 7/7/7.

Leukozytenpräparation und Differenzierung mit Magnetikpads. Anschließend Inkubation mit PCW und Nitritmessung, TNF Messung an isolierten Granulozyten und Monozyten.

Welche Rolle spielen Mastzellen für die Induktion von Leukozytenrollen?

Intrazisternale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 75 µl) oder Vehikel (75 µl NaCl) in Wistar Ratten und in Mastzell defizienten Ws/Ws, Ratten (Kooperation Kitamura, Osaka); Online Quantifizierung der Leukozyten-Endothelinteraktion mit confokaler Laserscanning Mikroskopie rCBF-, ICP-Messung, Hirnwassergehaltbestimmung, Liquoruntersuchung - Leukozytenzahl, TNF, IL-6. n = 21, 7/7/7.

Wird die Entzündungsantwort durch Apoptose der eingewanderten Leukozyten reguliert?

Intrazisternale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 75 µl) oder Vehikel (75 µl NaCl) Liquorentnahme und Suche nach Apoptosemarkern in Leukozyten. n = 14, 7/7.

3.5.2.3 Neuronale Mechanismen, die zu Glia- und Endothelaktivierung führen

Im Rattenmodell: intrazisternale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 75 µl) oder Vehikel (75 µl NaCl) und Behandlung mit NK 1 Rezeptor Antagonist (SR 140333, Sanofi, Montpellier, Frankreich) Antikörper; rCBF-, ICP-Messung, Hirnwassergehaltbestimmung, Liquoruntersuchung - Leukozytenzahl, TNF und IL-6. n = 21, 7/7/7.

Im Mausmodell: lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in Tac-1 Knock out Mäusen die keine SP produzieren (Kooperation Zimmer). Zellzahl und Hirnödembestimmung. n = 20, 10/10.

lumbale Injektion von PCW (Äquivalent von 10^7 CFU, *S.pneumoniae* PnR-527, 50µl) oder Vehikel (50 µl NaCl) in Tac-1 Knock out Mäusen die keine SP produzieren Perfusionsfixierung, Mikro-, Astrogliaaktivierung (OX 42, GFAP). n = 20, 10/10.

in vitro

Primäre cerebrale Endothelzellen, Inkubation mit PCW, CGRP, SP, bzw. PCW und CGRP oder SP.

RT-PCR TNF, IL-1, IL-6, IL-10 und MIP-2 und jeweils Proteinmessung.

Inhibition mit NK 1 Rezeptoren Antagonist (SR 140333, Sanofi, Montpellier, Frankreich) bzw. CGRP 8-37 Peptidfragment (Sigma).

ICAM-1, P-Selektin Messung mit Durchflußzytometrie.

3.5.4 Zeitplan

Die geplanten Experimente sollen parallel durchgeführt werden. In der zweiten Hälfte der Antragsphase soll auch die rCBF Messung sowie komplexere kraniale Fenstertechniken an

der Maus etabliert werden. Entsprechende Modifikationen der Protokolle sind durch die Ergebnisse der beantragten Untersuchungen zu erwarten.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Dieses Projekt steht im inhaltlichen und methodischen Zusammenhang mit den immunologisch orientierten Projekten (Hanisch, Volk, Haas). Bisher wurden mit dem Projekt Hanisch Signalkaskaden für IL-15 sowie Mikrogliaaktivierung nach LPS und PCW Stimulation untersucht. Diese Zusammenarbeit wird intensiv fortgeführt.

Regulationsvorgänge der Glia und Leukozytenaktivierung sollen mit den Projekten Haas und Volk untersucht werden. Modelle experimenteller Inflammation in situ stehen im Mittelpunkt einer Kooperation mit den Projekten Nitsch, Hanisch und Volk.

Enge methodische Kooperationen bestehen zusätzlich mit den Projekten Paul, Dirnagl, Dreier und Blasig. Zudem besteht eine langjährige Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité (Direktor: Prof Dr. U. Göbel) mit der Arbeitsgruppe PD Dr. Bürger und neuerdings auch im Bereich signalling und der Auswirkung von Sepsis auf das Gehirn mit PD Dr. R. Schumann.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
 SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
 I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
		BAT IIa/2	1	19800	BAT IIa/2	1	39600	BAT IIa/2	1	39600	BAT IIa/2	1	19800
zusammen		zus.		19800	zus.		39600	zus.		39600	zus.		19800
	SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		18400			36800			36800			18400
		515		7000									
		zusammen		25400	zusammen		36800	zusammen		36800	zusammen		18400
	I	Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:			Mittel für Investitionen insge- samt:		
		7.000											

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	Weber Jörg Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik	10	1995	Ib
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Einhäupl Karl Prof. Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik	5	1995	C4
	Angstwurm Klemens Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik	40	1995	IIa („Gerok“) eingerichtet auf Empfehlung der DFG
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Klatt Renate	TA	Neurologische Kli- nik	10	1995	Vb
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Freyer Dorette Dr. rer. Nat	Neurobiologie	Neurologische Klinik	20	1995	IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	

Begründung der Personalausstattung:

Grundausrüstung

1. Weber, Jörg R. Dr. med.: Herr W. kann sich neben seinen klinischen Verpflichtungen als Oberarzt der Klinik dem Projekt etwa 15 Stunden / Woche widmen. Herr W. beherrscht alle im Projekt vorgeschlagenen Präparationen und Techniken und wird selbst einen Teil der Experimente durchführen.

2. Einhäupl, Karl M. Prof. Dr. med.: Als Direktor der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Charité wird sich Herr E. neben der Leitung der Klinik, Lehrverpflichtungen, Patientenbetreuung etc. ca. 5 Stunden/Woche dem Projekt widmen.

3. Angstwurm, Klemens Dr. med. (BAT IIa, "Gerok" - Stelle): Herr A. ist ein junger, engagierter Wissenschaftler, der von Anfang an den Aufbau des Meningitismodelles im Labor der experimentellen Neurologie mitgetragen hat.

Auf Empfehlung der Gutachter bei der letzten SFB Begutachtung wurde eine "Gerok" - Stelle eingerichtet und mit Herrn A. besetzt. Dadurch wurde sicher gestellt, daß auch Herr W. sich über längere Zeit ausschließlich dem Projekt widmen konnte. Dies ermöglichte eine sehr erfolgreiche Konzentration und Kontinuität in der wissenschaftlichen Arbeit in der ersten Antragsperiode

Herr A. beherrscht alle im Antrag vorgeschlagenen in vivo Techniken und hat einen wesentlichen zur Etablierung des Mausmodelles beigetragen.

4. Klatt Renate MTA: Frau K. ist eine erfahrene MTA und mit den Techniken der Zellkultur, Interleukinmessung, Leukozytenbestimmung in CSF und Blut etc. vertraut. Neben anderen Aufgaben im Labor der experimentellen Neurologie wird sie sich dem Projekt ca. 10 Stunden / Woche widmen.

Ergänzungsausstattung

5. Freyer Dorette, Dr. rer. nat. (BAT IIa/2): Frau F. ist Biologin und war entscheidend am Aufbau der Zellkultursysteme und diverser Meßmethoden beteiligt. Die Präparation für primäre Zellkultursysteme sowie die Überwachung, Charakterisierung und Qualitätskontrolle ist eine sehr wichtige Aufgabe von Frau F. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Erarbeitung neuer Versuchsansätze in Zellkultursystemen. Die von ihr durchgeführten Zytokinmessungen sowie auch die PCR Techniken ergänzen die in vivo Experimente Da ein Teil der in vivo Versuche technisch sehr aufwendig ist widmet sich Frau F. hier dem Aufbau von Messgeräten, Dateneintrag und der Bereitstellung von Pharmaka, Antikörpern etc.

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	5.000	10.000	10.000	5.000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	25400	36800	36800	18400

Geräte im Einzelwert von bis zu DM 20.000 (brutto) ohne Fahrzeuge

Sterotaktischer Rahmen mit Mausadapter und Mikromanipulator der Fa. Stoelting DM 7.000
 Begründung: Zur Fixierung der Mäuse, insb. bei Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.
Summe Kleingeräte: **DM 7.000**

Verbrauchsmaterial und Versuchstiere 1998/1999/2000/2001 pro Jahr

1. Versuchstiere:
 - Wistar Ratten (300 g) 95 Stück à DM 15 DM 1.425
 - Wistar Ratten (30 g) 300 Stück à DM 7 DM 2.100
 - Mäuse (20g) 120 Stück à DM 5 DM 600
 - Mäuse (20g) transgen 150 Stück à DM 15 DM 2.250
 - Begründung: Die Tiere müssen vom BGA, bzw. Charles River bezogen werden und können im Tierstall der Charité in der Ziegelstr. gehalten werden.
2. Chemikalien, Medien (RPMI, FKS etc.), Filter DM 7.000
 Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für die Durchführung von Zellkulturexperimenten notwendig sind.
3. Gefäße für die Zellkultur (4-, 6-, 21-, 96-Multi Well) DM 4.500
 Begründung: Hierbei handelt es sich um die Gefäße, die für die Durchführung von Zellkulturexperimenten unerlässlich sind.
4. Chemikalien für PCR DM 6.000
 Begründung: Hierbei handelt es sich um teure Verbrauchsmaterialien, die für die Durchführung von PCR-Methoden notwendig sind.
5. Narkotika und Chemikalien für in vivo Experimente DM 9.000
 Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für die Durchführung von Tierexperimenten notwendig sind.
6. Sondergase zu Narkose und Begasung von künstlichem Liquor DM 2.500
 Begründung: Hierbei handelt es sich um Gase, die für die Durchführung von Narkosen und zur Herstellung künstlichen Liquors notwendig sind.
7. Laser Doppler Flowsonde DM 1.414
 Begründung: Auch bei sorgfältigster Behandlung ist die Lebenserwartung ca. 1 Jahr.

Summe Verbrauchsmittel:

DM 36.789

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B7

3.1.1 Thema:

Signalkaskade der Differenzierung und Aktivierung monozytärer Zellen unter dem Einfluß von Astrozyten

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Zellbiologie, Signaltransduktion

3.1.3 Leiter:

PD Dr. rer. nat. Ralf Hass, *16.Nov. 1958

Institut für Anatomie

AG Zell- und Neurobiologie

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität

Universitätsklinikum Charité

10098 Berlin

Telefon: 28028461

Telefax: 28021460

e-mail: rhass@rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

nein ja, befristet bis zum 31.3.2003

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen ja nein
- klinische Studien im Bereich der
somatischen Zell- oder Gentherapie ja nein
- Tierversuche ja nein
- gentechnologische Versuche ja nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998	44,4	9,0		53,4
1999	88,8	18,0		106,8
2000	88,8	18,0		106,8
1. Hj. 2001	44,4	9,0		53,4

3.2 Zusammenfassung

Hirnschädigungen sind häufig auch mit einer Perforation der Blut-Hirn-Schranke verbunden, was zu einer Invasion u.a. von Monozyten führt. Die ersten zellulären Kontakte der Monozyten auf neuronaler Seite finden dabei mit den Astrozyten an der defekten Blut-Hirn-Schranke statt. Als experimentelle Grundlage sollen in Zellkultorexperimenten Interaktionen von monozytären Zellen verschiedener Entwicklungsstufen mit Hirnzellpopulationen, insbesondere Astrozyten studiert werden. Der Schwerpunkt dieser Charakterisierungen beinhaltet inter- und intrazelluläre Signale zwischen Monozyten und Astrozyten. Die Expression bestimmter Integrine (Fibronectin, CD11a, b, c, CD18), beteiligter Kinasen (fokal adhesion kinase (p125^{FAK}) und Isoenzyme der Proteinkinase C (PKC)), sowie der Proliferations- und Aktivierungszustand der monozytären Zellen durch die Expression von Transkriptionsfaktoren (c-Jun, c-Fos) und monozytärer Marker (Zytokinexpression und Zytokinrezeptoren) sollen bestimmt werden.

Es ist vorgesehen, die im Zellkulturmodell erworbenen Resultate auch *in vivo* zu testen. Hierzu eignen sich die bereits im SFB etablierten Schädigungsmodelle in der Ratte, und zwar 1) "bakterielle Meningitis" (Teilprojekt A3) und 2) "entorhinale Läsion" (Teilprojekt C1). Monozyten aus Rattenblut sollen isoliert, markiert und anschließend in die geschädigte Ratte wieder injiziert werden. In isolierten Hirnschnitten sollen die eingewanderten markierten Monozyten dann über *in situ* Hybridisierungen auf Veränderungen der im Zellkulturmodell verwendeten Marker überprüft werden. Die erworbenen Resultate können einen Beitrag leisten für gezielte pharmakologische Eingriffe in die Signalkette der Monozyten-/Makrophagenaktivierung bei Hirnschädigungen.

3.3 Stand der Forschung

Eine ganze Reihe chronischer und akuter Hirnerkrankungen wie beispielsweise chronisch demyelinisierende Erkrankungen (Multiple Sklerose) oder Degeneration und Verlust neuronaler Zellverbände (Alzheimer, Parkinson) und andererseits akute Hirnerkrankungen (bspw. Meningitis, Schlaganfall) sind mit Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke verbunden und resultieren u.a. in einer Akkumulation von Makrophagen aus dem peripheren Blut im Hirn. Die

funktionelle Bedeutung invadierender hämatogener Makrophagen zu den Schädigungszentren im Hirn ist unklar, denn residente Mikrogliazellen üben u.a. Makrophagenfunktion im Hirn aus. So konnten Studien am Schädigungsmodell der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) zeigen, daß Mikrogliazellen bestimmte makrophagenspezifische Marker verstärkt exprimieren können und teilweise an den Schädigungszentren sehr viel effektiver wirken als hämatogene Makrophagen [Rinner et al., 1995]. In diesem Zusammenhang ist auch weitgehend unbekannt, durch welche Mediatoren eine Attraktion der Makrophagen induziert wird und welche intrazellulären Signalwege bei der Aktivierung und bei Interaktionen der Makrophagen mit bestimmten Hirnzellpopulationen wichtig sind. Es gibt bisher Hinweise, daß bestimmte Cytokine und immunmodulatorische Substanzen, sogenannte Chemokine, als Mediatoren einer entzündungsinduzierten Zellmigration für eine Leukozytenattraktion zu den Schädigungszentren im Zentralnervensystem verantwortlich sind [Ransohoff et al., 1996]. Neuere Daten konnten hierbei zeigen, daß im EAE Schädigungsmodell bestimmte Chemokine (Monocyte chemoattractant protein-1 und ein IFN- γ -induzierbares 10KDa Protein) verstärkt exprimiert werden und mit einer Attraktion von T-Lymphozyten korrelieren [Glabinski et al., 1997].

Eine möglicherweise bedeutsame Rolle bei der Attraktion von Makrophagen könnten initial Astrozyten spielen, die über Extrazellulärmatrrixproteine mit dem kontinuierlichen Epithel der Kapillaren an der Stabilität der Blut-Hirn-Schranke mitwirken. Astrozyten sezernieren eine Reihe von Peptidmediatoren und Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , IFN- γ), [Minamo et al., 1991; Rothwell et al., 1990; Nakamori et al., 1993], die zu einer Aktivierung von immunkompetenten Zellen wie Monozyten/Makrophagen führen. Allerdings ist eine direkte Beteiligung von Astrozyten in der Immunregulation bislang noch nicht eindeutig geklärt. Darüberhinaus sind mögliche Interaktionen von Astrozyten mit Monozyten/Makrophagen wie bspw. über die Expression bestimmter Integrine (CD11/CD18), sowie den ICAMs (intercellular adhesion molecules) und beteiligte molekulare Signalwege weitgehend unklar. Vor kurzem konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß die durch Integrine vermittelte Adhäsion an die Extrazellulärmatrrix eine zentrale Rolle spielt bei der Kontrolle von Apoptosemechanismen und der Zellzyklusregulation [Giancotti, 1997]. Die große Bedeutung der Integrine und ICAMs bei Zell-Zell-Interaktionen und interzellulären Kommunikationsprozessen wurde auch bereits im Hirn gezeigt durch Untersuchungen im EAE-Schädigungsmodell, wobei ICAM-1 vermittelte Signalwege in die Pathogenese der EAE involviert sind [Archelos et al., 1993].

Zelluläre Interaktionen sind im weiteren Verlauf der Einwanderung hämatogener Makrophagen auch mit anderen Hirnzellpopulationen wie bspw. Oligodendrozyten, Neuronen und Mikroglia sehr wahrscheinlich. Interaktionen phagozytierender Mikrogliazellen mit T-Lymphozyten wurden auch bei einer intakten Blut-Hirn-Schranke postuliert, ohne daß daraus eine generalisierte Immunreaktion resultiert [Raivich et al., 1996]. Die Wechselwirkung hämatopoetischer Zellen mit verschiedenen Hirnzellpopulationen wurde vor kurzem bei markierten Knochmarkstransplantaten beobachtet, allerdings blieb hierbei unklar, auf welchem Weg die hämatopoetischen Zellen ins Zentralnervensystem gelangen, um mit Hirnzellen zu interagieren [Eglitis and Mezey, 1997]. Auch hier ist über die Beteiligung und Charakterisierung interzellulärer Signalwege bei diesen Interaktionen sehr wenig bekannt.

Literatur:

- Archelos, J.J., Jung, S. et al.: *Ann. Neurol.* **34**:145-154 (1993)
- Chalfie, M., Tu, Y. et al.: *Science* **263**:802-805 (1994)
- Economu, J.S., Rhoades, K. et al: *J. Exp. Med.* **170**:321-326 (1989)
- Eglitis, M.A., Mezey, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:4080-4085 (1997)
- Giancotti, F.G., *Curr. Opinion in Cell Biol.* **9**:691-700 (1997)
- Glabinski, A.R., Tani, M. et al: *Am. J. Pathol.* **150**:617-630 (1997)
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J. et al: *Cell* **62**:1189-1204 (1990)
- Maniak, M., Rauchenberger, R. et al.: *Cell* **83**:915-924 (1995)
- Minamo, F., Sancibrian, M. et al: *Brain Res. Bull.* **27**:701-706 (1991)
- Nakamori, T., Morimoto, A., et al: *Am. J Physiol.* **265**:R834-R839 (1993)
- Raivich, G., Jones, L. et al: *Annals of Anatomy* **179**: (abstract) (1996)
- Ransohoff, R.M., Glabinski, A., Tani, M: *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**:35-46 (1996)
- Rinner, W.A., Bauer, J. et al.: *Glia* **14**:257-266 (1995)
- Rittling, S.R., et al: *Nucleic Acid. Res.* **17**:1619-1633 (1989)
- Rothwell, N., Hardwick, A. et al: *Horm. Metab. Res.* **22**:595-596 (1990)
- Schüle, R., Rangarajan, P. et al: *Cell* **62**:1217-1226 (1990)
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C. et al: *Cell* **62**:1205-1215 (1990)

3.4 Eigene Vorarbeiten

Humane Zelllinien in verschiedenen monozytären Entwicklungsstadien (promyelozytäre (HL-60), monoblastoide (U937), und monozytäre (THP-1) Populationen) können mit bestimmten Substanzen, wie bspw. dem Phorbolster TPA zu einem Differenzierungsprozess entlang dem monozytären Entwicklungsweg induziert werden [Sundström and Nilsson, 1976; Lotem and Sachs, 1979; Rovera et al., 1979]. Die TPA-induzierte Differenzierung führt zu einem sofortigen Wachstumsstopp dieser Zellen und zu signifikanten morphologischen und metabolischen Veränderungen [Rovera et al., 1979]. In Suspension wachsende HL-60, U937 oder THP-1 Zellen werden innerhalb von 72 Stunden nach Inkubation mit TPA adhären unter Ausbildung von Zellausläufern und dreidimensionalen Zellaggregaten. Parallel zur induzierten Adhärenz ist die Expression von Intermediärfilamentproteinen (Vimentin, Lamin A, Lamin C) und Proteinen der Extrazellulärmatrix (Fibronectin) signifikant erhöht. Auch Zelloberflächenintegrine (Fibronectinrezeptor, LFA-1, MAC-1, gp150,95), die bei der Zell-Zell-Adhäsion und bei interzellulären Kommunikationsprozessen eine entscheidende Rolle spielen, sind nach TPA-Behandlung von U937 Zellen signifikant exprimiert [Hass et al., 1990a]. Die Expression dieser Oberflächenglykoproteine korreliert mit differenzierungsinduzierten Veränderungen im Glykosylierungs- und Lektinmuster bestimmter Kohlenhydratspezifitäten, wie bspw. Lactose und Fucose [Hass et al., 1990b]. Dagegen sind andere Oberflächenglykoproteine in TPA-behandelten Zellen deutlich herunterreguliert. Hierzu zählt der Transferrinrezeptor, dessen

Expression für proliferierende Zellen *in vitro* notwendig ist. Entsprechend der reduzierten Expression des Transferrinrezeptors ist die autonome Proliferation der Zellen komplett inhibiert [Gunji et al., 1992; Kharbanda et al., 1991]. Es findet eine Arretierung in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus statt [Hass et al., 1990a; Hass et al., 1992]. Während der TPA-vermittelten Adhärenz und dem induzierten Wachstumsstopp entwickeln differenzierende HL-60, U937 oder THP-1 Zellen teilweise funktionelle Eigenschaften von Makrophagen. TPA-differenzierte U937 exprimieren bspw. c-fms (M-CSF Rezeptor) [Sariban et al., 1985], sie können in großen Mengen Arachidonsäure in Prostaglandine metabolisieren [Köhler et al., 1990] und sie setzen konstitutiv Tumornekrose Faktor (TNF- α) und Interleukin-1 (IL1- β) frei [Hass et al., 1991a]. Entsprechend dem unterschiedlichen Entwicklungsstand der drei Zelllinien ist aber auch der differenzierte Zustand entsprechend abgestuft:

HL-60 < U937 < THP-1

D.h., TPA-differenzierte THP-1 Zellen sind weiter entwickelt als entsprechende U937 und HL-60 Zellen und tragen auch am deutlichsten Eigenschaften aktivierter Monozyten/Makrophagen.

Eigene Arbeiten (Literatur):

- Gunji, H., Hass, R. et al: *J. Clin. Invest.* **89**, 954-960 (1992)
- Hass, R., Giese, G., Meyer, G. et al: *Eur. J. Cell Biol.* **51**:265-271 (1990a)
- Hass, R., Köhler, L., Rehfeldt, W. et al: *Cancer Res.* **50**:323-327 (1990b)
- Hass, R., Lonnemann, G., et al. *Leukemia Res.* **15**:327-339 (1991a)
- Hass, R., Pfannkuche, H.J. et al: *Cell Growth & Diff.* **2**:541-548 (1991b)
- Hass, R., Gunji, H. et al: *Cancer Res.* **52**:1445-1450 (1992)
- Hass, R., Gunji, H. et al: *Cell Growth & Diff.*, **4**, 159-166 (1993a)
- Hass, R., Hirano, M. et al: *Cell Growth & Diff.*, **4**, 657-663 (1993b)
- Hass, R., Meinhardt, G. et al: *Eur. J. Cell Biol.*, **65**, 408-416 (1994)
- Hass, R., Busche, R. et al: *Gastroenterol.* **112**, 875-881 (1997a)
- Hass, R., Prudovsky, I. et al: *Leukemia Res.*, **21**, 589-594 (1997b)
- Kharbanda, S., Nakamura, T., Hass, R. et al: *J. Clin. Invest.* **88**:571-577 (1991)
- Köhler, L., Hass, R. et al: *Biochim. Biophys. Acta* **1042**:395-403 (1990)
- Lotem, H., Sachs, L: *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **76**:5158-5162 (1979)
- Rovera, G., O'Brian, T.A., Diamond, L: *Science* **204**:868-870 (1979)
- Sariban, E., Mitchell, T., Kufe, D: *Nature* **316**:64-66 (1985)
- Sundström, C. , Nilsson, K: *Int. J. Cancer* **17**:565-577 (1976)

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1. Ziele

Um zelluläre Interaktionen von Monozyten/Makrophagen mit Astrozyten in einem komplexen Zellsystem wie dem Hirn modellhaft untersuchen zu können, sind zunächst *in vitro* Studien mit homogenen Populationen dieser beiden Zelltypen vorgesehen. Dazu werden humane monozytäre Zelllinien verschiedener Entwicklungsstufen mit normalen humanen Astrozyten kultiviert. Der große Vorteil dieses experimentellen Ansatzes im humanen System liegt in den durch zahlreiche eigene Vorarbeiten eingehend charakterisierten Differenzierungsstadien der verschiedenen monozytären Zellpopulationen. Dadurch ermöglichen die Resultate u.a. Aussagen darüber, welche Entwicklungsstufe beim monozytären Entwicklungsweg Voraussetzung ist, bzw. welche Oberflächenmarker exprimiert sein müssen, um suszeptibel für Interaktionen mit Astrozyten zu sein. Als gut charakterisierte humane Zelllinien für den monozytären Entwicklungsweg werden promyelozytäre (HL-60), monoblastoide (U937), und monozytäre (THP-1) Populationen für Co-Kultorexperimente verwendet. Im Tiermodell, speziell in der Ratte, gibt es dagegen derzeit keine diesen unterschiedlichen Entwicklungsstadien entsprechenden monozytären Zelllinien.

Es ist vorgesehen, die Resultate aus den Zellkultorexperimenten auch teilweise physiologisch zu verifizieren. Hierzu sind *in vivo* Studien mit den im SFB etablierten Schädigungsmodellen geplant.

Die Resultate aus diesen Experimenten sollen zeigen, welche intrazellulären Signalwege möglicherweise zentral an der Regulation von monozytärer Differenzierung, Zellwachstum und Apoptose beteiligt sind.

3.5.2/3 Methoden und Arbeitsprogramm

In humanen monozytären Zelllinien verschiedener Reifestadien und normalen humanen Astrozyten sollen interzelluläre Kommunikationsprozesse untersucht und beteiligte Signalwege charakterisiert werden.

3.5.2/3.1 Markierung der monozytären Zelllinien:

Verschiedene humane Zelllinien (promyelozytäre (HL-60), monoblastoide (U937), und monozytäre (THP-1)) werden mit dem eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) über den pEGFP-N1 Vektor von Clontech stabil transfiziert mit Hilfe der Elektroporationsmethode von BioRad (Puls bei 960uF/250V). Entsprechende Zellklone mit einer guten Fluoreszenzausbeute (gute Transfektionsrate) werden über einen Becton Dickinson Cell Sorter isoliert (kann über die Arbeitsgruppe von H. Kettenmann (Teilprojekt B1) am MDC mitbenutzt werden) und als klonale Populationen für die Co-Kultorexperimente hochgezüchtet. Die Transfektion und konstitutive Expression des eGFP sollte entsprechend bisher bekannter Studien zu diesem Vektor keinen Einfluß auf die Funktionalität der Zellen und damit auf die durchzuführende Co-Kultorexperimente haben [Chalfie et al., 1994; Maniak et al., 1995].

3.5.2/3.2 Zellkultur:

Die Kultivierung der humanen monozytären Zelllinien HL-60, U937 und THP-1, sowie der entsprechenden eGFP-Transfektanten erfolgt unter gleichen Bedingungen (RPMI 1640 Medium, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin/100ug/ml Streptomycin und 10% (v/v) (bei HL-60 Zellen 15% (v/v)) fötales Kälberserum). Die normalen humanen Astrozyten werden von der Firma BioWhittaker erworben und in der Passage 2 mit einer Zelldichte von etwa 3.500 Zellen/cm² an diese Kulturbedingungen adaptiert, um eine Co-Kultur zu ermöglichen und um das konditionierte Medium problemlos zu übertragen.

3.5.2/3.3 Co-Kultur von humanen monozytären Zellen mit normalen humanen Astrozyten (NHA):

Humane monozytäre Zelllinien (HL-60, U937, THP-1) verschiedener Reifestadien werden mit normalen humanen Astrozyten kultiviert und Interaktionen unter folgenden Bedingungen studiert:

- Kultivierung der monozytären Zellen mit konditioniertem Astrozytenmedium
- Co-Kultivierung von Monozyten und Astrozyten in Doppelwandkulturen mit 0,2µm Membranausschluß (erlaubt nur den Austausch von Medium)
- direkte Co-Kultur von Monozyten und Astrozyten (Markierung der monozytären Zellpopulation durch stabile Transfektion mit einem eGFP-Vektor (*enhanced green fluorescent protein*)).

3.5.2/3.4 Adhärenz:

Eine durch Astrozytenfaktoren induzierte Adhärenz monozytärer Zellen soll durch eine Charakterisierung interzellulärer Glykosylierung von Zellaggregaten (Zell-Substrat-Adhärenz, Zell-Zell-Adhärenz) untersucht werden. Dabei werden die monozytären Zellen nach Vorbehandlung mit Tunicamycin mit konditioniertem Astrozytenmedium kultiviert (*Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung von Proteinen durch Inhibition der Dolicholpyrophosphat-N-Acetylglucosaminsynthese und durch Inhibition des Glucosetransfers auf Vorläuferstufen von Glykolipiden*). Eine Quantifizierung der Glykosylierung in den Zellen soll durch [¹⁴C]Leucin- und [¹⁴C]Mannose-Einbau vorgenommen werden, was entsprechend der eigenen Vorarbeiten im Labor etabliert ist [Hass et al., 1990b].

Bei den Untersuchungen zur Adhärenz soll auch die Expression von Extrazellulärprotein (Fibronectin) und die Expression von Integrinen (α-Untereinheiten: CD11a (LFA-1); CD11b (CR3/MAC1); CD11c (gp150,95); gemeinsame β-Untereinheit: CD18, Liganden: ICAMs), die bei Zell-Zell-Kontakten eine Rolle spielen, über FACS-Analyse getestet werden.

3.5.2/3.5 Funktionalität:

Die während der zellulären Interaktionen zwischen Monozyten und Astrozyten wirkenden Zytokine und Peptidmediatoren im konditionierten Medium können zu metabolischen Veränderungen in Form von Aktivierung/Deaktivierung oder zur Induktion von Differenzierungsvorgängen bei den Monozyten führen. Es wäre wichtig zu untersuchen, inwieweit verschiedene monozytären Zelltypen Eigenschaften aktivierter Makrophagen erwerben oder im Gegen-

teil, Eigenschaften verlieren. Zwei wichtige Untersuchungsparameter sind die Expression von alpha-Naphthylacetatesterase über eine histochemische Nachweisreaktion sowie die Fähigkeit der Zellen, Sauerstoffradikale zu produzieren, was über die Reduktion von Nitrobluetetrazolium quantifiziert werden kann. Die Expression spezifischer monozytärer Marker wie CD14 und c-fms, sowie die Generation von Zytokinen TNF- α , IL-1 α/β , IL-6 soll über Northern Blot und FACS-Analysen getestet werden.

3.5.2/3.6 Proliferation und Apoptose:

Während der zellulären Interaktionen sind Untersuchungen zum Zellwachstum in den monozytären Zellen geplant. Die Proliferationsrate soll über [³H]Thymidin-Einbau bestimmt werden. Gleichzeitig soll durch [³H]Uridin-Einbau die metabolische Aktivität der Zellen überprüft werden und in Relation zur Zellzahl gestellt werden. Ein wichtiges Ergebnis hieraus beantwortet die Fragestellung, ob die Proliferationsrate signifikant verändert wird oder ob das veränderte Zellwachstum nur dadurch zustande kommt, daß bspw. bei fast unveränderter Proliferationsrate viele Zellen eliminiert werden über Apoptosemechanismen. Gleichzeitig muß geklärt werden, inwieweit die monozytären Zellen während der Co-Kultur mit Astrozyten überhaupt zur Apoptose induziert werden können und welche zellulären Parameter (bspw. terminale Differenzierung) für die Apoptose erfüllt sein müssen. Apoptotische Zellen können immunhistochemisch mit Hilfe von Apoptosekits über die Aktivität der terminalen Transferase nachgewiesen werden [Hass et al., 1997a]. Ein weiterer Nachweis für das Auftreten apoptotischer Zellen soll biochemisch erfolgen: Durch DNA-Isolierung, Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung kann hierbei nachgewiesen werden, ob die DNA in den Zellen noch intakt ist, oder ob ein signifikanter DNA-Anteil degradiert erscheint in dem für Apoptose typischen Leitmuster von internukleosomaler DNA-Fragmentierung. Eine Quantifizierung degradiertes DNA wird im DNA-cleavage-assay vorgenommen: Der prozentuale Anteil degradiertes DNA wird bestimmt durch die Anreicherung und Aufreinigung der DNA mit Phenol/Chloroform; anschließend folgt die Sedimentation der DNA in zwei verschiedenen Ansätzen: Hochmolekulare (intakte) DNA wird mit 70% Ethanol bei Raumtemperatur sedimentiert, während die gesamte DNA Menge (intakte + fragmentierte DNA) mit 0,3 M Natriumacetat und 70% Ethanol bei -20°C gefällt wird; aus der Differenz der O.D._{260nm} Messungen von gesamter und hochmolekularer DNA kann der prozentuale Anteil degradiertes DNA bestimmt werden [Gunji et al., 1991; Hass et al., 1994].

Gleichzeitig soll über Western-Blot-Analysen die Expression von Bcl-2 und Bax überprüft werden, die an der Regulation von Apoptose beteiligt sind. Andere Western-Blot-Analysen sollen mit c-Myc, Max und Mxi-1 vorgenommen werden. Diese Faktoren sind zentral an der Regulation der Proliferation mitbeteiligt und sind in proliferierenden Zellen konstitutiv exprimiert. In diesem Zusammenhang soll auch geklärt werden, in welcher Phase des Zellzyklus die Proliferation arretiert oder verzögert werden könnte. Durch Methanolfixierung und Propidiumjodidfärbung der Zellen können im FACS mit Zellzyklus-Software die Anteile in verschiedenen Phasen des Zellzyklus quantifiziert werden [Hass et al., 1993b; Hass et al., 1994]. Aus diesen Resultaten lassen sich Hypothesen herleiten, welche intrazellulären Signale möglicherweise zentral an Veränderungen während der Progression durch eine bestimmte Zellzyklusphase mitwirken.

3.5.2/3.7 Intrazelluläre Signalkaskaden:

Bei der induzierten Adhärenz und Integrinexpression wird vermutet, daß die Aktivierung von cytosolischer Fokal-Adhesion Kinase (p125^{FAK}) zur Koordination inter- und intrazellulärer Signale beiträgt. Weiterhin haben bisherige Arbeiten in verschiedenen monozytären Zelllinien gezeigt, daß Differenzierung und Inhibition des Zellwachstums über bestimmte Kinasesysteme, insbesondere bestimmte Isoenzyme der Proteinkinase C (PKC) reguliert werden [Hass et al., 1993a; Hass et al., 1997b]. Im Verlauf der Signalkaskaden werden dabei Transkriptionsfaktoren aktiviert wie bspw. Jun und Fos [Jonat et al., 1990; Schüle et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990], die als Leucinzipper dann die Promotorregion differenzierungsassoziierter Gene transaktivieren können, wie TNF- α [Economou et al., 1989] oder Vimentin [Rittling et al., 1989]. Analog soll in den Zellkulturen der Aktivierungszustand von p125^{FAK} und PKC-Isoenzymen bestimmt und über Northern bzw. Western-Blot Analysen die Expression von Jun und Fos quantifiziert werden.

3.5.2/3.8 In vivo Versuche:

Da die in dem Zellkulturmodell erworbenen Resultate nicht unbedingt der in vivo Situation entsprechen müssen, ist in einem weiteren Versuchsansatz geplant, einige in vitro Daten im Tierversuch zu verifizieren. Entsprechend den Co-Kulturexperimenten müssen dabei die monozytären Zellen markiert werden. Um die Zellpopulation mit möglichst hoher Ausbeute zu markieren, ist bei der Isolierung von Rattenmonozyten die Markierung mit Propidiumjodid vorgesehen. Die markierten monozytären Zellen werden dann tierspezifisch wieder den einzelnen Ratten zugeführt und in unterschiedlichen Schädigungsmodellen getestet, wie bspw. der bakteriellen Meningitis (Kooperation mit Teilprojekt A3, Dr. J. Weber/Prof. Dr. K. Einhäupl) und der entorhinalen Läsion (Kooperation mit Teilprojekt C1, Prof. Dr. R. Nitsch). Eine signifikante Beeinflussung der Funktionalität der Monozyten durch das DNA-assoziiierende Propidiumjodid ist nicht gegeben, da innerhalb weniger Stunden die markierten monozytären Zellen in den Schädigungsmodellen nach erfolgter transkardialer Fixierung unter tiefer Narkose und Gehirnentnahme in neuronalen Schnitten bereits fixiert und anschließend über Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Alternativ kann eine Markierung der Rattenmonozyten durch transiente Transfektion mit dem eGFP-Vektor vorgenommen werden, wobei allerdings die Transfektions- und damit die Markierungseffizienz relativ niedrig ist. Die Untersuchung zellulärer Interaktionen ist im Anschluß an die Fixierung auf Filtermembranen geplant, wobei neben den histologischen Untersuchungen entsprechend der in vitro Studien auch biochemische und funktionelle Charakterisierungen über in-situ-Hybridisierungen durchzuführen sind.

3.5.4 Zeitplan

Da die Resultate bedingt aufeinander aufbauen, sollen die Experimente reihenfolgemäßig durchgeführt werden. Hinsichtlich der Co-Kulturexperimente zwischen monozytären Zellen und Astrozyten soll zunächst die Methodenetablierung innerhalb des ersten Jahres der Förderperiode abgeschlossen und dann unter Einsatz der spezifischen eGFP-Transfektanden die physiologischen und biochemischen Parameter untersucht werden.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Die in vivo Studien und anschließende Analyse der Hirnschnitte soll an verschiedenen Schädigungsmodellen wie bakterielle Meningitis und entorhinale Läsion durchgeführt werden, wodurch sich eine methodische und inhaltliche Kooperation ergibt mit dem Teilprojekt A3 (Dr. J. Weber/Prof. Dr. K. Einhäupl) und Teilprojekt C1 (Prof. Dr. R. Nitsch). Damit steht das Projekt an der Schnittstelle mehr neuroimmunologisch ausgerichteter Projekte (Weber/Einhäupl; Nitsch) und den eigenen zellbiologisch/immunologischen Fragestellungen.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
 SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
 I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997 Verg.-Gr.	Anzahl	2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
		Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
		BAT IIa/2	1	19800	BAT IIa/2	1	39600	BAT IIa/2	1	39600	BAT IIa/2	1	19800
		BAT VIb	1	24600	BAT VIb	1	49200	BAT VIb	1	49200	BAT VIb	1	24600
zusammen		zus.	2	44400	zus.	2	88800	zus.	2	88800	zus.	2	44400
	SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		9.000	Verbrauchsmittel		18.000	Verbrauchsmittel		18.000	Verbrauchsmittel		9.000
		zusammen		9.000	zusammen		18.000	zusammen		18.000	zusammen		9.000
	I	Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		0			0			0			0		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	1. Hass, Ralf, PD. Dr. rer. nat.	Zellbiologie	Institut für Anatomie	20		C2
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						
Ergänzungsausstattung	1. N.N.*	Zellbiologie	Institut für Anatomie	40		BAT IIa/2
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	1. N.N.*	(B/C/M)TA	Institut für Anatomie	40		BAT VIb

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Das Projekt wird von PD. Dr. Ralf Hass geleitet und wissenschaftlich betreut.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung entfällt

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungs-ausrüstung

N.N. (BAT IIa/2)

Der Förderungsantrag für den Personalbedarf ist notwendig, da die geplanten Experimente, die eine Kombination moderner zellbiologischer und molekularbiologischer Methoden und Techniken beinhalten, vom Antragsteller allein nicht bewältigbar sind. Durch entsprechende Lehr- und Verwaltungsaufgaben ist der Antragsteller auch zu einem wesentlichen Teil in den administrativen Bereich der Universität eingebunden. Hier ist durch die Übernahme von diversen Lehrverpflichtungen im Fach Anatomie eine entsprechende Weiterqualifikation des Antragstellers geplant.

Die aus dem Antrag resultierenden sehr umfangreichen Experimente erfordern zell- und molekularbiologisches Grundwissen, um diese arbeitsaufwendigen Tätigkeiten erfolgreich durchführen zu können. Durch eine ausgiebige und intensive Betreuung, die seitens des Antragstellers gewährleistet wird, entspricht das Anforderungsprofil einer Doktorandenstelle. Nach einer entsprechenden Einarbeitungszeit sollen die einzelnen Experimente von dem Mitarbeiter mit einem gewissen Maß an Selbstständigkeit durchgeführt werden. Das Projekt kann über einen kontinuierlichen Zeitraum von etwa 3 Jahren als Dissertation abgeschlossen werden. Neben der Bearbeitung von anspruchsvollen Thematiken werden die hierbei vom Doktoranden zu erlernenden und anzuwendenden Techniken ein breites Spektrum von sehr aktuellen biochemischen und zellbiologischen Methoden umfassen.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungs-ausrüstung

Für die Durchführung der Projekte steht seitens der Charité´ und des Instituts für Anatomie keine personelle Hilfe zur Verfügung, da das gesamte technische Personal hier bereits in entsprechende forschungsspezifische Projekte eingebunden und damit voll ausgelastet ist. Die Durchführung der geplanten Projekte erfordert jedoch die permanente Unterstützung durch eine(n) medizinische-technische(n) Assistent(in). Insbesondere im Zellkulturbereich sind Erfahrungen mit adhärenz Zellen (Astrozyten) wie auch mit Suspensionskulturen (monozytäre Populationen) essentiell. Dabei soll die Zellkulturführung als Dauerkultur von dem(r) technischen Assistenten(in) selbstständig übernommen werden (Vorbereiten und Aliquotieren spezifischer Medienzusätze, Kultivierung der verschiedenen Zelllinien, Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen, etc.). Daneben ist die Versorgung der Arbeitsgruppe mit Sterilmaterial (Ansetzen und Autoklavieren von Puffern, Gefäßen, etc.) vorgesehen und Unterstützung bei der Versuchsdurchführung mit Zellkulturen (Vorbereitung von histologischen Färbungen, FACS-Analysen oder elektronenmikroskopischen Untersuchungen). Weiterhin sollen Zellpräparationen (Proteinpräparation; RNA-Präparation) und Gelelektrophoresen (SDS-Gele und Agarosegele) mit vorbereitet werden. Die hierbei von dem(r) medizinisch-technische(n) Assistent(in) zu übernehmenden Arbeiten sind Grundlage für die anschließend von dem Doktoranden durchzuführenden Experimente. Diese Tätigkeiten können von dem Antragsteller oder dem Doktoranden nicht zusätzlich mit übernommen werden, da sie extrem arbeits- und zeitauf-

wendig sind und letztlich die Voraussetzungen für die nachfolgenden eigentlichen Experimente und Untersuchungen darstellen.

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	5.000	10.000	10.000	5.000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	9.000	18.000	18.000	9.000

Verbrauchsmaterial

Folgende Verbrauchsmittel (inkl. MwSt) werden p.a. benötigt:

<i>Zellkulturmaterialien:</i> (fötale Kälberserum, Kulturmedien mit Zusätzen, sterile Kulturgefäße, sterilen Einmalpipetten, Sterilfilter (0,2µm), Ficoll-Zentrifugationsmedium, Neomycin, Hygromycin, TPA, Trypsin/EDTA)	5.500 DM
<i>Material für morphologische Arbeiten und Zellzyklusanalysen:</i> (Fixierungsmittel, Immersionsöl, Propidiumjodid, DNase-freie RNase, FITC- und rhodaminmarkierte sekundäre Antikörper, Filme)	3.000 DM
<i>Material für RNA-Arbeiten:</i> (Guanidiniumisothiocyanat, Cäsiumchlorid, oligo(dT)-Zellulose, Agarose, Morpholinoäthansulfonsäure, Nylonmembranen)	2.000 DM
<i>Material für DNA-Arbeiten:</i> (Bacto-Agar, Qiagen-Säulen zur Plasmidextraktion, Restriktionsenzyme, Gene-clean-Kit zur Isolierung von Plasmidinserts, Radioaktivität [³² P-dCTP], DNA-labeling Kits, Säulen zur Aufreinigung markierter cDNA's, Hybridisierungszusätze (Denhardt's, ssDNA, SDS, Formamid), [³ H]Thymidin, [³ H]Uridin)	4.500 DM
<i>Material für Proteinarbeiten:</i> (Proteaseinhibitoren, Acrylamid/Bisacrylamid, TEMED, Molekulargewichtsmarker, Nitrozellulosemembranen, primäre Antikörper, radioaktivmarkierte oder Peroxidase-markierte sekundäre Antikörper, ECL-Detektions-Kit, Röntgenfilme, [¹⁴ C]Mannose, [¹⁴ C]Leucin)	3.000 DM
Summe	18.000 DM

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

keine

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B8

3.1.1 Thema:

Schmerzinhibition durch Migration Opioid-enthaltender Immunzellen in entzündetes Gewebe

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung: Anaesthesiologie, Schmerzmechanismen

3.1.3. Leiter/in:

Stein, Christoph, Prof.Dr.med, 30.11.54

Welte, Martin, PD Dr.med., 6.10.57

Klinik Anaesthesiologie/operative Intensivmedizin

Freie Universitdt Berlin

Klinikum Benjamin Franklin

Hindenburgdamm 30

D-12200 Berlin

Tel: +49-30-8445-2731

Fax: +49-30-8445-4469

e-mail: cstein@medizin.fu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

(x) nein () ja

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen (X) ja () nein
- klinische Studien im Bereich der
 somatischen Zell- oder Gentherapie () ja (X) nein
- Tierversuche (X) ja () nein
- gentechnologische Versuche () ja (X) nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998	50.4	18,0	47.3	112.6
1999	100.8	35,9		130.7
2000	100.8	35,9		130.7
1. Hj. 2001	50.4	18,0		65.3

3.2 Zusammenfassung

Unsere Arbeitshypothese ist, daß Opioid-produzierende Immunzellen in entzündetes Gewebe einwandern und dort Schmerz inhibieren. Dies geschieht durch die Interaktion freigesetzter Opioidpeptide mit korrespondierenden Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen, was dann zu einer Herabsetzung der Erregbarkeit dieser Neurone führt. Wir untersuchen folgende Hypothesen: **A)** daß Opioid-enhaltende Immunzellen *gezielt* in peripheres entzündetes Gewebe einwandern (wie T-Gedächtniszellen); **B)** daß die Blockierung dieser Extravasation durch Antikörper gegen Selektine, Integrine und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie die endogene Opioid-induzierte Analgesie verhindert und daß neuronale Cadherine die Migration opioid-haltiger Zellen in die Richtung der sensorischen Nervenendigungen leiten; **C)** daß effektive exogene Schmerztherapie die Einwanderung von Opioid-haltigen Immunzellen in entzündetes Gewebe beeinflußt. Wir benutzen ein Rattenmodell für Entzündungsschmerz *in vivo*. *In vitro* untersuchen wir Opioidpeptide in entzündetem Gewebe sowie in T-Gedächtniszellen mittels Radioimmunoassay und Fluoreszenzmikroskopie. *Klinische* Studien sollen klären, ob Zellen, die in chirurgisches Wundgebiet einwandern und kutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen (CLA) exprimieren, Opioidpeptide enthalten und ob sich die Anzahl dieser Zellen in Relation zu analgetischer Therapie verändert.

3.3 Stand der Forschung

Opioidanalgetika sind in der pharmakologischen Behandlung starker und stärkster Schmerzen unübertroffen und sind eine Hauptstütze in der Versorgung von Patienten mit intra- und postoperativen Schmerzen oder Malignomschmerzen. Eine Reihe schwerwiegender unerwünschter Wirkungen wie Atemdepression, Sedation, Toleranzentwicklung und Abhängigkeit limitieren jedoch den therapeutischen Einsatz. Die unerwünschten wie auch die erwünschten analgetischen Wirkungen der Opioide wurden traditionell einer Aktivierung von Opioidrezeptoren im Zentralnervensystem zugeschrieben. In letzter Zeit konnten jedoch auch potente analgetische Wirkungen nachgewiesen werden, die durch die Aktivierung von Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen von Mensch und Tier zustande kommen¹⁻³. Diese Befunde sind von herausragendem Interesse in Hinsicht auf eine potentielle Vermeidung der

oben genannten, zentral vermittelten unerwünschten Wirkungen. Die peripheren antinozizeptiven Effekte der exogenen Opioidagonisten sind besonders deutlich ausgeprägt in Gegenwart eines schmerzhaften, inflammatorischen Geschehens^{1, 4, 5}. Opioidrezeptoren sind auf peripheren sensorischen Neuronen lokalisiert und endogene Liganden dieser Rezeptoren, Opioidpeptide, konnten in ortsständigen Immunzellen in entzündlichem subkutanem Gewebe nachgewiesen werden. Die Peptide werden in diesen Zellen synthetisiert und verschiedene Stimuli wie Stress, Corticotropin Releasing Factor (CRF) und Interleukin-1 β (IL-1) können zur Freisetzung dieser Opioidpeptide führen⁵. Ähnlich den exogenen Agonisten sind auch die endogenen Opioidpeptide in der Lage, die Opioidrezeptoren sensorischer Neurone zu besetzen. Die Aktivierung der Opioidrezeptoren führt durch Hemmung der Erregbarkeit dieser Neurone^{6, 7} und/oder durch Reduktion der Freisetzung exzitatorischer, proinflammatorischer Neuropeptide (z.B. Substanz P)⁸ zu Analgesie.

1. Barber A, Gottschlich R. Opioid agonists and antagonists: an evaluation of their peripheral actions in inflammation. *Med Res Rev* 1992;12:525-562.
2. Stein C, Comisel K, Haimerl E, Lehrberger K, Yassouridis A, Herz A, Peter K. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *N Engl J Med* 1991;325:1123-1126.
3. Stein C, Pflüger M, Yassouridis A, Hoelzl J, Lehrberger K, Welte C, Hassan AHS. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J Clin Invest* 1996;98:793-799.
4. Stein C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth Analg* 1993;76:182-191.
5. Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med* 1995;332(25):1685-1690.
6. Russell NJW, Schaible HG, Schmidt RF. Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat. *Neurosci Lett* 1987;76:107-112.
7. Andreev N, Urban L, Dray A. Opioids suppress spontaneous activity of polymodal nociceptors in rat paw skin induced by ultraviolet irradiation. *Neuroscience* 1994;58:793-798.
8. Yaksh TL. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res* 1988;458:319-324.

3.4. Eigene Vorarbeiten

Die Analgesie ist unser hauptsächlichliches Meßsystem zur Beurteilung der Wirkung von Opioiden auf primär afferente Neurone. Wir konnten zeigen, daß lokal applizierte exogene Opioidagonisten in peripherem Gewebe Opioidrezeptor-spezifische Analgesie auslösen¹⁻³, daß Opioidrezeptoren auf sensorischen Nervenendigungen lokalisiert sind^{4, 5}, und daß diese Rezeptoren in entzündetem Gewebe infolge eines erhöhten nach peripher gerichteten axonalen Transports (nicht jedoch durch eine erhöhte Transkriptionsrate in Hinterwurzelganglien) hochreguliert sind^{6, 7}. Für die endogen generierte periphere Opioidanalgesie ist ein Opioidpeptid von besonderer Bedeutung, das β -Endorphin (END)^{4, 8-10}. Dieses Peptid leitet sich vom Proopiomelanocortin (POMC) ab, welches in Immunocyten synthetisiert und prozessiert

wird¹¹⁻¹³. Im Bereich entzündlich veränderter Gewebe ist die Synthese für POMC-codierende mRNA gesteigert, und END kann in Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen werden¹⁴. In weiterführenden Studien konnten wir zeigen, daß die lymphozytäre Synthese und Freisetzung von END in Abhängigkeit von der Zellmigration aus der Blutzirkulation in das entzündliche Areal und weiter in die regionären Lymphknoten variiert¹⁵. Eine bestimmte Population zirkulierender Immunzellen enthält erhöhte Konzentrationen von POMC mRNA und END. Diese Zellen scheinen bevorzugt in verletzte Gewebe einzuwandern, wo sie, in Ca⁺⁺-abhängiger Weise, Opioide zur Schmerzreduktion freisetzen¹⁵.

Dieses Migrationsmuster erinnert an Gedächtniszellen der T-Zellreihe und an humane CLA (cutaneous lymphocyte associated antigen) positive Zellen. Die Migration dieser Zellen geschieht nicht zufällig, vielmehr werden sie spezifisch von Orten antigener oder mikrobieller Invasion bzw. von kutanen entzündlichen Läsionen angezogen¹⁶⁻¹⁸. In Vorversuchen benutzten wir Antikörper gegen naive T-Zellen (CD45RC), da Antikörper gegen T-Gedächtniszellen der Ratte nicht erhältlich sind. Diese Experimente konnten zeigen, daß sich zirkulierende Lymphozyten von Ratten mit entzündeter Hinterpfote in Doppelfärbungsexperimenten durch Antikörper gegen CD4 und END anfärben lassen, was darauf hinweist, daß T-Helferzellen END enthalten. Bei der Untersuchung von Subpopulationen zeigte sich jedoch, daß sich END-haltige Zellen nur vereinzelt mit CD45RC anfärben lassen. Dies deutet darauf hin, daß nur wenige naive T-Zellen END enthalten. Die Tatsache, daß im Vergleich zu CD4⁺/END⁺ Zellen die Anzahl der CD45RC⁺/END⁺ Zellen sehr gering ist, ist ein Hinweis darauf, daß die Mehrheit der verbleibenden Zellen (CD45RC⁻/END⁺) von END-haltigen T-Gedächtniszellen gebildet wird^{15, 19}. Diese Studien sollen nun auch auf den Menschen ausgedehnt werden. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen CLA (HECA-452, von Prof. L. Picker zur Verfügung gestellt) sollen zirkulierende und gewebsständige Lymphozyten von Patienten vor, während und nach operativen Eingriffen untersucht werden.

Neuere Arbeiten konnten zeigen, daß die Spezifität der Lymphozyteneinwanderung durch die Interaktion zwischen Adhäsions- und Signalmolekülen auf Immunzellen und vaskulären Endothelien bestimmt wird. Wir postulieren, daß das Immunsystem diese Migrationsmechanismen nicht allein zur Bekämpfung von Antigenen und Pathogenen, sondern auch zur Schmerzkontrolle im geschädigten Gewebe nutzt. Unsere Pilotversuche in Ratten ergaben, daß durch Vorbehandlung mit Fucoidin eine Streß-induzierte periphere Opioidantinozipation im entzündeten Gewebe signifikant vermindert werden kann²⁰. Dies indiziert, daß die Blockade der Zelladhäsion den Eintritt END-haltiger Zellen ins Gewebe und folglich die Opioidfreisetzung hemmt. Wir beabsichtigen nun in einem nächsten Schritt die Auswanderung von END-haltigen Zellen in entzündetes Gewebe gezielter durch Blockade von L-, P- b.z.w. E-Selektin zu hemmen und auch solche Moleküle zu untersuchen, die an späteren Stadien der Adhäsion und transendothelialen Migration beteiligt sind, wie Integrine oder Immunglobulin-ähnliche Moleküle (ICAM-1, VCAM-1). Hier könnten auch Mechanismen der Chemotaxis, insbesondere Chemotaxis-Rezeptoren und Chemokine von Bedeutung sein. Wir beabsichtigen, die wichtigsten Adhäsionsmoleküle zu identifizieren, die über eine Steuerung der Extravasation END-haltiger Zellen an der Erzeugung endogener Opioidantinozipation mit beteiligt sind.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

1. Stein C, Millan MJ, Yassouridis A, Herz A. Antinociceptive effects of μ - and κ -agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism. *Eur J Pharmacol* 1988;155:255-264.
2. Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, Peter K, Herz A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248(3):1269-1275.
3. Stein C, Comisel K, Haimerl E, Lehrberger K, Yassouridis A, Herz A, Peter K. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *N Engl J Med* 1991;325:1123-1126.
4. Stein C, Hassan AHS, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5935-5939.
5. Stein C, Pflüger M, Yassouridis A, Hoelzl J, Lehrberger K, Welte C, Hassan AHS. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J Clin Invest* 1996;98:793-799.
6. Hassan AHS, Ableitner A, Stein C, Herz A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 1993;55:185-195.
7. Schäfer M, Imai Y, Uhl GR, Stein C. Inflammation enhances peripheral μ -opioid receptor-mediated analgesia, but not μ -opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol* 1995;279:165-169.
8. Stein C, Gramsch C, Herz A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation. Local opioid receptors and β -endorphin. *J Neurosci* 1990;10:1292-1298.
9. Stein C, Hassan AHS, Lehrberger K, Giefing J, Yassouridis A. Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet* 1993;342:321-324.
10. Schäfer M, Carter L, Stein C. Interleukin-1b and corticotropin-releasing-factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4219-4223.
14. Przewlocki R, Hassan AHS, Lason W, Eppelen C, Herz A, Stein C. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue. Functional role in antinociception. *Neuroscience* 1992;48:491-500.
15. Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schäfer M, Loeffler JP, Stein C. Immune cell-derived b-endorphin: production, release and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest* 1997;100:142-148.
20. Machelska H, Cabot PJ, Zhou L, Stein C. Fucoidin inhibits stress-induced antinociception in inflammation. *Soc Neurosci Abstr* 1997;23(1):1020.

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

11. Heijnen CJ, Kavelaars A, Ballieux RE. β -endorphin: cytokine and neuropeptide. *Immunol Rev* 1991;119:41-63.
12. Sharp B, Linner K. Editorial: What do we know about the expression of proopiomelanocortin transcripts and related peptides in lymphoid tissue? *Endocrinology* 1993;133(5):1921A-1921B.
13. Lyons PD, Blalock JE. Pro-opiomelanocortin gene expression and protein processing in rat mononuclear leukocytes. *J Neuroimmunol* 1997;78(1-2):47-56.
16. Mackay CR, Marston W, Dudler L. Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *Eur J Immunol* 1992;22:2205-2210.
17. Mackay CR. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 1993;5:423-427.
18. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing homeostasis. *Science* 1996;272:60-66.
19. Lawrence MH, de Riesthal HF, Calvano SE. Changes in memory and naive CD4⁺ lymphocytes in lymph nodes and spleen after thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 1996;17(1):1-6.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1. Ziele

Das primäre Ziel dieses Antrages ist, die Hypothese zu prüfen, daß Opioid-produzierende Immunzellen in entzündetes Gewebe einwandern und dort Schmerz inhibieren, und daß eine Blockade dieser Migration durch Adhäsionsmolekül-Inhibitoren zu einer Abschwächung der peripheren Opioidanalgesie führt. Wir wollen untersuchen: **A)** ob Opioid-enthaltende Immunzellen *gezielt* in peripheres entzündetes Gewebe einwandern (wie T-Gedächtniszellen); **B)** ob die Blockierung dieser Migration durch Inhibitoren wie Fucoidin oder Antikörper gegen Selektine, Integrine und Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsmoleküle den Opioidpeptidgehalt und die endogene Opioid-induzierte Analgesie reduziert und ob neuronale Cadherine die Migration END-haltiger Zellen in die Richtung der peripheren sensorischen Nervenendigungen leiten; und **C)** ob effektive Schmerztherapie beim Patienten die Einwanderung von Opioid-enthaltenden Immunzellen in entzündetes Gewebe beeinflusst.

Im einzelnen wollen wir untersuchen, ob T-Gedächtniszellen der Ratte und CLA positive Zellen des Menschen END unter normalen b.z.w. schmerzhaft inflammatorischen Bedingungen enthalten. Ferner planen wir die Blockade lymphozytärer Extravasation in entzündliches Subkutangewebe durch monoklonale Antikörper und Inhibitoren der E-, P- und L-Selektine. Hiermit wollen wir feststellen, ob es tatsächlich zu einer Verarmung an END-haltigen Zellen kommt, und ob daraus eine Abnahme lokaler endogener Schmerzkontrolle im entzündlich veränderten Gebiet resultiert. Selektine sind für die initiale Leukozytenadhäsion und für das

'rolling' am vaskulären Endothel verantwortlich. Zusätzlich werden wir Moleküle untersuchen, die an späteren Stadien der Adhäsion und transendothelialen Migration (Integrine, ICAM-1, VCAM-1) oder an einer möglichen heterotypischen Adhäsion zwischen neuronalen Cadherinen und $\alpha_E\beta_7$ -positiven Lymphozyten (Cepek et al. *Nature*. 272:190-3,1994; Karecla et al. *Eur J Immunol*. 25:852-6,1995) beteiligt sind. Unsere Vorstellung ist, die wichtigsten Adhäsionsmoleküle zu identifizieren, die für die Erzeugung endogener Opioidantinozipeption in entzündlichen Geweben mit verantwortlich sind. Schließlich planen wir zu untersuchen, ob eine komplette Blockade der Schmerzleitung durch Periduralanästhesie beim Patienten die Einwanderung von Opioidzellen in das chirurgische Wundgebiet beeinflusst.

Langfristig beabsichtigen wir, Grundlagen zu entwickeln für eine neuartige Generation von Analgetika, basierend entweder auf der Verstärkung spezieller adhäsiver Interaktionen für die Extravasation von opioidproduzierenden Zellen, oder auf der Antagonisierung von Adhäsionsmolekülen, die Opioidzellen hindern in das geschädigte Gewebe einzutreten (dies wird z.B. für zirkulierendes lösliches L-Selektin vermutet). Darüberhinaus impliziert unsere Hypothese daß bei zukünftigen Therapiestrategien, die auf Limitierung der Adhäsion schädlicher Zellen bei entzündlichen Erkrankungen zielen (Peebles et al. *Inflammation: Mediators and Pathways*. 29-96,1995), die Migration opioidhaltiger, „Schmerzkontroll-Zellen“ nicht negativ beeinflusst werden sollte. Eine präzise Zuordnung der END-haltigen Zellen zu bestimmten Zelltypen könnte eine gezieltere Beeinflussung ermöglichen und könnte damit helfen, diese ambivalenten Folgen einer Hemmung der Extravasation zu vermindern. Außerdem ist die Erkennung der engen Verbindung des Immunsystems mit endogener Schmerzkontrolle von wesentlicher Bedeutung für das pathophysiologische Verständnis von Schmerz bei immunsupprimierten Patienten mit malignen Erkrankungen oder AIDS.

Das Konzept einer Interaktion von Opioid-haltigen Immunzellen mit primär afferenten Neuronen ist sehr wahrscheinlich auch bei zentralen neurologischen Erkrankungen von Bedeutung. Zahlreiche Krankheitsbilder wie Schädel-Hirn-Trauma, Schlaganfall oder Tumore sind von Entzündung und Einwanderung von Immunzellen begleitet. Auch bei der Meningitis kommt es zu einer Einwanderung von Immunzellen, die durch Adhäsionsmoleküle gesteuert wird, und zu einer meningealen Reizung, die sich in Schmerz äußert. In Tiermodellen für Kopfschmerz (z.B. Migränemodell) konnte gezeigt werden, daß, analog zu unserer Entzündung im subkutanen Gewebe, auch hier die Freisetzung von Substanz P aus primär afferenten Neuronen eine entscheidende Rolle spielt (Limmroth et al. *Curr Opin Neurol*. 9:206-10,1996). Es ist unschwer vorstellbar, daß auch primär afferente (trigeminal) Neurone in Meningen Opioidrezeptoren exprimieren und daß solche Rezeptoren mit Opioidpeptiden, die aus eingewanderten Immunzellen freigesetzt werden, interagieren. Eine solche Interaktion könnte auch hier zu einer Modulation der Substanz P Freisetzung führen.

3.5.2 Methoden

Die Techniken zur Durchführung der in vivo und in vitro Experimente sind in unserem Forschungslabor an der Johns Hopkins University etabliert und werden gegenwärtig hier am Klinikum Benjamin Franklin aufgebaut.

I. Freund's Adjuvans (FA)-induzierte Entzündung einer Rattenpfote:

Dieses Modell wird seit vielen Jahren von uns und anderen Forschungsgruppen eingesetzt (Barber and Gottschlich. *Med Res Rev*. 12:525-62,1992; Stein. *Anesth Analg*. 76:182-

91,1993). Wistar Ratten erhalten unter kurzer Halothannarkose eine intraplantare (i. pl.) Injektion von 0,15 ml FA in die Fußsohle einer Hinterpfote. Innerhalb von 12-24 Stunden kommt es zur entzündlichen Gewebereaktion (i.e. Rötung, Schwellung) und entsprechender Schmerzhaftigkeit (Hyperalgesie). Dieser Prozeß bleibt auf die injizierte Pfote beschränkt. Unsere Experimente beginnen 4-6 Tage nach FA-Applikation. In diesem Zeitraum treten keine signifikanten Änderungen in Nahrungsaufnahme, Körpergewicht, Körperkerntemperatur oder allgemeiner körperlicher Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Tieren auf. Außerdem bleibt die nozizeptive Schwelle der nichtentzündeten Extremität unverändert (Stein et al. *Pharmacol Biochem Behav.* 31:445-51,1988; Stein et al. *Eur J Pharmacol.* 155:255-64,1988; Stein et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 248:1269-75,1989; Stein et al. *J Neurosci.* 10:1292-8,1990).

II. *In vivo* Algesiometrie:

Für die Messung der Schmerzschwelle wird eine Modifikation des „Randall-Selitto Tests“ verwendet. Vor dem eigentlichen Versuch werden die Tiere mehrmals aus dem Käfig genommen und an die Testsituation gewöhnt. Dabei werden sie vorsichtig unter einer Lage Zellstoff gehalten und mittels eines stumpfen, keilförmigen Kolbens wird von dorsal zunehmender Druck auf die Hinterpfote ausgeübt, indem ein Gewicht über einen Hebearm gleitet („Analgesymeter“, Ugo Basile). Bei Erreichen der (schmerzhaften) Druckschwelle (paw pressure threshold, PPT) (durchschnittlich 50-150 g) zieht das Tier die Pfote zurück. Der maximale Druck ist auf 250 g beschränkt um Gewebeschäden zu vermeiden, wenn die Schmerzempfindung durch stark wirksame Analgetika ausgeschaltet ist (Stein et al. *Pharmacol Biochem Behav.* 31:445-51,1988). Nach Messung der Ausgangswerte werden Testsubstanzen i.pl. (Injektionsvolumen 0.1-0.2 ml) oder systemisch (intravenös, i.v.; subkutan, s.c.; Injektionsvolumen 0.2 ml) unter Halothankurzarkose verabreicht. Die PPT wird nach 5, 10, 20 und 30 min durch einen Untersucher, dem das applizierte Agens unbekannt ist, wiederholt ermittelt. Die Tiere werden am Ende des Experiments eingeschläfert. Eine Erhöhung der PPT wird als Hemmung der nozizeptiven Reflexe interpretiert (Antinozizeption). Die durchschnittliche Zahl der Versuchstiere liegt bei 8 pro Gruppe. Zur Aktivierung endogener Releasing Faktoren (z.B. CRF) und/oder Opioide werden die Tiere in einigen Versuchsreihen für 1-2 min in kaltem Wasser (4°C) schwimmen (cold water swim, CWS) (Stein et al. *J Neurosci.* 10:1292-8,1990; Stein et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:5935-9,1990; Schäfer et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:6096-100,1996). Dies führt zu einem Anstieg der PPT (Streß-induzierte Analgesie). Faktoren, die für diesen Effekt verantwortlich sind, sollen durch pharmakologische Antagonisten identifiziert werden. Die Tiere sind während des Schwimmens unter ständiger Beobachtung. Sie werden nach CWS mit Papiertüchern abgetrocknet und ihr gesundheitliches Befinden wird kontrolliert, bevor sie wieder in ihren Käfig gesetzt werden. Die PPT wird 5, 10, 20 und 30 min nach CWS gemessen. Die Tiere werden nach Beendigung des Versuches eingeschläfert.

III. *In vitro* Experimente:

Gewebegewinnung:

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (bis zu 6 Tagen) nach Induktion der Entzündung werden die Ratten durch CO₂ Inhalation eingeschläfert. Die Haut wird mit 70% Ethanollösung vorbereitet. Es wird Blut (nach Dekapitation), Subkutangewebe aus den Hinterpfoten, sowie Gewebe aus Lymphknoten oder Milz unter Verwendung chirurgischer Standardtechni-

ken entnommen und zu Zellsuspensionen oder für Gewebepfusionen weiterverarbeitet. Blutproben für Untersuchungen an Patienten werden über intravenöse Kanülen gewonnen, die zur perioperativen Routineversorgung gelegt werden. Außerdem werden von Patienten, die sich einer Prostataektomie unterziehen, intraoperativ kleine subkutane Gewebepben (ca. 5 x 5 x 5 mm) für die Immunfluoreszenzuntersuchungen gewonnen.

Extraktion von Opioidpeptiden:

Die Proben werden gewogen und in 0,1 M HCl, für 10 min bei 95°C inkubiert. Nach Homogenisation und Zentrifugation (10.000 G, 18°C, 20 min) wird der Zellüberstand abgeschöpft und durch YM Ultrafiltrationsmembranen filtriert (Amicon). Die Proben werden zur Bestimmung des Opioidpeptidgehalts durch RIA weiter aufgeteilt und in einem Savant Vac Konzentratoren (Hicksville) gefriergetrocknet.

Radioimmunoassay (RIA):

Es werden kommerziell erhältliche RIA Sets (Peninsula Laboratories) verwendet. Ähnlich wie in früheren Studien (Stein et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:5935-9,1990; Cabot et al. *J Clin Invest*. 100:142-8,1997), werden die gefriergetrockneten Zellüberstände in RIA Pufferlösung resuspendiert. Inkubationsröhrchen werden in dreifacher Ausführung vorbereitet. Sie enthalten jeweils 0.2 ml (total count und nonspecific binding), beziehungsweise 0.1 ml RIA Pufferlösung (total binding). Die verbleibenden Röhrchen enthalten eine definierte Standardkonzentration an nicht-radioaktivem END beziehungsweise gewonnene Proben und 0,1 ml END Antikörper vom Kaninchen (mit Ausnahme von total count und nonspecific binding) und werden über Nacht bei 4°C inkubiert. Schließlich wird ¹²⁵I-END (10.000-15.000 cpm pro 0,1 ml) hinzugegeben und nochmals unter gleichen Konditionen inkubiert. Am 3. Tag werden zunächst 0.1 ml Anti-Kaninchen IgG von der Ziege, dann 0.1 ml normales Rattenserum zugesetzt, anschließend erfolgt wiederum eine Inkubation für 90 min bei 20°C. Danach werden 0,5 ml RIA Pufferlösung hinzugefügt und die Proben bei 3.000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Überstände werden aspiriert (mit Ausnahme von total count) und die Gamma Radioaktivität im Pellet gemessen. Die Menge an nicht-radioaktivem END wird durch den Vergleich mit einer Standardkurve ermittelt.

Histologie:

Gewebepben aus dem chirurgischen Wundgebiet werden während der operativen Eingriffe gewonnen, um den Schweregrad der Entzündung zu beurteilen. Das Gewebe wird in Formalin fixiert, in Ethanol dehydriert, in Paraffin eingebettet und mit Hämalum-Eosin gefärbt. Wie beschrieben wird ein unabhängiger Untersucher die Präparate hinsichtlich An- bzw. Abwesenheit von Entzündungszellen, follikulären Infiltraten und Zellproliferation beurteilen (Stein et al. *J Clin Invest*. 98:793-9,1996).

Immunhistochemie:

Humane Gewebepben werden mit Antiserum gegen END gefärbt, wie bereits beschrieben (Stein et al. *J Clin Invest*. 98:793-9,1996; Stein et al. *Lancet*. 342:321-4,1993). Das Gewebe wird in Zambioni Lösung fixiert und über Nacht bei 4°C in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gewaschen. Die Proben werden in einer Serie abgestufter Ethanollösungen dehydriert, in Methylsalizylat gewaschen, in Paraplast Plus

eingebettet und anschließend geschnitten. Die Schnitte werden in Xylene entwachst, in abgestuften Ethanollösungen rehydriert, kurz in PBS gewaschen und eine Immunfärbung mit Hilfe von Avidin-Biotin Peroxidase Komplex durchgeführt. Endogene Peroxidase wird durch 30 min Inkubation in 0.3% H₂O₂ in PBS neutralisiert. Dann werden die Schnitte in PBS gewaschen, in 0,2% Triton X-100 inkubiert, erneut gewaschen und anschließend mit normalem Ziegen Serum über 30 min behandelt, um Fc Rezeptoren zu sättigen und nicht-spezifische Bindungen zu verhindern. In einem weiteren Arbeitsschritt werden sie bei 4°C über Nacht mit dem primären Antiserum inkubiert. Schließlich werden die Objektträger mit einer 3'-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung (0,0125 %) mit 0,003 % H₂O₂ in 0,05 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung inkubiert, mit nuclear fast red gegengefärbt und dann dehydriert. Um die Spezifität der Färbungen zu demonstrieren, werden folgende Kontrollen durchgeführt: Prä-Adsorption des primären Antiserums mit einem Überschuß an homologem Antigen (1 µM END) bei 4°C für 24 Stunden; Elimination des primären oder sekundären Antikörpers oder des Avidin-Biotin-Komplexes.

Ratten werden unter tiefer Halothannarkose transkardial mit 60 ml warmer Kochsalzlösung perfundiert, gefolgt von 200-300 ml 4 % Paraformaldehyd mit 0.4 % Picrinsäure in 0.16 M Phosphatpufferlösung (pH 7.2). Subkutanes Pfortengewebe wird entfernt, für 90 min im gleichen Fixiermedium nachfixiert und bei 4°C über Nacht in 15 % Sucroslösung inkubiert. Das Gewebe wird in OCT compound (Miles) eingebettet, im Kryostat geschnitten (14 µm) und entweder auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen oder in ParaPlast eingebettet. Die Schnitte kommen dann in eine Feuchtkammer und werden wie beschrieben weiterverarbeitet (Stein et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:5935-9,1990; Przewlocki et al. *Neuroscience*. 48:491-500,1992).

Immunfluoreszenz:

Lymphozyten und Lymphknoten werden wie oben beschrieben gewonnen. Die Zellen (5x10⁶ Zellen/Röhrchen) werden auf die Koexistenz von CD4 (T-Helferzellen) und END untersucht. Dazu verwenden wir eine Zweifachfärbung zunächst mit FITC-präkonjugiertem Anti-CD4 (W3/25) und Kaninchen Anti-END. Anschließend wird inkubiert mit einem sekundären IgG Anti-Kaninchen Antikörper von der Ziege, der mit Texas-Rot präkonjugiert ist. Zweifachfärbungen mit einem Marker für naive T-Lymphozyten und END werden mit FITC-präkonjugiertem CD45RC-Antikörper (OX-22) ausgeführt. PBS wird als Pufferlösung verwendet, um damit zwischen jedem Antikörperschritt die Zellen durch Zentrifugieren (1500 G, 20 min) zu waschen. Sie werden dann für 45 min mit dem primären Anti-END und für 30 min mit allen übrigen Antikörpern inkubiert. Zuletzt werden die Pellets in PBS resuspendiert und zur visuellen Analyse und Photographie (mit einem Zeiss Fluoreszenz-Overtroskop 80) auf Objektträger aufgetragen. In Kontrollexperimenten werden die Antikörper mit homologem Antigen präabsorbiert oder die primären Antiseren durch nicht-immunisiertes Serum ersetzt. Als weitere Kontrolle für die Spezifität der Anfärbung von T-Helferzellen wird auch ein Antikörper gegen CD3 anstelle von CD4 verwendet. In Zukunft soll versucht werden, diese Zellpopulationen mittels Flow-Zytometrie (in Zusammenarbeit mit Prof. E. Thiel, Haematologie, FU Berlin) auch quantitativ zu charakterisieren.

IV. Klinische Studien:

Patientenpopulation und Protokoll:

Patienten aller Altersgruppen, die sich einer Prostatektomie unterziehen, werden in die Studie aufgenommen. Patienten mit schweren kardiovaskulären, respiratorischen, metabolischen und neurologischen Erkrankungen werden ausgeschlossen, da sie mit großer Wahrscheinlichkeit einer postoperativen intensivmedizinischen Betreuung bedürfen. Die eine Hälfte der Patienten wird unter Allgemeinanästhesie, die andere unter Periduralanästhesie operiert. Die Einleitung der Allgemeinnarkose erfolgt mit Fentanyl (0.1 mg), Thiopental (4 mg/kg) und Vecuronium (10 mg), gefolgt von einer kontinuierlichen Applikation von Sauerstoff, Lachgas und Isoflurane, sowie von zusätzlichen Dosen von Vecuronium bei Bedarf. Die Einleitung der Periduralanästhesie erfolgt durch Anlage eines lumbalen Periduralkatheters, gefolgt von einer Initialdosis von 20 ml 0,5 % Bupivacain. Bei Bedarf werden supplementäre Dosen von 5 ml 0,5 % Bupivacain nachgegeben. Postoperativ wird die Periduralanästhesie für 24 h mit 0,25 % Bupivacain (5-10 ml/h) weitergeführt. Die Dosierungsangaben beziehen sich auf ein Durchschnittsgewicht des Patienten von 70 kg. Intraoperativ werden in beiden Gruppen keine Opioide gegeben. Alle Patienten können bei Bedarf jederzeit unbegrenzt zusätzliche konventionelle Analgetika (Piritramid i.v.) erhalten.

Schmerzmessung:

Zur Beurteilung der individuellen Schmerzempfindung werden eine 10 cm lange visuelle Analogskala (0 = kein Schmerz, 10 = unerträglicher Schmerz), eine numerische Skala (1-100), eine Adaptation des McGill Schmerzfragebogens und der Bedarf an zusätzlicher Schmerzmedikation verwendet (Chapman et al. *Pain*. 22:1-31,1985; Stein and Mendl. *Pain*. 32:251-5,1988; Stein et al. *N Engl J Med*. 325:1123-6,1991). Der Gebrauch der Schmerzskalen wird jedem Patienten am Tag vor der Operation erklärt. Alle Daten werden durch den selben Untersucher erhoben. Im Aufwachraum werden die Patienten stündlich (über 4 h) beurteilt, anschließend werden sie telefonisch oder auf den Stationen kontaktiert (nach 6, 12, 24 und 48 h).

Erfassung von Vitalparametern und unerwünschten Wirkungen:

Blutdruck, Herzfrequenz, und Atemfrequenz werden kontinuierlich überwacht. Somnolenz wird mit Hilfe einer 5-Punkte-Skala (wach, orientiert bis nicht erweckbar) bewertet. Anzeichen unerwünschter Wirkungen wie Pruritus, Übelkeit, Harnverhalt und Hautreaktionen, werden mit besonderer Aufmerksamkeit beobachtet.

V. Statistische Analyse:

Vergleiche zweier Gruppen werden unter Anwendung des Wilcoxon Tests für abhängige (z.B. rechte vs. linke Pfote) und des Mann-Whitney U-Tests für unabhängige Daten durchgeführt. Multiple Vergleiche und post-hoc Tests werden mittels Friedman- und Scheffe-Test für abhängige und Kruskal-Wallis- und Dunn-Test für unabhängige Daten durchgeführt. Die Bonferroni Korrektur wird bei Bedarf (wiederholte Messungen an der selben Population) angewandt. Die Linearität von Dosis-Anwort-Beziehungen wird mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse getestet (Zar. 1984). Unterschiede werden als signifikant bewertet wenn $p < 0.05$ (zwei-seitig). Unsere Versuchsgruppen beinhalten typischerweise 8 Tiere pro Dosis für alle *in vivo* Untersuchungen. In klinischen Studien werden demographische Daten, Vitalparameter und unerwünschte Wirkungen durch Varianzanalyse untersucht. Zur Bewertung der visuellen Analogskala wird die Distanz von Skalenende 0 (kein Schmerz) bis zur Patientenmarkierung gemessen. Zur Beurteilung des McGill Fragebogens werden entsprechend der mittleren Skalenergebnisse für die jeweilige Kategorie (sensorisch, affektiv, evaluativ), sowie für alle Ka-

tegorien (gesamt), 'Pain Rating Indices' berechnet. Die Anzahl ausgewählter Worte wird wie beschrieben berechnet (Melzack. *Pain*. 1:277-99,1975). Vergleiche von Ergebnissen der Schmerzbewertung und dem analgetischen Bedarf zwischen den Gruppen werden mittels des Mann-Whitney U-Tests und des Kruskal-Wallis-Tests angestellt.

3.5.3. Arbeitsprogramm

Wir untersuchen die Hypothesen **A**) daß Opioid-enthaltende Immunzellen *gezielt* in peripheres entzündetes Gewebe einwandern (wie T-Gedächtniszellen); **B**) daß die Blockierung dieser Migration durch Inhibitoren von Adhäsionsmolekülen den Opioidpeptidgehalt und die endogene Opioid-induzierte Analgesie reduziert und **C**) daß effektive Schmerztherapie beim Patienten die Einwanderung von Opioid-enthaltenden Immunzellen in entzündetes Gewebe beeinflußt.

A. Migration von Opioid-enthaltenden Immunzellen

a. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese daß zirkulierende T-Gedächtniszellen FA-behandelter Ratten END enthalten. Lymphozyten werden mittels eines Accu-paque Gradienten (Accurate Chemicals, USA) aus dem Blut gewonnen (s. 3.5.2. III). CD4⁺ T-Zellen sollen weiter in Naiv- und Gedächtniszellen unterschieden werden. Da Antikörper gegen T-Gedächtniszellen der Ratte nicht verfügbar sind, werden die Zellen zunächst für Immunfluoreszenzmikroskopie mit Anti-END und mit Anti-CD4 doppelgefärbt. In einem weiteren Experiment werden wir Doppelfärbungen für END und für T-Naiv-Zellen erstellen (CD45RC⁺). Analoge Versuche werden mit Anti-CD3 anstelle von Anti-CD4 durchgeführt.

b. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß T-Gedächtniszellen (wie oben charakterisiert) aus entzündetem Subkutangewebe der Pfote und aus den drainierenden Lymphknoten END enthalten, und daß diese Zellen in der entzündeten Pfote zahlreicher anzutreffen sind, als in der nichtentzündeten. Im Gewebe der Pfote und in poplitealen Lymphknoten der entzündeten, sowie der kontralateralen nicht-entzündeten Extremität, werden, wie oben beschrieben, Zweifachfärbungen angefertigt.

c. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß Gedächtnis- und Naiv-T-Zellen, normaler Ratten END-haltig sind, und daß naive END-Zellen zahlenmäßig seltener vorkommen, als END-Gedächtnis-Zellen. Lymphozyten aus Blut, Lymphknoten und Subkutangewebe werden entsprechend der obigen Beschreibung weiterverarbeitet.

d. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß eine effektive *in vivo* Blockade von Adhäsionsmolekülen sowohl die Zahl der Opioid-haltigen Zellen, als auch den Opioidpeptidgehalt im entzündeten Gewebe der Pfote reduziert. Die Ratten werden mit denjenigen Adhäsionsmolekülinhibitoren vorbehandelt, die in der Lage sind endogene Opioidanalgesie aufzuheben (ermittelt in B). Die Anzahl der END-haltigen Zellen wird mittels Immunzytochemie bestimmt, der END-Gehalt durch RIA.

Interpretation der Versuchsergebnisse:

a, b) Wir betrachten END⁺-Zellen, die positiv mit Anti-CD4 (b.z.w. mit Anti-CD3), jedoch negativ mit Anti-CD45RC (END⁺/CD45RC⁻) reagieren, als END-haltige T-Gedächtniszellen (Bell et al. *International Immunology*. 7:1861-71,1995; Lawrence et al. *J Burn Care Rehabil*. 17:1-6,1996). Auf Grund von Literatur über Lymphozytenwanderung (Butcher and Picker. *Science*. 272:60-6,1996) erwarten wir, daß der überwiegende Anteil der T-Zellen in der entzündeten Pfote den Gedächtniszellen zuzuordnen ist, und daß diese END enthalten

(CD4⁺/END⁺ aber CD45RC⁻/END⁺). Neben dem Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop planen wir eine zusätzliche Quantifizierung mittels Flowzytometrie in Kollaboration mit Prof. E. Thiel (Haematologie, FU Berlin). In den entzündlichen Lymphknoten erwarten wir sowohl Naiv- als auch Gedächtniszellen die END enthalten, da die Lymphknoten den Ort antigener Drainage darstellen und hier die Konversion von Naiv- zu Gedächtniszellen erfolgt (Mackay. *Current Opinion in Immunology*. 5:423-7,1993). Wenn entzündlich veränderte Lymphknoten weniger END-haltige Zellen als kontralaterale nicht-entzündete Lymphknoten (desselben Tieres) aufweisen, würde dies mit unseren früheren Studien übereinstimmen, die einen wesentlich geringeren Gehalt an immunreaktivem END in Zellen der entzündeten Lymphknoten ergaben (Cabot et al. *J Clin Invest*. 100:142-8,1997). Diese Befunde würden darauf hinweisen, daß CD45RC⁻/END⁺ Gedächtniszellen END in der entzündeten Pfote freisetzen und in die regionalen Lymphknoten abwandern, nachdem ihre intrazellulären Opioidpeptidspeicher erschöpft sind. Dies wäre vereinbar mit dem Konzept daß eine FA-induzierte Entzündung die END Synthese in Lymphozyten steigert, und daß END vorzugsweise in aktivierten T-Gedächtniszellen, die in das entzündliche subkutane Gewebe einwandern (Butcher and Picker. *Science*. 272:60-6,1996; Mackay. *Current Opinion in Immunology*. 5:423-7,1993), lokalisiert ist. Unsere vorausgegangenen Studien, die einen erhöhten Gehalt an POMC mRNA in Lymphozyten aus FA-behandelten Tieren gezeigt haben (Cabot et al. *J Clin Invest*. 100:142-8,1997), haben bereits Hinweise auf eine derart gesteigerte END Synthese geliefert.

c) Wir erwarten, daß in sämtlichen Geweben (Blut, Subkutangewebe und Lymphknoten), END⁺- Zellen in gesunden Ratten weniger zahlreich als in FA-behandelten Tieren zu finden sind, wie unsere vorausgegangenen Studien bereits erkennen lassen (Cabot et al. *J Clin Invest*. 100:142-8,1997). Normales subkutanes Gewebe der Rattenpfote sollte, wenn überhaupt, nur wenige T-Naivzellen (CD45RC⁺) (Mackay. *Current Opinion in Immunology*. 5:423-7,1993) und dementsprechend wenige bis keine END⁺-Zellen aufweisen. Wenn END-haltige Gedächtniszellen weniger zahlreich als END-haltige Naivzellen im normalen Blut b.z.w. Lymphknoten nachweisbar sind, würde dies mit der Vorstellung im Einklang stehen, daß bereits T-Naivzellen END produzieren und erst in FA-behandelten Tieren zu Gedächtnis-END-Zellen konvertieren. Wenn END-haltige Gedächtniszellen häufiger als END-haltige Naivzellen im normalen Blut bzw. Lymphknoten anzutreffen sind (oder wenn Naiv-END-Zellen fehlen), könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß T-Zellen END nur dann bilden, wenn sie sich in eine aktivierte Gedächtniszelle umwandeln. Dies wäre mit der Annahme vereinbar, daß Lymphozyten END überwiegend unter pathologischen Bedingungen produzieren (Sharp and Linner. *Endocrinology*. 133:1921A-B,1993).

d) Wenn *in vivo* verabreichte Adhäsionsmolekülinhibitoren (siehe B) erfolgreich eine CWS-induzierte Antinozizeption blockieren, würden wir auch eine signifikante Reduktion END-haltiger Zellen und/oder des totalen END-Gehalts in der entzündeten Pfote erwarten.

B. Adhäsionsblockade und endogene Opioidanalgesie

a. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß eine Adhäsionsblockade die Extravasation opioidhaltiger Lymphozyten in entzündliches Subkutangewebe hemmt, und daß dadurch die lokale endogene Opioidanalgesie aufgehoben wird. In ersten Pilotstudien werden wir Fucoidin einsetzen, das an L- und P-Selektine bindet (Gebb et al. *J Appl Physiol*. 79:493-7,1995; Mizgerd et al. *J Exp Med*. 184:639-45,1996). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 2, 3, 4 Tage) nach FA-Inokulation werden separate Gruppen von Ratten steigende Dosen Fucoidin (5-25 mg/kg i.v.) oder Vehikel (3 Injektionen in 2 stündlichen Intervallen) erhalten. Zwei Stunden nach Erhalt der letzten Fucoidin Injektion werden sie Schwimm-Streß

(CWS) ausgesetzt und anschließend werden nozizeptive Pfortendruckschwellen (PPT) ermittelt (siehe 3.5.2. II).

b. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß monoklonale selektive Antikörper gegen E-, P- und L-Selektine (einzeln oder in Kombinationen verabreicht) (Peebles et al. *Inflammation: Mediators and Pathways*. 29-96,1995; Mulligan et al. *J Immunol*. 52:832-40,1994; Arndt et al. *Gut*. 37:374-9,1995; Klönz et al. *Scand J Immunol*. 44:461-9,1996), die Adhäsion und folglich die Extravasation opioidhaltiger Zellen in das entzündliche Gewebe inhibieren und so die lokale endogene Opioidanalgesie abschwächen. Dabei muß die Spezies-Spezifität dieser Antikörper berücksichtigt werden. Momentan sind solche Antikörper verfügbar gegen humanes L-Selektin. Andere werden z.Zt. im Labor von Prof. R. Tauber (Klinische Chemie, FU Berlin) entwickelt und uns zur Verfügung gestellt. Vier Tage nach FA-Inokulation werden getrennte Gruppen von Ratten wie in a. vorbehandelt und erhalten Injektionen verschiedener Dosen der jeweiligen Antikörper (und deren Kombinationen) (0,5-1,5 mg/kg i.v.) oder homologe inaktive Immunglobuline als Kontrolle. 15 min - 4 h danach (abhängig von der jeweiligen Pilotstudie) werden sie CWS ausgesetzt und die PTT ermittelt (siehe 3.5.2. II).

c. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß die Blockade späterer Stadien der Extravasation von opioidhaltigen Gedächtniszellen zur Abschwächung lokaler, endogener Opioidanalgesie führt. Unter Anwendung ähnlicher Behandlungsregimes wie unter b. beschrieben, werden wir Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle testen, die von besonderer Wichtigkeit für die Extravasation END-haltiger Gedächtniszellen in das entzündliche Gewebe sind. Für diese Untersuchungen werden Antikörper gegen VCAM-1, ICAM-1, $\alpha_4\beta_1$ und CD44 eingesetzt (Butcher and Picker. *Science*. 272:60-6,1996; Iigo et al. *J Immunol*. 147:4167-71,1991; DeGrendele et al. *J Exp Med*. 183:1119-30,1996).

d. Aus Immunzellen freigesetzte Opioidpeptide sind in der Lage, Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen zu besetzen und führen z.B. durch Hemmung der Erregbarkeit dieser Neurone zu Analgesie (Stein et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:5935-9,1990; Stein. *N Engl J Med*. 332:1685-90,1995). Dieses Protokoll überprüft daher die Hypothese, daß neuronale Cadherine die Migration END-haltiger Zellen in die Richtung der peripheren sensorischen Nervenendigungen leiten. Sensorische Neurone exprimieren E-Cadherin (Shimamura et al. *Dev Biol*. 152:242-54,1992; Uchiyama et al. *J Neurocytol*. 23:460-8,1994) und T-Lymphozyten exprimieren das Integrin $\alpha_E\beta_7$ (Shaw and Brenner. *Semin Immunol*. 7:335-42,1995; Trollmo et al. *Scand J Immunol*. 44:293-8,1996; Hanninen et al. *Blood*. 88:934-44,1996), welches bislang als der wichtigste nicht-homologe Ligand des E-Cadherins gilt (Karecla et al. *Eur J Immunol*. 25:852-6,1995). Wir untersuchen die Hypothese, daß, ähnlich den intestinalen Lymphozyten (Cepek et al. *Nature*. 272:190-3,1994), die Migration END-haltiger Zellen in die Umgebung sensorischer Nervenendigungen durch eine spezifische heterotypische Interaktion zwischen neuronalem E-Cadherin und lymphozytärem $\alpha_E\beta_7$ vermittelt wird. Wir werden untersuchen, ob sich Lymphozyten aus Blut und entzündlichem Subkutangewebe in Zweifachfärbungen für END und $\alpha_E\beta_7$ färben lassen, und ob Spinalganglien und ihre peripheren Nervenendigungen mit Antikörper gegen E-Cadherin reagieren. *In vivo* wollen wir beurteilen, ob lokal (i. pl.) applizierte Antikörper gegen E-Cadherin und $\alpha_E\beta_7$ zur Hemmung der CWS-induzierten Antinozizeption führen. Dabei muß die Spezies-Spezifität dieser Antikörper berücksichtigt werden.

Interpretation der Ergebnisse:

a, b) Optimale Injektionspläne und Dosierungen für die Gabe von Fucoidin und monoklonalen Antikörpern müssen durch eine Reihe von Pilotexperimenten zunächst ermittelt

werden, da die in der Literatur erwähnten *in vivo* Applikationen zum überwiegenden Teil an isolierten oder akut inflammatorischen Modellen durchgeführt wurden. Nur selten wurden chronische Entzündungszustände untersucht. Frühere Studien konnten zeigen, daß sich Populationscharakteristika von Lymphozyten während ihrer Wanderung durch inflammatorisches Gewebe über einen Zeitraum von 2-3 Tagen nicht dramatisch verändern (Mackay et al. *Eur J Immunol.* 22:2205-10,1992). Deshalb erwarten wir, daß sich eine Adhäsionsblockade hinsichtlich der Reduktion CWS-induzierter Antinozizeption und des END-Gewebegehaltes in frühen und späteren Stadien einer FA-induzierten Entzündung als ähnlich effektiv erweist. Lymphozyten rezirkulieren kontinuierlich (ca. 1-2 mal pro Tag) aus dem Blut in die Gewebe und zurück (Butcher and Picker. *Science.* 272:60-6,1996). Hierauf beruht unsere Hypothese, daß eine Adhäsionsblockade allein (über mehrere Stunden), zu einem suffizienten Abfall der Zahl opioidhaltiger Zellen sowie des END-Gehaltes im Subkutangewebe führt (siehe A.d.), und folglich die CWS-induzierte Antinozizeption aufgehoben wird. Wenn dies der Fall sein sollte, könnten wir schlußfolgern, daß antinozizeptive Effekte viel mehr von einer kontinuierlichen Lymphozytenextravasation abhängig sind, als von gewebeständigen Entzündungszellen. Wenn ein verabreichter Inhibitor, nicht jedoch inaktives IgG die CWS-induzierte Analgesie abschwächt oder aufhebt, würde dies nahelegen, daß das respektive Adhäsionsmolekül eine entscheidende Rolle in der Extravasation relevanter opioidhaltiger Immunzellen spielt. Falls unsere unter C. beschriebenen Experimente zeigen können, daß Gedächtniszellen (CLA⁺) unter schmerzhaften, inflammatorischen Bedingungen END enthalten, würden wir weiter erwarten, daß E-Selektin (ein entscheidender Ligand für Homing Rezeptoren von Gedächtniszellen (Butcher and Picker. *Science.* 272:60-6,1996) von besonderem Interesse für unsere *in vivo* Untersuchungen sein wird. Da L-Selektin für die Wanderung zu Lymphknoten wichtiger erscheint als für den Eintritt in entzündliches Gewebe (Butcher and Picker. *Science.* 272:60-6,1996; Mackay. *Current Opinion in Immunology.* 5:423-7,1993; Mackay et al. *Eur J Immunol.* 22:2205-10,1992), gehen unsere Überlegungen dahin, daß sich Anti-L-Selektin als weniger effektiver Inhibitor der endogenen Antinozizeption und der Migration von END⁺ Zellen in das entzündete Gewebe erweisen müßte. Für P-Selektin besteht die Vorstellung, daß es ebenfalls als endotheliales Adhäsionsmolekül im Bereich entzündlicher Prozesse fungieren kann. Folglich erwarten wir auch von Anti-P-Selektin eine Inhibition der CWS-induzierten Antinozizeption.

c) Die Selektine sind an den frühen Phasen des Leukozyten-rollings beteiligt, wohingegen Integrine und Immunglobuline für die spätere feste Adhäsion und transendotheliale Migration verantwortlich sind. Aus diesem Grund werden wir in unseren Experimenten ganz besonders darauf achten, Informationen über die Kinetik der Migration opioidhaltiger Zellen zu sammeln. Da im wesentlichen keines der bekannten Adhäsionsmoleküle für einen speziellen Zelltyp selektiv ist, werden diese Untersuchungen nicht die Schlußfolgerung zulassen, welchem Zelltyp die größte Bedeutung zukommt. Diese Experimente können jedoch wichtige Daten darüber liefern, welche Adhäsionsmoleküle die Hauptrolle in der Migration opioidhaltiger „schmerz-kontrollierender“ Zellen in das Entzündungsgebiet spielen. Diese Informationen sind von Bedeutung für zukünftige Behandlungsstrategien die darauf abzielen, im Rahmen entzündlicher Erkrankungen die Adhäsion schädlicher Zellen zu limitieren (Peebles et al. *Inflammation: Mediators and Pathways.* 29-96,1995), da solche Therapien möglicherweise auch Schmerz verstärken könnten, wenn die Migration opioidhaltiger Zellen ebenfalls blockiert würde. Darüberhinaus ist die Identifikation von Adhäsionsmolekülen von Bedeutung für eine mögliche therapeutische Promotion von Adhäsionsinteraktionen, die für die Extravasation opioidhaltiger Zellen und damit für Schmerzkontrolle wichtig sind.

d) Wenn sich Lymphozyten aus dem Blut bzw. aus entzündlichem Subkutangewebe mit entsprechenden Zweifachfärbungen für END und $\alpha_E\beta_7$ markieren lassen und wenn Spi-

nalganglienzellen und ihre peripheren Nervenendigungen im Entzündungsgebiet positiv bei der Färbung für E-Cadherin reagieren, würde dies indizieren, daß END-haltige Zellen die Tendenz haben, in Richtung von E-Cadherin exprimierenden sensorischen Neuronen im entzündlichen Gewebe zu wandern. Wenn lokal (i.pl.) applizierte Antikörper gegen E-Cadherin und/oder gegen $\alpha_E\beta_7$ die CWS-induzierte Antinozizeption hemmen, spräche dies weiter dafür, daß diese Interaktion zwischen E-Cadherin und $\alpha_E\beta_7$ in der Lage ist, die Migration opioidhaltiger Zellen auf sensorische Nervenendigungen mit Opioidrezeptoren auszurichten. Lassen sich END-haltige Zellen nicht mit Anti- $\alpha_E\beta_7$ anfärben, werden wir die Hypothese prüfen, daß sie selbst E-Cadherin exprimieren (Aiba et al. *J Invest Dermatol.* 105:379-82,1995; Cepek et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:6567-71,1996) und damit das Potential für homotypische Interaktionen mit neuronalem E-Cadherin haben.

C. Klinische Schmerztherapie und Migration von Opioid-Zellen

a. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß zirkulierende T-Gedächtniszellen (CLA^+) von Patienten mit postoperativen Schmerzen END enthalten, und daß die Anzahl dieser END^+/CLA^+ - Zellen postoperativ größer ist als präoperativ. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h vor, während und jeweils 1, 2, 6, 12, 24, und 48 h nach Operation) werden wir Blutproben bei Patienten (n = 15) entnehmen, die sich einer Prostatektomie unter Allgemeinnarkose unterziehen. Gleichzeitig werden Schmerzmessungen (siehe IV.) und Lymphozyten-Doppelfärbungen für END und CLA (mit HECA- 452), wie oben erläutert durchgeführt.

b. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß CLA^+ - Zellen im Subkutangewebe post-, jedoch nicht präoperativ, END enthalten. Bei jedem Patienten (siehe a.) werden zu Beginn und Ende der Operation jeweils kleine Gewebeproben der Dermis und Subkutis im abdominalen Wundgebiet entnommen und wiederum Zweifachfärbungen für END und CLA angefertigt (siehe oben).

c. Dieses Protokoll überprüft die Hypothese, daß durch eine effektive Schmerztherapie die Anzahl END-haltiger Gedächtniszellen (CLA^+) in der Blutzirkulation und im (akut entzündeten) Operationsgebiet beeinflußt wird (möglicherweise abnimmt). Zu den gleichen Zeitintervallen wie oben werden Blut- und Gewebeproben von zwei Patientengruppen (n = 15 pro Gruppe) gewonnen. Eine Gruppe wird unter Allgemeinanästhesie, die andere unter kontinuierlicher Regionalanästhesie mittels epiduraler Applikation von Bupivacain operiert. Die letztere Behandlung wird bis zu 48 h nach der Operation weitergeführt. Dies ist die effektivste Methode zur Therapie von Operationsschmerz (im Unterschied zur traditionellen intravenösen Analgesie) da hierbei alle afferenten nozizeptiven Impulse komplett blockiert werden. Es bietet sich außerdem der Vorteil, die möglichen immunsuppressiven wirkungen exogen zugeführter Opiode zu umgehen. Auch hier werden zusätzlich Schmerzmessungen durchgeführt (siehe IV) und Zell-Zweifachfärbungen wie oben beschrieben angefertigt. Außerdem wird die Entzündungsreaktion im Wundgebiet histologisch beurteilt um auszuschließen, daß die Periduralanästhesie selbst antiinflammatorische Wirkungen hat. In Zukunft wollen wir auch eine Quantifizierung von Zellsubpopulationen für alle dargestellten Experimente mittels Flow-Zytometrie in Kollaboration mit Prof. E. Thiel durchführen.

Interpretation der Ergebnisse:

a-c) Präoperativ erwarten wir nur wenige zirkulierende CLA^+ - Zellen, da ein kutaner, inflammatorischer Stimulus fehlt. Steigt die Zahl zirkulierender CLA^+ - Zellen während und/oder nach der Operation, würde dies auf ein entzündliches Geschehen im Bereich der Inzision hindeuten, wodurch es zu einem verstärkten Auftreten von Gedächtniszellen kommt, die dann in verletztes Gewebe einwandern können. Wenn diese CLA^+ - Zellen END enthalten,

würde dies nahelegen, daß sie dem Zweck dienen, END in das geschädigte Gewebe zu transportieren um dort möglicherweise Schmerz zu reduzieren (Cabot et al. *J Clin Invest.* 100:142-8,1997). Wir rechnen mit einem Anstieg zirkulierender CLA⁺/END⁺ Zellen innerhalb einiger Stunden nach Operationsbeginn. Am Anfang der Operation erwarten wir im wesentlichen keine oder nur eine geringe Anzahl an CLA⁺ Zellen im Bereich der chirurgischen Inzision. Wenn die Zahl der CLA⁺ Zellen am Ende größer ist als zu Beginn der Operation, würde das bedeuten, daß die Zahl der Gedächtniszellen relativ schnell (innerhalb von ca. 3 h) hochreguliert werden kann. Enthält die Mehrheit der subkutanen CLA⁺ Zellen END, so würde dies darauf hindeuten, daß END Zellen bevorzugt in verletzte Gebiete migrieren. Ist die Anzahl der CLA⁺/END⁺ Zellen in der Zirkulation und/oder im Bereich des Wundgebiets erhöht bei Patienten, die über geringere postoperative Schmerzen berichten, könnte dies bedeuten, daß die Funktion dieser Zellen darin besteht, END in das verletzte Gewebe zu transportieren, um Schmerz zu reduzieren. Ist die Zahl der CLA⁺/END⁺ Zellen in der Blutzirkulation und im Bereich der Inzision vermindert bei Patienten, die eine Epiduralanästhesie erhalten, könnte darauf geschlossen werden, daß eine komplette exogene Blockade nozizeptiver Impulse den Bedarf an endogenen „Schmerzkontroll-Zellen“ reduziert.

3.5.4 Zeitplan

- 6/1998 - 5/1999: Immunhistochemische Untersuchungen A.a. und C.a.-b.
 - In vivo* algesiometrische Untersuchungen B.a.-b.
 - Klinische Untersuchungen C.a.
- 5/1999 - 4/2000: Immunhistochemische Untersuchungen A.b.-c. und C.c.
 - In vivo* algesiometrische Untersuchungen B.c.
 - Klinische Untersuchungen C.a.d.
- 5/2000 - 6/2001: Immunhistochemische Untersuchungen A.d.,B.d. und C.d.
 - In vivo* algesiometrische Untersuchungen B.d.
 - Klinische Untersuchungen C.d.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Wir untersuchen Interaktionen nicht-neuronaler (Immun-) Zellen mit primär afferenten Neuronen bei Schmerz. Damit deckt sich unsere Thematik mit der zentralen Fragestellung des SFB (Bedeutung nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen). Das Konzept einer Interaktion von Opioid-haltigen Immunzellen mit primär afferenten Neuronen ist sehr wahrscheinlich auch bei zentralen neurologischen Erkrankungen von Bedeutung. Zahlreiche Krankheitsbilder wie Schädel-Hirn-Trauma, Schlaganfall oder Tumore sind von Entzündung und Einwanderung von Immunzellen begleitet. Auch bei der Meningitis kommt es zu einer Einwanderung von Immunzellen, die durch Adhäsionsmoleküle gesteuert wird, und zu einer meningealen Reizung, die sich in Schmerz äußert. In Tiermodellen für Kopfschmerz (z.B. Migränemodell) konnte gezeigt werden, daß, analog zu unserer Entzündung im subkutanen Gewebe, auch hier die Freisetzung von Substanz P aus primär afferenten Neuronen eine entscheidende Rolle spielt (Limmroth et al. *Curr Opin Neurol.* 9:206-10,1996). Es ist unschwer vorstellbar, daß auch primär afferente (trigeminale) Neurone in Meningen Opioidrezeptoren exprimieren und daß solche Rezeptoren mit Opioidpeptiden, die aus eingewanderten Immun-

zellen freigesetzt werden, interagieren. Eine solche Interaktion könnte auch hier zu einer Modulation der Substanz P Freisetzung führen.

Enge thematische Beziehungen bestehen daher zu mehreren Gruppen: Adhäsionsmoleküle und Integrine sind zentraler Bestandteil der Projekte von Prof. Dr. R. Nitsch (Anatomie, Charite, HU Berlin) und Dr. R. Reszka (MDC, Berlin-Buch). Die größte Nähe besteht zur Arbeitsgruppe Dr. J. Weber/Prof. Dr. K. Einhäupl, die sich mit Schritten der Entzündungskaskade bei bakterieller Meningitis, insbesondere mit Zytokinen und deren Rezeptoren, mit der Leukozyten-Endothelinteraktion, mit der Inhibition von Adhäsionsmolekülen, mit aus primär afferenten Neuronen freigesetzten Neuropeptiden und mit deren Interaktion mit Endothelzellen beschäftigt. Es ist geplant, zusammen mit dieser Gruppe zu untersuchen, ob und welche Leukozyten im Liquor bei Meningitis und anderen meningealen Reizen (z.B. Migräne, Schädel-Hirn-Trauma, Subarachnoidalblutung) Opiode produzieren. Außerdem planen wir zu untersuchen, ob die Aktivierung von Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Nervenendigungen zu einer Inhibition zentraler neuronaler Exzitation (gemessen an C-Fos Expression) in schmerzleitenden Bahnen führt.

Kooperationen außerhalb des SFB

Prof. R. Tauber (Klinische Chemie, FU Berlin) hat sich bereit erklärt, uns Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle zur Verfügung stellen. Prof. E. Thiel (Hämatologie, FU Berlin) wird uns bei der Etablierung der Flow-Zytometrie unterstützen und beraten.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bevilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
		IIa	1	50.400	IIa	1	100.800	IIa	1	100.800	IIa	1	50.400
Zusammen		zusammen	1	50.400	zusammen	1	100.800	zusammen	1	100.800	zusammen	1	50.400
	SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		18.000			35.900			35.900			18.000
		Zusammen		18.000	Zusammen		35.900	zusammen		35.900	zusammen		18.000
	I	Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		47.325			-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mit- arbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrich- tung	Mitarbeit im Teilpro- jekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	derzeitige Einstu- fung in BAT ...
Grundausrüstung	1. Stein, Christoph, Prof. Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie	2,5/Woche		C4
3.7.1.1 wissenschaftliche Mitarbei- ter (einschl. Hilfskräfte)	2. Welte, Martin, PD Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie	5/Woche		Ia
	3. Machelska, Halina, PhD	Pharmakologie	Anaesthesiologie	5/Woche		IIa
	4. Spies, Claudia PD Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie	B		Ia
	5. Schäfer, Michael, Dr. med.	Anaesthesiologie	Anaesthesiologie	B		Ib
	6. Föhring, Ulrich, Dr. med. Ing. grad	Anaesthesiologie med. Informatik	Anaesthesiologie	B		Ia
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-
Ergänzungsausstattung	*7. Mousa, Shaaban, PhD	Anatomie	Anaesthesiologie	40/Woche		IIa
3.7.1.3 wissenschaftliche Mitarbei- ter (einschl. Hilfskräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Stein, Christoph, Prof. Dr. med.: Als geschäftsführender Direktor der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin kann Herr Stein ca. 2,5 Stunden / Woche dem Projekt widmen. Herr Stein wird die Projektplanung und Konzeption der Versuche gemeinsam mit den wissenschaftlichen Mitarbeitern übernehmen.

Welte, Martin, PD Dr. med.: Herr Welte kann sich dem Projekt neben seinen klinischen Verpflichtungen als leitender Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin etwa 5 Stunden/Woche widmen. Er wird insbesondere das Teilprojekt C. (Klinische Untersuchungen) übernehmen. Herr Welte hat drei Jahre ganztätig bei Herrn Prof. Hammer in München mit histochemischen Methoden über mononukleäre Zellen in Nierentransplantaten und vier Jahre ganztätig bei Herrn Prof. Meßmer in München an Ganztiermodellen mit Mikroelektroden sowie verschiedenen Fluß- und Druckmeßmethoden über Gewebeoxygenierung gearbeitet. Seit 1997 ist er in der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin tätig. Herr Welte hat jahrelange Expertise in tierexperimentellen Techniken sowie in Design, Organisation und Durchführung klinischer Studien am Patienten. Er betreut zur Zeit drei medizinische Doktoranden, welche sich u.a. mit dem Teilprojekt C. (Klinische Untersuchungen) dieses Antrags befassen. Zwei weitere von ihm betreute Doktoranden haben ihre Arbeiten bereits abgeschlossen.

Machelska, Halina, PhD: Frau Machelska kann diesem Projekt neben ihren Tätigkeiten in anderen Projekten 5 Stunden/Woche widmen. Frau Dr. Machelska arbeitet bereits seit Februar 1997 in unserer Gruppe an der Johns Hopkins University in Baltimore und bringt über 7-jährige Erfahrungen in der *in vivo* Algesiometrie, sowie in RIA und Histologie mit (s. Lebenslauf im Anhang). Daher soll der größte Teil der algesiometrischen Tierexperimente unter ihrer Anleitung zusammen mit 2 Doktoranden durchgeführt werden.

Spies, Claudia, PD Dr. med.: Frau Spies wird diesem Projekt neben ihren klinischen Verpflichtungen als Oberärztin der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin und ihrer Tätigkeit in anderen Projekten als ständiger Berater zur Verfügung stehen. Frau Spies hat langjährige Expertise in klinisch-experimentellen Untersuchungen über Gewebeoxygenierung und metabolische Veränderungen bei Intensivpatienten mit Sepsis, systemisch inflammatorischer Reaktion und Alkoholentzug sowie in Design, Organisation und Durchführung klinischer Studien. Sie betreut zur Zeit drei medizinische Doktoranden, die sich u.a. mit Flow-Zytometrie befassen. Acht weitere von ihr betreute Doktoranden haben ihre Arbeiten bereits abgeschlossen.

Schäfer, Michael, Dr. med.: Herr Schäfer wird diesem Projekt neben seinen klinischen Verpflichtungen als Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin und seiner Tätigkeit in anderen Projekten als ständiger Berater zur Verfügung stehen. Herr Schäfer arbeitete bereits seit 1992 in unserer Gruppe an der Johns Hopkins University in Baltimore. Er ist nun auf einer Hausstelle der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin auch klinisch tätig, befindet sich in seiner Facharztausbildung und strebt die Habilitation auf dem Gebiet der Anaesthesiologie an. Er bringt über 6-jährige Erfahrungen in der *in vivo* Algesiometrie, in Immunhistochemie und molekularbiologischen Methoden sowie im Design, Organisation und Durchführung klinischer Studien mit.

Föhring, Ulrich, Dr. med., Ing. grad.: Herr Föhring ist der verantwortliche Oberarzt für elektronische Datenverarbeitung und Kommunikation in der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin und steht diesem Projekt als ständiger Berater zur Verfügung. Unsere Klinik ist in der Datenverarbeitung vorbildlich ausgestattet und Herr Föhring verfügt über extensive Erfahrungen in der medizinischen Informatik, Statistik und im elektronischen Zugang zu Literatur und Datenbanken.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

entfällt

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Beantragt wird eine wissenschaftliche Assistentenstelle nach BAT IIa für Dr. Shaaban Mousa zur:

- Durchführung der morphologischen Experimente
- Auswertung der Experimente
- Adaptation der morphologischen Technologien (Fluoreszenz-Mikroskopie, Doppelfärbungen, Flow-Zytometrie).
- Präsentation der Ergebnisse, Verfassen von Manuskripten etc.

Herr Mousa ist ein junger, engagierter Neurowissenschaftler, der bereits von 1993-1995 als Doktorand in unserer Gruppe an der Johns Hopkins University in Baltimore gearbeitet hat (siehe Literaturliste unter 3.4. und curriculum vitae im Anhang). Er verfügt über 6-jährige Erfahrungen in Histologie, Immunzytochemie und Autoradiographie. Er hat über die morphologische Darstellung und quantitative Untersuchung von Interleukin- und CRF-Rezeptoren in subkutanem Gewebe und in Lymphknoten in einem Modell für Entzündungsschmerz promoviert. Darüberhinaus hat er in Untersuchungen über das Vorkommen von Neuropeptiden (CRF) in Immunzellen und über Veränderungen des Perineuriums peripherer sensorischer Nervenfasern bei Entzündung mitgearbeitet. Er beherrscht einen großen Teil der im Antrag vorgeschlagenen morphologischen Techniken (Histologie, Immunzytochemie). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da somit eine Einarbeitungsphase entfällt. Herr Mousa würde seine gesamte Arbeitszeit dem Projekt widmen und würde sich ohne Zweifel schnell mit der Technik der Immunfluoreszenz, RIA und Flow-Zytometrie vertraut machen. Herr Mousa hat seine Ergebnisse international vorgestellt (u.a. bei der International Narcotics Research Conference 1995 in USA und beim Annual Meeting der Society for Neuroscience in San Diego 1995).

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

entfällt

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben				
Stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	3.000	6.000	6.000	3.000
Werden als Ergänzungsausstattung beantragt				
Verbrauchsmaterial	17.957	35.914	35.914	17.957
+ Kleingeräte	-	-	-	-

Geräte im Einzelwert bis zu DM 20.000 (brutto) ohne Fahrzeuge

entfällt

Verbrauchsmaterial und Versuchstiere pro Jahr

750 erwachsene Wistar Ratten/Jahr (20 DM pro Ratte, BGVV Berlin) DM 15.000
 Tierhaltungskosten 0.8 DM/Ratte/Woche = 12 DM/Woche DM 600

Algesiometrie

Fucoidin, Lösungsmittel, kommerziell erhältliche Antikörper DM 6.000
 Anästhetika (Halothan) DM 500
 Glaswaren DM 500

Radioimmunoassays

RIA Kits für beta-Endorphin DM 2.000
 Glaswaren DM 300

Immuncytochemie

Antikörper, Chemikalien DM 8.000
 Anästhetika DM 500
 chirurgische Instrumente DM 500
 Photomaterialien DM 2.014

Summe Verbrauchsmaterial (nur Ergänzungsausstattung) pro Jahr **DM 35.914**
 (1995 und 1998 deshalb nur die halbe Summe)

Begründung: Es handelt sich hierbei um die notwendigen Verbrauchsmaterialien für die jeweiligen Methoden. Neben den von Prof. Tauber zur Verfügung gestellten Antikörpern werden auch kommerziell erhältliche Antikörper für in vivo Versuche (d.h. in relativ großen

Mengen) verwendet. Die Tiere müssen vom BGVV bezogen werden und können im Tierstall nur kurzfristig gehalten werden.

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Alle Preisangaben in DM einschließlich Mehrwertsteuer, Transportkosten usw.

<i>Bezeichnung des Gerätes</i>	<i>Beantragt für das Haushaltsjahr</i>			
	<i>Einzelpreis 2. Hj. 1998</i>	<i>Einzelpreis 1999</i>	<i>Einzelpreis 2000</i>	<i>Einzelpreis 1. Hj. 2001</i>
Zeiss Axiovert 135 Mikroskop	43.325	-	-	-
<i>Summe</i>	43.325	-	-	-

Begründung:

Bis zum Februar 1998 stehen Mittel der National Institutes of Health (RO1NS32466) zur Finanzierung von 3 promovierten Mitarbeitern und von Verbrauchsmaterial in unserem Labor an der Johns Hopkins University zur Verfügung. Ab Anfang 1998 soll unsere Forschungsgruppe in Berlin neu etabliert werden. Die Grundausrüstung für Radioimmunoassays, Algesiometrie und einfache Histologie sowie 100 qm Laborräume wurden im Rahmen des Berufungsangebots zugesagt. Die Grundausrüstung für die Datenverarbeitung (5 PC's, Software, Vernetzung) und ein Photolabor sind am Klinikum Benjamin Franklin vorhanden. Die hier dargestellten ausführlichen immunhistochemischen Untersuchungen erfordern jedoch den täglichen ununterbrochenen Einsatz eines hochwertigen Mikroskops mit Zusatzausrüstung für Photographie und Immunfluoreszenz. Im Fall der Bewilligung dieses Mikroskops werden wir diese Zusatzausrüstung über die Berufungsmittel beschaffen.

<p style="text-align: center;">PROJEKTBEREICH C Neurodegeneration (Projektbereichsleiter: Prof.Dr.R.Nitsch)</p>
--

- C1** Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion
Nitsch
- C2** Expression und Regulation von Apolipoprotein E (APOE) in Gliazellen nach experimenteller und neuropathologischer Läsion (M.Alzheimer)
Ohm
- C3** Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse Physiologie
Eder / Heinemann
- C4** Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, freier Fettsäuren und der Glutathionspiegel in pathologisch veränderten und normalen Astrozyten
Müller
- C5** Untersuchungen zur Kommunikation zwischen Neural- und Immunzellen mittels akuter und chronischer intracerebroventrikulärer Applikation pro und anti-inflammatorischer Zytokine im Tierversuch
Woiciechowsky/Volk

3.0 Zusammenfassende Darstellung des Projektbereiches C

Zelluntergang im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen oder Traumata des zentralen Nervensystems werden von Reaktionen nicht-neuronaler Zellen begleitet. Für eine solche Korrelation liegen in der Literatur vielfältige Daten vor. Ein kausales Verständnis der Rolle von nicht-neuronalen Zellen bei solchen Schädigungen und eine genaue Kenntnis der Mechanismen, die dabei zugrunde liegen, fehlt allerdings. So sind Aktivierungen von Mikrogliazellen und Astrozyten bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer beschrieben, finden sich ebenso in epileptischem Gewebe, beim Downsyndrom und ebenso nach Schädel-Hirn-Verletzungen. Ebenso kommt es zu Reaktionen von Zellen des Immunsystems, d. h. sowohl Antigen-präsentierende Zellen (APCs) als auch T-Zellen. Es liegt nahe, solche Veränderungen als für den weiteren Verlauf neuronaler Schädigungen wesentlich anzusehen und die Vermutung zu äußern, daß ein Eingreifen in Glia- und Immunzellaktivierung und eine Modulation der von diesen Zellen produzierten Mediatoren eine aussichtsreiche Perspektive zur Entwicklung therapeutischer Ansätze liefern dürfte. Aus diesem Grund finden sich im Projektbereich C dieses Sonderforschungsbereiches Experimentalsansätze, die die grundlegenden Mechanismen und somit die Bedeutung von nicht-neuronalen Zellen an neurodegenerativen und traumatologischen Vorgängen aufklären sollen. Gemeinsame Ausgangsbasis dieser Projekte hinsichtlich der Frage nach der Bedeutung von nicht-neuronalen

Projektbereich C

Zellen bei solchen Veränderungen ist der Versuch, ein besseres Verständnis für die Rolle von Gliazellen bei dem Auftreten neuronaler Funktionsausfälle zu erarbeiten.

Im Projekt C1 (Nitsch) soll die Rolle von Gliazellen bei transneuronalen Veränderungen nach Läsion aufgeklärt werden. Solche Veränderungen, die sich in durch Läsion deafferenzierten Hirnarealen vorfinden, können für den Prozeß neurodegenerativer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung sein. Am Modell der entorhinalen Läsion, die zu einer Deafferenzierung der Hippocampusformation führt und die in ähnlicher Weise auch während der Pathogenese des Morbus Alzheimer auftritt soll sowohl in vivo (in der Ratte) als auch in vitro (in einer organotypischen Slicekultur) die Aktivierung, die Phagozytoseaktivität sowie die Steuerung dieser Mechanismen durch Zytokine untersucht werden. Eine Beeinflussung glialer Aktivität, etwa die Inhibition mikroglialer Migration oder Beeinflussung astrozytärer Proliferation sollen hierbei in ihrem Effekt auf neuronale Umbauvorgänge eingegrenzt werden. Unter der Vorstellung, daß solche Umbauvorgänge nach Deafferenzierung sowohl reparativen als auch degenerativen Charakter haben können, kann durch ein solches Verständnis die Möglichkeit geschaffen werden, modulatorsich (d. h. gezielt) in solche Umbauvorgänge einzugreifen. Zum Einsatz kommen in diesem Projekt Techniken der Morphologie, der Schnittkulturanalysen sowie Transformationsexperimente und die Induktion neuronalen Schadens in vitro.

Das Projekt C2 (Ohm) widmet sich der Rolle von Gliazellen bei neuropathologischen Veränderungen im Rahmen der Alzheimer'schen Erkrankung mittels eines experimentellen Ansatzes. Hierbei soll die Rolle des Apo-Lipoprotein E, im Besonderen seiner Isoform E4, eingegrenzt werden. Dieses Protein, welches sich in Astrozyten vorfindet, zeigt vielfältige Prozessierungsinteraktionen mit dem Beta-Amyloid und könnte so den epidemiologischen Befund, daß nämlich $\epsilon 4$ Allelträger ein erhöhtes Risiko, am Morbus Alzheimer zu erkranken, haben, erklären. Im Vordergrund des vorgeschlagenen Ansatzes steht die Frage, inwieweit die Stärke der Expression der unterschiedlichen Apo-E-Isoformen und deren Rezeptoren tatsächlich mit typischen Veränderungen korreliert werden können sowie experimentelle Untersuchungen, die mittels bildgebender Verfahren second-messenger-Kaskaden und im Besonderen die Rolle des Calciums hierbei eingrenzen sollen. Eine Beeinflussung der Prozessierung der Apo-E4-Isoform könnte hierbei das jedenfalls deuten epidemiologische Daten an, zu einer Verschiebung des Krankheitseintritts des Morbus Alzheimer führen.

Im Teilprojekt C3 (Eder, Heinemann) soll der Frage nachgegangen werden, ob die Beteiligung von Gliazellen eine Erklärung für die Tatsache liefert, daß etwa ein Viertel aller Patienten, die an einer Epilepsie leiden, pharmakotherapeutisch nur sehr schwer behandelt werden können. Hierbei könnten Astrozyten durch ihre Eigenschaft, die extrazelluläre Kaliumkonzentration zu regeln wie ihre Eigenschaft, Glutamat und GABA am synaptischen Spalt aufzunehmen, eine entscheidende Rolle spielen. Dieser Frage soll an akuten Slices sowie an dissoziierten Zellen nachgegangen werden. Im Vordergrund der einzusetzenden Techniken stehen elektrophysiologische Methoden, die den funktionellen Wert der Veränderungen in Expressionen von Ionenkanälen, der Kaliumregulation sowie der extrazellulären Homeostase von Glutamat und GABA nachgehen sollen. Hierbei ist eine vergleichende Analyse der Eigenschaften von Astrozyten in humanem Gewebe sowie in Modellen der experimentellen Epilepsie vorgesehen. Ein weiterer Schwerpunkt soll klären helfen, inwieweit die Protektion vor freien Radikalen den im Rahmen epileptischer Episoden auftretenden Verlust von Astrozyten beeinflussen könnten. Unter gleichen Bedingungen sollen die Eigenschaften ruhender und aktivierter die Mirkogliazellen weiter charakterisiert werden. Dieses Projekt hat zum Ziel,

durch ein genaues Verständnis der Rolle von sowohl Astrozyten als auch Mikrogliazellen im Status epilepticus eine mögliche positive Beeinflussung einer epileptischen Erkrankung zu ermöglichen.

Das Projekt C4 (Müller) widmet sich der Regulation von intrazellulärem Calcium und Wechselwirkungen zur mitochondrialen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und cytosolischen Freisetzung von Fettsäureradikalen in Astrozyten, die gesundem Gewebe bzw. pathologisch verändertem Gewebe entstammen. Hierbei soll das Trisomie-16-Maus-Modell des Down-Syndroms im Besonderen untersucht werden. Im Zentrum der Untersuchungen steht die Analyse der Bedeutung der intrazellulären Calciumspeicherung, der intrazellulären Calciumfreisetzung und mitochondrialer Calciumveränderungen für die Produktion reaktiver Radikale und Aktivierung von Schadenskaskaden mittels bildgebender Verfahren. Hierbei soll neben der Einzelzellkultur auch die organotypische Hirnschnittkultur und das akute Slicepräparat eingesetzt werden. Therapeutisch wäre ein Eingriff in die Mechanismen intrazellulärer Calciumregulation und Genese reaktiver Radikale in Astrozyten ein aussichtsreicher Weg, neuronale Pathologien in einem gewünschten Sinne zu beeinflussen.

Lokale pro-inflammatorische Reaktionen im Zentralnervensystem (ZNS) mit Zytokinfreisetzung, wie sie nach Schädel-Hirn-Traumata, Ischämie und Infektion auftreten stehen im Zentrum des Teilprojektes C5 (Woiciechowsky/Volk). Die vorgesehenen tierexperimentellen Untersuchungen gehen von der Hypothese aus, dass infolge der pro-inflammatorischen Reaktion im ZNS eine systemische anti-inflammatorische Reaktion ausgelöst wird. Das führt zu einer Deaktivierung der peripheren Blutmonozyten mit den Zeichen einer Immunsuppression und erhöhten Infektionsanfälligkeit, wie bereits in klinischen Studien demonstriert wurde. An einem Rattenmodell sollen nun die Mechanismen der zentral-nervös vermittelten Immunsuppression untersucht werden. Besonders wichtig erscheint hierbei die Rolle von Zytokinen als Signalüberträger an Nervenzellen und die Beeinflussung von Immunzellen durch Neurotransmitter. Eine selektive Blockade verschiedener Rezeptoren bzw. die Applikation von Antagonisten sollen helfen Regelkreise zu erforschen, wobei der neuroendokrinen Achse und dem sympathischen Nervensystem eine besondere Funktion zukommt. Am gleichen Modell sollen neben der Beeinflussung systemischer Immunkompetenzen durch lokale Zytokinfreisetzung im ZNS, auch die Mechanismen der Zellinfiltration und direkten Interaktionen zwischen Neural- und Immunzellen bei Degenerations- und Reparationsprozessen untersucht werden. Ein gezieltes Eingreifen in die Balance pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im ZNS und ein genaueres Verständnis der Interaktionen von Immun- und Neuralzellen muß als wesentliche Voraussetzung für die Beeinflussung von Reparationsprozessen im Gehirn sowie der systemischen Immunkompetenz nach cerebralem Trauma angesehen werden

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C1

3.1.1 Thema:

Die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neuroanatomie, Experimentelle Neurobiologie

3.1.3 Leiter:

Prof. Dr. med. Robert Nitsch

Institut für Anatomie

AG Zell- und Neurobiologie

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität

Universitätsklinikum Charité

10098 Berlin

Telefon: 28023547

Telefax: 28021460

e-mail: nitsch@rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

(X) nein () ja, befristet bis zum :

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

- Untersuchungen am Menschen () ja (x) nein
- klinische Studien im Bereich der
- somatischen Zell- oder Gentherapie () ja (x) nein
- Tierversuche (x) ja () nein
- gentechnologische Versuche (x) ja () nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus- halts- jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs- Ausgaben	Investition	gesamt
bis 1995	42,8	15,0		57,8
1996	89,7	30,0		119,7
1997	89,7	30,0		119,7
1. Hj. 1998	45,6	15,0		60,6
Zwischen- summe	267,8	90,0		
2. Hj. 1998	64,2	39,3	55,2	163,2
1999	128,4	32,0		160,4
2000	128,4	32,0		160,4
1. Hj. 2001	64,2	16,0		80,2

3.2 Zusammenfassung

Pathologische Prozesse im entorhinalen Cortex, wie sie im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen wie der M. Alzheimer auftreten, führen zu einer partiellen Deafferenzierung der Hippocampusformation. Dabei stellt der entorhinale Cortex für die Signalweiterleitung isocortikaler Information in den für Gedächtnisleistungen wichtigen Hippocampus ein Nadelöhr dar. Nach experimenteller entorhinaler Läsion kommt es zu schichtenspezifischen Umbauvorgängen sowohl der Dendriten hippocampaler Neurone als auch zum ebenso schichtenspezifischen Einwachsen verbliebener Afferenzen. Diese Umbauvorgänge resultieren in einer dauerhaften Veränderung der hippocampalen Signalverarbeitung. In der ersten Förderperiode konnte die Phagozytose degenerierter Axone durch hippocampale Gliazellen und die darauf folgende Regulation von immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen (ICAM-1, CD11, MHC II) nach entorhinaler Läsion *in vivo* beschrieben werden. Ebenso gelang die Charakterisierung des Aktivierungs- und Deaktivierungsverhaltens von Microgliazellen in der organotypischen entorhinal-hippocampalen Komplexschnittkultur *in vitro*, welche ein Langzeitmonitoring der Gliazellreaktion nach Läsion im kombinierten Fluoreszenz/Infrarotvideomikroskop *in situ* ermöglicht. Die nun folgenden Untersuchungen sollen *in vivo* die Frage nach der Phagozytose dendritischer Strukturen durch Gliazellen und die dadurch induzierte Regulation von immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen beantworten, das Schicksal dieser Zellen (Proliferation, Deaktivierung, Apoptose) aufklären und der funktionellen Relevanz von Adhäsionsmolekülen, Integrinen und dem MHC-System beim Phagozytoseprozess durch pharmakologische Untersuchungen *in vivo* und *in situ* (in der organotypische Schnittkultur) sowie durch Transformationsexperimente mit Antisensetransekonstrukten nach entorhinaler Läsion *in situ* nachgehen. Auf diese Weise sollen sowohl die Art der Beteiligung von Gliazellen bei

anterograder Degeneration besser verstanden als auch erste Schritte unternommen werden, in diese Prozesse einzugreifen.

3.3 Stand der Forschung

Umbauvorgänge nach neuronaler Schädigung betreffen nicht nur Nervenzellen, sondern finden unter Beteiligung von Gliazellen statt. Grundlegende Untersuchungen, die eine solche Hypothese stützen, zeigen etwa bei der *retrograden* Degeneration nach Axotomie eine Aktivierung von perineuronalen Gliazellen (Kreutzberg, 1968). Es ist bekannt, daß Gliazellen im Verlauf der Pathogenese verschiedener des ZNS betreffender Erkrankungen aktiviert werden. Dies führt zum einen zu morphologischen Veränderungen, die bei Astrozyten durch Zunahme distaler, langstreckiger Fortsätze zum Ausdruck kommen, bei Mikrogliazellen zu einem Verlust der vormals bestehenden Ramifizierung und der Ausbildung einer amöboiden Morphologie führen. Zum anderen geht die Aktivierung mit der Expression immunologisch relevanter Moleküle einher. So läßt sich auf Mikrogliazellen *in vivo* bei verschiedenen Pathologien des ZNS eine Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen finden (Perlmutter et al. 1992). Auch *in vitro* konnte die Expression dieser Moleküle auf Mikrogliazellen induziert werden (Loughlin et al. 1992; Xu and Ling, 1994). Es konnte desweiteren gezeigt werden, daß die Expression dieser Moleküle funktionelle Bedeutung besitzt, da Mikrogliazellen *in vitro* nach der Phagozytose zur Antigenpräsentation in der Lage sind (Fischer et al. 1993; Cash et al. 1993; Hayashi et al. 1993; Williams et al. 1994; Jiang et al. 1995). Auch die Expression verschiedener für die Etablierung und Aufrechterhaltung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen notwendiger Adhäsionsmoleküle ist sowohl auf Mikrogliazellen als auch auf Astrozyten beschrieben worden. *In vivo* findet sie sich bei fast allen mit einer Aktivierung von Gliazellen einhergehenden ZNS-Pathologien (Akiyama et al. 1993; Akiyama and McGeer, 1990; McGeer et al. 1993), *in vitro* konnte durch die Gabe von Zytokinen oder unspezifischen Immunstimulatoren wie Lipopolysacchariden auf Mikrogliazellen und Astrozyten die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle induziert werden. So wurden Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) (Zielasek et al. 1993; Hayashi et al. 1993) sowie Leucocyte Function Antigen-1 (LFA-1) auf Mikroglia (Lee et al. 1993) nachgewiesen, während unterschiedliche Integrine auf Astrozyten gefunden wurden (Aloisi et al. 1992).

In der Literatur liegen vielfältige Daten zu morphologischen Veränderungen hippocampaler Neurone nach Läsion des entorhinalen Cortex vor (als Übersichtsarbeit siehe Steward, 1991). Der entorhinale Cortex stellt dabei das Nadelöhr für sämtliche aus den Assoziationscortices stammende Information dar, die den Hippocampus erreicht. Dabei werden corticale Afferenzen auf Neurone in der Lamina pre- α und pre- β (Braak and Braak, 1993) bzw. Schicht II und III (Witter et al., 1989) umgeschaltet. Diese sind die Ursprungsneurone der Hauptafferenz zum Hippocampus, des Tractus perforans. Im Hippocampus terminiert der Tractus perforans in den äußeren Zweidritteln des Stratum moleculare der Fascia dentata sowie im äußeren Stratum lacunosum-moleculare des Ammonshorns (Witter et al., 1989). Die synaptische Verschaltung findet an den peripheren Dendritenabschnitten dieser Neurone statt, die sich in das äußere Zweidrittel des Stratum moleculare bzw. das äußere Stratum lacunosum-moleculare erstrecken. Läsionen des Tractus perforans oder seiner Ursprungsneurone führen somit zu einer selektiven Deafferenzierung dendritischer Strukturen, da Nervenzellsomata und Axone nicht vom Tractus perforans erreicht werden. Es liegen nun zunehmend Hinweise vor, daß auch bei solchen *anterograden* und *transneuronalen* Veränderungen Gliazellen eine entscheidende Rolle zukommt (etwa Nieto-Sampedro et al., 1985; Steward et al., 1993).

Entorhinale Deafferenzierung resultiert in einer sehr differenzierten Hochregulation von Wachstumsfaktoren und Cytokinen im Hippocampus (NGF, BDNF, bFGF, IGF, TGF- β 1; (Kar et al., 1993; Lapchak et al., 1993; Morgan et al., 1993), die zum überwiegenden Teil von Gliazellen exprimiert werden. Hierbei zeigt sich, daß die gliale Expression von solchen Faktoren schichtenspezifisch vor sich geht, d.h., selektiv in der Deafferenzierungszone konzentriert ist. Auch das APP als Vorstufe des β -A4 Proteins, welches in den bei der Alzheimer'schen Erkrankung auftretenden Plaques vorkommt und dem in jüngster Zeit neurotrophe und neurotrophe Eigenschaften zugesprochen worden, wird von Gliazellen nach entorhinaler Deafferenzierung in der ehemaligen Terminationszone entorhinaler Fasern synthetisiert (Banati et al., 1993). Die Expression von APP scheint transmitterabhängig kontrolliert zu werden (Nitsch et al., 1992). Experimentelle Daten konnten zeigen, daß Antikörper gegen NGF hippocampales "Sprouting" nach entorhinaler Läsion verhindern können (van der Zee et al., 1992). Interessanterweise führen diese Läsionen zu einer selektiven Verminderung der Glucocorticoidrezeptor-Expression (nicht der Mineralocorticoidrezeptor-Expression) und die Gabe von Glucocorticoiden scheint postläsionales "sprouting" hemmen zu können (O'Donnell et al., 1993). Gonadale Steroide selber regulieren dabei die Expression von GFAP in hippocampalen Gliazellen, so daß Gliazellen sowohl als Effektoren als auch als Intermediärkomponenten spezifisch in den Prozeß des hippocampalen Umbaus eingreifen (Day et al., 1993).

Morphologisch liegen Daten für eine schichtenspezifische Aktivierung von Gliazellen in der Deafferenzierungszone sowohl für Astrozyten (Steward et al., 1993) als auch Mikrogliazellen vor (Gehrmann et al., 1991). Dabei ist bis jetzt im wesentlichen der zeitliche Zusammenhang mit axonalen Reorganisationsprozessen aufgezeigt worden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Nitsch and Frotscher, 1993) konnten zeigen, daß es zu langanhaltenden Veränderungen des dendritischen Zytoskelettes kommt, besonders zum Auftreten von Invaginationen der Dendritenmembran. Gliazellfortsätze füllen diese Einbuchtungen auch noch sehr lange nach der Deafferenzierung aus (60 Tage). Diese elektronenmikroskopische Untersuchungen legen es nahe, daß Gliazellen eine enge Assoziation auch mit dendritischen Umbauvorgängen eingehen und noch nach langen postläsionalen Überlebenszeiten in engem Membrankontakt mit dauerhaft veränderten hippocampalen Dendriten stehen (Nitsch and Frotscher, 1993). Diese Veränderungen bleiben auf die Deafferenzierungszone in der mittleren und äußeren Molekularschicht beschränkt.

Nach entorhinaler Läsion kommt es schon nach 2 Stunden zu einer starken Expression der mRNA von c-fos sowohl in hippocampalen Neuronen als auch in Gliazellen (Nitsch, 1993). Diese Genexpression wurde gefolgt von der immunzytochemisch detektierbaren Erhöhung des fos-Proteins in hippocampalen Zielzellen und in Gliazellen, die vornehmlich in der Deafferenzierungszone konzentriert sind (Nitsch and Frotscher, 1992). Diese Ereignisse lassen sich durch MK-801 blocken. Aufgrund dieser Ergebnisse muß angenommen werden, daß partielle Deafferenzierung zur Aktivierung der Genexpression über einen NMDA-Rezeptor vermittelten Signalmechanismus auch in Gliazellen führt. Neuere Untersuchungen haben zeigen können, daß Mikrogliazellen *in vivo* offenbar an Orte neuronaler Schädigung gelangen können, indem sie sich aus der unmittelbaren Nachbarschaft dorthin bewegen (Akiyama et al. 1994; Thanos and Richter, 1993; Jensen et al. 1994). In diesem Zusammenhang ist auf die Bedeutung chemotaktisch wirksamer Faktoren verwiesen worden, die dafür verantwortlich sein müssen, daß zunächst ruhende Mikrogliazellen zu aktivierten, migrierenden Zellen werden. Hierbei spielen das Complement System (Johnsen et al. 1996, Möller et al. 1997, Nolte et al. 1996) sowie etwa TNF α und TGF β (Hurwitz et al. 1995) und MCP-1 eine wichtige Rolle (Glabinski et al. 1996). Mit Hilfe von *in vitro*-Untersuchungen an Mikroglia-Zelllinien hat man begonnen, die Phagozytoseprozesse dieser Zellen näher zu charakterisieren (Abd el Basset and Fedoroff, 1994, Atanassov et al. 1994). Über die Rolle verschiedener Komple-

mentfaktoren, Zytokine und Zellzerfallsprodukte für die Initiierung der Phagozytosevorgänge und über die Bedeutung der Expression von Adhäsions- und MHC-Molekülen vor, während und nach der Phagozytose existieren nur unklare Vorstellungen.

Zitierte Literatur

- Abd el Basset and Fedoroff (1994) Dynamics of actin filaments in microglia during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Acta Neuropathol. Berl.* 88 (6): 527-537.
- Akiyama H, Kawamata T, Yamada T, Tooyama I, Ishii T and McGeer PL (1993) Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 by a subset of astrocytes in Alzheimer disease and some other degenerative neurological disorders. *Acta Neuropathol. Berl.* 85: 628-634.
- Akiyama H, Tooyama I, Kondo H, Ikeda K, Kimura H, McGeer EG and McGeer PL (1994) Early response of brain resident microglia to kainic acid-induced hippocampal lesions. *Brain Res.* 635: 257-268.
- Akiyama, H, Tooyama I, Kondo H, Ikeda K, Kimura H, McGeer EG and McGeer PL (1994) Early response of brain resident microglia to kainic acid-induced hippocampal lesions. *Brain Res.* 635: 257-268.
- Aloisi F, Borsellino G, Samoggia P, Testa U, Chelucci C, Russo G, Peschle C and Levi G (1992) Astrocyte cultures from human embryonic brain: characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *J. Neurosci. Res.* 32: 494-506.
- Atanassov CL, Muller CD, Sahran S, Knodgen B, Rebel G and Seiler N (1994) Effect of ammonia on endocytosis cytokine production and lysosomal enzyme activity of a microglial cell line. *Res. Immuno.* 154 (4): 277-288
- Banati RB, Gehrman J, Czech C, Mönning U, Jones LL, König G, Beyreuther K, Kreutzberg GW (1993) Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer betaA4-amyloid precursor protein (APP) in activated Microglia. *Glia* 9:199-210.
- Braak H, Braak E (1993) Entorhinal-hippocampal interaction in mnestic disorders. *Hippocampus* 3:239-241.
- Caceres A, Steward O (1983) Dendritic reorganization in the denervated dentate gyrus of the rat following entorhinal cortex lesions: a Golgi and electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 214:387-403.
- Cash E, Zhang Y and Rott O (1993) Microglia present myelin antigens to T cells after phagocytosis of oligodendrocytes. *Cell Immunol.* 147: 129-138.
- Crutcher K, Anderton BH, Barger SW, Ohm TG, Snow AD (1993) Cellular and molecular pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus Special Issue*, 3:271-288.
- Day JR, Laping NJ, Lampert Etchells M, Brown SA, O'Callaghan JP, McNeill TH, Finch CE (1993) Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus. *Neuroscience* 55:435-443.
- de Lacoste MC, White CL (1993) The role of cortical connectivity in Alzheimer's disease pathogenesis: a review and model system. *Neurobiol Aging* 14:1-16.
- Fischer HG, Nitzgen B, Germann T, Degitz K, Daubener W and Hadding U (1993) Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia

- with interferon-gamma-independent antigen presentation function. *J. Neuroimmunol.* 42: 87-95.
- Gehrmann J, Schoen SW, Kreutzberg GW (1991) Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol Berl* 82:442-455.
- Glabinski AR, Balasingam V, Tani M, Kunkel SL, Strieter RM, Yonk V and Ransohoff RM (1996) Chemokine monocyte chemoattractant protein -1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J. Immunol.* 156: 4363-4368.
- Gwag BJ, Sessler FM, Waterhouse BD, Springer JE (1993) Regulation of nerve growth factor mRNA in the hippocampal formation effects of N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Exp Neurol* 121:160-171.
- Hayashi M, Dorf ME and Abromson Leeman S (1993) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor inhibits class II major histocompatibility complex expression and antigen presentation by microglia. *J. Neuroimmunol.* 48: 23-32.
- Hurwitz AA, Lyman WD and Berman JW (1995) Tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta upregulate astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein -1. *J. Neuroimmunol.* 57: 193-198
- Jensen MB, Gonzalez B, Castellano B and Zimmer J (1994) Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp. Brain Res.* 98: 245-260.
- Jiang H, Milo R, Swoveland P, Johnson KP, Panitch H and Dhib Jalbut S (1995) Interferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *J. Neuroimmunol.* 61: 17-25.
- Johnson SA, Young-Chang CS, Laping NJ and Finch CE (1996) Perforant path transection induces complement C9 deposition in hippocampus. *Exp. Neurol.* 138: 198-205
- Kar S, Baccichet A, Quirion R, Poirier J (1993) Entorhinal cortex lesion induces differential responses in [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II and [125I]insulin receptor binding sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 55:69-80.
- Kreutzberg GW (1968) Autoradiographic studies on perineuronal microgliaocytes. *Acta Neuropathol (Berl)* 4:141-145.
- Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F (1993) BDNF and trkB mRNA expression in the rat hippocampus following entorhinal cortex lesions. *Neuroreport* 2:191-194.
- Lee TT, Martin FC and Merrill JE (1993) Lymphokine induction of rat microglia multinucleated giant cell formation. *Glia* 8: 51-61.
- Loughlin AJ, Woodroffe MN and Cuzner ML (1992) Regulation of Fc receptor and major histocompatibility complex antigen expression on isolated rat microglia by tumour necrosis factor, interleukin-1 and lipopolysaccharide: effects on interferon-gamma induced activation. *Immunology.* 75: 170-175.
- Mattson MP, Barger SW (1993) Roles for calcium signalling in structural plasticity and pathology in the hippocampal system. *Hippocampus Special Issue*, 3:73-88.

- Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM, Finch CE (1993) TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp Neurol* 120:291-301.
- Möller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A and Kettenmann H (1997) Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling in mouse microglia. *J. Neuroscience*. 17: 615-624
- Nieto-Sampedro M, Saneto RP, De Vellis J, Cotman CW (1985) The control of glial populations in the brain: changes in astrocyte mitogenic and morphogenic factors in response to injury. *Brain Res* 343:320-328.
- Nitsch R (1993) Transneuronal changes in the lesioned entorhinal-hippocampal system. *Hippocampus* 3, Special Issue.: 247-256.
- Nitsch R, Bader S and Frotscher M (1992) Reorganization of input synapses of parvalbumin-containing neurons in the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Neuroscience Letters*. 135: 33-36
- Nitsch R, Frotscher M (1993) Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin containing neurons in the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Hippocampus*. 3:481-490
- Nolte C, Möller T, Walter T and Kettenmann H (1996) Complement 5a controls motility of murine microglia cells in vitro via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neuroscience*. 73: 1091-1107
- O'Donnell D, Baccichet A, Seckl JR, Meaney MJ, Poirier J (1993) Entorhinal cortex lesions transiently alter glucocorticoid but not mineralocorticoid receptor gene expression in the rat hippocampus. *J Neurochem* 61:356-359.
- Parnavelas JG, Lynch G, Brecha N, Cotman CW, Globus A (1974) Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature* 248:71-73.
- Perlmutter LS, Scott S.A., Barron E and Chui HC (1992) MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J. Neurosci. Res*. 33:549-558.
- Steward O (1991) Synapse replacement on cortical neurons following denervation. *Cerebral Cortex* 9:81-132.
- Steward O, Kelley MS, Torre ER (1993) The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: Temporal relationship between changes in the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Exp Neurol* 124:167-183.
- Thanos S and Richter W (1993) The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int. J. Dev. Neurosci*. 11: 671-680.
- van der Zee CE, Faecett J, Diamond J (1992) Antibody to NGF inhibits collateral sprouting of septohippocampal fibers following entorhinal cortex lesion in adult rats. *J Comp Neurol* 326:91-100.
- Williams K, Ulvestad E and Antel JP (1994) B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. *Eur. J. Immunol*. 24: 3031-3037.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Da Silva FHL, Lohman AHM (1989) Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 33:161-253.

Xu J and Ling EA (1994) Expression of major histocompatibility complex class II antigen on amoeboid microglial cells in early postnatal rat brain following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Exp. Brain Res.* 100: 287-292.

Zielasek J, Archelos JJ, Toyka KV and Hartung HP (1993) Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat microglial cells. *Neurosci. Lett.* 153: 136-139.

3.4 Eigene Vorarbeiten

In diesem Abschnitt soll nur auf die Arbeiten eingegangen werden, die im Rahmen der Untersuchungen der vergangenen Förderperiode entstanden sind. Andere, auch vorher entstandene Arbeiten sind in den Stand der Forschung eingegangen und finden sich auch dort dargestellt (siehe 3.3). Folgende Fragestellungen wurden während der letzten Förderungsperiode bearbeitet:

a. Welche Typen von Gliazellen sind am Phagozytoseprozess bei *anterograder* Degeneration nach Läsion beteiligt?

Nachdem schon früh in unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen Hinweise vorliegen, daß auch unter den Bedingungen der anterograden Degeneration nicht nur Mikrogliazellen, sondern auch Astrozyten an der Phagozytose degenerierender Axone beteiligt sind (Zipp et al., 1989; Nitsch and Frotscher, 1993), konnten wir in einer elektronenmikroskopischen Studie an intrazellulär gefüllten Körnerzellen im fixierten Schnitt direkte Hinweise auf die Beteiligung zumindest von Mikrogliazellen auch an dendritischen Umbauvorgängen nach entorhinaler Läsion aufzeigen (Diekmann et al., 1996). Dabei weisen diese Daten nicht nur auf Phagozytose, sondern auf einen Zell-Zell-Kontakt von Dendriten und Mikrogliazellen im Sinne einer Zytoplasma-Zytoplasma-Interaktion hin. Diesem Phänomen soll in der nächsten Antragsperiode weiter nachgegangen werden (siehe unten). Durch die Etablierung einer Tracing-Technik, die *in vivo* die Charakterisierung solcher Gliazellen erlaubt, die sich nach der Läsion an der Phagozytose des anterograd degenerierenden Materials beteiligen (Bechmann and Nitsch, 1997a), konnten wir im Modell der entorhinalen Läsion zunächst die offene Frage klären, daß sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten an diesem Prozeß beteiligt sind (Bechmann and Nitsch, 1997b).

b. Wie ist der Zeitablauf dieser Beteiligung?

Wie aus anderen Untersuchungen bekannt, kommt es zunächst zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen innerhalb des ersten Tages nach Läsion. Diese zeigen aber noch nicht phagozytotische Aktivität, sind jedoch schon in die Deafferenzierungszone migriert. Etwa einen Tag später findet sich identifiziertes anterograd degeneriertes Material in solchen Mikrogliazellen. Einige Tage später findet sich solches Material auch in Astrozyten. Beide Zelltypen wurden mit spezifischen Markern identifiziert (MAC-1, Isolectin B4, OX42 für Mikrogliazellen, GFAP für Astrozyten) und sowohl licht- als auch konfokal- und elektronenmikroskopisch dargestellt (Bechmann and Nitsch, 1997b). Interessanterweise finden sich nach längeren Überlebenszeiten nach Läsion (> 20 Tage) ausschließlich Astrozyten, die noch das phagozy-

tierte Material enthalten. Diese Daten legen entweder einen apoptotischen Untergang von Mikrogliazellen oder deren eigene Phagozytose durch Astrozyten nahe.

c. Mit welchen morphologischen Veränderungen geht die Phagozytose einher?

Die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten zeigte die bekannten morphologischen Charakteristika. Amöboide Mikrogliazellen und fortsatzreiche Astrozyten fanden sich in der Deafferenzierungszone. Interessanterweise führte aber eine Phagozytose nicht zu einer bleibenden morphologisch faßbaren Aktivierung, sondern es fanden sich nach einigen Tagen nach Läsion wieder morphologisch ruhende Gliazellen, die degenerierendes Material phagozytiert hatten (Bechmann and Nitsch, 1997b). Elektronenmikroskopisch fanden sich enge und langstreckige Appositionen der Gliamembranen (zunächst von Mikrogliazellen, dann auch von Astrozyten) mit Dendriten, die in dieser Zone keine Synapsen mehr aufwiesen. Ein solches Phänomen ist dem „synaptic stripping“ (siehe Stand der Forschung) zumindestens phänomenologisch sehr ähnlich.

d. Führt dieser Prozeß zur Expression immunologisch relevanter Moleküle?

Wir konnten darüber hinaus zeigen, daß die postläsionale Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten mit einer Expression der Integrine LFA-1 und VLA-4 sowie des ICAM-1 auf aktivierten, in der äußeren Molekularschicht des deafferenzierten *Gyrus dentatus* akkumulierenden Mikrogliazellen einher geht. Damit sind offensichtlich die Voraussetzungen für eine effektive Interaktion der aktivierten Mikroglia-Zellen miteinander und mit der umgebenden Extrazellulärmatrix gegeben. In einem experimentellen Ansatz, der durch das Vormarkieren der äußeren Molekularschicht innervierenden *Tractus perforans* und die anschließende entorhinale Läsion die Identifizierung einzelner, phagozytischer Zellen erlaubt, konnte gezeigt werden, daß insbesondere diejenigen Mikroglia-Zellen, die den zerfallenden *Tractus perforans* phagozytieren, die genannten Adhäsionsmoleküle exprimieren (Hailer et al., 1997a).

e. Über welche Mechanismen ist die Aktivierung und die Expression von immunologisch relevanten Molekülen gesteuert und wie läßt sie sich beeinflussen?

Mit Hilfe der Mikroglia-Einzelzellkultur war es möglich, erste Faktoren zu charakterisieren, die für morphologische Veränderungen und für die Induktion der Expression der Integrine LFA-1 und VLA-4 verantwortlich sind. Die Behandlung der Mikroglia-Einzelzellkulturen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 und TNF- α sowie mit IFN- γ resultierte im rapiden Verlust filigraner Zellfortsätze und einer Transformation zu einer amöboiden Morphologie. Durch durchflußzytometrische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß parallel zu diesen morphologischen Veränderungen die Expression der schon in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur charakterisierten Integrine induziert wurde. So führten das proinflammatorische Zytokin TNF- α und das Interferon- γ zu einer deutlichen Verstärkung der Expression von LFA-1, während IL-1 nicht als Induktor wirksam war. Lipopolysaccharid, ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien und in immunologischen Untersuchungen als unspezifischer Stimulus verwendet, erwies sich ebenfalls als sehr starker Induktor der LFA-1-Expression. Die Expression von VLA-4 lies sich durch alle genannten Zytokine und das LPS

induzieren, wenn auch in wesentlich schwächerem Ausmaß. Mit der Gabe des Antioxidans Vitamin E konnte eine erhebliche Verbesserung der Kulturbedingungen erreicht werden, was sich in einem höheren Anteil ramifizierter Mikroglia-Zellen und in einer deutlich verbesserten Vitalität niederschlug (Heppner et al., eingereicht-a). Damit korrelierend fand sich unter dem Einfluß von Vitamin E eine reduzierte Basis-Expression der untersuchten Integrine und des ICAM-1 (Heppner et al., 1997).

f. Läßt sich das Slicekulturmodell zur Analyse von Gliazellaktivierung und Deaktivierung einsetzen?

Eine Analyse der Morphologie von Mikrogliazellen und ihrer Expression von Adhäsionsmolekülen erbrachte, daß nach der anfänglichen, explantationsbedingten Aktivierung nach mindestens 6 Tagen *in vitro* in inneren Schichten der Kulturen eine Ramifizierung vormals amöboider Mikrogliazellen zu beobachten war, während die in äußeren Schichten der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur gelegenen Mikrogliazellen ihre amöboide Morphologie beibehielten. (Hailer et al. 1996). Weitergehende Untersuchungen erbrachten, daß in der Einzelzellkultur vormarkierte, aktivierte Mikrogliazellen in organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur hineinmigrierten und im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung eine Ramifizierung erfuhren, wodurch eine direkte Beobachtung vormarkierter und einzeln identifizierbarer Mikrogliazellen in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur ermöglicht wurde (Hailer et al., 1997b).

g. Zeigen sich vergleichbare Expressionsmuster von immunologisch relevanten Molekülen wie *in vivo*?

Neben diesen rein morphologischen Kriterien wurde nach immunologischen Markern der Aktivierung von Mikrogliazellen gesucht. Die Integrine VLA-4 und LFA-1 konnten als gute Indikatoren von Aktivierungsprozessen charakterisiert werden, da sie sich auf den hochramifizierten und somit nach morphologischen Kriterien ruhenden Mikrogliazellen nicht fanden, während die nach der Explantation in großer Zahl zu findenden amöboiden Mikrogliazellen eine intensive Immunreaktivität für VLA-4 und LFA-1 aufwiesen. Somit konnte die organotypische hippocampale Komplexschnittkultur erstmals als experimentelles Modell zur Untersuchung nicht nur neuronaler, sondern auch nicht-neuronaler Bestandteile des ZNS etabliert werden (Hailer et al. 1996).

h. Wie verhalten sich Gliazellen nach experimenteller Schädigung im Slice
- nach NMDA-Läsion?

Unter Einsatz des Superkultivierungsansatzes (Hailer et al., 1997b), bei dem mit MiniRuby vormarkierte Mikrogliazellen in die organotypische Slicekultur migrieren, konnten nun das Verhalten dieser Zellen auf eine experimentell induzierte neuronale Schädigung untersucht werden. Zur Induktion eines solchen neuronalen Schadens wurde dem Kulturmedium kurzzeitig NMDA hinzugegeben und die untergehenden Nervenzellen mit Propidiumjodid als *in situ* Marker für Zelltod eingesetzt. Die Befunde zeigten, daß vormarkierte Mikrogliazellen spezifisch zum Ort neuronaler Schädigung migrierten (Heppner et al., eingereicht-b). Mikrogliazellen können nicht direkt durch NMDA beeinflusst werden, da sie nicht über entsprechende Rezeptoren verfügen. Somit müssen andere Signalkaskaden für diesen Effekt verantwortlich

gemacht werden. Es liegt nahe anzunehmen, daß das Complementsystem sowie migratorisch wirkende Zytokine hierbei eine zentrale Rolle spielen.

- nach Schnittläsion des *Tractus perforans*?

Analog zur Darstellung des *Tractus perforans in vivo* (Bechmann and Nitsch, 1997a) wurde auch im Komplexschnittpräparat von entorhinalem Cortex und Hippocampus das Vorhandensein dieser Faserverbindung *in situ* zur Darstellung gebracht (Kluge et al., im Druck). Läsionen des *Tractus perforans in situ* führten zur Aktivierung von Gliazellen und zur Phagozytose, welches sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch gesichert wurde. Dieser Ansatz soll nun in der weiteren Förderungsperiode weiterverfolgt werden.

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

Wir konnten zeigen, daß Astrozyten schon sehr früh nach Läsion die mRNA von Neurotrophinen hochregulieren. NGF und BDNF sind beide wenige Stunden nach Deafferenzierung stark exprimiert. Interessanterweise stellt sich aber ein direkter Zusammenhang zu den postläsionalen Umbauvorgängen nicht her (Förster et al., 1997).

Eigene Arbeiten

Bechmann I and Nitsch R (1997a) Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: Combination of axonal tracing and lectin- or immunostaining. *Histochem. and Cell Biol.* 107:391-397

Bechmann I and Nitsch R (1997b) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia.* 20:145-154

Diekmann S, Ohm TG and Nitsch R (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopic study. *Brain Pathol.* 6: 205-215.

Förster E, Naumann T, Deller T, Straube A, Nitsch R and Frotscher M (1997) Cholinergic sprouting in the rat fascia dentata after entorhinal lesion is not linked to early changes in neurotrophin mRNA expression. *Neuroscience.* 80:731-739

Hailer NP, Jährhult J, Nitsch R (1996) Resting microglial cells *in vivo*: Analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18:319-331

Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S and Nitsch R (1997a) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus.* 7:341-349

Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R (1997b) Fluorescently prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neuroscience.* 9:836-866

Heppner FL, Roth K, Nitsch R and Hailer NP (1997) Vitamin E induces ramification and downregulation of Adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* (im Druck)

- Heppner FL, Roth K, Nitsch R and Hailer NP Quantifying microglial morphology: A novel index of ramification (eingereicht)
- Heppner FL, Hailer NP, Skutella T and Nitsch R Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures (eingereicht)
- Kluge A, Hailer NP, Horvath TL, Bechmann I and Nitsch R (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway *in vitro*. (Hippocampus, im Druck)
- Nitsch R, Frotscher M (1993) Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin containing neurons in the rat fascia dentata following entorhinal lesion. Hippocampus. 3:481-490.
- Zipp F, Nitsch R, Soriano E and Frotscher M (1989) Entorhinal fibers form synaptic contact on parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. Brain Res 495:161-166

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Die nun folgenden Untersuchungen sollen *in vivo* die Frage nach der Phagozytose dendritischer Strukturen durch Gliazellen und die dadurch induzierte Regulation von immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen beantworten, das Schicksal dieser Zellen (Proliferation, Deaktivierung, Apoptose) aufklären und der funktionellen Relevanz von Adhäsionsmolekülen, Integrinen und dem MHC-System beim Phagozytoseprozess durch pharmakologische Untersuchungen *in vivo* und *in situ* (in der organotypische Schnittkultur) sowie durch Transformationsexperimente mit Antisensetranskripten nach entorhinaler Läsion *in situ* nachgehen. Auf diese Weise sollen sowohl die Art der Beteiligung von Gliazellen bei anterograder Degeneration besser verstanden als auch erste Schritte unternommen werden, in diese Prozesse einzugreifen.

3.5.2/3 Methoden und Arbeitsprogramm

3.5.2/3.1. Entorhinale Läsion

Adulte Wistarratten eines Gewichtes von 290-310 g werden in tiefer Anästhesie in einer stereotaktischen Operationseinrichtung fixiert. Im weiteren erfolgt die entorhinale Läsion unter Verwendung folgender Koordinaten: Apikal +1, lateral 3-7, vertikal bis zur Schädelbasis, jeweils gemessen von Lambda. Die Tiere werden nach unterschiedlichen Überlebenszeiträumen in tiefer Narkose durch transkardiale Perfusionsfixation, bestehend aus einer ersten Perfusion mit 0,1M PB und einer zweiten Perfusion mit Immunfixativ, perfundiert und das Gehirn entnommen. Daran schließt sich eine Postfixationsphase des Gehirns für 2 Stunden in dem bereits erwähnten Immunfixativ an. Das so gewonnene Gewebe kann nun auf dem Vibratom in 0,1M PB in 50-70 µm dicke Koronarschnitte geschnitten werden, die im 0,1M PB aufbewahrt werden können.

3.5.2/3.2 Phagozytose dendritischer Strukturen

Unter tiefer Narkose und stereotaktischer Kontrolle (siehe oben) soll analog zur Vormarkierung des *Tractus perforans* MiniRuby in die Zielregion der Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, der CA3 Region appliziert werden. Durch retrograden Transport dieses Farbstoffes kommt es zur Markierung der Dendriten der Körnerzellen. In einer zweiten Operation wird nun unter stereotaktischer Kontrolle zwei Tage später eine entorhinale Läsion durchgeführt. Nach unterschiedlichen Überlebenszeiten (1, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 30 Tagen) werden die Tiere perfusionsfixiert, vibratomgeschnitten und dann immunzytochemisch mit Markern gegen Mikrogliazellen (Isolektin, Mac-1) bzw. Astrozyten gefärbt. Die Analyse soll analog zu den Phagozytosestudien axonalen Materials (siehe oben) sowohl licht- und konfokal, als auch elektronenmikroskopisch durchgeführt werden. Hierbei soll zunächst morphologisch, dann auch unter Einsatz von Antikörpern gegen Connexin 43 die Art der Interaktion von Gliazellen mit deafferenziereten Dendriten (Gap-Junctions?) aufgeklärt werden.

3.5.2/3.3 Proliferation und Apoptose von Gliazellen

Sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten verändern sich morphologisch sowie hinsichtlich der Expression von immunrelevanten Molekülen in der Deafferenzierungszone nach Läsion. Ungeklärt bleibt jedoch, ob es zu einer Proliferation ortsständiger Gliazellen in Gefolge der Deafferenzierung kommt, oder ob die Migration in das ehemalige Terminationsgebiet des *Tractus perforans* alleine die Zunahme der Zellzahl erklärt. Hierzu sollen die Tiere nach verschiedenen Überlebenszeiten nach Läsion (3, 7, 10, 30, 100 Tage) eine Stunde vor Tötung 5' Bromodesoxyuridin (BRDU) i. p. injiziert bekommen. Nach Fixation und schneiden des Materials (siehe oben) wird das BRDU mit einem Antikörper in Kombination mit Gliazspezifischen Markern dargestellt und die kerngefärbten Zellen quantifiziert.

Unsere bisherigen Daten zeigen, daß nach längeren Überlebenszeiten (> 20 Tage) keine Mikrogliazellen mit phagozytiertem Material im Gewebe vorhanden sind. Dies wirft die Frage auf, ob diese Zellen selber durch Astrozyten phagozytiert worden sind oder aber apoptotisch untergehen. Elektronenmikroskopisch zeigen sich Apoptose-typische Formationen. Es soll unter dem Einsatz der TUNEL-Methode die Frage nach der Apoptose von phagozytierenden Mikrogliazellen beantwortet werden.

3.5.2/3.4 Pharmakologische Beeinflussung der Aktivierung von Gliazellen nach entorhinale Läsion

Nach Vormarkierung des *Tractus perforans* mit MiniRuby können phagozytierende Gliazellen an Hand der aufgenommenen, fluoreszenz-markierten Axonmaterialien erkannt werden. Den Tieren, die einer entorhinalen Läsion unterzogen worden sind, sollen im postoperativen Verlauf während der gesamten Überlebenszeit (1, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 30 Tagen) mit Cyclosporin A i.p. behandelt werden. Ebenso soll der Effekt von Interferon-beta, ebenfalls i.p. appliziert, untersucht werden. Es soll dabei die Zahl aktivierter Mikrogliazellen und Astrozyten in der äußeren Molekularschicht des denervierten *Gyrus dentatus*, die Intensität der Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle LFA-1, VLA-4 und ICAM-1 sowie der MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Antigene analysiert werden.

3.5.2/3.5 Organotypische hippocampale Komplexschnittkulturen

Organotypische hippocampale Komplexschnittkulturen werden gewonnen, indem 10 Tage alte Ratten dekapitiert werden, woraufhin unter sterilen Bedingungen das Hirn entnommen wird. In zwei weiteren Präparationsschritten wird der den Hippocampus enthaltende Hirnteil nach rostral vom restlichen Neocortex sowie nach kaudal vom Hirnstamm und von Kleinhirn abpräpariert. Die so gewonnene Scheibe wird senkrecht in eiskaltem Präparationsmedium (MEM, 1% L-Glutamin, pH=7,35) auf einen Sektionsblock aufgeklebt, woraufhin das Schneiden mit dem Vibratom in einer Schnittdicke von 400 µm möglich wird. Die so gewonnenen Koronarschnitte durch die kaudalen Hirnanteile werden nach der bereits charakterisierten Interfacetechnik auf Millipore-Filtermembranen der Porengröße 0,1 µm gebracht, die wiederum in die Vertiefungen einer 6-Loch-Kulturschale eingesetzt werden. Das Medium, auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt und bestehend aus MEM und HBSS im Verhältnis 2:1, 25% Normal Horse Serum (NHS), 2% Glutamin, 2,64 mg/ml Glucose sowie Penicillin/Streptomycin, wird anschließend in die Vertiefungen gefüllt, so daß es die auf der Filtermembran liegenden Schnittkulturen nur von unten her erreicht. Die Inkubation dieser Schnittkulturen erfolgt bei 35°C, 5% CO₂, 95% Raumluft in einer befeuchteten Atmosphäre. Die Fixation der Schnittkulturen nach verschiedenen langen *in vitro*-Zeiträumen erfolgt durch Immersion der Filtermembranen mit den darauf liegenden Schnitten in Standard-Immunfixativ (4% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure), wobei in der ersten Fixationsperiode, die 15 Minuten andauert, 0,1% Glutaraldehyd enthalten ist, die nach dreimaligem Waschen in PB erfolgende 2. Fixationsperiode, die 60 Minuten andauert, erfolgt in Immunfixativ ohne Glutaraldehyd. Nach dreimaligem Waschen in 0,1M PB werden die fixierten Schnitte in 0,8M Sacharoselösung verbracht, wo sie bis zum Absinken bleiben. Nach Absinken der Schnitte werden diese in 1,5M Sacharoselösung überführt, in der sie bis zur Weiterprozessierung verbleiben. Das horizontale Schneiden der Schnittkulturen erfolgt auf dem Kryostat, in dem die in 1,5M Sacharoselösung aufbewahrten Schnitte horizontal auf einen zurechtgeschnittenen Block gefrorenen Gefriermediums aufgebracht werden, wonach sie mit einer weiteren Schicht Gefriermediums bedeckt werden. Das horizontale Schneiden der Schnittkulturen erfolgt nun bei -40°C Umgebungstemperatur und -35°C Blocktemperatur in einem Jung-Kryostat, wobei die Schichtdicke 14 µm beträgt und die gewonnenen Schnitte direkt auf gelatinierte Objektträger aufgezo-gen werden. Nach dem Antrocknen der Schnitte auf den gelatinierten Objektträgern können diese für die weitere konventionelle Immunhistochemie verwendet werden.

3.5.2/3.6 Einzelzellkultur von Mikroglia und Astrozyten

Mikrogliaeinzelzellkulturen werden gewonnen, indem Ratten direkt postnatal das Gehirn entnommen wird, woraufhin unter dem Präparationsmikroskop bei 4°C auf Eis und in Präparationsmedium (HBSS mit Ca und Mg) die Meningen abpräpariert werden. Anschließend erfolgen die Dissoziation des Gewebeverbandes durch die 3-5 min. bei Raumtemperatur anhaltende Inkubation mit Trypsin und DNase in HBSS ohne Ca und Mg sowie durch die Trituration mit einer Pasteur-Pipette, deren Spitze feingeschmolzen und somit eingengt worden ist. Das so dissoziierte Gewebe wird zentrifugiert (100 x g, 10 min. 4°C), in Kulturmedium resuspendiert und auf mit Poly-L-Lysin-beschichtete 20 cm²-Kulturflaschen gegeben, in denen auf diese Art und Weise gemischte Mikroglia- und Astrogliazellkulturen entstehen. Das Medium zum Unterhalten der Primärkulturen setzt sich zusammen aus DMEM, 10 % FCS, 1% L-Glutamin sowie einen Zusatz von Penicillin/Streptomycin. Die Inkubation findet unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO₂, 95% Raumluft und in befeuchteter Atmosphäre statt.

Nach Ausbildung eines homogenen, konfluenten Astrozytenzellrasens können die auf diesem Zellrasen liegenden Mikrogliazellen durch mechanische Alteration abgelöst und durch Aufnahmen des Überstandes in die Einzelzellkultur überführt werden. Die in Einzelzellkultur gehaltenen Mikrogliazellen benötigen ein weniger serumhaltiges Medium, wiederum bestehend aus DMEM, 2 % Serum sowie L-Glutamin und den bereits erwähnten Antibiotika.

3.5.2/3.7 Zell- und Molekülmarkierung

Marker	Markierung von	Verdünnung
anti-LFA-1a	b ₂ -Integrin, a-Kette/Adhäsionsmolekül	1:200
anti-LFA-1b	b ₂ -Integrin, b-Kette/Adhäsionsmolekül	1:200
anti-VLA-4	b ₁ -Integrin, a-Kette/Adhäsionsmolekül	1:200
anti-ICAM-1	Ig-Supergenfamilie, Adhäsionsmolekül	1:200
anti-VCAM-1	Ig-Supergenfamilie, Adhäsionsmolekül	1:500
anti-MHC-I	Antigenpräsentation (CD8-restringiert)	1:5
anti-MHC-II	Antigenpräsentation (CD4-restringiert)	1:5
anti-GFAP	saure gliale Fibrillen (in Astrozyten)	1:1.000
anti-Connexin 43	Gap-Junctions	1:200
Mac-1	C3bi-Rezeptor Makrophagentypisch	1:100
GFS-B ₄	an Monozyten, Makrophagen, Mikroglia und Endothelien bindendes Lektin	1:40
anti -BRDU	teilende Zellen	1:20

3.5.2/3.8 Durchflußzytometrie

Die quantitative Auswertung morphologischer Parameter, wie Größe und Granularität, sowie der Expression verschiedener zytoplasmatischer und zellmembrangebundener Antigene erfolgt mit der Durchflußzytometrie. Ebenso kann auf diese Weise der Transformation- bzw. Transfektionserfolg mit Antisensekonstrukten gesichert und quantifiziert werden (siehe 3.5.2/3.8). Hierfür werden die in den Vertiefungen einer 24-Loch-Kulturschale in Einzelzellkultur gehaltenen Mikrogliazellen oder Astrozyten durch Inkubation in kalzium/magnesiumfreiem HBSS mit 0,5 mM von ihrer Kulturfläche abgelöst und in Suspension gebracht. Das nach der Zentrifugation (100 x g, 4 min., 4°C) erhaltene Zellpellet wird mit einem Fixativ überschichtet, welches 4 % Paraformaldehyd, 0,1 % Glutaraldehyd sowie 15% gesättigte Pikrinsäure enthält. Nach 8minütiger Fixation und 3maligem Waschen in 0,1 M Phosphatpuffer (PB; pH = 7,4) mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) erfolgt die Inkubation

mit den jeweiligen Primärantikörpern. Sofern es sich hierbei um direkt fluoreszenzkonjugierte Primärantikörper handelt, kann nach 3 weiteren Waschschritten in 0,1M PB mit 0,1% BSA zur durchflußzytometrischen Auswertung fortgeschritten werden. Handelt es sich um nicht-fluoreszenzkonjugierte Primärantikörper so muß nach weiterem 3maligem Waschen die Inkubation mit einem fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper erfolgen, der gegen den F_C-Anteil des jeweils verwendeten Primärantikörpers gerichtet ist. Nach weiterem 3maligem Waschen mit 0,1 M PB mit 1% BSA kann auch hier mit der durchflußzytometrischen Auswertung begonnen werden. Die durch die Inkubation mit einem FITC-konjugierten Primär- oder Sekundärantikörper induzierte Fluoreszenz wird im FL1-Kanal des Durchflußzytometers quantitativ bestimmt, und dient als Maß für die Menge des jeweils mit dem Primärantikörper markierten Antigens.

3.5.2/3.9 Superkultivierung fluoreszenzmarkierter Gliazellen auf organotypische hippocampale Komplexschnittkulturen

Gliazellen sollen in der Einzelzellkultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff MiniRuby vormarkiert (24 Stunden, Standardinkubationsbedingungen, 20 µg/ml MiniRuby) werden und in einem zweiten Schritt abgelöst und in Suspension gebracht werden. Dies geschieht durch Absaugen des Kulturmediums und Waschen mit Ca- und Mg-freiem PBS, woraufhin das Ablösen der Zellen durch mechanische Inkubation in Ca- und Mg-freiem HBSS mit 5 mM EDTA erfolgen kann. Die so gewonnene Zellsuspension wird zentrifugiert (100 x g, 4°C, 4 Minuten), der Überstand verworfen und das gewonnene Zellpellet in 200 µl Medium resuspendiert. Dafür wird das für die Kultur der organotypischen hippocampalen Slice-Kulturen verwendete Kulturmedium (siehe oben) verwendet werden. Diese Zellsuspension soll nun auf die Oberfläche frisch präparierter organotypischer hippocampaler Schnittkulturen gebracht werden, die dann bei 35°C, 5% CO₂, 95% Raumluft und in befeuchteter Atmosphäre kultiviert werden sollen. Die Slice-Kulturen sollen zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 6, 9, 18 div) fixiert und in Saccharoselösung überführt werden. Das horizontale Schneiden der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen wird die getrennte Beobachtung äußerer und innerer Schichten der hippocampalen Schnittkultur möglich machen. So soll in einem ersten Schritt ohne weitere Gegenfärbung die Betrachtung der auf gelatinierte Objektträger aufgezogenen und mit Immumount eingedeckelten Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Rhodaminanregung erfolgen, woraus ersichtlich werden wird, ob vormarkierte Makrophagen ihren Weg in innere Schichten der hippocampalen Schnittkultur gefunden haben. Zusätzlich wird eine Aussage über die morphologische Erscheinungsform dieser Zellen ermöglicht werden, denn den eingangs angestellten Überlegungen zufolge erscheint sowohl eine persistierend amöboide als auch eine nach längeren Kulturzeiträumen auftretende Ramifizierung denkbar. Bei anderen Schnitten soll eine Gegenfärbung der Präparate mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Antigene erfolgen (GFAP, Mac-1, LFA1, VLA4, MHC-I, MHC-II), wobei nach 3maligem Waschen in 0,1M PB die Inkubation mit adäquaten Sekundärantikörpern erfolgen soll, die FITC-konjugiert sind. So soll eine Doppelfluoreszenzuntersuchung ermöglicht werden, bei der die Kolokalisation von dem in der Einzelzellkultur verabreichten Fluoreszenzfarbstoff MiniRuby mit den bezeichneten Antigenen möglich wird.

3.5.2/3.10 Transformations- bzw Transfektionsexperimente

Diese Experimente sollen die funktionelle Bedeutung der Expression von Adhäsionsmolekülen und anderer Faktoren im kombinierten Einzelzell- und Slicekulturmodell analysieren. Durch die temporäre Integration von Plasmiden soll die Möglichkeit geschaffen werden, die Expression bestimmter, für Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsvorgänge möglicherweise verantwortlicher Moleküle experimentell zu unterdrücken oder aber unphysiologisch zu verstärken. Hierzu wird einerseits der methodische Ansatz der temporären Transformation von primären Mikrogliazellkulturen mit *E.coli*-Plasmiden verfolgt werden, die mit dem EGFP-(Enhanced Green Fluorescent Protein)-Gen versehen sind und damit bei gelungener Transformation und Ablesen des Plasmides in der Zielzelle eine grüne Fluoreszenz der Zielzelle hervorrufen. Somit ist bei jedem Transformationsvorgang die Möglichkeit gegeben, den Transformationserfolg anhand einer einfachen Fluoreszenzuntersuchung abzulesen. Andererseits sollen BV-2-Zellen, die sowohl morphologisch als auch physiologisch als Mikrogliazelllinie gut charakterisiert ist, stabil transfiziert werden. Erste Versuche in unserem Labor zeigen, daß eine solche stabile Transfektion gelingt. Es sollen zwei experimentelle Strategien verfolgt werden: 1. Durch Einklonieren einer gegen die mRNA des zu inhibierenden Zielmoleküls gerichteten Antisense-Sequenz am Multiple Cloning Site des EGFP-Plasmides soll in der transformierten Zielzelle eine Hybridisierung der für das Zielmolekül kodierenden mRNA mit der vom Plasmid abgelesenen Antisense-Sequenz erfolgen. Hierdurch wird die ribosomale Translation der für das Zielmolekül kodierenden mRNA behindert und die Expression des Zielmoleküls unterbleibt. 2. Durch Einklonieren einer für das Zielmolekül kodierenden Basensequenz soll die Überexpression dieser Zielmoleküle erreicht werden. Zunächst sollen *E.coli* durch mit Ca komplexierte Plasmide transformiert und auf Gentamycin-versetztem Agar kultiviert werden. Das im EGFP-Plasmid downstream enthaltene Gentamycin-Resistenz-Gen wird in *E.coli* dauerhaft exprimiert, so daß nur transfizierte *E.coli*-Kolonien auf dem Gentamycin-Agar überleben. Überlebende Kolonien werden aufgenommen und in Nährbouillon in großen Mengen herangezogen werden. Durch Zentrifugation der *E.coli*-Suspension und eine sich daran anschließende DNA-Maxipräparation wird das Plasmid in größeren Mengen gewonnen werden können. Die Sicherung, daß es sich bei der im Rahmen der Maxipräparation gewonnen DNA tatsächlich um das Plasmid handelt, wird durch das Schneiden des Plasmides an 2 definierten Stellen (z.B. EcoR1 und NOT) erfolgen, woraus ein DNA-Bruchstück definierter Länge (XY-Basenpaare) resultiert. Der Southern-Blot dieser gewonnenen DNA-Bruchstücke wird im Vergleich zu einer Größenleiter bestehend aus Phagen-DNA definierter Länge erfolgen und die Beurteilung der Länge der herausgetrennten Sequenz ermöglichen. Im nächsten Schritt werden die bei der Maxipräparation in großen Mengen gewonnenen Plasmide wiederum mit Ca komplexiert und in die Zielzellen transformiert werden. Nach Kultivierung der Zielzellen unter Standardinkubationsbedingungen wird nach 12 Stunden der Transformationserfolg dadurch sichtbar werden, daß transformierte und damit das Plasmid enthaltende Zielzellen GFP-transkribieren und translatieren und daher im Fluoreszenzmikroskop bei FITC-Anregung fluoreszieren sollten. Das EGFP-Plasmid verfügt upstream der für das EGFP kodierenden Sequenz über ein Multiple Cloning Site, in dem durch das Vorhandensein von Zielsequenzen unterschiedlicher Endonukleasen das Einklonieren einer definierten Basensequenz möglich ist. Die unter der Kontrolle des CMV-immediate-early-antigen Promoters stehende, einklonierte Sequenz wird in der Zielzelle die eingebrachte Basensequenz dauerhaft exprimieren. Nach der oben geschilderten Sicherung dieser Transformationsmethode wird der Transformationsvorgang mit *E.coli*-Plasmiden begonnen werden,

in die 1. geeignete Antisense-Sequenzen oder 2. geeignete, für bei Aktivierungs- oder Deaktivierungsvorgängen von Mikrogliazellen wesentlichen Zielmolekülen kodierende Sequenzen inkloniert worden sind.

3.5.2/3.11 Gliazellaktivierung in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur nach Läsion

In organotypischen hippocampalen Schnittkulturen herrschen nach 9 Tagen *in vitro* in inneren Zonen auch bezüglich nicht-neuronaler Zellen organotypische Verhältnisse: Zunächst explantationsbedingt amöboide Mikrogliazellen entwickeln sich in der intakten hippocampalen Schnittkultur zu typischen ramifizierten Mikrogliazellen, wie sie sonst nur im gesunden adulten ZNS anzutreffen sind. Astrozyten zeigen eine normale Morphologie. Desweiteren haben wir zeigen können, daß die Intaktheit des entorhinal-hippocampalen Systems durch die Fluoreszenzmarkierung des *Tractus perforans in vitro* nachgewiesen werden kann, womit die Voraussetzungen für Experimente gegeben sind, die die Intaktheit dieses Systems lädieren. Auf der Grundlage dieser beiden Voraussetzungen haben wir zeigen können, daß durch den gezielten Einsatz verschiedener Noxen eine Aktivierung der in inneren Schichten deaktivierten Mikrogliazellen erreicht wird. Es werden dabei Kainat (50 µM), NMDA (50 µM) und Colchizin (10 µM) als Noxen appliziert. Desweiteren konnte durch die *in vitro* durchgeführte Läsion des entorhinalen Cortex der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur eine experimentelle Deafferenzierung der äußeren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* erreicht. All diese experimentellen Manipulationen induzieren neuronale Degenerationsprozesse, was in einer Aktivierung nicht-neuronaler Zellen in diesem Gebiet resultiert. Die Untersuchung der Aktivierbarkeit von nicht-neuronalen Zellen soll sich auf die Charakterisierung der Expression funktioneller Aktivierungsmarker wie der bereits beschriebenen Integrine LFA-1, VLA-4, des ICAM-1, der MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Antigene sowie die Untersuchung der Phagozytoseaktivität beschränkt werden. Die Schnittkulturen werden ab dem 9. Tag *in vitro*, d. h. zu einem Zeitpunkt, an dem in inneren Schichten intakter Schnittkulturen eine Deaktivierung der Gliazellen eingesetzt haben müßte, einer Behandlung mit den 3 löslichen Noxen oder aber einer Läsion des entorhinalen Cortex unterzogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Einsatz dieser Noxen bzw. der entorhinalen Läsion (12 Stunden, 24 Stunden, 1 Tag, 3 Tage, 6 Tage) sollen die derart vorbehandelten Schnittkulturen fixiert und in der bereits beschriebenen Weise aufgearbeitet werden. Durch Färbungen mit dem GFS-B₄ bzw. GFAP sollen die Gliazellen charakterisiert und hinsichtlich morphologischer Veränderungen beschrieben werden. Die Visualisierung soll mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Methoden durch eine ABC-DAB-Entwicklung erfolgen. Durch Nissl-Färbung kann die durch den Einsatz der neurotoxischen Substanzen möglicherweise induzierte Reduktion der Körnerzellzahl im *Gyrus dentatus* bzw. der Pyramidenzellzahl im Ammonshorn quantifiziert werden. Für den Fall der *in vitro* durchgeführten experimentellen entorhinalen Läsion sollen schon *in vitro* mikroskopische Beobachtungen am inversen Mikroskop stattfinden, um mögliche Degenerationsvorgänge im Terminationsgebiet des mit MiniRuby vormarkierten *Tractus perforans*, d.h. der äußeren Molekularschicht des *Gyrus dentatus*, beschreiben zu können. Auch hier soll zu verschiedenen Zeiträumen nach entorhinaler Läsion eine Fixation der Schnittkulturen erfolgen, woraufhin das weitere histologische Aufarbeiten der Präparate in horizontale Schnitte auf dem Kryostat erfolgen wird. Bei denjenigen Schnittkulturen, deren *Tractus perforans* mit MiniRuby fluoreszenzmarkiert wurde, wird unter fluoreszenzoptischen Bedingungen (Rhodaminanregung) zu prüfen sein, inwieweit sich parallel zu den *in vivo* ablaufenden Vorgängen auch in der Schnittkultur im Terminationsgebiet des *Tractus perforans* eine Degeneration vormarkierte

Fasern finden läßt. Für diesen Fall wären eine Auflösung der zunächst axonalen Struktur der Fasern in der äußeren Molekularschicht und eine Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes in Form granulärer Strukturen zu erwarten, die auf eine Phagozytose durch nicht-neuronale Zellen zurückzuführen wäre. Durch eine Gegenfärbung der Präparate mit GFAP bzw. GFS-B₄ (FITC-konjugiert) oder monoklonalen Antikörpern gegen Mac-1 und eine sich daran anschließende Inkubation mit dem adäquaten, FITC-konjugierten Sekundärantikörper würde sich charakterisieren lassen, inwieweit Astrozyten bzw. Mikrogliazellen in inneren Schichten der hippocampalen Schnittkultur an der Phagozytose degenerierender Fasern des *Tractus perforans* beteiligt wären. Anschließend soll untersucht werden, ob durch die Applikation verschiedener Zytokine, denen eine immunsupprimierende Wirkung zugeschrieben wird kann (beta-Interferon, 500 U/ml; TGF-beta, 500 U/ml), in diese Aktivierungsprozesse eingegriffen werden kann. Desweiteren soll versucht werden, mit pharmakologischen Substanzen, deren immunsuppressive Wirkung gut charakterisiert ist, eine Inhibierung der glialen Aktivierung zu erreichen. Hier werden Cyclosporin A und FK506 in Konzentrationen von 50 ng/ml bis 50 mg/ml bzw. 500 pg bis 5 mg/ml eingesetzt werden. Nach Applikation dieser Substanzen soll geprüft werden, ob die oben bereits beschriebenen Parameter Morphologie, Adhäsionsmolekülexpression, MHC-I- und -II-Expression und Phagozytose sich durch die Gabe der immunsuppressiv wirkenden Substanzen haben beeinflussen lassen.

3.5.2/3.12 Einsatz des „dual-photon“ konfokalen Mikroskopes (beantragt als Gemeinschaftsantrag Z2) zur Analyse

fluoreszenzmarkierter Gliazellen in organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen *in situ* (siehe 3.5.2/3.9)

- der Effekte der Transformationsexperimente *in situ* (siehe 3.5.2/3.10)
- von Gliazellaktivierung in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur nach Läsion *in situ* (siehe 3.5.2/3.11)

Das „dual-photon“ konfokale Mikroskop erlaubt das direkte Monitoring vormarkierter (Mini Ruby-fluoreszenzmarkierter oder EGFP-transfizierter) Gliazellen in der lebenden organotypischen Kultur auch in den mittleren Schichten. Hierbei wird eine Auflösung erreicht, die die direkte Visualisierung von Phagozytoseprozessen ermöglicht. In unserer Arbeitsgruppe ist ein begasbarer Miniaturbrutschrank zur Kultivierung von Slicekulturen unter einem aufrechten Mikroskop entwickelt worden. Diese Einrichtung läßt sich auch unter dem beantragten „two-photon“ Mikroskop adaptieren. Diese Kammer ermöglicht einen langandauernde sowie eine repetitive Analyse der Slicekulturen. Zur Zeit wird dieser Setup auch für Einzell-Zell PCR Analysen eingesetzt. DiesEine direktes Monitoring würde es erlauben, ein Verständnis der Pathophysiologie der Gliazell-Neuron-Interaktion zur erarbeiten und auch die Dynamik dieser Phänomene zu verstehen. Für die Etablierung eines interventionistischen Ansatzes (unter Anwendung von Pharmaka, Antikörpern oder Liganden) ist diese Verständnis unabdingbare Voraussetzung.

3.5.4 Zeitplan

Die Experimente sollen parallel durchgeführt werden. Hinsichtlich der Transformationsexperimente soll zunächst die Methodenetablierung innerhalb des ersten Jahres der Förderperiode abgeschlossen und dann unter Einsatz spezifischer Transformationen der physiologische Effekt getestet werden.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Das Projekt steht an der Schnittstelle mehr neuroimmunologisch ausgerichteter Projekte (Weber/Einhäupl; Volk; Hanisch) und den Projekten zu chronischen Veränderungen (Eder/Heinemann). Bisher wurde zusammen mit dem Projekt Eder/Heinemann die Korrelation der Downregulation von Adhäsionsmolekülen und der Veränderung des Strommusters als Zeichen immunologischer Deaktivierung analysiert. Diese Untersuchungen sollen intensiv fortgeführt werden. In Zusammenarbeit mit dem Projekt Kettenmann werden die physiologischen Auswirkungen der Microglia-Ramifizierung sowohl in der Slice-Kultur als auch nach Vitamin-E Gabe in der Einzelzellkultur untersucht. In enger Kooperation mit den Projekten Weber/Einhäupl und Volk sowie Hanisch soll die Rolle unterschiedlicher Zytokine sowie die Möglichkeit der Induktion einer experimentellen Inflammation *in situ* (in der organotypischen Schnittkultur) geklärt werden.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997 Verg.-Gr.	2. Hj. 1998				1999			2000			1. Hj. 2001		
	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
		BAT IIa/2	2	39600	BAT IIa/2	2	79200	BAT IIa/2	2	79200	BAT IIa/2	2	39600
		BAT VIb	1	24600	BAT VIb	1	49200	BAT VIb	1	49200	BAT VIb	1	24600
zusammen		zusammen	3	64200	zusammen	3	128400	zusammen	3	128400	zusammen	3	64200
	SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		16000	522		32.000	522		32.000	522		16.000
		515		23287	515			515			515		
		zusammen		39287	zusammen		32000	zusammen		32000	zusammen		16000
	I	Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		55.164											

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausstattung	1. Nitsch Robert, Prof. Dr. med.	Anatomie, Zellbio- logie	Institut für Anatomie	5	1.7.95	C4
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	2. Gimsa, Ulrike, Dr. rer. nat.	Immunologie	Institut für Anatomie	5	1.1.98	BAT IIa
	3. Ninnemann, Olaf, Dr. rer. nat.	Molekularbiologie	Institut für Anatomie	5 (B)	1.7.95	BAT IIa
	4. Plaschke, Martina, Dr. med. dent.	Anatomie	Institut für Anatomie	5	1.7.95	C1
	3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	1. Duwe, Gisela 2. Lehmann, Anita	MTA MTA	Institut für Anatomie Institut für Anatomie	4 5	1.7.95 1.7.95
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	1. N.N.*	Zellbiologie	Institut für Anatomie	40	1.12.95	BAT IIa/2
	2. N.N.*	Molekularbiologie	Institut für Anatomie	40		BAT IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	1. Haas, Dorit*	MTA	Institut für Anatomie	40	1.12.95	BAT VIb

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Das Projekt wird von Prof. Dr. Robert Nitsch geleitet und wissenschaftlich betreut. Frau Dr. Ulrike Gimsa verfügt über langjährige Erfahrungen in der Immunologie und wird im Institut einen neuroimmunologisch orientierten Schwerpunkt aufbauen. Sie kann zu einem kleinen Teil ihrer Arbeitszeit auch für das geplante Projekt tätig werden. Herr Dr. Olaf Ninnemann hat das molekularbiologische Labor in der AG aufgebaut und leitet dieses. Er wird seine Expertise beratend zur Verfügung stellen. Frau Dr. Martina Plaschke verfügt über langjährige Erfahrungen in tierexperimenteller Arbeit. Sie ist für den Tierstall des Instituts verantwortlich und einen Teil ihrer Arbeitszeit im Projekt tätig sein.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Frau Gisela Duwe verfügt über langjährige Erfahrungen in der Vorbereitung der Elektronenmikroskopie und betreut in dieser Technik sämtliche Projekte in der AG. Frau Anita Lehmann betreut das Zellkulturlabor organisatorisch und arbeitet für alle zellbiologische Projekte der AG. Sie wird die Grundbetreuung der Zellkulturarbeiten übernehmen.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1. N.N. (BAT IIa/2)

Der/die biologische Doktorand/in die *in vivo* Untersuchungen durchführen. Hierfür ist eine zellbiologische Orientierung Voraussetzung. Die Untersuchungen zur Phagozytose auf licht-, konfokal- und elektronenmikroskopischem Niveau unter Einsatz der Immunzytochemie sowie die pharmakologischen Experimente gehören zu diesen Aufgaben. Sie können nicht zusammen mit den Transformationsexperimenten von einer Person durchgeführt werden.

2. N.N. (BAT IIa/2)

Der/die biologische Doktorand/in soll die molekularbiologischen Arbeiten durchführen, die einen erheblichen zeitlichen und methodischen Aufwand erfordern. Diese umfassen

- Einklonieren verschiedener Sequenzen in das Multiple-Cloning-Site des EGFP-Plasmides
- Etablierung und Durchführung der transienten Transformation mit dem verschiedene inklonierte Sequenzen enthaltenden EGFP-Plasmid

Die genannten Aufgaben erfordern zell- und molekularbiologische Vorkenntnisse sowie eine über einen Zeitraum von etwa drei Jahren erfolgende, kontinuierliche Mitarbeit an dem charakterisierten Teilprojekt. Ein hohes Maß an selbständigem Arbeiten, sowohl in der Planung als auch in der Auswertung der Experimente, sind hier eine unabdingbare Voraussetzung für das Gelingen des Projektes.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1. Dorit Haas (BAT VIb)

Die Notwendigkeit zur Mitarbeit einer technischen Assistentin ergibt sich aus dem großen Umfang arbeitsintensiver Routinearbeiten im Zellkulturlabor und im Zusammenhang mit der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung verschiedener Gewebe. Frau Haas arbeitet seit Beginn im Projekt und hat sich als hervorragende MTA ausgewiesen. Dies zeigt sich durch die Tatsache, daß sie sogar Koautorin in zwei Veröffentlichungen ist. Sie ist für das Gelingen des Projektes außerordentlich wichtig gewesen.

Sie hat folgende Aufgaben:

- Anlegen und Propagieren der Einzelzellkulturen aus Mikroglia und Astrozyten
- Anlegen und Versorgen der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen
- Fixieren, Kryostatschneiden und immunhistochemische Weiterbearbeitung der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen und der bei *in vivo*-Experimenten gewonnenen Gewebe

Die genannten Aufgaben implizieren das Anforderungsprofil eines/einer technischen Assistenten/in, da hier die Durchführung von routinemäßigen Abläufen der Zellkultur sowie der Histologie und Immunhistochemie erforderlich sein wird. Aufgrund der Arbeit mit primären Zellkulturen, Komplexschnittkulturen und Zelllinien werden ein hohes Maß an selbständiger Tätigkeit und Vorerfahrungen im Umgang mit Zellkulturen erwartet.

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	5.000	10.000	10.000	5.000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	39.287	32.000	32.000	16.000

Die Transfektionsexperimente müssen im vorhandenen Sicherheitsbereich nach S2 durchgeführt werden und können somit nicht mehr im normalen Zellkulturlabor mitlaufen. Die BV-2-Zelllinie ist selber nach S2 zu klassifizieren. Die Sterilbank in diesem Bereich darf ausschließlich für Arbeiten mit Bakterien und Hefen (Infektionsgefahr!) benutzt werden. Gleichzeitig ist der Umfang der dargestellten zellbiologischen Experimente an Einzelzellkulturen aus der Primärkultur und an organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen erheblich und übersteigt die apparativen Kapazitäten des in der AG Zell- und Neurobiologie eingerichteten Zellkulturlabors beträchtlich. Als Zusatzausstattung ist deshalb für das Projekt eine Zusatzausstattung des S2-Labors notwendig:

Inkubator NUAIRE 4500E US AUTOFLOW CO ₂ -Inkubator für Zell- und Gewebekulturen Angebot der Fa. Zapf (inkl. MwSt):	10.925,00 DM
Sterile Arbeitsbank ANTARES 72 Sicherheitswerkbank Klasse II, GS-Zeichen nach DIN 12950 Angebot der Fa. Labor- und Forschungsbedarf Udo Piatek (inkl. MwSt):	12.362,50 DM
Summe	23.287,50 DM

Verbrauchsmaterial

Folgende Verbrauchsmittel (inkl. MwSt) werden p.a. benötigt:

Versuchstiere (neugeborene Ratten)	1.000 DM
Versuchstiere (p10 Ratten)	1.000 DM
Versuchstiere (adulte Ratten)	1.000 DM
Medien (PBS, RPMI, DMEM, HBSS, FBS, Penicillin, Streptomycin)	4.000 DM
Zellkulturmaterialien (Kulturflaschen, Kulturschalen, Zentrifugenröhrchen, Ficoll-Zentrifugationsmedium, Trypsin/EDTA)	3.500 DM
Fluoreszenzmarkierte Latexpartikel	1.500 DM
ABC-Kits	2.000 DM
Primärantikörper (Anti- LFA-1a, -VLA-4, -ICAM-1, -MHC-I, -MHC-II, -Mac-1, -GFAP)	7.000 DM
Sekundärantikörper (biotinylierte, FITC-, TRITC-konjugierte)	2.000 DM
Zytokine (IL-1, TNF-a, IFN-b, IFN-g, TGF-b)	5.000 DM
Laborchemikalien	2.000 DM
Fotomaterial	1.000 DM
flüssiger Stickstoff	1.000 DM
Summe	32.000 DM

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Für die *in vitro*-Beobachtung von in Schnittkulturen hineinmigrierenden, mit Fluoreszenzfarbstoffen vormarkierten Gliazellen sowie die Beobachtung des *in vitro* vormarkierten *Tractus perforans* muß ein Mikroskop vorhanden sein, welches in seinem optischen Auflösungsvermögen. Ein solches Mikroskop muß im S2-Labor vorhanden sein, das Gewebe aus den Gründen des gentechnologischen Sicherheitsvorschriften diesen Laborbereich nicht verlassen darf. Aus diesem Grund wird die Anschaffung eines inversen Mikroskopes mit folgenden technischen Eckdaten als Zusatzausstattung für die Durchführung geschilderten Experimente für unabdingbar gehalten:

Inverses Mikroskop (IX70) mit bis zu 60facher Objektivvergrößerung mit Zwei-Kanal-Fluoreszenzanregung und Fotografiereinrichtung Angebot der Fa. Olympus (inkl. MwSt):	55.164,46 DM
Summe	55.164,46 DM

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C2

3.1.1 Thema:

Expression und Regulation von Apolipoprotein E (ApoE) in Gliazellen nach experimenteller und neuropathologischer Läsion (M. Alzheimer)

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neuroanatomie, Neuropathologie, Experimentelle Neurobiologie

3.1.3 Leiter/in:

Prof. Dr. med. Thomas G. Ohm, geb. 4.3.1954
Institut für Anatomie
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität
Universitätsklinikum Charité,
Schumannstraße 20/21
10098 Berlin
Telefon: 030 2802 1450
Telefax: 030 2802 8031
Email: tgohm@rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

(x) nein () ja, befristet bis zum :

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

Untersuchungen am Menschen	()	ja	(x)	nein
klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Genterapie	()	ja	(x)	nein
Tierversuche	(x)	ja	()	nein
gentechnologische Versuche	()	ja	(x)	nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-Halts-Jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
bis 1995	36,2	23,5	-	59,7
1996	76,6	47,0	-	123,6
1997	76,6	47,0	-	123,6
1. Hj. 1998	39,6	23,5	-	63,1
Zwischen-summe	229,0	141,0	-	370,0
2. Hj. 1998	19,8	54,2	37,0	111,0
1999	39,6	33,6	-	75,6
2000	39,6	33,6	-	75,6
1. Hj. 2001	19,8	16,8	-	37,8

3.2 Zusammenfassung

Träger des $\epsilon 4$ -Allels haben ein stark erhöhtes Risiko, die Alzheimersche Erkrankung zu bekommen. Das $\epsilon 4$ -Allel kodiert für das Apolipoprotein-E4, einer von dreien durch singuläre Punktmutationen polymorph vorhandenen und im ZNS nur astrozytär gebildeten Apolipoprotein-E-Varianten (ApoE2; ApoE3, ApoE4). Die geplanten Untersuchungen sollen klären (I) inwieweit das Muster und die Stärke der Expression von ApoE-Varianten und ApoE-assoziierten Rezeptoren (LRP, LDL) mit dem der Alzheimer-assoziierten pathologischen Veränderungen (plaques, tangles) in genotypisierten Fällen korreliert, (II) wie die regionale und zelluläre Verteilung von ApoE und ApoE-Rezeptoren bei experimenteller und neuropathologischer Läsion ist, (III) durch welche Rezeptoren und nachgeschalteten second messenger-Kaskaden die ApoE-Bildung, Metabolisierung und Ausschleusung beeinflussbar ist und (IV) welche Effekte die ApoE-Varianten direkt oder in Interaktion mit anderen Molekülen an und in Zellen auslösen. Denkbar ist, daß zumindest bei $\epsilon 4$ -Allel-Trägern die Beeinflussung der ApoE-Expression zu einer um etwa eine Dekade verzögerten Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung führen könnte.

3.3 Stand der Forschung

3.3.1. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) unterliegt beim Menschen einem Polymorphismus (ApoE2, ApoE3 und ApoE4), dessen Allele $\epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$ unterschiedlich mit dem Auftreten der Alzheimerschen Erkrankung korrelieren: $\epsilon 2$ erscheint protektiv, $\epsilon 4$ risikoe erhöhend, beides jeweils auf den „Wildtyp“ $\epsilon 3$ bezogen (Corder et al. 1995). Apolipoproteine werden primär in der Leber synthetisiert und sind als relativ gut untersuchte Moleküle für die Regulation des Lipidstoffwech-

sels, des Lipidtransportes und der Lipidumverteilung zwischen Geweben, Zellen und Zellorganellen bekannt (Weisgraber, 1994). Die ApoE-Varianten unterscheiden sich jeweils durch den Austausch einer einzigen Aminosäure des 299mer großen Moleküls. ApoE3, die häufigste Isoform, enthält an Positionen 112 Cystein und an Position 158 Arginin, ApoE4 hat an beiden Positionen Arginin und ApoE2 an beiden Cysteinen. Die Amino-terminale Domäne (1-191) enthält die Lipoproteinrezeptor-Bindungsstelle (136-150) und die C-terminale Domäne (216-299) die Hauptdeterminanten für die Lipid-Bindungen bzw Lipoproteinbindungen (244-272) (Weisgraber, Mahley, 1996). Zwischen beiden Domänen kommt es zur Interaktion, denn z.B. beeinflusst der Aminosäureaustausch an Position 112 die Präferenz mit welcher ApoE 3 bzw. ApoE4 an Lipoproteinklassen (β VLDL bzw HDL) bindet, wobei die Rezeptorbindung an LDL unbeeinflusst bleibt. Dabei ist eine Interaktion mit dem Arginin an Position 61 notwendig. Andererseits, wie ApoE3 hat ApoE2 Präferenz für HDL aber bindet im Gegensatz dazu nicht an LDL-Rezeptoren. Das Arginin an Position 61 ist humanspezifisch, da alle bisher bekannten neun anderen Spezies mit ApoE-Sequenz hier ein Threonin haben.

3.3.2. Apolipoprotein E und Nervensystem

Apolipoprotein E überschreitet die Blut-Hirn-Schranke nicht und wird deshalb dort lokal gebildet, wobei das Hirn als Organ der zweitstärksten ApoE-Produktion gilt. In der Ratte sind Astrozyten die Bildungsstätten von ApoE (Pitas et al. 1987). Beim Menschen findet sich ApoE in Astrozyten und Neuronen, wobei der Proteinnachweis vermutlich von der Auswahl des ApoE-Antikörpers wesentlich beeinflusst wird. (vgl. Arbeitsbericht zur letzten Antragsperiode). Ein Teil der ApoE-positiven Neurone sind „tangle“-frei, während andere von klinisch unauffälligen Individuen einen Alzheimer-tangle tragen, aber immunonegativ für ApoE sind. Die ApoE-Produktion ist hoch wenn lipidreiche Membranen beim Auf- und Umbau neuronaler Verbindungen während der Ontogenese und nach Trauma vermehrt auf- bzw abgebaut werden müssen (Poirier et al., 1993, Nathan et al. 1994). Neben diesen, mit der aus der Peripherie bekannten Rolle der Lipidumverteilung, kann ApoE jedoch auch den Tod von Neuronen und nicht-neuronalen Zellen induzieren (z.B. Tolar et al. 1997), wobei die Isoformen unterschiedlich effektiv dabei sind. Auch zeigen in vitro Untersuchungen zu neuronalen Wachstums- bzw. Differenzierungsvorgängen, daß diese in Anwesenheit von ApoE4 schlechter sind gegenüber ApoE3 (Nathan et al. 1994) und daß eine Interaktion mit Laminin und Heparansulfat-Proteoglykanen eine wichtige Rolle (Huang et al. 1995b) hat. Dabei spielt vermutlich auch ein LRP-artiger Rezeptor eine zentrale Rolle (Holtzman et al. 1995), der vermutlich auch bei der Internalisierung von Komplexen aus APP-Varianten mit Kunitz-Domäne (= Protease Nexin II, PN2) und PN2-Liganden eine wichtige Funktion hat (Knauer et al. 1996; Fagan et al. 1996) und mit Heparansulfat-Proteoglykanen interagiert. APP mit Kunitz-Domäne ist Ligand für LRP und wird nach Internalisation degradiert (Kounnas et al., 1995). Auch in vivo scheint ApoE4 mit einer geringeren dendritischen Regenerationskapazität verbunden zu sein (Arendt et al. 1997) bzw. - wie an Zwillingstudien gezeigt - mit einer reduzierten kognitiven Leistungsfähigkeit (Reed et al. 1994). Im Liquor cerebrospinalis ist ApoE hauptsächlich an eine HDL-Fraktion gebunden und dirigiert über ApoE-Rezeptoren (in Säugern derzeit fünf identifiziert; LDL, LRP, VLDL, Megalin/Gp330, LR8B) die Verteilung von Cholesterin. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungseigenschaften der ApoE-Isoformen an diese Rezeptoren werden unterschiedlich viel der Lipidpartikel und damit auch Cholesterin für die Zellen bereitgestellt. Cholesterin ist - neben anderen Funktionen - als „Weichmacher“ von Membranen bekannt, und vermag die Transkription verschiedener Gene zu kontrollieren (Osborne et al. 1985). Darüberhinaus vermag Cholesterin die α -Sekretase-Aktivität für das transmembranäre β /A4-Amyloid-Vorläufermolekül, APP, zu modulieren, was vermutlich das Gleichge-

wicht zwischen der β /A4-amyloidogenen β -Sekretase und der α -Sekretase zugunsten der β -Sekretase verschiebt (Bodovitz, Klein, 1996). Auf jeden Fall wird das als neurotroph bewertete lösliche APP, APPsol, bei unverminderten Gesamt-APP signifikant reduziert. Experimentelle Studien an Kaninchen zeigen, daß cholesterinreiche Diät die intrazelluläre Konzentration von β /A4-Amyloid erhöht (Sparks et al. 1994). Andererseits vermag β /A4-Amyloid die Lipidbiosynthese zu hemmen (Koudinova et al. 1996). Cholesterin wiederum kann die Calciumvermittelte Toxizität von β /A4-Amyloid in PC12-Zellkulturen verhindern, wobei der Mechanismus unklar ist (Zhou, Richardson, 1996).

3.3.3 Apolipoprotein E und Alzheimer

Im Rahmen der Alzheimerschen Erkrankung scheint die Expression von ApoE verringert zu sein, was aus Messungen von ApoE im Liquor cerebrospinalis geschlossen wurde (Pirtillä et al., 1996; Blennow et al., 1994). Allerdings haben andere Studien keine signifikante Unterschiede gefunden (Rösler et al., 1996; Lehtimäki et al., 1995). Analysen an post mortem Hirnparenchym haben unterschiedliche Ergebnisse gebracht, wobei das N für die relative seltenen ApoE-Varianten (ϵ 2/2 und ϵ 4/4) jeweils klein war (erniedrigt: Bertrand et al., 1995; erhöht: Diedrich et al., 1991). Histologisch findet sich in Alzheimer-Hirnen eine deutliche Markierung von β /A4-Amyloid-plaques und eine gegenüber von Kontrollen verstärkte von Neuronen. Auch hier gibt es Subpopulationen, d.h. Neurone mit Tangle aber ohne ApoE-Immunoreaktivität, solche mit beidem und solche, mit ApoE-Immunoreaktivität aber keinem Tangle (Zitate in Weisgraber, Mahley, 1996). Derzeit sind keine Studien bekannt, die die ApoE-Immunoreaktivität mit den Braak-Stadien und/oder dem bei Alzheimer hyperphosphorylierten Epitopen korrelieren. Erste Untersuchungen zur Verteilung und zur Konzentration des VLDL-Rezeptors, einem der fünf Säugetierezeptoren für ApoE, deuten keinen Unterschied zwischen Kontrollen und Alzheimer-Patienten an (Christie et al. 1996).

3.3.4. Apolipoprotein E und seine Regulation

ApoE könnte auch isoformenabhängig seine eigene Expression beeinflussen, denn obgleich bei Alzheimer-Hirnen die mittels RT-PCR bestimmte ApoE-mRNA erhöht ist, ist eine gendosisabhängige niedrigere Expression mit dem ϵ 4- als mit dem ϵ 3-Allel verbunden (Yamada et al. 1995). Vermutlich wird in Astrozyten die ApoE-Genexpression über den Transkriptionsfaktor AP-2, der cAMP- und Retinolsäure-abhängig, ist kontrolliert (Garcia et al. 1996). Cytokine $Il-1\alpha$, β , $IFN\gamma$ und bFGF reduzieren die ApoE-Sekretion, während EGF sie erhöht (Baskin et al. 1997). Microglia, die u.a. bei Aktivierung solche Cytokine bereitstellt, wird durch ApoE3-Interaktion mit APPsol nicht mehr aktiviert, während ApoE4 diesen Effekt nicht zeigt (Barger and Harmon, 1997).

3.3.5. Apolipoprotein E und β /A4-Amyloid

ApoE zeigt in vitro Bindung an die beiden bei der Alzheimerschen Erkrankung im Zentrum stehenden Moleküle, dem β /A4-amyloid und dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau (Strittmatter et al. 1993; Naslund et al. 1995). Die Bindungen sind isoformabhängig. ApoE-Domänen 244-272 sind für die Bindung an β /A4 notwendig, wobei ApoE-Isoformen in einer Lipidumgebung inverse Effekte im Vergleich zu Lipid-freiem ApoE zeigen (Strittmatter et al. 1993; LaDu et al. 1995): Lipid-freies ApoE4 bindet schneller und besser β /A4-Amyloid als ApoE3, während dies bei ApoE mit Lipidquelle umgekehrt ist. Die Bindung zwischen ApoE3 konnte unter nicht-denaturierenden Assaybedingungen ebenfalls gezeigt werden (Shuvaev,

Siest, 1996). Andere Studien zeigen, daß β /A4-Amyloid zwar mit 'nativem' ApoE3 aber nicht mit ApoE4 denaturierungsresistente Komplexe zu bilden vermag (Zhou et al., 1996). Dies deutet auf konformationsabhängige Bindungsstellen von ApoE hin, die bei der Alzheimer-Pathologie verändert sein könnten, wobei vermutlich die Interaktion mit Lysinresten am ApoE eine wichtige Rolle spielt (Lund-Katz et al., 1993). Umgekehrt vermag ApoE die Konformation von β /A4-Amyloid in Richtung der unlöslichen Form A-beta-ac zu schieben und damit zur Fibrillogenese von β /A4-Amyloid beizutragen (Soto et al. 1996) was wiederum die Interaktion mit ApoE beeinflusst (Golabek et al. 1996). Lipid-freies ApoE bildet während mehrtägiger Koinkubation mit β /A4-Amyloid unlösliche, hoch-molekulare Fibrillen, wobei ApoE4 schneller und dichter gepackte Monofibrillen induziert als ApoE3 (Sanan et al., 1994). Beide ApoE-Isoformen hemmen die Bildung von nieder-molekularen β /A4-Amyloid-Komplexen, die als Bildungsrate-bestimmende Komplexe gelten (Evans et al. 1995). Dabei zeigen alle drei ApoE-Varianten gleiches inhibitorisches Potential auf die Bildung von β /A4-Aggregate (Wood et al., 1996).

3.3.6. Apolipoprotein E und tau

Mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, welches Mikrotubuli stabilisiert, bildet ApoE3 in vitro ein SDS-stabiles 1:1-Addukt, welches - im Gegensatz zur β /A4-Bindung - über eine aminoterminal Domäne vermittelt wird (Strittmatter et al. 1994; Joyce et al. 1992). Diese Bindung ist durch vorherige Phosphorylierung von Tau blockierbar (Huang et al. 1995a) und auch nicht mit ApoE4 und tau40, der längsten humanen tau-Variante, zu finden (Fleming et al. 1996). Allerdings vermag ApoE4 - gleich stark wie ApoE3 an Tubulin, Actin und das kürzeste humane tau zu binden (Fleming et al., 1996). Inwieweit die Bindung von ApoE an Tubulin z.B. die Bindung zwischen Tubulin und Tau verändert, ist gegenwärtig unklar. ApoE-defiziente Mäuse zeigen hyperphosphoryliertes tau (Genis et al. 1995) und Veränderung des Cytoskeletts (Masliah et al., 1995). An transfizierten COS-Zellen konnte mittels confokaler Lasermikroskopie gezeigt werden, daß ApoE3 mit tau colokalisiert - was für ein cytosolisches Kompartiment spricht. ApoE4 hingegen colokalisiert hingegen nicht und scheint nur in vesikulären und Chloroquin-sensitiven Kompartimenten visualisierbar zu sein (Lovestone et al. 1996; Jensen et al. 1994). Neben diesen Interaktionen vermag ApoE durch Produkte der Lipidperoxidation kovalent verknüpft werden und damit den intrazellulären Metabolismus von ApoE beeinflussen (Montine et al. 1996b), wobei ApoE in einem post-Golgi-Kompartiment, d.h. cytosolisch, durch eine Calcium-abhängige Cysteinprotease degradiert wird (Ye et al. 1993). Von diesen Produkten (z.B. 4-hydroxy-2-nonenal) ist bekannt, daß sie auch tau verknüpfen können (Montine et al. 1996a).

Zum Verständnis der oben skizzierten physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen sollen zwei prinzipielle Komplexe geklärt werden: Wie wird im ZNS die astrogliale ApoE Bildung und Sekretion kontrolliert und welche Effekte werden durch ApoE in Zellen des Gehirnes ausgelöst oder moduliert.

Literatur

Arendt T, Schindler C, Brückner MK, Eschrich K, Bigl V, Zedlick D, Markova L (1997) Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein ϵ 4 allele. *Journal of Neuroscience* 17:516-529

- Barger SW, A.D. (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388:878-881
- Baskin F, Smith GM, Fosmire JA, Rosenberg RN (1997) Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures. *J Neurol Sci* 148:15-18
- Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* 33:174-178
- Blennow K, Hesse C, Fredman P (1994) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5:2534-2536
- Bodovitz S, Klein WL (1996) Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 271:4436-4440
- Christie RH, Chung H, Rebeck GW, Strickland D, Hyman BT (1996) Expression of the very low-density lipoprotein receptor (VLDL-r), an apolipoprotein-E receptor, in the central nervous system and in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:491-498
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell, Jr., Rimmer JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, Tanzi RE, et al (1995) Apolipoprotein E, survival in Alzheimer's disease patients, and the competing risks of death and Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1323-1328
- Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W, 2d, Haase AT (1991) Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol* 65:4759-4768
- Diekmann S, Nitsch R, Ohm TG (1994) The organotypic entorhinal-hippocampal complex slice culture of adolescent rats. A model to study transcellular changes in a circuit particularly vulnerable in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm Suppl* 44:61-71
- Evans KC, Berger EP, Cho CG, Weisgraber KH, Lansbury PT (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:763-767
- Fagan AM, Bu G, Sun Y, Daugherty A, Holtzman DM (1996) Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 271:30121-30125
- Fleming LM, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Troncoso JC, Johnson G (1996) Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins. *Exp Neurol* 138:252-260
- Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 19:1-8
- Garcia MA, Vázquez J, Giménez C, Valdivieso F, Zafra F (1996) Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells. *Journal of Neuroscience* 16:7550-7555
- Genis I, Gordon I, Sehayek E, Michaelson DM (1995) Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 199:5-8

- Golabek AA, Soto C, Vogel T, Wisniewski T (1996) The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation. *J Biol Chem* 271:10602-10606
- Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL (1995) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9480-9484
- Huang DY, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Roses AD, Strittmatter WJ (1995a) ApoE3 binding to tau tandem repeat I is abolished by tau serine262 phosphorylation. *Neurosci Lett* 192:209-212
- Huang DY, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Matthew WD (1995b) Interaction of apolipoprotein E with laminin increases neuronal adhesion and alters neurite morphology. *Exp Neurol* -257)
- Jensen TG, Roses AD, Jorgensen AL (1994) Apolipoprotein E uptake and degradation via chloroquine-sensitive pathway in cultivated monkey cells overexpressing low density lipoprotein receptor. *Neurosci Lett* 180:193-196
- Joyce JN, Lexow N, Kim SJ, Artymyshyn R, Senzon S, Lawrence D, Cassanova MF, Kleinman JE, Bird ED, Winokur A (1992) Distribution of Beta-Adrenergic Receptor Subtypes in Human Post-Mortem Brain - Alterations in Limbic Regions of Schizophrenics. *Synapse* 10:228-246
- Knauer MF, Orlando RA, Glabe CG (1996) Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* 740:6-14
- Koudinova NV, Berezov TT, Koudinov AR (1996) Multiple inhibitory effects of Alzheimer's peptide A β 1-40 on lipid biosynthesis in cultured human HepG2 cells. *FEBS-Letters* 204-206
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK (1995) LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82:331-340
- LaDu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT (1995) Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J Biol Chem* 270:9039-9042
- Lehtimaki T, Pirttila T, Mehta PD, Wisniewski HM, Frey H, Nikkari T (1995) Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum Genet* 95:39-42
- Lovestone S, Anderton BH, Hartley C, Jensen TG, Jorgensen AL (1996) The intracellular fate of apolipoprotein E is tau dependent and apoE allele specific. *Neuro Report* 7:1005-1008
- Lund Katz S, Weisgraber KH, Mahley RW, Phillips MC (1993) Conformation of apolipoprotein E in lipoproteins. *J Biol Chem* 268:23008-23015
- Maslah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD (1995) Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp Neurol* 136:107-122

- Montine TJ, Amarnath V, Martin ME, Strittmatter WJ, Graham DG (1996a) E-4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures. *Am J Pathol* 148:89-93
- Montine TJ, Huang DY, Valentine WM, Amarnath V, Saunders A, Weisgraber KH, Graham DG, Strittmatter WJ (1996b) Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:202-210
- Naslund J, Thyberg J, Tjernberg LO, Wernstedt C, Karlstrom AR, Bogdanovic N, Gandy SE, Lannfelt L, Terenius L, Nordstedt C (1995) Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron* 15:219-228
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas R (1994) Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 264:850-852
- Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1985) 5' end of HMG CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell* 42:203-212
- Pirttila T, Mehta PD, Soininen H, Kim KS, Heinonen O, Paljarvi L, Kosunen O, Riekkinen P, Wisniewski HM (1996) Cerebrospinal fluid concentrations of soluble amyloid beta protein and apolipoprotein e in patients with alzheimers disease: correlations with amyloid load in the brain. *Arch Neurol* 53:189-193.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917:148-161
- Reed T, Carmelli D, Swan GE, Breitner JC, Welsh KA, Jarvik GP, Deeb S, Auwerx J (1994) Lower cognitive performance in normal older adult twins carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele. *Arch Neurol* 51:1189-1192
- Rosler N, Wichart I, Jellinger KA (1996) Intra vitam lumbar cerebrospinal fluid and serum and postmortem ventricular immunoreactive apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:452-454
- Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders AM, Schmechel DE, Wisniewski T, Frangione B, Roses AD, Strittmatter WJ (1994) Apolipoprotein E Associates with Beta Amyloid Peptide of Alzheimer's Disease to Form Novel Monofibrils. *Journal of Clinical Investigation* 94:860-869
- Shuvaev VV, Siest G (1996) Interaction between human amphipathic apolipoproteins and amyloid beta-peptide: surface plasmon resonance studies. *FEBS Lett* 383:9-12
- Soto C, Golabek A, Wisniewski T, Castano EM (1996) Alzheimer's beta-amyloid peptide is conformationally modified by apolipoprotein E in vitro. *Neuroreport* 7:721-725
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, Liu H, Landers T, Gross D (1994) Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126:88-94
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8098-8102

- Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak Vance M, Schmechel D, Roses AD (1994) Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11183-11186
- Tolar M, Marques MA, Harmony JAK, Crutcher KA (1997) Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated. *Journal of Neuroscience* 17:5678-5686
- Weisgraber KH (1994) Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 45:249-302
- Weisgraber KH, Mahley RW (1996) Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB Journal* 1485-1494
- Wood SJ, Chan W, Wetzel R (1996) Seeding of A beta fibril formation is inhibited by all three isotypes of apolipoprotein E. *Biochemistry* 35:12623-12628
- Yamada T, Kondo A, Takamatsu J, Tateishi J, Goto I (1995) Apolipoprotein E mRNA in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 129:56-61
- Ye SQ, Reardon CA, Getz GS (1993) Inhibition of apolipoprotein E degradation in a post-Golgi compartment by a cysteine protease inhibitor. *J Biol Chem* 268:8497-8502
- Zhou Z, Smith JD, Greengard P, Gandy S (1996) Alzheimer amyloid-beta peptide forms denaturant-resistant complex with type epsilon 3 but not type epsilon 4 isoform of native apolipoprotein E. *Mol Med* 2:175-180
- Zhou Y, Richardson JS (1996) Cholesterol protects PC12 cells from beta-amyloid induced calcium disordering and cytotoxicity. *Neuroreport* 7:2487-2490

3.4 Eigene Vorarbeiten

siehe Arbeitsbericht.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

- März W, Scharnagl H, Kirca M, Bohl J, Groß W, Ohm TG (1996) Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann NY Acad Sci*, 777:276.280.
- Ohm TG, Müller H, Braak H, Bohl J (1995) Close-meshed prevalence rates of different stages as a tool to uncover the pace of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neuroscience*, 64:209-217
- Ohm TG, Kirca M, Bohl, J, Scharnagl H, Groß W, März W (1995) ApoE polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Neuroscience* 66:583-587
- Ohm TG (1997) Does Alzheimer's disease start early in life? *Mol Psychiatry* 2: 21-25.
- Wüstenberg F, Berlin K, Scharnagl H, März W, Ohm TG and Müller W. (1997). Complexes of ApoE-isoforms and Amyloid- β peptides elevate intracellular Calcium levels differentially. *Proceedings of the 5th International Conference on Alzheimer's Disease*. In

Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics. K. Iqbal et al. (eds.), John Wiley & Sons, Chichester, UK. Ch. 49, 383-388

- Scharnagl H, Winkler K, Hüttinger M, Wittmann D, Nauck M, Wieland H, Groß W, Ohm TG and W März (1996) The β A4 amyloid peptide enhances cellular uptake of apolipoprotein E-containing receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor. In: Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease, A.D. Roses et al. (Eds.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, 136-144
- Ohm TG, Scharnagl H and W März (1996) Apolipoprotein E and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Proceedings CIMP Regional Meeting, Basic and Clinical Science of Mental and Addictive Disorders. 167 (1997): 119-122.
- Ohm TG, Schmitt M, Bohl J, Lemmer B (1997) Decrease in adenylate cyclase activity antecedes neurofibrillary tangle formation. *Neurobiol Aging* 18: 275-279
- Ohm TG (1997) Prävalenzraten der neuropathologischen Stadien bei DAT. Proceedings of the Aloys-Alzheimer Symposium, Würzburg, im Druck
- Meske V, Hamker U, Albert F, Ohm TG (1998) The effects of β /A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, GFAP- and S100 β -staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes. *Neuroscience*, im Druck
- Scharnagl H, Tisljar U, Winkler K, Hüttinger M, Nauck MA, Groß W, Wieland H, Ohm TG, März W (1997) Endocytosis of the β A4 amyloid peptide by the low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor and heparan sulfate proteoglycans pathway. *J Biol Chem*. In re-review.
- Ohm TG, Scharnagl H, März W, Bohl J (1997) ApoE-isoforms and the development of pre-clinical phases of Alzheimer's disease. Eingereicht.
- Müller W, Meske V, Berlin K, Scharnagl H, März W, Ohm TG (1998) Apolipoprotein E increases intracellular Ca^{2+} isoform specific through a omega-Agatoxin IVa-sensitive Ca^{2+} channel. Eingereicht
- Hamker U, Meske V, Albert F, Ohm TG (1998) β A4 lowers available apoE secreted from cultured astrocytes differentially. Eingereicht.

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

- Diekmann S, Ohm TG, Nitsch R (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal lesion. A combined intracellular injection and electron microscopic study. *Brain Pathol* 6: 205-215
- Fastbom J, Ohm TG, Bonkale WL, Kurumatani T, Winblad B, Cowburn RF (1997) Signal transduction mechanisms in Alzheimer's disease. Proceedings of the International Academy for Biomedical and Drug Research workshop "Mental disorders in the elderly : new therapeutic approaches". Basel. Karger Vol 13, im Druck
- Kurumatani T, Fastbom J, Bonkale WL, Bogdanovic N, Winblad B, Ohm TG, Cowburn RF (1997) [^3H]Inositol 1,4,5-triphosphate, [^3H]Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and [^3H]Phorbol 12,12-dibutyrate binding in postmortem brain stages for Alzheimer's disease neurofibrillary pathology. Eingereicht

Anderton BH, Callahan L, Coleman P, Davies P, Flood D, Jicha GA, Ohm TG, Weaver C (1997) Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog Neurobiol*, im Druck

Ohm TG, von Dewitz G, Witte K, Nitsch R, Lemmer B (1997) Basal and stimulated hippocampal adenylate cyclase activity after unilateral electrolytic lesion of the entorhinal cortex in young adult rats. Eingereicht

Ohm TG, Münch S., Schönheit B., Nitsch R (1997) Transneuronally altered dendritic processing of tangle-free neurons in Alzheimer's disease. Eingereicht.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Es sollen die vier Komplexe, die auch in der ersten Antragsperiode im Zentrum standen, weiter untersucht werden. (I) Inwieweit korreliert das Muster und die Stärke der Expression von ApoE-Varianten und ApoE-assoziierten Rezeptoren (LRP, LDL) mit dem der Alzheimer-assoziierten pathologischen Veränderungen (plaques, tangles) in genotypisierten Fällen? (II) Wie ist die regionale und zelluläre Verteilung von ApoE und ApoE-Rezeptoren bei experimenteller und neuropathologischer Läsion? (III) Durch welche Rezeptoren und nachgeschalteten second messenger-Kaskaden ist die ApoE-Bildung, Metabolisierung und Ausschleusung beeinflussbar. (IV) Welche Effekte können die ApoE-Varianten direkt oder in Interaktion mit anderen Molekülen an und in Zellen auslösen. Durch ein Verständnis insbesondere der beiden letzten Komplexe könnte möglicherweise ein neuer therapeutischer Ansatz gefunden werden, der zumindest bei $\epsilon 4$ -Allel-Trägern die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung wesentlich verzögern könnte. Ein um fünf Jahre verzögerter Beginn der klinischen Symptomatik führt zu einer 50%-igen Reduktion der Anzahl von Alzheimer-Patienten. Darüberhinaus ist die molekulare Aufklärung der Rolle von ApoE und seinen Varianten für das Verständnis neuronaler Plastizität auch bei anderen neuropathologischen Vorgängen sehr hilfreich.

3.5.2 Methoden

Es werden korrelative Untersuchungen am Autopsiehirngewebe vorgenommen. Zur Analyse kausaler und funktioneller Aspekte werden dissoziierte Primärkulturen der Ratte (Misch- und zelltypspezifische hippocampale und cerebelläre Kulturen) sowie organotypische Slicekulturen herangezogen. PCR-Techniken werden zur Genotypisierung des Autopsiegewebes verwendet und zur quantitativen Bestimmung von mRNA von ApoE und ApoE-Rezeptoren (RT-PCR). Intraastrozytäre Calciumkonzentrationen werden mittels Calcium-Imagings (FURA-2) und Einsatz verschiedener Substanzen im nanomolaren Bereich auf Einzelzellebene analysiert. Für die Analyse von ApoE-Spiegeln intra- und extrazellulär werden Immunopräzipitationstechniken und ELISA eingesetzt. ApoE-Isoform-abhängige Rückkopplungsschleifen sollen mittels Pulse-Chase-Ansätzen untersucht werden.

3.5.3. Arbeitsprogramm

Autopsiehirne werden einerseits wie bisher von Dr. Bohl (Neuropathologie, Universität Mainz) - mit dem seit 6 Jahren ein gemeinsames DFG-Projekt (Oh48/1-1 - Oh48/1-3) durchgeführt wird - zur Verfügung gestellt. Andererseits kann die reduzierte Bereitstellung von

Autopsiehirnen aus Mainz aufgrund der allgemein rückgängigen Sektionsfrequenz ausgeglichen werden, da durch zwischenzeitlich hier in Berlin etablierte Kooperationen mit Prof. Dr. M. Dietl (Pathologisches Institut der Charité) und Frau Prof. Dr. Stoltenburg-Didinger (Neuropathologisches Institut der FU) eine gut etablierte Logistik entstanden ist. Wir bekommen von den Autopsie-Fällen nun auch teilweise Liquor, so daß nach Genotypisierung für ApoE dieser im Rahmen von Zellkultur-Inkubationsexperimenten herangezogen werden kann. Antikörper zu ApoE und seinen Rezeptoren (soweit nicht kommerziell erhältlich) werden wie bisher von Dr. März, Universität Freiburg, Prof. Manfred Hüttinger (Universität, Wien) und Prof. Brian Anderton (Institute of Psychiatry, London) bereitgestellt. Rekombinantes ApoE₂, 3 und 4 werden weiterhin von PanVera bezogen und 'natives' ApoE aus Liquor cerebrospinalis verwendet. Tierexperimentelle Studien (Läsionsexperimente) werden wie bisher mit der AG Prof. Dr. R. Nitsch durchgeführt. Fetale menschliche Zellkulturen (Cortex, Rückenmark, Cerebellum) werden durch Kooperation mit Prof. Dr. N. Ulfing (Universität Rostock) und lokal durch Kooperation mit der Neurochirurgie im Rahmen von möglichen ApoE-Isoform-differenten Unterschieden in Rückkopplungsschleifen bei der Regulation von ApoE untersucht.

(I) Histologische Expression von ApoE-Varianten und Vergleich zum Muster der Alzheimer-Pathologie

Die Untersuchungen erfolgen wie bisher. Zuerst wird der ApoE-Genotyp mittels DNA-PCR wie bisher festgestellt (Ohm et al. 1995a). Im zweiten Schritt wird von jeweils für $\epsilon 2$ -, $\epsilon 3$ - und $\epsilon 4$ -homozygoten Individuen wie bisher das histologische Stadium der Alzheimer-assoziierten Veränderungen festgestellt (Ohm et al. 1995b). Die Alzheimer-assoziierten neurofibrillary tangles, neuropil threads, neuritic plaques sowie $\beta A 4$ -amyloid werden mit hoch-sensitiven und spezifischen Versilberungstechniken dargestellt (Gallyas, 1971; Campbell et al., 1985) die üblichen immunocytochemischen Methoden mindestens gleichwertig sind (Ohm et al. 1989; Braak et al. 1989). Dabei werden zur Charakterisierung der betroffenen Zellen und Regionen eine Kombination mit einer Pigment/Nissl-Färbung angeschlossen (Braak et al. 1988). Zur Darstellung der AT8-positiven Neurone am Übergang zum Stadium I insbesondere und ihrer evtl. Co-Lokalisation mit ApoE-Varianten und ApoE-assoziierten Rezeptoren wird eine immunocytochemische Doppelfärbung durchgeführt, wobei die Visualisierung der primären Immunreaktion mittels der ABC-Technik und verschiedenen Chromogenen erfolgt. Um zu klären, ob das in Neuronen von Alzheimer-Patienten vorkommende ApoE aufgenommen oder dort durch (pathologische) Expression von ApoE selbst gebildet wurde, soll später und in Kooperation mit Prof. Robert Nitsch eine nicht-radioaktive in-situ-Hybridisierung durchgeführt werden. Im dritten Schritt wird an den nun genotypisierten und stadieneingeteilten Fällen mittels Immunocytochemie das Verteilungsmuster der ApoE-Varianten und der LDL- und LRP-Rezeptoren dargestellt. Es werden 40-60 μ m dicke Vibratom- oder Gefrierschnitte für 48-72 Stunden mit dem primären Antikörper (AT8, ApoE, LDL, LRP) inkubiert. Die Visualisierung der Reaktion erfolgt mittels der ABC-Technik und verschiedenen Chromogenen wie z.B. Diaminobenzidin. Mögliche quantitative Differenzen bei gleichem Verteilungsmuster können methodenbedingt nur semi-quantitativ erfaßt werden.

Durch die geplanten Untersuchungen sollen unsere bisherigen Daten ergänzt werden und festgestellt werden, (1) ob die Verteilung der ApoE- und ApoE-assoziierten Rezeptor-Expression in Astrozyten und die Regionen der Alzheimer-Pathologie korrelieren und umgekehrt sowie (2), ob die Neurone, die ApoE enthalten, zu den als vulnerabel bekannten gehören, (3) sogar bereits Alzheimer-assoziierte Veränderungen tragen (AT8-Markierung, neurofibrillary tangle)

und ApoE eventuell sogar selbst (pathologischerweise) gebildet haben (der mRNA-Nachweis mittels in-situ-Hybridisierung ist in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Robert Nitsch für später geplant).

(II) Expression von ApoE-Varianten und ApoE-assoziierten Rezeptoren zwischen Kontrollen und Alzheimer-Fällen

Von Stadien-eingeteilten Autopsiefällen (sowohl für tangles als auch β A4-Amyloid) wird quantitativ die Expression von ApoE und ApoE-assoziierten Rezeptoren bestimmt. Dabei soll primär wiederum der Genotyp wie bisher mittels DNA-PCR festgestellt werden (s.o.). Die Verwendung eines polyklonalen 'ApoE-'common' und polyklonalen LDL und LRP Antikörpern soll soweit wie möglich autopsiebedingte Epitopveränderungen auffangen. Unsere experimentellen Voruntersuchungen aus der ersten Antragsphase haben gezeigt, daß ApoE eine sehr hohe post mortem Stabilität aufweist. Parallel zu den Homogenaten aus spezifischen Hirnregionen, die u.U. mittels Mikrodissektion herauspräpariert werden müssen, soll Autopsieliquor und - sofern erhältlich - auch intra vitam gewonnener Liquor cerebrospinalis auf den ApoE-Gehalt untersucht werden. Zur quantitativen Bestimmung von ApoE sollen verschiedene in der ersten Antragsphase etablierten Techniken (ELISA, Immunopräzipitationstechnik) herangezogen werden. Der von uns in der ersten Antragsphase etablierte ELISA (nach Aufreinigung cruder antiApoE-Seren, Spezifitätstestung etc.) erlaubt die spezifische und für alle drei Isoformen gleich sensitive Detektion von humanem und Ratten ApoE ab einer Schwelle von 250pg/ml.

Durch die geplanten Untersuchungen soll festgestellt werden, (1) ob zwischen Individuen mit Alzheimer-Erkrankung und solchen ohne eine quantitativ unterschiedliche ApoE-Expression und/oder ApoE-assoziierte Rezeptorexpression vorliegt. (2) Durch Korrelation der im Liquor cerebrospinalis von Stadien-eingeteilten Fällen enthaltenen ApoE-Mengen und der von ApoE im Hirn soll untersucht werden, ob eine Liquordiagnostik intra vitam Risikogruppen herausfiltern könnte.

(III) Die regionale und zelluläre Verteilung der an der Glia/Neuron-Interaktion von ApoE beteiligten Komponenten bei experimenteller und neuropathologischer Läsion

Durch Immunocytochemie wird das Verteilungsmuster von ApoE, LDL- und LRP-Rezeptoren (s.o.) und durch Versilberungen die Alzheimer-assoziierten histopathologischen Veränderungen (s.o.) dargestellt. Zur Charakterisierung der betroffenen Zellen und Regionen wird wiederum eine Kombination mit einer Pigment/Nissl-Färbung angeschlossen (Braak et al., 1988). Die Darstellung erfolgt an Vibratomschnitten von Stadien-eingeteilten Autopsie-Hirnen und Ratten ohne und mit entorhinaler Läsion. Dabei werden aufgrund der Erfahrungen im Rahmen unserer Pilotstudien und Western-Blotting unterschiedliche Überlebenszeiten nach Läsion untersucht (0, 2, 6, 14, 28, 60 und 360 Tage). Ausgangsüberlegungen für diese Untersuchungen sind, daß das entorhinal-hippocampale System einerseits bereits sehr frühzeitig bei der Alzheimer-Pathologie gestört ist (AT8-Stadium, Stadium I,II) und andererseits ein hervorragendes Modell zum Studium transzellulärer Veränderungen darstellt. So haben Poirier et al. (1991) zeigen können, daß drei Wochen nach experimenteller entorhinaler Läsion im Hippocampus die Expression von ApoE-mRNA stark ansteigt. Da - wie oben ausgeführt -

wahrscheinlich ein ApoE-Isoformen-spezifischer Effekt auf die Bindung zu β /A4-Amyloid vorliegt, dieses im Terminationsbereich der entorhinalen Projektion im Alzheimer-Hippokampus vorliegt, könnten Komplexe von ApoE/ β A4-Amyloid im Sinne einer Kaskadenhypothese (Braak and Braak, 1991) vulnerable Zellen im Gebiet des nächsten Stadiums, d.h. dort wo sich die nächsten tangles bilden, schädigen. Die Tierläsions-Experimente werden wie bisher in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nitsch erfolgen. Ergänzt werden diese Untersuchungen durch Analysen der z.B. durch Transsektion lädierten organotypischen Schnittkulturen, da hier ein weitgehend organotypischer Verband eines in der Alzheimer-Entwicklung frühzeitig gestörten Systems vorliegt, welcher der Applikation von Pharmaka etc. relativ frei und kontrolliert zugänglich ist. Die organotypischen Schnittkulturen werden wie bisher (Diekmann et al., 1994) nach der Interphase-Technik angelegt.

Durch die geplanten Untersuchungen soll festgestellt werden, ob (1) Speziesdifferenzen in der Expression und Verteilung von ApoE und LDL- und LRP-Rezeptoren im normalen (gesunden) entorhinal-hippocampalen System vorkommen, welches essentiell für mnestic Funktionen ist und beim Alzheimer frühzeitig histologische und Signaltransduktionsstörungen aufweist. (2) Existieren Differenzen in der Expression von ApoE nach entorhinaler neuropathologischer und experimenteller Läsion? (3) Durch die relativ genaue Kenntnis der Terminationsbereiche der entorhinalen Projektion im Hippocampus, die zwischen Ratte und Primat nicht prinzipiell verschieden ist, könnte an Stadien-eingeteilten Fällen untersucht werden, ob bei der Alzheimer-Erkrankung ebenfalls eine transzelluläre Beeinflussung der Genexpression von ApoE und evtl. auch LDL- und LRP-Rezeptoren vorliegt. Sollte dies der Fall sein, so würde sich möglicherweise eine anatomische Erklärung für das Ausbreitungsmuster der Alzheimer-Pathologie im Sinne einer anatomisch/biochemischen Kaskadenhypothese ergeben.

(IV) Analyse von Effekten, die ApoE-Varianten direkt oder in Interaktion mit anderen Molekülen an und in Zellen auslösen (einschließlich auf Expression, Metabolisierung und Sekretion von sich selbst)

Aufgrund der Erfahrungen und Resultate der ersten Antragsphase wird der Hauptschwerpunkt dieser Antragsphase neben der weiteren Abarbeitung der Punkte (I-III) auf der weiteren Analyse der überraschenden Befunde zu Rolle von ApoE als Modulator der Calciumkonzentration und als Interaktionspartner für β /A4-Amyloid liegen.

Es konnte von uns in der ersten Antragsperiode an primären hippokampalen Zellkulturen gezeigt werden, daß ApoE isoformenabhängig die intrazelluläre Konzentration von freiem Calcium transient durch Aktivierung eines P-Typ-artigen Kanal erhöht wird (s.Arbeitsbericht). Bei diesen Untersuchungen wurde rekombinantes ApoE verwendet. Es ergeben sich daher zwei zunächst zu den bisherigen Fragestellungen zwei weitere. Erstens, inwieweit spielt die Konformation von ApoE bei diesem Effekt eine Rolle, d.h. kann ApoE, so wie es im Liquor vorkommt diesen Effekt ebenfalls auslösen. Und, zweitens, sind - und wenn ja, welche - intrazellulären Calcium-Kompartimente bei dieser transienten intraastrozytären Calciumkonzentrationsänderung beteiligt?

Um zu klären, welche intra-astrozytären Calcium-Speicher und Kompartimente dabei eine Rolle spielen, sollen weitere Calcium-Imaging-Studien mit FURA durchgeführt werden (s. Arbeitsbericht), wobei durch Gabe verschiedener Blocker (z.B. Ranitidin, Thapsargin etc.) die Beteiligung unterschiedlicher Kompartimente bei der Ausbildung der transienten Calci-

umerhöhung untersucht werden soll. Auch sollen die begonnenen Analysen zu den Signaltransduktionswegen, die für die Produktion, Metabolisierung und Sekretion von ApoE im Astrozyten wichtig sind, fortgesetzt werden. Die von den Zellen vor und nach Stimulation (oder anderem Experiment) gebildete ApoE-Menge kann durch ELISA (s.o.) und/oder Immunopräzipitationstechnik (s.o.) der homogenisierten Zellen untersucht werden. Nach Analyse dissoziierter Zellen sollen die Ergebnisse bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf organotypische Bedingungen im Rahmen der Slice-Kulturen überprüft werden. Primär soll auf Proteinkinase-A- und Proteinkinase-C-aktivierende Kaskaden eingegangen werden, die in unseren Untersuchungen während der ersten Antragsphase sich für die Regulation der ApoE-Sekretion als zentral herausgestellt haben. Durch unterschiedliche Inkubations- und Kultivierungszeiten kann die Zeitabhängigkeit untersucht werden. Die Sekretion von ApoE kann ebenfalls zeitabhängig durch Bestimmungen von ApoE im Kultivierungsmedium bestimmt werden. In einer anschließenden Phase sollen möglich cross talks der Signalkaskaden durch gleichzeitige und zeitlich versetzte Gaben von Substanzen untersucht werden. Durch Vergleich mit Entorhinalis-Läsionen an der Ratte soll geprüft werden, ob die gefundene Muster und Mechanismen auch in vivo analog sind.

Analyse der endogenen Calciumspeicher

Die kultivierten Zellen (hippocampale und cerebelläre primäre dissoziierte Mischkulturen im Vergleich) werden wie bisher mit FURA-2 beladen. In den Meßkammerpuffer (HBSS, 10mM Hepes, 1,8 mM CaCl₂) oder in das Zellkulturmedium werden verschiedene Substanzen zur Analyse der Beteiligung intraastrozytärer Calciumverschiebungen gegeben.

Eine unspezifische, breite Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher wird durch Gabe des Calcium-Ionophors A23187 in einer Arbeitskonzentration von 10-50µM (Stammlösung 10mM in DMSO) erreicht. Durch anschließende Gabe von ApoE soll getestet werden, ob der beobachtete transiente Anstieg des freien intrazellulären Calciums weiterhin in gleich Weise erfolgt. Wäre dies der Fall, so wären keine internen Speicher beteiligt. Zur detaillierteren Analyse des Verlaufs der ApoE-vermittelten Calciumerhöhung sollen verschiedene intrazelluläre Calciumspeicher analysiert werden. Für die Untersuchung endoplasmatischer Calciumspeicher wird Thapsigargin (100nM-1µM) dem Meßpuffer oder dem Wachstumsmedium zugesetzt, wobei hierdurch Calcium-Pumpen des endoplasmatischen Retikulums (SERCA Familie) inhibiert werden. Thapsigargin wird als Stammlösung in DMSO (1mM) vorgehalten. Die mitochondrialen Calciumspeicher sollen durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mittels FCCP - und damit des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials - untersucht werden. Die Arbeitskonzentration von FCCP soll 1-10µM im Meßpuffer bzw Kulturmedium betragen. Intrazelluläre IP3-regulierte Calciumkanäle können durch Ryanodin (10-50µM) blockiert werden. Ryanodin wird als 10mM Stammlösung in DMSO angesetzt. Die Blockade von Calcium-induzierter Calciumfreisetzung soll durch Applikation von 10-50µM Ruthenium Rot erreicht werden.

Zur Klärung der Frage, inwieweit 'natives' ApoE des Liquor cerebrospinalis ähnliche Effekte auf die freie intra-astrozytäre Calciumkonzentration ausübt wie rekombinantes ApoE, sollen unsere bisherigen Versuche an Primärkulturen dissoziierter hippocampaler Zellen fortgesetzt werden (s. Arbeitsbericht). Durch Gabe von entsprechend verdünntem Liquor (Endkonzentration in Meßkammer 20nM ApoE) von $\epsilon_4/4$ bzw. $\epsilon_3/3$ oder $\epsilon_2/2$ sollen die Isoformentypischen Differenzen analysiert werden. Aufgrund unserer Beobachtung, daß Liquor aufgrund anderer Komponenten einen mehrphasigen Verlauf des durch ihn induzierten Calcium-

fluxes hervorruft, ist die durch ApoE evozierte Konzentrationsänderung zu ermitteln. Hierzu ist geplant, durch vorherige Immunoaffinitätsreinigung von ApoE befreitem Liquor im Vergleich einzusetzen. Unsere bisherigen Analysen zeigten, daß der Verlauf der mehrphasigen Calciumantwort durch Blockade von spannungsabhängigen Calciumkanälen modulierbar ist und ebenfalls durch Chelatierung des freien externen Calciums durch EGTA.

Analyse der Signaltransduktionswege zur Regulation der ApoE-Expression und Sekretion

Unsere bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß dosisabhängig Phorbolster die Sekretion von ApoE ins Kulturmedium hemmt, während cAMP-Analoga - und schwach auch Retinolsäure - die Sekretion fördert. Dabei zeigte sich, daß das Alter der Primärkultur eine wichtige Rolle spielt: Junge Kulturen 7-14 Tage alte (aus E18/P1) reagieren mit einer deutlich stärkeren Sekretion von ApoE in das vorher ApoE-freie Kulturmedium als 21-28 Tage alte Kulturen. Auch scheinen Kulturen, die in Cholesterin-freiem Medium leben, vermehrt ApoE-Rezeptoren für die Aufnahme von Cholesterin bereitzustellen. In beiden Fällen könnten Rückkopplungsschleifen, die möglicherweise direkt durch ApoE-Konzentrationen gesteuert werden, eine zentrale Rolle spielen. Da die ApoE-Isoformen sowohl unterschiedliche Präferenz für Lipidpartikel - zumindest im Plasma - haben (HDL/LDL) als auch bei der Bindung an ApoE Rezeptoren, könnte diese Rückkopplung in Trägern der verschiedenen ApoE-Allele unterschiedlich effektiv sein. ApoE wird nach Ausbildung der neuronalen Verschaltungen in der Ontogenese herunterreguliert. Ein physiologischer Reiz für die Re-Expression ist die Deafferenzierung bei Läsion. Um diese Vorgänge besser verstehen zu können, sollen jung-adulte entorhinal/hippocampale Komplexschnittkulturen der Ratte untersucht werden. Die Kulturen werden wie bisher in der interphase-Technik angelegt (Diekmann et al., 1994), wobei die entorhinale Projektion in den Hippocampus, der Tractus perforans, durch Applikation mit dem Tracer MiniRuby markiert wird. Bei einem Teil der Kulturen wird dann durch mikromanipulative Durchtrennung dieser Projektion eine kontrollierte hippocampale Deafferenzierung durchgeführt und der Verlauf der ApoE-Expression und Sekretion im Vergleich zu den undurchtrennten Kulturen des gleichen Tieres untersucht. Der Einsatz der organotypischen Komplexschnittkultur erlaubt dabei eine weitgehende kontrollierte Analyse der ApoE-Metabolisations- und Expressionswege auch im Sinne einer möglichen pharmakologischen Beeinflußbarkeit.

Da ApoE selbst isoformenabhängig die intra-astrozytäre Konzentration freien Calciums erhöht, und Calciumerhöhung zu einer Stimulation von PKC-Wegen führt, könnte die Rückkopplung von ApoE auf seine eigene Bereitstellung einmal durch das ApoE selbst (Bindung von ApoE an ApoE-Rezeptoren und anschließender Internalisation) aber auch durch den durch ApoE-induzierten Calcium-Flux indirekt moduliert werden. Zur Untersuchung dieser Frage soll die ApoE-Bereitstellung durch Gabe von ApoE bei gleichzeitiger Blockade von spannungsabhängigen Calciumkanälen vom P-Typ untersucht werden, die von uns als ApoE-modulierbar gefunden wurden (s. Arbeitsbericht). Hierzu sollen sowohl dissoziierte Primärkulturen und Astrozyten-angereicherte Kulturen von Ratte als auch Mensch untersucht werden. Adulte menschliche Astrozyten werden uns durch Kooperation mit der Neurochirurgie zur Verfügung gestellt. Für die Analyse der Rückkopplungsschleife von ApoE auf seine eigene Expression bzw. Sekretion sollen Puls-Chase-Techniken eingesetzt werden. Die Astrozytenkulturen werden nachdem sie 3-5x mit Methionin-freiem Medium gewaschen wurden mit [³⁵S]Methionin (50µCi/ml) für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert. Nach Zugabe des Rezeptorliganden, der ApoE-Isoformen o.ä., werden nach ebenfalls unterschiedlichen Zeit-

spannen Aliquots (100-200 μ l) des Mediums oder das gesamte Medium entnommen. Die Zellen werden für 3' in 2% SDS bei 95°C lysiert und dann in 1% Triton-X100 in PBS verdünnt. Das Gesamtprotein aus Medium oder Zellextrakt wird durch Tri-Chloressigsäure gefällt und gleiche Mengen gefällte Radioaktivität mit gleichen Mengen des ApoE-Antikörper in SDS versetzt. Die immunopräzipitierten Proteine werden in Protein A-Sepharose isoliert, durch Kochen in 62.5 mM Tris, pH 6,8, 2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol eluiert und die Konzentration des neu-gebildeten Proteins mit dem Szintillationszähler über den Einbau des markierten radioaktiven Methionins bestimmt. Sollte es ein indirekter Effekt auf die ApoE-Expression sein, der durch den von ApoE hervorgerufenen Calcium-Einstrom via P-Typ-Kanäle induziert wird, so dürfte dieser sich nicht mehr auslösen lassen. Andersherum, ist die Regulation der ApoE-Expression direkt durch ApoE selbst vermittelt, so wäre er weiter beobachtbar, aber durch ApoE-Rezeptor-Liganden/Blocker (LDL, α 2-Makroglobulin, Lactoferrin, RAP etc.) hemmbar.

Untersuchungen zur Interaktion von ApoE mit anderen Molekülen

Unsere Studien zur Expression und Sekretion von ApoE in Astrozytenkulturen, die mit β /A4-Amyloid inkubiert wurden, zeigten, daß bei einigen - und zwar die als neurotoxisch bekannten Fragmente - ApoE im Medium nicht mehr mittels ELISA (Nachweisgrenze 250 pg/ml; s. Arbeitsbericht) nachweisbar war. Anschließende Untersuchungen fanden heraus, daß ApoE zwar gebildet wird, jedoch mit β /A4-Amyloid Komplexe bildet, so daß das freie, für das Neuron verfügbare ApoE teilweise völlig fehlt. Andererseits konnten wir in Kooperation mit Winfried März zeigen, daß Komplexe aus ApoE und β /A4 verstärkt internalisiert werden - jedoch der normalen Degradation weitgehend entzogen bleiben. In der kommenden Antragsperiode sollen deshalb die begonnenen Protein/Protein-Interaktionen mit der Resonanz-Mirrortechnik weiterverfolgt werden (s. Arbeitsbericht). Dabei stehen die Isoform-spezifischen Interaktionsunterschiede im Vordergrund. Der Frage, ob die Inkubation mit β /A4-Fragmenten die mRNA-Ebene beeinflusst, soll mittels Northern-Blottings bzw. quantitativer RT-PCR untersucht werden. Unsere biochemische Beobachtung, daß β /A4-Amyloid/ApoE/ β VLDL-Komplexe in Neuronen, Fibroblasten und Astrozyten offenkundig nicht mehr normal degradiert werden, soll durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergänzt werden. Hierzu sollen Experimente an dissoziierten Primärkulturen durchgeführt werden. Es werden einerseits DiI- oder DiA-markierte Lipidpartikel (HDL bzw. β VLDL mit ApoE) und Rhodamin- bzw. Fluorescein-markiertes β /A4-Amyloid lichtmikroskopisch (Konfokales Lasermikroskop) als auch mittels der Immunogold-Markierung elektronenmikroskopisch untersucht.

Wachstum und Differenzierung unter verschiedenen ApoE-Isoformen

In diesem Ansatz sollen die morphologischen Veränderungen, die durch die verschiedenen ApoE-Isoformen induziert werden, qualitativ und quantitativ untersucht werden. Dabei werden die teilweise bereits in der Literatur beschriebenen Veränderungen auf Differenzierungsgrad und Arborisationsmuster der Neuriten qualitativ und quantitativ erfaßt und mit denen unter anderen experimentellen Bedingungen (z.B. Blockade der P-Typ-Kanäle, Ko-Inkubation mit β /A4-Amyloid etc.) verglichen. Das im Rahmen eines früheren DFG-Einzelprojektes erhaltene Neuron-Tracing-System kann hierzu verwendet werden. Als Parameter werden wie bisher schrumpfungsunabhängige Variablen gemessen (Diekmann et al., 1996). Prospektiv sollen diese Daten dann mit denen von transgenen Tieren (für humane ApoE-Isoformen) verglichen werden, die im Rahmen einer gerade begonnen Kooperation mit der AG von Winfried März (Freiburg) und Roche (Basel) erhalten werden sollen.

Durch die geplanten Untersuchungen des Komplexes IV soll festgestellt werden, welche (1) die bei der Alzheimer-Erkrankung frühzeitig gestörten Signaltransduktionskaskaden eine Rolle in der glialen Expression und Metabolisierung von ApoE spielen. (2) Durch Verwendung der Komplexschnittkultur können entsprechende Untersuchungen an einem organotypischen Zellverband durchgeführt und experimentell beeinflusst werden. (3) An beiden Kultursystemen können Studien zur Blockade von ApoE-Expression, Sekretion und Metabolisierung durchgeführt werden. Damit würde ein Modellsystem entwickelt werden können, welches u.U. erlaubt, gliaspezifisch die ApoE-Expression zu beeinflussen. (4) Der weitere Einsatz der Resonant-Mirror-Technik zum Studium der ApoE/Protein-Interaktion unter nicht-denaturierenden Bedingungen soll helfen, mögliche Interaktionspartner bzw. deren Bindungskinetiken zu erfassen. (5) Der Einfluß der biochemischen und pharmakologischen Effekte der verschiedenen Isoformen auf die Morphologie soll qualitativ und quantitativ erfaßt werden.

Zitierte Literatur

- Braak H, Braak E, Ohm T, Bohl J (1988) Silver impregnation of Alzheimer's neurofibrillary changes counterstained for basophilic material and lipofuscin pigment. *Stain Technology* 197-200
- Braak H, Braak E, Ohm TG, Bohl J (1989) Alzheimer's disease: mismatch between amyloid plaques and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 103:24-28
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol Berl* 82:239-259
- Campbell S, Switzer RC, Martin TL (1987) Alzheimer's plaques and tangles: a controlled and enhanced silver staining method. *Soc Neurosci Abstr* 13:678
- Diekmann S, Nitsch R, Ohm TG (1994) The organotypic entorhinal-hippocampal complex slice culture of adolescent rats. A model to study transcellular changes in a circuit particularly vulnerable in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm (Suppl)* 44:61-71
- Diekmann S, Ohm TG, Nitsch R (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopy study. *Brain Pathol* 6:205-215
- Ohm TG, Kirca M, Bohl J, Scharnagl H, Gross W, März W (1995a) Apolipoprotein E polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Neuroscience* 66:583-587
- Ohm TG, Müller H, Braak H, Bohl J (1995b) Close-meshed prevalence rates of different stages as a tool to uncover the rate of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neuroscience* 64:209-217
- Poirier J, Hess M, May PC, Finch CE (1991) Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res Mol Brain Res* 11:97-106
- Zhou Y, Richardson JS (1996) Cholesterol protects PC12 cells from beta-amyloid induced calcium disordering and cytotoxicity. *Neuroreport* 7:2487-2490

3.5.3.1 Untersuchungen am Menschen

Es werden keine Untersuchungen am lebenden Menschen vorgenommen.

3.5.3.2 Tierversuche

Die Läsionsexperimente werden in Kooperation mit Prof. Dr. Nitsch durchgeführt. Eine entsprechende Tierversuchserlaubnis liegt vor. Bei der Anlage der Astrozytenkulturen kommt es nur zu genehmigungsfreier Tiertötung.

3.5.3.3 Gentechnische Experimente

Keine in dieser Antragsperiode. Im Rahmen einer begonnenen Kooperation mit der AG W.März (Freiburg) und Roche (Basel) werden von uns zugeschnittene histologische Schnitte und Gewebe transgener Tiere ausgewertet werden.

3.5.3.4 Perspektiven

Nach der Analyse der bei der ApoE-Bildung, Metabolisierung und Ausschleusung beteiligten Signaltransduktionskaskaden liegt nahe, zu untersuchen, inwieweit eine selektive Blockade der astrozytären ApoE-Expression bzw. Ausschleusung durchführbar wäre. Damit wäre es potentiell möglich, Risikopatienten (=Apoε4-Träger; ca. 20-25% der late onset-Alzheimer-Patienten) einer Präventivtherapie zu unterziehen, die den Verlauf der Erkrankung zwar nicht stoppen, ihn jedoch möglicherweise um eine Dekade verlangsamen würde.

3.5.4 Zeitplan

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Mit Prof. Robert Nitsch besteht seit mehreren Jahren eine enge Kooperation im Rahmen von (trans)zellulären Veränderungen des entorhinal/hippocampalen Systems. Dabei sind sowohl gemeinsam Dendritenbaumanalysen bei tierexperimentellen und neuropathologischen Läsionen durchgeführt worden. Zudem wurde gemeinsam die organotypische Schnittkultur aufgebaut und charakterisiert und Veränderungen der Signaltransduktion nach experimenteller Läsion analysiert. Diese Kooperationen sollen weiter geführt werden. Nach Aufbau der nicht-radioaktiven in situ Hybridisierung in der Arbeitsgruppe von Prof. Nitsch soll diese Technik im eigenen Labor etabliert werden. Die Technik der Glia-Kultivierung konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Uwe Heinemann in unserem Labor etabliert werden. Der Einfluß von Ca-Signalen auf die ApoE-Expression, Metabolisierung und Ausschleusung wird weiter in Kooperation mit PD.Dr. Wolfgang Müller untersucht.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
 SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
 I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997 Verg.-Gr.	2. Hj. 1998				1999			2000			1. Hj. 2001		
	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
BATIIa/2	2	BATIIa/2	1	19800	BATIIa/2	1	39600	BATIIa/2	1	39600	BATIIa/2	1	19800
Zusammen	2	zusammen	1	19800	zusammen	1	39600	zusammen	1	39600	zusammen	1	19800
SV	Kostenkategorie oder Kennziffer			Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
	522			16.800	522		33.600,-	522		33.600,-	522		16.800,-
	515			37.400									
	zusammen			54.200,-	zusammen		33.600,-	zusammen		33.600,-	zusammen		16.800,-
I	Mittel für Investitionen insgesamt:				Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
	36.982,-				-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausstattung	Ohm, Thomas G, Prof.Dr.med.	Anatomie	Inst. f. Anatomie	7	1995	C3
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Schönheit, Bärbel, Dr.med.	Anatomie	Inst. f. Anatomie	10		Ib-Ost
	Röckl, Wolfgang, Dr.rern.nat.		Inst. f. Anatomie	8		BATIIa-Ost
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Zarski, Rosemarie MTA	Histologie, Gewebekultur	Inst. f. Anatomie	10	1995	BATIVb
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Hamker, Ulrike Dipl.Biol.	Zellbiologie Pharmakologie	Inst. f. Anatomie	38,5	1995	BATIIa/2-Ost
	Meske, Volker Dr. rer.nat	Zellbiologie	Inst.f.Anatomie	14	ab 1998	Stipendiat (derzeit Hertie- Stiftung)
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	-	-	-	-	-	-

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

1. Prof. Dr. med. Thomas G. Ohm plant und konzipiert die Untersuchungen. Er beteiligt sich am Aufbau der neuen Methoden und betreut die Untersuchungen sowie die Erstellung der Publikationsmanuskripte. Neben seinen Lehraufgaben ist zusätzliche Zeit durch die Tätigkeit als Geschäftsführender Direktor beansprucht.

2. Dr. med. Bärbel Schönheit soll den Einfluß von ApoE-Varianten auf die Alzheimer-Histopathologie untersuchen. Dabei wird sie die Veränderungen nach der Braak-Klassifikation einteilen und mit Daten aus immunocytochemischen Untersuchungen korrelieren. Frau Dr. Schönheit hat sich zwischenzeitlich theoretisch und praktisch mit den Techniken der Immunocytochemie vertraut gemacht, die sie während der DDR-Zeit nicht erlernt hat. Sie kann und wird zu dieser Technik Doktoranden einweisen und betreuen und selbst die begonnenen Dendritenbaumanalysen zum Einfluß des ApoE-Genotyps auf immunocytochemisch identifizierte Zellen verschiedener Braak-Stadien fortsetzen. Für die konkret geplanten zellbiologischen und biochemischen oder molekularbiologischen Untersuchungen kann sie leider nicht mitherrangezogen werden.

3. Dr.rer.nat.Wolfgang Röckl wird die weitere Analyse der durch ApoE-Isoformen unterschiedlich beeinflussten Calciumkonzentrationen betreuen und selbst dabei die durch die Calciumkonzentrationsänderungen ausgelösten Effekte in den Zellen bei seiner Analyse in den Vordergrund stellen. Dazu wird derzeit von ihm u.a. die Technik der Differential-Display-PCR aufgebaut. Er ist desweiteren maßgeblich an der Analyse von Fibroblasten, die von Kontroll- und Alzheimerfällen abstammen, im Rahmen eines anderen Projektes beteiligt. Herr Röckl hat aufgrund seiner Lehrverpflichtungen (er hat z.B. keine Erfahrung im Präparierkurs) insbesondere im WS nur eingeschränkt Zeit für Laborarbeiten zur Verfügung. Zudem ist er durch den Aufbau eines Arbeitsplatzes zur Video-verstärkte DIC-Mikroskopie zeitlich stark beansprucht.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Frau Rosemarie Zarski soll wie bisher das Zellkulturlabor und die organotypischen Komplexschnittkultur adoleszenter Ratten betreuen. Sie wird an der Einarbeitung von Doktoranden mitwirken und führt die Routine-Histologie durch.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Personal der Ergänzungsausrüstung

1) BAT IIa/2. (Ulrike Hamker) Diese Mitarbeiterin soll die weiteren pharmakologischen Experimente zur Beeinflussung der ApoE-Expression und Sekretion durchführen und an der Entwicklung und Etablierung des ELISAs für ApoE-Rezeptoren eingesetzt werden. Sie hat im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr.Cowburn, Karolinska Institut, Schweden, ihre Kenntnisse zur Messung von Signaltransduktionskaskaden auf die Analyse von IP3 und anderer Calcium-assoziiierter Wege erweitert (primäre Ca-Signale sollen allerdings auch weiter in bereits bestehender enger Kooperation mit Volker Meske untersucht werden). Ferner soll sie die begonnenen Untersuchungen zur Protein/Protein-Interaktion mit der Resonant-Mirror-Technik (Kooperation mit der AG Prof. Hoffmann, Inst. f. Biophysik) fortführen.

Ferner soll Herr Dr. rer.nat Volker Meske - sofern er weiter über andere Drittmittel (Stipendiat der Hertie-Stiftung) finanziert werden kann - Frau Steffenhagen ersetzen, die die Arbeitsgruppe verläßt. Er wird die Untersuchungen zur glialen Expression entorhinaler und hippocampaler Astrozyten nach kontrollierter Läsion im Tier und beim Mensch anhand verschiedener Stadien der Alzheimer-Pathologie (Braak-Klassifikation) durchzuführen. Ferner soll er seine sehr erfolgreichen Untersuchungen zur Analyse der Calcium-Kompartimente, die von den ApoE-Isoformen unterschiedlich beeinflußt werden, mittels des von ihm in unsere AG aufgebauten FURA-Imagings fortsetzen. Dabei soll er diese Untersuchungen auch auf organotypische Slice-Kulturen ausdehnen (Kooperation mit der Arbeitsgruppe Nitsch). Ferner soll er die von Frau Steffenhagen begonnen Untersuchungen mit der Resonant-Mirror-technik in Kooperation mit der AG Prof. Hofmann (Biophysik, Charité) forsetzen und ausbauen. Herr Meske hat sich innerhalb kurzer Zeit hervorragend in die Arbeitsgruppe und das Thema eingefügt (er hat vorher pflanzenphysiologisch gearbeitet), wobei innerhalb dieser Zeit mehrere Manuskripte entstanden sind. Seine Stipendiatsstelle ist derzeit bis Juni 1998 befristet. Gelder, die im Rahmen von Industriekooperationen zur Verfügung stehen, könnten von Verbrauchsmaterial in Personalmittel für ihn umgenutzt werden.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung keine beantragt

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

1 Brutschrank, begasbar (Nuair), lt. Angebot DM 13.973,-

Begründung: Für die Astrozyten-Kulturen wird ein eigener Brutschrank benötigt. Der bisher genutzte, aus Grundausrüstungsmitteln beschaffte Schrank wird im Rahmen Kultivierung der organotypischen Schnittkulturen und der menschlichen Fibroblastenkulturen, die zu einem anderen Projekt angelegt sind, benötigt.

1 ELISA-Reader, lt. Angebot DM 12.075,-

Begründung: Im Institut steht aus Grundausrüstungsmitteln nur ein Gerät in der AG Prof. Dr. R.Veh zu Verfügung. Dieses Gerät konnte bisher mitbenutzt werden. Allerdings haben sich mehrfach Probleme dadurch ergeben, daß das Gerät im anderen Gebäude steht und der Transport der vorbereiteten ELISA-Reader-Platten über den Hof und die Treppenhäuser zu Verlusten bzw. Vermischungen der Well-Inhalte geführt hat. Zudem zeigte sich, daß beide Ags aufgrund zunehmender Zahlen von ELISA-Messungen Koordinationsprobleme hinsichtlich der Nutzung des einen Gerätes hatten.

1 gekühlte Tischzentrifuge, lt. Angebot DM 11.328,-

Begründung: Im Rahmen der PCR-Analysen und pharmakologischen Studien sind zahlreiche Zentrifugationsschritte nötig. Eine solche dafür benötigte Tischzentrifuge ist nicht aus Grund-

ausstattung vorhanden und würde das zur Verfügung stehende investive Jahresbudget für Erneuerung der Grundausrüstung gänzlich verbrauchen, so daß z.B. Wartungs- und Reparaturkosten sowie kleinere Geräte nicht mehr finanziert werden könnten. Bisher wurden diese Präparationsschritte im Nachbarlabor (AG Nitsch) durchgeführt, was aus Eigenbedarf der dortigen Gruppe merklich behindert ist.

Summe Kleingeräte **DM 37.376,-**

Verbrauchsmaterial

1)	Thapsigargin, Conotoxin, Agatoxin etc. (für Analyse von Ca-Kanälen und Kompartimente)	DM	1.500,--
2)	Chemikalien für Zyklase-Messungen (cAMP-Kits, Gpp(NH)p, IBMX, IPN, Calmodulin, ATP-regenerierendes System, etc.)	DM	4.000,--
3)	Forskolin (7-deacetyl-7-butyryl, LOT 801652, Calbiochem), 5mg = DM 252.-;	DM	1.000,--
4)	Verbrauchsmaterial für AC- und GC-Studien Inkubationsröhrchen	DM	1.500,--
5)	Tiere zu Anlage der Gewebekulturen, Medien	DM	3.600,-
6)	Glaswaren für die Histologie	DM	1.000,--
7)	Verbrauchsmaterialien f. PCR (dATP, dGTP etc., Taq-Polymerase)	DM	4.000,--
8)	Primer	DM	2.500,--
9)	Electrophorese-Material	DM	1.000,--
10)	35S-Methionin	DM	1.500,--
11)	ABC-Kits	DM	500,--
12)	Verbrauchsmaterial f. Histologie + Resonant/Mirror-Tech.	DM	1.000,--
13)	synthetisches β A4(1-42), sowie Fragmente, rekombinante ApoE-Varianten	DM	10.000,--
14)	Fotomaterial	DM	500,--
	Summe	DM	33.600,--

Die vergleichsweise hohe Summe an Verbrauchsmaterial ergibt sich aus den biochemischen, molekularbiologischen und pharmakologischen Untersuchungen (z.B. bei Konzentrations-Wirkungsanalysen) und sind leider unvermeidbar. So kostet immernoch z.B. 1mg rekombinantes ApoE je Isoform etwa 2000,- DM. Alleine an β /A4-Amyloid wurden in der letzten Antragsperiode DM 17.000 verbraucht. Da aus der Grundausrüstung für die Untersuchungen nur ca. 2000,-/Jahr zur Verfügung stehen, muß auch für die aus der Grundausrüstung und anderen Drittmitteln eingesetzte Mitarbeiter (z.B. Dr. rer.nat. V..Meske, der im Rahmen eines reinen Stipendiums in der AG tätig ist) nur Verbrauchsmaterial bereitgestellt werden.

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung	1.000,-	2.000,-	2.000,-	1.000,-
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	54,176,-	33,600,-	33,600,-	16,800,-

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Alle Preisangaben in DM einschließlich Mehrwertsteuer, Transportkosten usw.

<i>Bezeichnung des Gerätes</i>	<i>beantragt für das Haushaltsjahr</i>			
	<i>Einzelpreis 2. Hj. 1998</i>	<i>Einzelpreis 1999</i>	<i>Einzelpreis 2000</i>	<i>Einzelpreis 1. Hj. 2001</i>
<i>Inverses Mikroskop</i>	36.982,-	-	-	-
<i>Summe</i>	36.982,-	-	-	-

Begründung:

Für die in-vivo Beobachtung und Qualitätskontrolle der dissoziierten und organotypischen Schnittkulturen wird ein solches einfaches inverses Mikroskop dringend gebraucht. Bisher mußte das hochwertige, im Rahmen der unvorhergesehen vielen Messungen nunmehr vollkommen ausgelastete Meßmikroskop am FURA-Imaging-Arbeitsplatz mitverwendet werden. Darüber hinaus kann das beantragte Mikroskop im Rahmen der zeitaufwendigen quantitativen Auswertungen zu Unterschieden in der Differenzierung und Neuritenarborisation genutzt werden, ohne daß die in vivo FURA-Imaging-Analysen beeinträchtigt werden müssen.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C3

3.1.1 Thema:

Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Neurophysiologie

3.1.3 Leiter/in:

Dr. rer. nat. C. Eder, Claudia, 23.09.1965
Prof. Dr. med. U. Heinemann, Uwe, 17.02.1944
Institut für Physiologie der Charite
Abt. Neurophysiologie
AG Molekulare Zellphysiologie
Tucholskystr. 2
D-10117 Berlin
Tel +49-30-2802-6640 FAX +49-30-2802-6669
email: heineman@rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

(x) nein () ja, befristet bis zum :

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

Untersuchungen am Menschen	()	ja	(x)	nein
klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie	()	ja	(x)	nein
Tierversuche	(x)	ja	()	nein
gentechnologische Versuche	()	ja	(x)	nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs-ausgaben	Investition	gesamt
bis 1995	39,8	15,0	25,0	79,8
1996	83,6	30,0		113,6
1997	83,6	30,0		113,6
1. Hj. 1998	42,6	15,0		57,6
Zwischen-summe	249,6	115,0		364,6
2. Hj. 1998	65,4	65,2		130,6
1999	130,8	30,0		160,8
2000	130,8	30,0		160,8
1. Hj. 2001	65,4	15,0		80,4

3.2 Zusammenfassung

Etwa 20% aller epileptischen Patienten leiden an schwer behandelbaren Temporallappen-epilepsien. Die überwiegende Zahl dieser Patienten weist eine hippokampale Sklerose auf, und in der Anamnese finden sich vorangegangene epileptische Sten oder komplizierte Fieberkrämpfe. Die hippokampale Sklerose ist durch neuronale Verluste und eine Astrozytose gekennzeichnet. Entsprechende Veränderungen können durch einen experimentell induzierten Status epilepticus auch an Ratten ausgelöst werden. Diese entwickeln nach einem Intervall spontane limbische Anfälle. An Hirnschnitten dieser Tiere und an Hirnschnitten aus reseziertem humanen Gewebe sollen mögliche Veränderungen der Eigenschaften von Astrozyten untersucht werden. Diese betreffen ihre Rolle bei der Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie ihre Fähigkeit zur Aufnahme von Glutamat und GABA. Das wird zunächst an Hirnschnitten und später an dissoziierten Zellen untersucht werden.

Die Gründe für die Zellverluste beim Status epilepticus sind noch wenig verstanden. Wir konnten an Hirnschnittkulturen zeigen, daß nach einem Status epilepticus akut und verzögert Zellverluste auftreten. Mit Hilfe von Protektionsexperimenten soll geklärt werden, welche Mechanismen den Zellverlusten zugrundeliegen und ob epileptische Aktivierung zur Migration von Mikrogliazellen zum Ort der Läsion und zur Phagozytose bzw. zu neurotoxischen Schäden führt. Die Eigenschaften der aktivierten Mikrogliazellen sollen elektrophysiologisch an diesen Hirnschnittkulturen geklärt werden.

3.3 Stand der Forschung

Humane Temporallappenepilepsien lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die meisten Patienten weisen eine Ammonshornsklerose (AHS) auf, die bei einseitiger Lokalisation eine Operationsindikation darstellt. Die Ammonshornsklerose ist durch eine Gliaproliferation und durch variable Zellverluste vor allem im Hilus und im CA1-Gebiet des Hippokampus sowie geringere Zellverluste im Subiculum und den mittleren Schichten des entorhinalen Kortex gekennzeichnet (Babb *et al.* 1984; Mathern *et al.* 1995; Zentner *et al.* 1995). Lange Zeit galt die Area dentata als wenig vulnerabel, und es wurde angenommen, daß es in dieser Struktur nicht zu Zellverlusten kommt. Untersuchungen in Bonn und Los Angeles haben aber gezeigt, daß in resezierten Hippokampi die Area dentata einen erheblichen Nervenzellverlust aufweist (Babb *et al.* 1984; Mathern *et al.* 1995; Zentner *et al.* 1995, Wolf *et al.* 1993).

Die AHS wird häufig auf vorhergegangene hypoxische Schäden, Enzephalitiden und durchgemachte epileptische Sten sowie komplizierte Fieberkrämpfe zurückgeführt. In diesem Zusammenhang wurde der Frage nach anfallsinduzierten- sowie statusinduzierten Zellverlusten nachgegangen. Untersuchungen nach einzelnen reizinduzierten Krampfanfällen zeigten, daß es zu apoptotischem und wahrscheinlich auch nekrotischem Zelltod kommt, verbunden mit einer Neubildung von Nervenzellen in der Area dentata sowie einer Proliferation von Astrozyten und Mikrogliazellen (Benzon *et al.* 1997). Experimentell ausgelöste Sten führen zu sehr viel ausgeprägteren Zellverlusten, die Nerven- und Gliazellen betreffen und ebenfalls zu einer Neubildung zumindest von Astrozyten führen (Schmidt-Kastner *et al.* 1991; Ingvar *et al.* 1994; Schmidt-Kastner *et al.* 1994). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, daß experimentell induzierte Sten (Pilocarpin, kontinuierliche elektrische Reizung, Kainat) ein Bild erzeugen, das dem der humanen Ammonshornsklerose ähnelt (Cavalheiro *et al.* 1996; Cavalheiro *et al.* 1991; Represa *et al.* 1993; Ben-Ari *et al.* 1986; Ben-Ari, 1985). Diese Tiere entwickeln etwa 3 bis 6 Wochen nach dem experimentellen Status epilepticus eine Temporallappenepilepsie.

Seltener sind Temporallappenepilepsien, bei denen eine extratemporale Läsion infolge eines Tumors, einer Entwicklungsstörung oder eines Hamartoms im Vordergrund steht (Wolf *et al.* 1993). Diese Patienten werden meist nur dann erfolgreich behandelt, wenn auch Teile der hippokampalen Formation reseziert werden. Bei diesen Anfallsformen sind ebenfalls Zellverluste in der Area dentata und eine milde Gliose beschrieben worden. Ähnliche Veränderungen können tierexperimentell bei der Kindlingepilepsie nachgewiesen werden, bei der nach täglicher Reizung in den Mandelkernen allmählich sekundär generalisierte Temporallappenanfälle entstehen (Goddard *et al.* 1969). In diesem Modell sind Zellverluste weniger eindrucklich als nach epileptischen Sten.

Mögliche Ursachen von Zellverlusten während epileptischer Aktivität

Für das Absterben von Zellen während epileptischer Aktivität wird häufig Exzitotoxizität verantwortlich gemacht. Diese Hypothese wird jedoch in Frage gestellt, weil der Nachweis exzitotoxisch wirksamer Glutamatspiegel während epileptischer Aktivität nur selten (Meldrum, 1993; Millan *et al.* 1991) bzw. nur in Gegenwart von Glutamat-Aufnahmehemmern gelang. Ein Absterben von Gliazellen aufgrund epileptischer Glutamatakkumulation ist bisher nicht gezeigt worden. Applikation vergleichbarer Mengen Glutamat an Hirnschnittpräparaten führte ebenfalls nicht zu signifikanten Zellverlusten. Die an Zellkulturen nach Glutamatappli-

kation beobachteten Zellverluste wurden teilweise auf die Verwendung serumfreien Mediums während der Glutamatapplikation zurückgeführt (Uto *et al.* 1994). Unbestritten ist aber, daß Zellverluste durch epileptiforme Aktivität auch in Zellkulturen auftreten, in denen extrazelluläre Ionenänderungen, Glutamatakkumulation etc. eher von nachgeordneter Bedeutung sind (Abele *et al.* 1990). Unklar ist gegenwärtig, ob in dissoziierten Kulturen auch Astrozyten sterben.

Wegen des gleichzeitigen Absterbens von Nerven- und Gliazellen sind auch Energiemangelzustände für den Zelltod während epileptischer Aktivität diskutiert worden. Messungen der Hirndurchblutung sowie der Deoxyglucoseaufnahme ergaben aber, daß während epileptischer Aktivität der zerebrale Blutfluß und die Glukoseaufnahme stark zunehmen. Diese Befunde haben Eingang in die klinische Diagnostik, vor allem bei iktalen SPECT-Studien, gefunden. Die iktales Durchblutung übersteigt die Reperfusion nach ischämischen Insulten und ist auch größer als bei der „spreading depression“ (SD).

Wie bei der Reperfusion kommt es auch während epileptischer Aktivität zu einer vermehrten Produktion freier Radikale (Bruce & Baudry, 1995). Es erscheint denkbar, daß während epileptischer Aktivität, die mit intrazellulärer Kalziumakkumulation und möglicherweise Mitochondriendepolarisationen einhergeht, die Bildung freier Radikale zu Zellschäden führt (Dykens, 1994). Unter der Annahme, daß aktivierte Mikrogliazellen in Zonen vermehrter Zellverluste einwandern, kann sekundärer Zellschaden teilweise auf das Anstoßen apoptotischer Programme, teilweise auf zytotoxische Effekte aktivierter Mikrogliazellen zurückgeführt werden. Letztlich sind die Mechanismen, die zu Zellverlusten während epileptischer Aktivität führen, noch wenig verstanden.

Veränderte Eigenschaften von Astrozyten in chronisch epileptischem Gewebe

Nur wenige Untersuchungen haben sich der Frage veränderter Eigenschaften von Astrozyten in chronisch epileptischem Gewebe gewidmet. Erste Untersuchungen der elektrophysiologischen Veränderungen bei reaktiver Gliose im Zellkulturmodell haben ergeben, daß sich proliferierende Astrozyten wie unreife Astrozyten verhalten, also nur eine geringe Anzahl Einwärtsgleichrichterkanäle für Kalium exprimieren (MacFarlane & Sontheimer 1997). Es ist offensichtlich, daß die Ausreifung der Astroglia und Oligodendroglia relativ lange Zeit in Anspruch nimmt. Studien aus dem Labor von Steinhäuser sowie Arbeiten der Gruppe um Kettenmann haben gezeigt, daß während der Ontogenese Gliazellen erst verzögert Ein- und Auswärtsgleichrichter exprimieren, während transient auch Na^+ -Einwärtsströme auftreten (Steinhäuser *et al.* 1994; Kressin *et al.* 1995; Steinhäuser *et al.* 1992). Während der Reifung der Astrozyten sind transient vermehrte Expressionen ionotroper Neurotransmitterrezeptoren zu beobachten (Kettenmann *et al.* 1984; Steinhäuser *et al.* 1994; V.Blankenfeld & Kettenmann, 1991). Metabotrope Rezeptoren für Glutamat und andere Neurotransmitter scheinen ebenfalls mit gewisser Variabilität vorzukommen (Kim *et al.* 1994; Miller *et al.* 1994). In reifen Gliazellen finden sich regional variierende Eigenschaften. So besitzen Bergmann-Gliazellen Kainatrezeptoren mit hoher Kalziumpermeabilität (Müller *et al.* 1992) und Rückenmarksgliazellen Glycinrezeptoren. Gliazellen aus dem Striatum scheinen besonders reich an GABA-Transportern und GABA-Rezeptoren zu sein (Schousboe, 1982). Teilweise bleiben diese Eigenschaften auch in Kulturen erhalten.

Untersuchungen aus humanem epileptischen Gewebe haben ergeben, daß Kalziumoszillationen und Farbstoff-Kopplung an kultivierten Gliazellen verändert sind (Kim *et al.* 1994) und

daß Astrozyten weniger häufig einwärtsgerichtete Kaliumströme exprimieren (Sontheimer, persönliche Mitteilung). Dies könnte darauf hindeuten, daß die Fähigkeit der Gliazellen, Kalium räumlich umzuverteilen, vermindert ist.

Untersuchungen bezüglich der Expression von GABA-Transportern zeigen, daß die Fähigkeit zur zellulären Aufnahme von GABA in humanem Epilepsiegewebe mit AHS ebenfalls beeinträchtigt ist (Williamson *et al.* 1995). Gegenwärtig sind verschiedene GABA-Transporter kloniert, die eine unterschiedliche Pharmakosensitivität besitzen. Der GAT-1 kann durch Nipicotinsäure (NPA) und Tiagabin blockiert werden. NPA wird in Zellen aufgenommen, und diese geben im Austausch GABA ab, das dann auf neuronale Zellen wirkt. Beta-Alanin blockiert den GAT-3 und setzt gleichfalls GABA frei, dessen Wirkung an neuronalen Zellen gemessen werden kann. GAT-3 scheint bevorzugt in Gliazellen exprimiert zu sein, während GAT-1 vielleicht auch in präsynaptischen Endigungen vorkommt (Draguhn & Heinemann, 1996).

Bei der Ratte sind zur Zeit drei verschiedene Glutamat-Transporter beschrieben. Der GLAST scheint vorwiegend im Cerebellum, GLT-1 und GLT-2 im übrigen Nervengewebe exprimiert zu sein. Einige Glutamat-Transporter werden u.a. durch freie Radikale reguliert (Volterra, 1994; Swanson *et al.* 1995). Eine Reduktion glialer Glutamat-Transporter könnte demnach ebenso wie eine verstärkte gliale GABA-Aufnahme oder eine Reduktion neuronaler GABA-Transporter zur Auslösung epileptischer Anfälle beitragen

3.4 Eigene Vorarbeiten

Die eigenen Vorarbeiten sind ausführlich im Arbeitsbericht dargestellt.

3.4.1 Entwicklung von Modellen eines pharmakoresistenten Status epilepticus

Wir konnten zeigen, daß durch Absenken der Magnesiumkonzentration ausgelöste krampfähnliche Ereignisse nach ca. 45 Minuten in einen auf die gegenwärtig verfügbaren Medikamente nicht mehr ansprechenden Status epilepticus übergehen (Zhang *et al.* 1995). Wir konnten außerdem ein zweites Modell entwickeln, bei dem 4AP gemeinsam mit dem GABA-A-Rezeptorblocker Bicucullin bzw. mit dem Kaliumkanal-Blocker TEA appliziert wird (Brückner, Draguhn, Stenkamp und Heinemann, in Vorbereitung). Eine ähnliche Form epileptischer Aktivität läßt sich bei Behandlung mit 4AP und Bicucullin auch in dissoziierten Kulturen auslösen (Brückner, Draguhn und Heinemann, in Vorbereitung). Für den Übergang pharmakosensitiver in pharmakoresistente Aktivität im Niedrig-Magnesiummodell konnte ein Transfer von GABA aus Nervenzellen in Gliazellen wahrscheinlich gemacht werden (Pfeiffer *et al.* 1996).

3.4.2. Untersuchungen zu Status-induziertem akuten und verzögerten Zelltod

a. Hirnschnittpräparate

An Hirnschnittpräparaten wurde eine Reihe von orientierenden Untersuchungen zu Status epilepticus-induziertem Zelltod vorgenommen. Als Indikatoren für den Zellverlust wurden das irreversible Verschwinden reizinduzierter antidromer Potentiale sowie Färbungen der

Hirnschnitte mit Ethidiumbromid verwendet. Es zeigte sich, daß langanhaltende epileptiforme Aktivität zu einer Abnahme der reizinduzierten Potentiale und zu fleckförmigen Zellverlusten im entorhinalen Kortex und Hippokampus führt. Ein ähnlicher irreversibler Verlust von Zellen und evozierbaren Potentialen konnte nach ca. 20minütiger Hypoglykämie sowie nach Applikation von ca. 5 mM Glutamat oder 1 mM Kainat evoziert werden. Vollständiges Absterben der Nervenzellen wurde nach Applikation von 20 mM Glutamat, 5 mM Kainat oder 40minütiger Hypoglykämie beobachtet (Alici & Heinemann, 1995; Alici *et al.* 1997; Alici *et al.* 1996; Alici *et al.* 1997; Alici *et al.* 1996). Die notwendigen Glutamatwerte liegen sehr deutlich über jenen, die während epileptischer Aktivität gemessen wurden. Glutamat begrenzt über präsynaptische Autorezeptoren offenbar die Glutamatfreisetzung.

b. Hirnschnittkulturen

Gegen Messungen zu krampfbedingtem Zelltod an Hirnschnittpräparaten läßt sich unter anderem einwenden, daß die Untersuchungen an vorgeschädigten Präparaten erfolgen und daß die Sauerstoffspannung in der Mitte des Hirnschnittpräparates bereits erniedrigt ist. Wir haben deshalb unsere Untersuchungen auf Hirnschnittkulturen des Hippokampus und des entorhinalen Kortex-Hippokampuskomplexes ausgedehnt. Auch die Hirnschnittkulturen entsprechen sicher nicht in jeder Form der physiologischen Situation. Zwar läßt sich die hippocampale Schleife von der Area dentata nach CA3 und von dort nach CA1 weiter nachweisen, aber unphysiologische Verbindungen vom CA1- und CA3- Gebiet zurück in die Area dentata haben sich ausgebildet, die zu einer erhöhten Krampfbereitschaft beitragen könnten (Draguhn *et al.* 1997; Gutiérrez & Heinemann, 1997; Gutiérrez *et al.* 1997). Untersuchungen zum anfallsinduzierten Zelltod haben ergeben, daß wie am intakten Tier und den Hirnschnitten längere Anfallsserien zu einem erheblichen akuten und zeitlich verzögerten Zelluntergang führen, der Nervenzellen und Astrozyten betrifft (Gutiérrez *et al.* 1997). Am Rand der fleckenförmigen Läsionszonen finden sich amöboide Zellen, bei denen es sich vermutlich um Mikrogliazellen handelt (Kovacs, Gabriel und Heinemann, in Vorbereitung). Erste Hinweise zeigen in noch nicht sicher identifizierten Mikrogliazellen Lysosomen, die ethidiumbromidpositiv sind. Phagozytotische Aktivität wird auch durch Experimente belegt, in denen mit den anterograd und retrograd transportierten fluoreszierenden Dextranaminen lebende Nervenzellen vor Induktion des Status epilepticus markiert wurden. Auch dieser Marker findet sich parallel zur Ethidiumbromidfärbung in Lysosomen.

c. Untersuchungen an dissoziierten Zellkulturen

Um die zugrundeliegenden Mechanismen für anfallsbedingte Zellverluste an dissoziierten Kulturen klären zu können, wurde, neben Untersuchungen zu 4AP-induzierten Formen epileptischer Aktivität, die Auswirkung von Glutamatapplikationen auf das Überleben von Zellen in Kultur gemessen und verschiedene intrazelluläre Reaktionen untersucht (Gutiérrez *et al.* 1997; Stabel-Burow *et al.* 1997; Schuchmann *et al.* 1997; Lückermann *et al.* 1996). In diesen Untersuchungen konnte auch nachgewiesen werden, daß Glutathion neuroprotektive Wirkungen besitzt und daß Nervenzellen auf die Zufuhr von Cystein aus Gliazellen zur Synthese von Glutathion angewiesen sind (Schuchmann, Müller und Heinemann, in Vorbereitung).

3.4.3 Gliale Kaliumregulation

Extrazelluläre Kaliumkonzentrationserhöhungen sind ein wichtiger Faktor bei der Induktion und Ausbreitung epileptischer Aktivität. Der Anstieg der Kaliumkonzentration wird unter Mitwirkung der Gliazellen reguliert. Drei Mechanismen sind an der Kaliumregulation beteiligt:

1. Aufnahme von Kalium in Nerven- und Gliazellen durch die Na-K-ATPase, deren gliale Variante durch extrazelluläres Kalium stimuliert wird. 2. KCl-Transport in die Gliazellen 3. Umverteilung von Kalium über den glialen räumlichen Puffermechanismus. Folgende Argumente sprechen für eine Beteiligung von Gliazellen an der Begrenzung des Kaliumanstieges:

- In juvenilen Hirnschnittpräparaten, in denen die Gliazellen noch nicht voll ausgereift sind, steigt die Kaliumkonzentration während maximaler repetitiver Reizung auf Werte bis 18 mM, womit der Grenzwert von 12 mM im adulten Gewebe deutlich überschritten wird.
- Barium, das für die Kalium-Pufferung wichtige Leckkaliumkanäle und Einwärtsgleichrichter in Gliazellen blockiert, verstärkt reiz- und iontophoretisch-induzierte Kaliumsignale im adulten, aber nicht im juvenilen Gewebe (Gabriel, Kivi und Heinemann, in Vorbereitung).
- Laminare Profile antidrom ausgelöster Kaliumkonzentrationserhöhungen und Stromsensendichteanalysen der begleitenden langsamen Feldpotentiale zeigen am Ort der maximalen Kaliumakkumulation im Stratum pyramidale (SP) eine Senke. Diese wird durch Barium, aber nicht durch Caesium, in eine Quelle umgewandelt, wobei gleichzeitig die Kaliumkonzentrationserhöhung um 80-140 % gesteigert wird (Heinemann *et al.* 1996) (Gabriel, Eilers, Le-weke, Weber-Luxenburger und Heinemann, in Revision)
- Gleiche Messungen in Hirnschnitten pilocarpin-behandelter chronisch epileptischer Ratten ergaben, daß in diesem epileptischen Gewebe, trotz verminderter neuronaler Aktivität, relativ hohe Kaliumkonzentrationssteigerungen ausgelöst werden. Außerdem bleiben Barium-Effekte auf das Stratum pyramidale beschränkt oder sind, im Vergleich zu nicht epileptischem Gewebe, drastisch reduziert. Dies weist darauf hin, daß die Fähigkeit der Astrozyten, Kalium über Mechanismen der räumlichen Pufferung aufzunehmen und umzuverteilen, im epileptischen Gewebe vermindert ist (Gabriel, Eilers, Kivi, Kovacs, Schulze, Lehmann und Heinemann, in press).

3.4.4. Mikrogliazellen

Um Mikrogliazellfunktionen an Hirnschnittkulturen untersuchen zu können, mußten wir zunächst mehr über die Eigenschaften von Mikrogliazellen unter dem Einfluß verschiedener Proliferationsfaktoren lernen. Dazu wurde eine Reihe von Studien zu den elektrophysiologischen Eigenschaften von Mikrogliazellen an dissoziierten Kulturen angefertigt. Nachdem die Gruppe um Herrn Nitsch zeigen konnte, daß in organotypischen Kulturen transplantierte Mikrogliazellen sich in ramifizierte Zellen umwandeln, besteht nun die Möglichkeit, die Eigenschaften von Mikrogliazellen in organotypischen Kulturen näher zu untersuchen. In diesem Zusammenhang ist der Nachweis phagozytischer Zellen im Schnittpräparat besonders interessant, da er das Auffinden phagozytischer Mikrogliazellen erleichtert.

Literaturangaben

- ABELE, A. E., SCHOLZ, K. P., SCHOLZ, W. K. & MILLER, R. J. (1990). Excitotoxicity induced by enhanced excitatory neurotransmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Neuron* 4, 413-419.
- ALICI, K., GLOVELI, T., SCHMITZ, D. & HEINEMANN, U. (1997). Effects of glutamate receptor agonists and antagonists on Ca^{2+} -uptake in rat hippocampal slices lesioned by glucose deprivation or by kainate. *Neuroscience* 77, 97-109.
- ALICI, K., GLOVELI, T., WEBER-LUXENBURGER, G., MOTINE, V. & HEINEMANN, U. (1996). Comparison of effects induced by toxic applications of kainate and glutamate and by glucose deprivation on area CA1 of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 738, 109-120.
- ALICI, K. & HEINEMANN, U. (1995). Effects of low glucose levels on changes in $[\text{Ca}^{2+}]_0$ induced by stimulation of Schaffer collaterals under conditions of blocked chemical synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 185, 5-8.
- ALICI, K., MÜLLER, W. & HEINEMANN, U. (1996). Effects of glutamate receptor agonists on presumed presynaptic Ca^{2+} -signals in juvenile rat hippocampal area CA1. *Neuroscience Letters* 214, 17-20.
- ALICI, K., WEBER-LUXENBURGER, G. & HEINEMANN, U. (1997). Effects of glucose deprivation in area CA1 hippocampal slices from adult and juvenile rats. *Developmental Brain Research* (In Press)
- BABB, T. L., BROWN, W. J., PRETORIUS, J. K., DAVENPORT, C. J., LIEB, J. P. & CRANDALL, P. H. (1984). Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 25(6), 729-740.
- BEN-ARI, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375-403.
- BEN-ARI, Y., REPRESA, A., TREMBLAY, E. & NITECKA, L. (1986). Selective and non-selective seizure related brain damage produced by kainic acid. In *Excitatory amino acids and epilepsy*, eds. SCHWARCZ, R. & BEN-ARI, Y. pp. 647-657. New York and London: Plenum Press.
- BENGZON, J., KOKAIA, Z., ELMÉR, E., NANOBASHVILI, A., KOKAIA, M. & LINDVALL, O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10432-10437
- BRUCE, A. J. & BAUDRY, M. (1995). Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic.Biol.Med.* 18, 993-1002.
- CAVALHEIRO, E. A., LEITE, J. P., BORTOLOTTI, Z. A., TURSKI, W. A., IKONOMICIDOU, C. & TURSKI, L. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: Structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32, 778-782.
- CAVALHEIRO, E. A., SANTOS, N. F. & PRIEL, M. R. (1996). The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* 37, 1015-1019.

- DRAGUHN, A., GUTIÉRREZ, R., GABRIEL, S. & HEINEMANN, U. (1997). Altered connectivity in hippocampal explant cultures causes enhanced excitation of dentate granule cells. 2, 888(Abstract)
- DRAGUHN, A. & HEINEMANN, U. (1996). Different mechanisms regulate IPSC kinetics in early postnatal and juvenile hippocampal granule cells. *Journal of Neurophysiology* 76, 3983-3993.
- DYKENS, J. A. (1994). Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : Implications for neurodegeneration. *J.Neurochem.* 63, 584-591.
- EDER, C., FISCHER, H.-G., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Properties of voltage-gated potassium currents of microglia differentiated with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Membr.Biol.* 147, 137-146.
- EDER, C., FISCHER, H.-G., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Properties of voltage-gated currents of microglia developed using macrophage colony-stimulating factor. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 430, 526-533.
- EDER, C. & HEINEMANN, U. (1996). Proton modulation of outward K^+ currents in interferon- γ -activated microglia. *Neuroscience Letters* 206, 101-104.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Pharmacological properties of Ca^{2+} -activated K^+ currents of ramified murine brain macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 356, 233-239.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Ca^{2+} -activated K^+ -currents of ramified murine microglial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 433 (Suppl.), R103(Abstract)
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Effects of astrocyte-conditioned medium on cell shape and on K^+ currents of microglia. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 433 (Suppl.), R103(Abstract)
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K^+ currents and ramification of brain macrophages. *Neuroscience Letters* 226, 147-150.
- FISCHER, H.-G., EDER, C., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Cytokine-dependent K^+ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 64, 183-191.
- GODDARD, G. V., MCINTYRE, D. C. & LEECH, C. K. (1969). A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp.Neurol.* 25, 295-330.
- GUTIÉRREZ, R., ARMAND, V., SCHUCHMANN, S. & HEINEMANN, U. (1997). Epileptiform activity and neuronal cell loss induced by low Mg^{++} in cultured rat hippocampal slices. (Abstract)
- GUTIÉRREZ, R. & HEINEMANN, U. (1997). Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. (Abstract)
- HEINEMANN, U., DRAGUHN, A. & EDER, C. (1996). Possible contribution of glial cells to initiation and spread of seizure activity. (Abstract)

- HEINEMANN, U., GABRIEL, S. & MEIERKORD, H. (1996). Änderungen von Ionenkonzentrationen während epileptiformer Aktivität im entorhinalen Kortex-Hippokampuspräparat der Ratte. *Zeitung für EEG und EMG* 27, 218-225.
- INGVAR, M., SCHMIDT-KASTNER, R. & MELLER, D. (1994). Immunohistochemical markers for neurons and astrocytes show pan-necrosis following infusion of high-dose NMDA into rat cortex. *Exp.Neurol.* 128, 249-259.
- KETTENMANN, H., BACKUS, K. H. & SCHACHNER, M. (1984). Aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neuroscience Letters* 52, 25-29.
- KIM, W. T., RIOULT, M. G. & CORNELL-BELL, A. H. (1994). Glutamate-induced calcium signaling in astrocytes. *Glia* 11, 173-184.
- KLEE, R., RICHTER, H., HEINEMANN, U. & EDER, C. (1997). Proton currents of immunologically resting and activated microglial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 433 (Suppl.), R104(Abstract)
- KRESSIN, K., KUPRIJANOVA, E., JABS, R., SEIFERT, G. & STEINHÄUSER, C. (1995). Developmental regulation of Na⁺ and K⁺ conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia* 15, 173-187.
- LÜCKERMANN, M., SCHUCHMANN, S., HEINEMANN, U. & BALLANYI, K. (1996). Mitochondrial membrane potential of the CA1 neurons in thin hippocampal slices. 2, 495(Abstract)
- MacFARLANE, S.N., & SONTHEIMER, H. (1997) Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis *In vitro*. *J. Neurosci* 17, 7316-7329
- MATHERN, G. W., BABB, T. L., PRETORIUS, J. K., MELENDEZ, M. & LÉVESQUE, M. F. (1995). The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 21, 133-147.
- MELDRUM, B. S. (1993). Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathology* 3, 405-412.
- MILLAN, M. H., OBRENOVITCH, T. P., SARNA, G. S., LOK, S. Y., SYMON, L. & MELDRUM, B. S. (1991). Changes in rat brain extracellular glutamate concentration during seizures induced by systemic picrotoxin or focal bicuculline injection: An in vivo dialysis study with on-line enzymatic detection. *Epilepsy Research* 9, 86-91.
- MILLER, S., BRIDGES, R. J., CHAMBERLIN, A. R. & COTMAN, C. W. (1994). Pharmacological dissociation of glutamatergic metabotropic signal transduction pathways in cortical astrocytes. *Eur.J.Pharmacol.Mol.Pharmacol.* 269, 235-241.
- MÜLLER, T., MÖLLER, T., BERGER, T., SCHNITZER, J. & KETTENMANN, H. (1992). Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256, 1563-1566.
- PFEIFFER, M., DRAGUHN, A., MEIERKORD, H. & HEINEMANN, U. (1996). Effects of -aminobutyric acid (GABA) agonists and GABA uptake inhibitors on pharmacosensitive and pharmacoresistant epileptiform activity *in vitro*. *Br.J.Pharmacol.* 119, 569-577.

- REPRESA, A., NIQUET, J., CHARRIAUT-MARLANGUE, C. & BEN-ARI, Y. (1993). Reactive astrocytes in the kainic acid-damaged hippocampus have the phenotypic features of type-2 astrocytes. *J.Neurocytol.* 22, 299-310.
- SCHMIDT-KASTNER, R., HEIM, C. & SONTAG, K.-H. (1991). Damage of substantia nigra pars reticulata during pilocarpine-induced status epilepticus in the rat: Immunohistochemical study of neurons, astrocytes and serum-protein extravasation. *Experimental Brain Research* 86, 125-140.
- SCHMIDT-KASTNER, R., TOMAC, A., HOFFER, B., BEKTESH, S., ROSENZWEIG, B. & OLSON, L. (1994). Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA up-regulation in striatum and cortical areas after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Mol.Brain Res.* 26, 325-330.
- SCHOUSBOE, A. (1982). Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int.Rev.Neurobiol.* 22, 1-45.
- SCHUCHMANN, S., MÜLLER, W. & HEINEMANN, U. (1997). Altered Ca-signaling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mice - a model of Down syndrome. (Abstract)
- STEINHÄUSER, C., BERGER, T., FROTSCHER, M. & KETTENMANN, H. (1992). Heterogeneity in the membrane current pattern of identified glial cells in the hippocampal slice. *European Journal of Neuroscience* 4, 472-484.
- STEINHÄUSER, C., JABS, R. & KETTENMANN, H. (1994). Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 4, 19-36.
- STEINHÄUSER, C., KRESSIN, K., KUPRIJANOVA, E., WEBER, M. & SEIFERT, G. (1994). Properties of voltage-activated Na⁺ and K⁺ currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 428, 610-620.
- SWANSON, R. A., FARRELL, K. & SIMON, R. P. (1995). Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 15, 417-424.
- UTO, A., DUX, E. & HOSSMANN, K. A. (1994) Effect of serum on intracellular calcium homeostasis and survival of primary cortical and hippocampal CA1 neurons following brief glutamate treatment. *Metab. Brain Dis.* 9, 333-345
- V.BLANKENFELD, G. & KETTENMANN, H. (1991). Glutamate and GABA receptors in vertebrate glial cells. *Mol.Neurobiol.* 5, 31-43.
- VOLTERRA, A. (1994). Inhibition of high-affinity glutamate transport in neuronal and glial cells by arachidonic acid and oxygen-free radicals. Molecular mechanisms and neuropathological relevance. *Renal Physiol.Biochem.* 17, 165-167.
- WILLIAMSON, A., TELFEIAN, A. E. & SPENCER, D. D. (1995). Prolonged GABA responses in dentate granule cells in slices isolated from patients with temporal lobe sclerosis. *Journal of Neurophysiology* 74, 378-387.
- WOLF, H. K., CAMPOS, M. G., ZENTNER, J., HUFNAGEL, A., SCHRAMM, J., ELGER, C. E. & WIESTLER, O. D. (1993). Surgical Pathology of temporal lobe epilepsy. Experience with 216 cases. *J. Neuropathol.Exp.Neurol.* 52, 499-506

- ZENTNER, J., HUFNAGEL, A., WOLF, H. K., OSTERTUN, B., BEHRENS, E., CAMPOS, M. G., SOLYMOSI, L., ELGER, C. E., WIESTLER, O. D. & SCHRAMM, J. (1995). Surgical treatment of temporal lobe epilepsy: Clinical, radiological, and histopathological findings in 178 patients. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 58, 666-673.
- ZHANG, C. L., DREIER, J. P. & HEINEMANN, U. (1995). Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. *Epilepsy Research* 20, 105-111.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

(einschließlich der in den Literaturangaben aufgeführten eigenen Arbeiten)

- ALICI, K., GLOVELI, T., SCHMITZ, D. & HEINEMANN, U. (1997). Effects of glutamate receptor agonists and antagonists on Ca^{2+} -uptake in rat hippocampal slices lesioned by glucose deprivation or by kainate. *Neuroscience* 77, 97-109.
- ALICI, K., GLOVELI, T., WEBER-LUXENBURGER, G., MOTINE, V. & HEINEMANN, U. (1996). Comparison of effects induced by toxic applications of kainate and glutamate and by glucose deprivation on area CA1 of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 738, 109-120.
- ALICI, K. & HEINEMANN, U. (1995). Effects of low glucose levels on changes in $[Ca^{2+}]_0$ induced by stimulation of Schaffer collaterals under conditions of blocked chemical synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 185, 5-8.
- ALICI, K., MÜLLER, W. & HEINEMANN, U. (1996). Effects of glutamate receptor agonists on presumed presynaptic Ca^{2+} -signals in juvenile rat hippocampal area CA1. *Neuroscience Letters* 214, 17-20.
- DRAGUHN, A. & HEINEMANN, U. (1996). Different mechanisms regulate IPSC kinetics in early postnatal and juvenile hippocampal granule cells. *Journal of Neurophysiology* 76, 3983-3993.
- EDER, C., FISCHER, H.-G., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Properties of voltage-gated potassium currents of microglia differentiated with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Membr.Biol.* 147, 137-146.
- EDER, C., FISCHER, H.-G., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Properties of voltage-gated currents of microglia developed using macrophage colony-stimulating factor. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 430, 526-533.
- EDER, C. & HEINEMANN, U. (1996). Proton modulation of outward K^+ currents in interferon- γ -activated microglia. *Neuroscience Letters* 206, 101-104.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Pharmacological properties of Ca^{2+} -activated K^+ currents of ramified murine brain macrophages. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 356, 233-239.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K^+ currents and ramification of brain macrophages. *Neuroscience Letters* 226, 147-150.

- FISCHER, H.-G., EDER, C., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Cytokine-dependent K^+ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 64, 183-191.
- HEINEMANN, U., GABRIEL, S. & MEIERKORD, H. (1996). Änderungen von Ionenkonzentrationen während epileptiformer Aktivität im entorhinalen Kortex-Hippokampuspräparat der Ratte. *Zeitung für EEG und EMG* 27, 218-225.
- MÜLLER, W., HEINEMANN, U., SCHUCHMANN, S. (1997) Impaired Ca-signaling in astrocytes from the Ts16 mouse model of Down syndrome. *Neurosci.Lett.* 223, 81-84.
- PFEIFFER, M., DRAGUHN, A., MEIERKORD, H. & HEINEMANN, U. (1996). Effects of -aminobutyric acid (GABA) agonists and GABA uptake inhibitors on pharmacosensitive and pharmacoresistant epileptiform activity *in vitro*. *Br.J.Pharmacol.* 119, 569-577.
- REICHELT, W., STABEL-BUROW, J., PANNICKE, T., WEICHERT, H., HEINEMANN, U. (1997). The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience* 77:1213-1224, 1997.
- STABEL-BUROW, J., KLEU, A., SCHUCHMANN, S. & HEINEMANN, U. (1997). Glutathione levels and nerve cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mice - a model of Down syndrome. *Brain Res.* (In Press)
- ZHANG, C. L., DREIER, J. P. & HEINEMANN, U. (1995). Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. *Epilepsy Research* 20, 105-111.

Manuskripte im Druck/ in Revision:

- ALICI, K., WEBER-LUXENBURGER, G., HEINEMANN, U. Effects of glucose deprivation in area CA1 hippocampal slices from adult and juvenile rats. *Dev. Brain Res.* (In Press)
- ARMAND, V., GABRIEL, S., HOFFMANN, P., HEINEMANN, U., VERGNES, M. Properties of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in a genetic rat model of absence epilepsy.
- GABRIEL, S., EILERS, A., KIVI, A., KOVÁCS,R., SCHULZE,K., LEHMANN, T., HEINEMANN, U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine treated epileptic rats. (In Press)
- GABRIEL, S., EILERS, A., LEWEKE, F.M., WEBER-LUXENBURGER, G., HEINEMANN, U. Stimulus induced changes in $[K^+]_o$, slow field potentials and glial membrane potentials in area CA1 of rat hippocampal slices: evidence for spatial K^+ buffering (In Revision).

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

Bücher und Buchkapitel:

- Heinemann, U., Eder, C. Control of neuronal Excitability. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, Eds. Engel, J.jr., Pedley, T.A. , Philadelphia: Lippincott-Raven Publ. 1997.

Abstracts:

- DRAGUHN, A., GUTIÉRREZ, R., GABRIEL, S. & HEINEMANN, U. (1997). Altered connectivity in hippocampal explant cultures causes enhanced excitation of dentate granule cells. (Göttinger Neurobiology Report 1997, *Proceedings of the 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997*, Volume II)(Abstract)
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Ca^{2+} -activated K^+ -currents of ramified murine microglial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 433 (Suppl.), R103(Abstract)
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Effects of astrocyte-conditioned medium on cell shape and on K^+ currents of microglia. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 433 (Suppl.), R103(Abstract)
- KLEE, R., RICHTER, H., HEINEMANN, U., EDER, C. (1997). Proton currents of immunologically resting and activated microglial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 433 (Suppl.), R104 (76th Annual Meeting 11-15 March 1997, Rostock)
- SCHUCHMANN, S., MÜLLER, W., HEINEMANN, U. (1997). Cultured hippocampal trisomy 16 neurons of mice, a model of Down's syndrome, show an age dependent elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. 2, 971 (Göttinger Neurobiology Report 1997, *Proceedings of the 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997*, Volume II)
- SCHUCHMANN, S., MÜLLER, W., HEINEMANN, U. (1997). Neurons maintain their glutathione level by taking up cysteine released from glial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 433 (Suppl.), R148 (76th Annual Meeting 11-15 March 1997, Rostock)

Manuskripte in Vorbereitung:

- Gabriel, S., Kivi, A., Eilers, A., Heinemann, U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal area CA1 of juvenile rats *in vitro*.
- Kovács, R., Schuchmann, S., Schulze, K., Gabriel, S., Heinemann, U. Acute and delayed loss of neurones and astrocytes after induction of epileptiform activity in cultured hippocampal slices: Time course of Ethidium bromide fluorescence.
- Lehmann, T., Gabriel, S., Eilers, A., Kivi, A., Kovács, R., Schulze, K., Heinemann, U. Aberrant fiber connections in hippocampal slices of chronic epileptic rats demonstrated by fluorescent dextran amines.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

1. Die Eigenschaften von Astrozyten in humanem Gewebe sollen mit den Eigenschaften von Astrozyten in Präparaten aus Pilocarpin-stabilisierten und gekindelten Tieren verglichen werden. Besonders interessiert die Frage nach Veränderungen in der Expression von Ionenkanä-

len, der Kaliumregulation und die Frage nach Veränderungen in der extrazellulären Homöostase von Glutamat und GABA.

2. Mechanismen, die während eines Status epilepticus zu akuten und verzögerten Nervenzellverlusten und zu den verzögert auftretenden Verlusten von Astrozyten führen, sollen weiter charakterisiert werden. Mit Hilfe von Kreatinin, Cystin, Beta-Liponsäure und Tocopherol soll der Frage nachgegangen werden, ob Energiemangel und Produktion freier Radikale zu Glia- und Nervenzellverlusten beitragen.

3. In Hirnschnittkulturen sollen die Eigenschaften ruhender und aktivierter Mikrogliazellen weiter charakterisiert werden.

3.5.2 Methoden

Präparate

Die Untersuchungen werden an Hirnschnitten, Hirnschnittkulturen und an dissoziierten Hippokampuskulturen durchgeführt. Zusätzlich werden ergänzende Untersuchungen an dissoziierten Nerven- und Gliazellen zum Einsatz kommen. Alle Methoden sind im Labor etabliert.

Meßmethoden

1. Elektrophysiologische Meßverfahren

- ionenselektive Mikroelektroden
- intrazelluläre Ableitungen
- single electrode voltage clamp
- patch clamp

2. Bildgebende Meßverfahren

- Ca (Fura), mitochondriales Ca (rhod2), Mitochondrienpotential (Rhodamin123, Tetrachlor-tetraethylbenzimidazolcarboxycyaninjodid) NAD(P)H- Autofluoreszenz, Produktion freier Radikale (Dihydro-rhodamine 123, DCFDA, DCF), Glutathion (MBCL), pH (SNARF) u.a. Die Messungen erfolgen teilweise mit dem bereits vorhandenen PTI Image-System, teilweise mit Hilfe eines Photomultipliers. Für die Anregung der Farbstoffe wird ein Monochromatorsystem beantragt. Hochauflösende Messungen werden mit dem im Dezember 1997 installierten Noran-OZ-System vorgenommen.

3. Zelltod und Histologie

Zelltod wird mit Ethidiumbromid nachgewiesen. Zum Teil werden Gegenfärbungen mit Acridin-Orange vorgenommen. Phagozytose soll nach Vormarkierung der Hirnschnitte und Hirnschnittkulturen mit Dextranaminen nachgewiesen werden. Die vorgefärbten Hirnschnittkulturen werden dann einer Anfallsserie ausgesetzt und nachgeschaut, ob in Mikrogliazellen

Dextranaminfluoreszenz sichtbar wird. Diese Messungen werden insbesondere bei dem verzögert auftretenden Zelltod von Interesse sein.

Hirnschnitte und Hirnschnittkulturen werden darüber hinaus mit GFAP und verschiedenen Mikrogliazellmarkern charakterisiert. Verwendet werden MHC Klasse II, ICAM4N-I, LFA-1 und VLA-4 Antikörper.

Epilepsie-Modelle

Epileptiforme Aktivität an Hirnschnitten, Hirnschnittkulturen und dissoziierten Kulturen des Hippokampus wird durch Absenken der extrazellulären Magnesiumkonzentration induziert. Diese Aktivität kann durch Glutamat-Rezeptor-Antagonisten einschließlich NMDA-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden. Zum Einsatz kommt auch 4-Aminopyridin-induzierte epileptiforme Aktivität. Diese wird nur teilweise durch Glutamat-Rezeptor-Antagonisten kontrolliert. Ein erheblicher Teil der Aktivität beruht auf synchroner Freisetzung von GABA aus Interneuronen. Dieser Teil wird durch GABA-A-Rezeptor-Blocker kontrolliert. Neben diesen akuten Modellen werden chronische Epilepsiemodelle verwendet. Sie sind an dem humanen Resektionsmaterial orientiert.

20 % des Resektionsmaterials stammt von Patienten mit einer extrahippokampalen Läsion. In diesem Fall zeigt die klinische Erfahrung, daß bei Beteiligung des Hippokampus Anfallsfreiheit nur nach Entfernen des Hippokampus erreicht wird. Wir gehen davon aus, daß in diesen Hippocampi anfallsinduzierte Veränderungen nachweisbar sind. Ein tierexperimentelles Modell für anfallsbedingte Veränderungen im Hippokampus ist die Kindling-Epilepsie. Wir implantieren bipolare Stimulationselektroden in die Mandelkerne. Nach einer Erholungszeit von einer Woche wird täglich einmal mit 1s, 50Hz, 0,1 ms, 400 Mikro-Ampere gereizt, bis 5 konsekutive sekundär-generalisierte tonisch-klonische Anfälle (Stadium V) erreicht worden sind. Kombinierte entorhinale Kortex-Hippokampus-Hirnschnittpräparate werden einen Tag und vier Wochen nach dem letzten Anfall präpariert und physiologisch untersucht. Nach Vorbehandlung mit Kollagenase und DNase bzw. Trypsin oder Pronase werden mit Hilfe einer kurzen Piezo-Vibration Nerven- und Gliazellen aus interessierenden Arealen freigesetzt und für Messungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode zur Verfügung gestellt.

80 % des humanen Materials ist durch eine Hippokampus-Sklerose wechselnden Ausmaßes charakterisiert. Die Hippokampus-Sklerose kann am Tier durch einen länger anhaltenden Status epilepticus induziert werden. 3 - 6 Wochen später entwickeln die Tiere spontan auftretende Temporallappen-Anfälle. Wir verwenden das Pilocarpin-Modell. Hierzu wird dem Tier, nach Vorbehandlung mit Scopolamin, Pilocarpin intraperitoneal injiziert. Der resultierende Status wird nach 1, 2 oder 6 Stunden mit Barbiturat unterbrochen. Hirnschnitte werden von den Tieren eine Woche nach Status und 2 Wochen nach Beginn der spontanen Anfälle präpariert. Das Auftreten der Anfälle wird durch kontinuierliche 24-Stunden-Video-Überwachung dokumentiert.

Humanes Gewebe erhalten wir von der neurochirurgischen Klinik der Charité am 4 km entfernten Standort Wedding. Während der Operation exerpiert Frau Dr. Gabriel die klinischen Befunde des Patienten (MRT, CT, EEG und Video-EEG, Tiefenableitungen, Erkrankungsalter, Dauer der Epilepsie und neuropsychologische Befunde). In der Phase der akuten Resektion protokolliert sie den OP-Verlauf (Dauer einer möglichen Hypoxie, mögliche Komplikationen) und übernimmt das Gewebe. Im Schnellschnittlabor neben dem OP werden mit Hilfe eines Vibratoms Hippokampus-Schnitte sowie - wenn möglich - entorhinale Kortex-Schnitte

hergestellt und mit einer Transportkammer unter kontinuierlicher Sauerstoffversorgung in unser Labor gebracht. Die Hirnschnitte erreichen das Labor meist gegen 15 Uhr und werden unter Anleitung von Frau Dr. Gabriel während der folgenden Nacht und dem folgenden Vormittag elektrophysiologisch charakterisiert. Die Gewebeprobe aus dem Resektat werden von der Neuropathologie diagnostisch bearbeitet, und 2 - 3 Hirnschnitte aus dem Resektat werden in unserem Labor mit GFAP-Antikörpern routinemäßig gefärbt, um Variationen in der Sklerose mit beobachteten Veränderungen der Gliazellreaktionen korrelieren zu können.

3.5.3 Arbeitsprogramm

1. Untersuchungen zu Veränderungen der Kaliumregulation in chronisch epileptischem Gewebe

Zum Einsatz kommen Hirnschnittpräparate von 2 Wochen jungen Ratten, adulten Kontroll-Ratten sowie von Ratten nach durchlittenem Status epilepticus mit und ohne Temporallappenepilepsie und von gekindelten Tieren einen Tag und 6 Wochen nach dem letzten Anfall.

Experiment I

Untersuchungen der Wirkungen von Barium und Caesium auf iontophoretisch induzierte Kaliumkonzentrationserhöhungen in Gegenwart von CNQX/2APV. Bestimmung der scheinbaren Volumenfraktion und des Tortuositätsfaktors mit Hilfe des Voltoro-Programms von C. Nicholson. Vergleich mit iontophoretisch induzierten TPA-Signalen, einem Marker für den Extrazellulärraum.

Die Differenz zwischen Kalium- und TPA-Verteilungsraum zeigt die zelluläre Aufnahme von Kalium an. Vorexperimente deuten daraufhin, daß Barium den Verteilungsraum für Kalium verkleinert. Es wird erwartet, daß der Verteilungsraum für Kalium im gliotischen Gewebe von Ratte und Mensch verkleinert ist und daß die Effekte von Barium auf die Kaliumsignale geringer ausfallen als in normalem Gewebe. Es wird ebenfalls erwartet, daß im juvenilen Hippokampus die Wirkungen von Barium auf die Kaliumsignale geringer ausfallen als im adulten normalen Gewebe.

Die Beteiligung von Gliazellen an der Kaliumaufnahme wird durch Messungen an Präparaten gesichert, in denen durch Behandlung mit hohen Kainatkonzentrationen die Nervenzellen zum Absterben gebracht wurden. Zur veränderten Funktion der Natrium-Kalium-ATPase wird die Wirkung von Ouabain auf die Größe des Extrazellulärraums und auf die iontophoretisch induzierten Kaliumsignale verglichen. Es kommen die gleichen Präparate zum Einsatz wie bei den Barium-Experimenten.

Experiment II

Untersuchung der Wirkung von Barium, Caesium und Ouabain auf Kaliumsignale, die durch ausschließlich antidrome Aktivierung von Körnerzellen oder Pyramidenzellen induziert wur-

den. Unterdrückung synaptischer Komponenten durch CNQX/2APV. Untersuchung der Wirkungen von Barium und Caesium auf reizinduzierte Kaliumsignale am Ort der maximalen Kaliumakkumulation. Bestimmung des Effektes von Barium und Caesium auf die maximale Konzentration. Es kommen die gleichen Hirnschnittpräparate wie in Experiment 1 zum Einsatz.

Experiment III

Untersuchung der Wirkungen von Barium, Caesium und Ouabain auf Laminarprofile der Kaliumkonzentrationsänderungen und der begleitenden langsamen Potentialänderungen. Bestimmung der CSD.

Experiment IV

Messung der Kalium-Leckleitfähigkeit und des Einwärtsgleichrichterstroms an akut isolierten Gliazellen aus normalem und pathologisch verändertem Gewebe. Untersuchungen der Effekte von Barium und Caesium auf diese Ströme. Diese Daten werden korreliert mit Expressionsdaten zu klonierten Einwärtsgleichrichter- und Leckleitfähigkeiten (Kooperation mit A.M. Brown und E. Ficker in Cleveland).

Experiment V

Untersuchungen der Effekte von Tiagabin und Nipicotinsäure auf IPSPs im CA1- und CA3-Gebiet des Hippokampus aus humanen Resektaten und pilokarpin-behandelten Tieren. Vergleich sklerotischen und nicht-sklerotischen humanen Gewebes, Messung von GABA-Transportströmen in Gegenwart von Bicucullin an akut isolierten Astrozyten. Messung des über Transport freigesetzten GABAs (Beta-Alanin, Nipicotinsäure) anhand der postsynaptischen Ströme während lokaler Druckapplikation der Blocker.

Experiment VI

Messungen der Wirkungen von Glutamat-Transport-Blockern in chronisch epileptischem Gewebe auf NMDA-vermittelte EPSPs an normalen und chronisch epileptischen Hirnschnitten einschließlich menschlichen Gewebes. Analyse der Eigenschaften von natriumabhängigen Glutamat-Transportströmen in Gegenwart von CNQX, 2APV und MCPG, einem Breitband-Antagonisten für alle drei Klassen metabotroper Glutamat-Rezeptoren.

Diese Experimente werden von Frau Dr. Siegrun Gabriel verantwortlich betreut. Einige der Punkte werden im Rahmen medizinischer Promotionsarbeiten abgearbeitet.

2. Nerven- und Gliazellverluste während epileptiformer Aktivität

A. Hirnschnittkulturen

Experiment I

Einfluß von verschiedenen Protektionsmechanismen auf anfallsbedingte Zellschäden in hippocampalen Kulturen. Ethidiumbromid wird für 1 h appliziert und dann eine weitere Stunde ausgewaschen. Ethidiumbromid wird unmittelbar nach Anfallsende, 1 Tag, 2 Tage und 1 Woche nach einem Status epilepticus appliziert. Verglichen werden jeweils scheinbehandelte Kontrollkulturen, Kulturen, in denen das Konvulsivum (4AP oder Niedrig-Magnesium) bei erniedrigter Temperatur (30°C) appliziert wurde, so daß keine Krampfaktivität entsteht, und Kulturen, in denen epileptiforme Aktivität ausgelöst wurde. Diese Ergebnisse werden verglichen mit Kulturen, bei denen dem anfalls-induzierenden Medium Beta-Liponsäure, Tocopherol oder Kreatin zugesetzt wurde. Außerdem sollen die Auswirkungen von Cystingaben auf die zellulären Glutathionspiegel bestimmt werden. Die Behandlungen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Status epilepticus vorgenommen.

Umgekehrt wird die Auswirkung des Absenkens der Glutathionspiegel nach Vorbehandlung mit Alphaaminoadipinsäure und nach kurzzeitiger Behandlung mit BMSO auf die krampf-induzierten Zellschäden abgeschätzt. Dabei soll zwischen glialen und neuronalen Zellschäden differenziert werden.

Experiment II

Sauerstoffspannung und neuronale sowie gliale Schädigung

Die Experimente an Hirnschnittkulturen wurden bisher mit 95% Sauerstoff und 5 % CO₂ Be-gasung durchgeführt. Die dabei erzielte Sauerstoffspannung in der Kultur übersteigt möglicherweise den Wert, der sich in vivo bei starker Durchblutungszunahme während eines Anfalls einstellt. Deshalb wird in Zusammenarbeit mit der von der DFG geförderten klinischen Forschergruppe (Leiter: Prof. Arnold Villringer) untersucht, wie sich die Sauerstoffspannung während eines epileptischen Anfalls verändert. Wir wollen mit Hilfe einer Gasmischpumpe verschiedene definierte Sauerstoffspannungen in den Hirnschnittkulturen erzeugen und im Vergleich zu den Daten der klinischen Forschergruppe klären, ob eine vermehrte Sauerstoffspannung im normalen und epileptischen Gewebe zu den Zellschädigungen beiträgt. Es werden 2 h lang Krampfserien in den Kulturen induziert und die Ethidiumbromidfluoreszenz als Funktion der Sauerstoffspannung während des Experimentes zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Status epilepticus aufgetragen. Es wird in Dünnschnittpräparaten bestimmt, ob Änderungen der Sauerstoffspannung mehr die neuronalen oder glialen Kompartimente betreffen. Quantifiziert wird ferner die Färbung im Zytosol von Glia- und Nervenzellen gegenüber der Anfärbung im Zellkern. Diese Änderungen werden als Funktion der Sauerstoffspannung analysiert.

Experiment III

Bei anfallsrelevanten Sauerstoffspannungen soll das Verhalten von Nerven- und Gliazellen in bezug auf intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderungen, Mitochondrienpotential, Produktion von ROS, NAD(P)H-Autofluoreszenz und von Glutathionspiegeln während und nach einem Status epilepticus analysiert werden. Es soll zwischen Nerven- und Gliazellen unterschieden werden. Diese Daten sollen in Neuronen und Astrozyten erfaßt werden. Diese Messungen werden sehr von der Möglichkeit profitieren die ein 2-Photonen konfokales Mikroskop bietet.

Experiment IV

An den Schnittkulturen soll die Migration von Mikrogliazellen in das bei Anfällen entstehende Läsionsareal dokumentiert werden. Die Proliferation von Mikrogliazellen soll daraufhin geprüft werden, ob sie anfalls- oder läsionsinduziert erfolgt. Dies setzt voraus, daß es uns gelingt, Doppelfärbungen für BRDU und Mikrogliazellmarker gleichzeitig vorzunehmen. Bei diesen Experimenten hat uns Robert Nitsch Hilfestellung zugesagt.

Diese Untersuchungen werden von Richard Kovacs in Verbindung mit dem beantragten Biologen vorgenommen und von Frau Eder und U. Heinemann gemeinsam betreut.

3. Untersuchungen an dissoziierten Kulturen

Während epileptiformer Aktivität an 4AP behandelten Zellen sollen die Veränderungen von Ca_i , pH, freien Radikalen, Mitochondrienpotentialen und NAD(P)H-Autofluoreszenz während epileptiformer Aktivität, induziert durch 4AP, vergleichend untersucht werden. Drei Bedingungen sollen verglichen werden: Epileptiforme Aktivität, die durch 4AP induziert wurde; epileptiforme Aktivität, die in Gegenwart von Bicucullin beobachtet wird und epileptiforme Aktivität, die in Gegenwart von Glutamatrezeptorantagonisten auszulösen ist.

Experiment I

Es soll geklärt werden, ob und welche Formen epileptiformer Aktivität zu Neuron- und Gliazellverlusten führen. Dazu werden die Zellkulturen zu unterschiedlichen Intervallen nach einer Periode epileptiformer Aktivität mit Zelltodmarkern und Vitalitätsmarkern gefärbt und anhand der mikroskopischen Bilder geklärt, in welchem Ausmaß Astrozyten und Neurone von einer Schädigung betroffen sind.

Experiment II

Die intrazellulären Vorgänge während epileptiformer Aktivität sollen durch Messung der Calcium-Konzentration, des Mitochondrienpotentials, der Produktion freier Radikale, des NADH-Signals und der Glutathionkonzentration sowie des Membranpotentials und insbesondere der Nachhyperpolarisationen nach Anfällen analysiert werden. Es wird erwartet, daß synchronisierte GABAerge Potentiale zu einem vernachlässigbaren Zelltod führen, während ausschließlich glutamaterge epileptiforme Entladungen mit einem maximalen Zelltod einhergehen. Es wird weiterhin vermutet, daß dieser Zelltod zunächst Neurone und erst sekundär Gliazellen betrifft. Es wird davon ausgegangen, daß während glutamaterger epileptiformer Aktivität Gliazellen mit Kalzium-Oszillationen, Mitochondrienmembran-Potentialänderungen, der Produktion freier Radikale sowie mit einem absinkenden NADH-Signal reagieren. Auch diese Untersuchungen sollen zum Teil durch Messungen mit dem hochauflösenden im Z Projekt beantragten konfokalen Mikroskop durchgeführt werden.

Experiment III

Wie an Hirnschnittkulturen sollen Rescue-Experimente mit Kreatin, Beta -Liponsäure und Tocopherol sowie Cystinvorbehandlungen durchgeführt werden. Die Substanzen sollen vor, unmittelbar nach epileptiformer Aktivität und 24 h nach Beendigung der epileptiformen Entladungen appliziert werden. Der Zelltod wird durch Live Death Assays mit Ethidiumbromid und Acridin-Orange quantifiziert. Das neuronale und gliale Kompartiment wird durch Gegenfärbungen mit GFAP charakterisiert sowie durch Messungen der Zellen im Phasenkontrast analysiert.

Diese Experimente werden teilweise von Sebastian Schuchmann in Verbindung mit Medizinstudenten, teilweise von U. Heinemann betreut.

4. Untersuchungen zu den Eigenschaften von Mikrogliazellen

Die bisherigen Untersuchungen an Mikrogliazellen richteten sich auf die Eigenschaften von kultivierten ramifizierten und amöboiden Mikrogliazellen, die mit Astrozyten-konditioniertem Medium oder unterschiedlichen Zytokinen behandelt worden waren.

Experiment I

An Schnittkulturen und an dissoziierten Kulturen soll geklärt werden, ob Krampfaktivität und resultierender Zellschaden zur Proliferation von Mikrogliazellen führt. Das soll mit Hilfe von BRDU-Markierungen erfolgen. Es soll geklärt werden, ob BRDU-positive Zellen sich im Bereich der Läsionszonen ansiedeln.

Anhand der Ethidiumbromid- bzw. Dextranaminfärbung von Lysosomen in Mikrogliazellen soll geklärt werden, ob und in welchem Zeitverlauf Mikrogliazellen in Zonen verstärkter Zellverluste phagozytotisch aktiv werden.

Experiment II

Es soll untersucht werden, ob Mikrogliazellen im Bereich von Läsionen verstärkt freie Radikale bilden. Dies soll mit Hilfe von Farbstoffreaktionen über bildgebende Verfahren nachgewiesen und in Beziehung zu intrazellulären Kalziumkonzentrationsänderungen und pH-Änderungen gesetzt werden. Es soll geklärt werden, ob Konzentrationsänderungen des intrazellulären freien Kalziums aufgrund eines extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms durch spannungsaktivierte oder CRAC-Kanäle zustande kommen, oder ob sie aufgrund der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher entstehen. In parallelen Untersuchungen an kultivierten Mikrogliazellen sollen die Mechanismen der Regulation des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels sowie die Eigenschaften und die Regulation der CRAC-Kanäle detailliert untersucht werden. Es soll außerdem herausgefunden werden, ob die Bildung freier Radikale durch Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration modulierbar ist. In weiteren Experimenten soll geklärt werden, welche Rolle verschiedene Ionen-Transporter in Mikrogliazellen während unterschiedlicher Aktivierungszustände spielen (z. B. Na/Ca-, Na/H- und Ca/H-Austauscher). Mit Hilfe von Messungen des intrazellulären pH-Wertes durch bildgebende Verfahren soll außerdem untersucht werden, welche Änderungen des intrazellulären pH-Wertes der Mikrogliazellen während zellulärer Aktivierung auftreten. Die Beziehung zur Expression der von uns erstmals an Mikrogliazellen beschriebenen Protonenkanäle soll weiter analysiert werden.

Experiment III

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von phagozytotisch aktiven und/oder von freien Radikalen bildenden Mikrogliazellen sollen in den Hirnschnittkulturen in akuten Epilepsiemodellen sowie in dissoziierten Kulturen in bezug auf die exprimierten spannungs- und Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle, auf Protonen-Kanäle, Ca^{2+} - und Na^+ -Kanäle analysiert werden. Diese Experimente werden mit Hilfe von Patch-clamp-Messungen in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt. In Kontrollexperimenten an gesunden Hirnschnittkulturen sollen die exprimierten Ionenkanäle und deren Regulation an ramifizierten Mikrogliazellen detailliert untersucht werden. Das Ionenkanal-Expressionsmuster der Mikrogliazellen soll außerdem in chronisch epileptischem Gewebe analysiert werden.

Experiment IV

Mit Antikörper-Komplementreaktionen soll geklärt werden, ob sekundärer Zelltod in Hirnschnittkulturen und dissoziierten Kulturen durch Ausschalten der Mikrogliazellen verhindert werden kann.

Experiment V

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Fischer in Düsseldorf soll an dissoziierten Kulturen geklärt werden, ob und welche Zytokine von Mikrogliazellen nach einem Status epilepticus sezerniert werden.

Diese Experimente sollen von Frau Dr. Eder verantwortlich geleitet werden und von dem beantragten Doktoranden bearbeitet werden.

3.5.4 Zeitplan

Die drei Experimentiergruppen werden parallel bearbeitet in der Reihenfolge der genannten Experimente.

3.5.5 Versuchsgenehmigungen

Für die Experimente liegen Genehmigungen des Landes Berlin bzw. der Ethik-Kommission des Virchow-Klinikums vor.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Das Projekt steht methodisch in enger Beziehung zu Ansätzen im Labor von Prof. Kettenmann, Dr. Dirnagl und Dr. Müller. Herr Prof. Nitsch unterstützt uns bei den morphologischen Untersuchungen. Herr Dr. Blasig hat angeboten, Glutathion biochemisch an den Kulturen zu bestimmen. Herrn Dr. Grune werden wir verschiedene konditionierte Mikrogliazellkulturen zur Verfügung stellen und von seiner Expertise profitieren. Die Nutzung der im Projekt von Herrn Dirnagl erzeugten transgenen Maus wird es uns an Hirnschnittkulturen erleichtern, Mikrogliazellen zuverlässig zu erkennen. Von diesem Ansatz würde unser Projekt außerordentlich profitieren. Indem das Labor die Betreuung des im Z-Projekt beantragten konfokalen Mikroskopes übernimmt, werden sich die nach Beendigung der Prodekanstätigkeit von U. Heinemann bereits initiierten Kooperationen innerhalb des SFB weiter verbessern.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bevilligung 1997	2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001			
	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	
Ia-Ost	1	Ib-Ost	1	45600	Ib-Ost	1	91200	Ib-Ost	1	91200	Ib-Ost	1	45600
		Ia/2	1	19800	Ia/2	1	39600	Ia/2	1	39600	Ia/2	1	19800
Zusammen	1	zusammen	2	65400	zusammen	2	130800	zusammen	2	130800	zusammen	2	65400
SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	
	522		15.000	522		30.000	522		30.000	522		15.000	
	515		50.200	-			-			-			
	zusammen		65.200	zusammen		30.000	zusammen		30.000	zusammen		15.000	
I	Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			
	-			-			-			-			

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung 3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	1) C. Eder, Dr. rer. nat.	Physiologie	Physiologie d. Cha- rité	30	1995	II a
	2) U. Heinemann, Dr. med., Prof. C4	Physiologie	"	12		C4
	3) A. Draguhn Dr. med, C1	Physiologie	"	5		C2
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	4) H. Siegmund, Dr.		Physiologie d. Cha- rité	4	1995	II a/O
	5) H.-J. Gabriel, Dr.		"	4		II a/O
	6) K. Schulze, Dr.		"	12		Vb
	7) S. Latta, TA		"	30		Vb
	8) A. Piechotta, TA		"	12		VIb
Ergänzungsausstattung 3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	1) S. Gabriel, Dr. med.	Physiologie	Physiologie d. Cha- rité	40	1995	Ib/O
	2) n.n.	Physiologie	"	20		IIa/2 O
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

1. Prof. Dr. med. Uwe Heinemann leitet die Experimente zur Gliatoxizität und zu veränderten Funktionen von Astrozyten. Er beteiligt sich an den Präparationen und der Erstellung von Publikationen.

2. Dr. Claudia Eder kümmert sich um die Charakterisierung der Eigenschaften von Mikrogliazellen in dissoziierten und organotypischen Kulturen.

3. Dr. med. Andreas Draguhn berät bei Untersuchungen zum GABA-Transport und stellt dem Projekt seine Expertise mit schnellen Applikationsmethoden und Untersuchungen an akut isolierten Zellen zur Verfügung.

4. und 5. Herr Dr. Hans-Jürgen Gabriel und Herr Dr. Herbert Siegmund unterstützen mit 10 % ihrer Arbeitszeit das Projekt mit apparativer Entwicklung, Datenerfassung und Dokumentationen sowie der Herstellung von Projekt-spezifischer Software.

6. Die technische Mitarbeiterin Dr. Katrin Schulze übernimmt die Herstellung von Hirnschnittkulturen und ist für die chronischen Epilepsie-Modelle (Pilocarpin, Kindling) verantwortlich.

7. und 8. Frau Sieglinde Latta und Frau Antje Piechotta sind als technische Mitarbeiterinnen für die Betreuung der Mikroglia- und Astrozytenkulturen verantwortlich. Sie übernehmen auch einen Teil der immunologischen Charakterisierung von Mikrogliazellen.

Das Projekt wird durch die mechanische und elektronische Werkstatt des Institutes sowie vom Tierstall der Charité unterstützt.

Personal der Ergänzungsausstattung

1. Dr. med. Siegrun Gabriel, BAT Ib O

Frau Dr. Gabriel betreut die Experimente an Hirnschnittkulturen, Pilocarpin-Tieren und an humanem Gewebe. Sie stellt im Virchow-Klinikum die humanen Hirnschnitte her, transportiert sie ins Labor und nimmt die Messungen zu Störungen der Kaliumregulation vor. Sie fabriziert Elektroden-Ensembles zu iontophoretischen Applikationen von Kalium, Barium, Cesium sowie verschiedener Kanalblocker für Kaliumleckleitfähigkeiten. Sie leitet medizinische Doktoranden im Rahmen des Projektes an. Frau Gabriel hat sich mittlerweile auch in die Patch-Clamp-Technik eingearbeitet und hat es übernommen, akut isolierte Astrozyten sowie die Eigenschaften von Astrozyten in situ zu charakterisieren. Darüber hinaus ist Frau Gabriel für die histologische Dokumentation der Tiermaterialien und des humanen Gewebes verantwortlich.

Frau Dr. Gabriel wurde zwar aus dem SFB-Projekt für 3 Jahre unterstützt, aber da Frau Dr. Eder für ihren Projektteil ebenfalls Hilfe benötigte, habe ich Dr. Rolf Klee für 2 Jahre dem Projektteil von Frau Eder zugeordnet und Frau Gabriel zum Ausgleich zunächst außerhalb des

Projektes liegende Aufgaben übertragen müssen. Für die Untersuchungen ist aber ihre vollwertige Mitarbeit erforderlich.

2. Eine BAT IIA/2 - Stelle für einen Dipl.-Biologen oder Dipl.-Physiker

Der Doktorand soll sich um die Charakterisierung der Stromeigenschaften von Mikrogliazellen in Slice-Kulturen kümmern. Gemeinsam mit Frau Dr. Eder soll er die Dynamik von Kalziumkonzentrationsänderungen und der Produktion freier Radikale mit bildgebenden Meßverfahren in den Slice-Kulturen übernehmen. Zur Charakterisierung der Mikrogliazellen in Slice-Kulturen soll er immunhistochemische Markierungsverfahren aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Nitsch übernehmen.

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung				
Kleingeräte (515)	20.000	40.000	40.000	20.000
Verbrauchsmaterial (522)	5.000	10.000	10.000	5.000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	65.158	30.000	30.000	15.000

Ergänzungsausstattung

Kennziffer 515 - Kleingeräte bis 20.000,00 DM (brutto)

1. Filtersätze für Axioskop DM 3.783,50

Die Filtersätze werden zur Darstellung der Fluoreszenzsignale benötigt.

2. Photomultiplier - Ratio- Fluoreszenz- D101-Photometer DM 18.745,60

Der Photomultiplier soll an einem Axioskop zur schnellen Aufzeichnung von Fluoreszenzsignalen befestigt werden.

3. Delta-Ram Fast-Scanning Monochromator DM 18.128,00

Der Monochromator dient zur Anregung der applizierten Farbstoffe.

C3 Eder/Heinemann

4. Steuerung und Interface

DM 9.500,00

Die Steuerung ist zur Bedienung des Monochromators in Verbindung mit dem Experiment erforderlich.

DM 50.157,10

Kennziffer 522 - Verbrauchsmaterial

1998 und 2001 jeweils der halbe Betrag, 1999 und 2000 der gesamte Betrag

1. Elektrodenmaterial (Thetaglas, Silberdraht, Ionenaustauscher, etc.)	DM 2.000,--
2. Elektronische Bauteile (Reizisolatoren, Verstärker)	DM 3.200,--
3. Mechanische Bauteile (Tischdämpfer, Manipulatorteile)	DM 3.000,--
4. Agonisten und Antagonisten (TTX, SITS, DIDS, etc.)	DM 5.100,--
5. Chemikalien - Antikörper	DM 5.100,--
6. Substanzen für die Histologie	DM 1.800,--
7. Zellkulturmaterial (Ersatzschläuche, Glas, Meßkolben, Bechergläser)	DM 5.800,--
8. Dokumentation (Sequest-Bänder, Video-Bänder, Disketten...)	DM 800,--
9. Schreibpapier und Schreibzeiger	DM 1.200,--
10. Gase	DM 2.000,--
Gesamt:	DM 30.000,--

Begründung

Die relativ hohe Summe für Elektrodenmaterial kommt zum Teil durch Einsatz von Thetaglas zustande. Pro Meter kostet das Thetaglas z.Zt. DM 70.--. Hinzu kommt die Beschaffung von Ionenaustauschern für die Herstellung ionenselektiver Mikroelektroden. Die elektronischen Bauteile werden für die Herstellung von Temperaturregulation, Manipulatorensteuerung, Zwischenverstärkern etc. verwendet. Die mechanischen Bauteile werden zur Herstellung von Versuchsaufbauten und Manipulatoren für die Grob-Positionierung unserer Elektroden verwendet. Die Kosten für Agonisten und Antagonisten sind sehr hoch, da wir mit schnellen Perfusionsmethoden an den Hirnschnittpräparaten arbeiten. Für viele der Messungen muß kontinuierlich TTX appliziert werden, was erhebliche Kosten verursacht. Ebenso teuer ist der Einsatz von CNQX, 2-APV und anderen spezifischen Rezeptorblockern. Für die histologische Charakterisierung des Gewebes fallen hohe Kosten vor allem durch den Einsatz von Antikörpern an. Hinzu kommen Tracer für die Darstellung verschiedener Faserverbindungen. Die Herstellung von organotypischen Kulturen, Mikroglia-kulturen und von Astrozytenkulturen ist

relativ teuer. Insbesondere die Filter, auf denen die organotypischen Kulturen ausgebracht werden, belasten mit sechs DM/pro Stück unseren Etat in erheblichem Maße.

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen über 20.000,- beantragt.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C4

3.1.1 Thema:

Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration, freier Fettsäuren reaktiver Sauerstoffspezies in pathologisch veränderten und normalen Astrozyten und Neuronen

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Physiologie

3.1.3 Leiter:

Wolfgang Müller, geb. am 19. Juni 1956

Institut für Physiologie der Charite

Abt. Neurophysiologie

AG Molekulare Zellphysiologie

Tucholskystr. 2

D-10117 Berlin

Tel +49-30-2802-6121 FAX +49-30-2802-6669

email: mueller@rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

() nein (X) ja, befristet bis zum : 30.04.99

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

Untersuchungen am Menschen () ja (x) nein

klinische Studien im Bereich der

somatischen Zell- oder Gentherapie () ja (x) nein

Tierversuche () ja (x) nein

gentechnologische Versuche () ja (x) nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
bis 1995	32,4	10	40	82,4
1996	68,0	20		88
1997	68,0	20		88
1. Hj. 1998	35,1	10		45,1
Zwischen-summe	203,5	60	40	303,5
2. Hj. 1998	35,1	10	40	85,1
1999	70,2	20		90,2
2000	115,8	20		135,8
1. Hj. 2001	54,9	10		64,9

3.2 Zusammenfassung

Die Erhöhung intrazellulärer Kalziumspiegel führt in Abhängigkeit des zugrundeliegenden Mechanismus, z.B. Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, zur vermehrten Produktion von reaktiven Radikalen. Diese Radikale entstehen infolge Freisetzung und Abbau von Arachidonsäure nach Ca-abhängiger Aktivierung der Phospholipase A2 sowie durch Ca-abhängige Steigerung der mitochondrialen Produktion. Vermehrte Produktion reaktiver Radikale soll ganz wesentlich an Zellschädigungen sowohl an Nerven als auch an Gliazellen beteiligt sein. Ihre wirksame Konzentration hängt von der Wirksamkeit intrinsischer Scavenger-Substanzen wie dem Glutathion ab. Hinweise auf eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies gibt es bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, u.a. beim Down-Syndrom. In Zellkulturen des Trisomie 16-Mausmodells des Down-Syndroms fanden wir reduzierte Glutathionspiegel sowie Störungen der Ca-Homöostase, Ca-Signalgebung, intrazellulären Ca-Speicherung, mitochondrialen Depolarisation, NAD(P)H-Synthese und Radikalenproduktion einschließlich der Funktion des Complex I der Atmungskette nach Glutamatexposition, verbunden mit vermehrtem Zelltod bei Belastung.

Wir wollen mit bildgebenden Meßverfahren die molekularen Zusammenhänge zwischen verschiedenen mit den Mitochondrien kommunizierenden Ca-Signalwegen, mitochondrialer Funktion, Phospholipase A2 und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Fettsäureradikale an diploiden und trisomen Zellkulturen untersuchen. Insbesondere wollen wir die Zusammenhänge zwischen intrazellulärer Ca-Speicherung, Ca-Freisetzung, kapazitativen Ca-Einstrom, mitochondrialer Depolarisation und Ca-Aufnahme, NADH-Synthese, Erhöhung der mitochondrialen Permeabilität und vermehrte Produktion reaktiver Radikale untersuchen. Die dabei erhobenen Befunde sollen mit Hilfe des segmentalen Trisomie 16 Modells Ts65Dn an organotypischen Hirnschnittkulturen und akuten Hirnschnittpräparaten überprüft werden.

3.3 Stand der Forschung

3.3.1 Schadenskaskaden

In der Diskussion von Schädigungsmechanismen im Nervensystem standen lange Zeit Ca-abhängige Prozesse im Mittelpunkt (Siesjö, Bengtsson et al. 1989). Tatsächlich konnte eine starke intrazelluläre Kalziumbelastung nach Applikation exzitotoxischer Substanzen wie Glutamat, bei Hypoglykämie, Hypoxie und epileptischer Aktivität nachgewiesen werden. Insbesondere der verzögerte Zelltod kann durch diese Ca-Erhöhungen ausgelöst werden (Choi 1992). Da der Zelltod nicht zwangsläufig eintritt und Blockade von NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängigen Ca-Kanälen nur mäßig neuroprotektiv wirkt, richtete sich das Interesse vermehrt auf andere Mechanismen, nämlich intrazelluläre Freisetzungsprozesse von Ca und insbesondere freie Sauerstoffradikale. Deren Produktion erfolgt sowohl Ca-abhängig als auch Ca-unabhängig (Volicer and Crino 1990; Cadet 1994; Volterra, Trotti et al. 1994). Ca-abhängig erfolgt eine Aktivierung von Phospholipasen, wobei beim Abbau der freigesetzten Fettsäuren freie Radikale entstehen. Desweiteren entstehen freie Radikale bei der oxydativen Phosphorylierung in den Mitochondrien. Auch hier führt mitochondriale Ca-Aufnahme zu verstärkter Produktion freier Radikale. Ca-Erhöhungen, die unter Stimulation von NMDA-Rezeptoren erfolgen, sind sowohl in bezug auf vermehrte Freisetzung von Arachidonsäure als auch vermehrte Produktion freier Radikale besonders wirksam (Dumuis, Sebben et al. 1988; Dumuis, Pin et al. 1990; Lafon, Pietri et al. 1993). In isolierten Mitochondrien führt Ca-Exposition zur vermehrten Bildung von Hydroxylradikalen, die in einer positiven Rückkopplung eine vermehrte Bildung von freien Radikalen aufrechterhalten. Zusätzlich kommt es zu einer Hemmung des Komplexes I der Atmungskette (Dykens 1994). In bezug auf Zellschädigung infolge glutamaterger Exzitotoxizität zeigt sich eine selektive neuroprotektive Wirkung schneller Ca-Chelatoren (BAPTA) gegenüber langsamen Ca-Chelatoren (EGTA u.a.) (Tymianski, Charlton et al. 1994). Bei anoxisch/aglykämischer Belastung von Slice-Kulturen kommt dazu ein präsynaptischer neuroprotektiver Effect von BAPTA (Abdel-Hamid and Tymianski 1997). In unseren eigenen Untersuchungen finden wir eine konzentrationsabhängige Potenzierung oder Unterdrückung der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale durch BAPTA bei exogener Applikation von hohem K wie von Glutamat/Glyzin. Dies weist auf eine Bedeutung schneller postsynaptisch lokalisierter Ca-Signale bei der Aktivierung von Schadenskaskaden hin. In bezug auf die Ca-Aufnahme von Mitochondrien fanden wir an kultivierten Astrozyten und Neuronen eine besondere Rolle von intrazellulären Ca-Freisetzungsprozessen für mitochondriale Ca-Aufnahme (in preparation), ähnlich wie in einigen Zelllinien beschrieben (Rizzuto, Brini et al. 1993; Rizzuto, Bastianutto et al. 1994). Dabei spielt an T-Lymphozyten und anderen nichterregbaren Zellen offensichtlich auch Freisetzungs-aktivierter Ca-Einstrom (ICRAC) eine Rolle (Hoth, Fanger et al. 1997). Blockade der mitochondrialen Transitionsproteine mit Cyclosporin A verhindert mitochondriale Depolarisation durch Ca-Aufnahme (White and Reynolds 1996). Hemmung von Phosphatasen durch 'Okadaic acid' scheint die mitochondriale Aufnahme von Ca ebenfalls zu hemmen (Hoek, Walajtys et al. 1997).

3.3.2 Das Trisomie 16-Mausmodell des Down-Syndroms

Aufgrund einer genetischen Homologie zwischen dem Maus-Chromosom 16 und dem humanen Chromosom 21 gilt die Trisomie 16-Maus als ein Modell für das humane Down-Syndrom (Reeves, Gearhart et al. 1986). Durch die Trisomie 21 bzw. 16 wird eine Reihe von Genprodukten überexprimiert, u.a. APP und SOD. Die durch die SOD bedingte Umwandlung von

freien Sauerstoffradikalen in H₂O₂ scheint dabei nur bedingt protektiv, da der Abbau von H₂O₂ ebenfalls toxisch wirkt bzw. den zelleigenen Schutzstoff Glutathion (GSH) verbraucht. Im Trisomie 16-Mausmodell in Kultur wie in fetalen Zellen des Down-Syndroms gibt es Evidenzen für eine erhöhte Produktion freier Sauerstoffradikale, u.a. auch durch die Mikroglia, als Ursache für vermehrten Zelltod (Stabel, Kleu et al. 1997; Busciglio and Yankner 1995; Colton, Yao et al. 1990). Im Trisomie 16-Mausmodell kann dieser vermehrte Zelltod dabei durch vermehrte Synthese des Schutzstoffes Glutathion nach Gabe von Cystin oder Cystein weitgehend verhindert werden (Stabel, Kleu et al. 1997). Bei der Trisomie 16 zeigt sich dabei altersabhängig eine Erhöhung der Ca-Ruhe Spiegel (Bambrick, Golovina et al. 1997; Müller, Heinemann et al. 1997; Schuchmann, Müller et al. 1998) sowie der glutamatinduzierten Depolarisation der Mitochondrien durch Ca-Aufnahme (Schuchmann, Müller et al. 1998). Erhöhte ATP-abhängige Ca-Speicherung in intrazellulären Organellen sowie unterdrückte Neurotransmitter-induzierte Ca-Signale in Astrozyten spielen vermutlich für die erhöhte Produktion freier Radikale ebenfalls eine Rolle. Verminderte Kompensationsfähigkeit der NAD(P)H-Synthese und Ausbleiben eines hemmenden Effektes von Komplex-I Blockade auf die Radikalenproduktion sind weitere pathophysiologische Kennzeichen der Trisomie 16-Maus (Schuchmann, Müller et al. 1998). Aufgrund anderer Trisomie 16-bedingter Schäden ist dieses Modell perinatal lethal und kann daher über längere Zeit nur in Kultur oder mit Transplantaten untersucht werden. Das Problem des Überlebens wurde mit dem Modell einer segmentalen Trisomie (Ts65Dn) gelöst, bei dem tatsächlich eine Degeneration septohippocampaler Neurone, eine astrozytäre Hypertrophie sowie Lernstörungen gezeigt werden konnten (Reeves, Irving et al. 1995; Demas, Nelson et al. 1996; Holtzman, Santucci et al. 1996).

Literatur

- Abdel-Hamid, K. M. and M. Tymianski Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins *J Neurosci* 17: 3538-3553, 1997.
- Bambrick, L. L., V. A. Golovina, et al. Abnormal calcium homeostasis in astrocytes from the trisomy 16 mouse *Glia* 19: 352-358, 1997.
- Bindokas, V. P., J. Jordan, et al. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine *J Neurosci* 16: 1324-1336, 1996.
- Busciglio, J. and B. A. Yankner Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro *Nature* 378: 776-779, 1995.
- Cadet, J. L. Free radicals and neurodegeneration *Trends Neurosci* 17: 192-194, 1994.
- Choi, D. W. Excitotoxic cell death *J Neurobiol* 23: 1261-1276, 1992.
- Colton, C. A., J. B. Yao, et al. Enhanced production of superoxide anion by microglia from trisomy 16 mice *Brain Res* 519: 236-242, 1990.
- Demas, G. E., R. J. Nelson, et al. Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice *Behav Brain Res* 82: 85-92, 1996.
- Dumuis, A., J. P. Pin, et al. Arachidonic acid released from striatal neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisqualate receptors *Nature* 347: 182-184, 1990.

- Dumuis, A., M. Sebben, et al. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons *Nature* 336: 68-70, 1988.
- Dykens, J. A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration *J Neurochem* 63: 584-591, 1994.
- Finkbeiner, S. M. Glial calcium *Glia* 9: 83-104, 1993.
- Hoek, J. B., R. E. Walajtys, et al. Hormonal stimulation, mitochondrial Ca^{2+} accumulation, and the control of the mitochondrial permeability transition in intact hepatocytes *Mol Cell Biochem* 174: 173-179, 1997.
- Holtzman, D. M., D. Santucci, et al. Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13333-13338, 1996.
- Hoth, M., C. M. Fanger, et al. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes *J Cell Biol* 137: 633-648, 1997.
- Lafon, C. M., S. Pietri, et al. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity *Nature* 364: 535-537, 1993.
- Müller, W., U. Heinemann, et al. Impaired Ca-signaling in astrocytes from the Ts16 mouse model of Down syndrome *Neurosci Lett* 223: 81-84, 1997.
- Reeves, R. H., J. D. Gearhart, et al. Genetic basis for a mouse model of Down syndrome *Brain Res Bull* 16: 803-814, 1986.
- Reeves, R. H., N. G. Irving, et al. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits *Nat Genet* 11: 177-184, 1995.
- Rizzuto, R., C. Bastianutto, et al. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells *J Cell Biol* 126: 1183-1194, 1994.
- Rizzuto, R., M. Brini, et al. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria *Science* 262: 744-747, 1993.
- Schuchmann, S., W. Müller, et al. Altered Ca^{2+} signalling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mice - a model of Down syndrome *submitted* 1998.
- Siesjö, B. K., F. Bengtsson, et al. Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain *Ann NY Acad Sci* 568: 234-251, 1989.
- Stabel, B. J., A. Kleu, et al. Glutathione levels and nerve cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mouse--a model of Down syndrome [In Process Citation] *Brain Res* 765: 313-318, 1997.
- Tymianski, M., M. P. Charlton, et al. Properties of neuroprotective cell-permeant Ca^{2+} chelators: effects on $[Ca^{2+}]_i$ and glutamate neurotoxicity in vitro *J Neurophysiol* 72: 1973-1992, 1994.
- van den Pol, A. N., S. M. Finkbeiner, et al. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro *J Neurosci* 12: 2648-2664, 1992.
- Volicer, L. and P. B. Crino Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: a hypothesis *Neurobiol Aging* 11: 567-571, 1990.

Volterra, A., D. Trotti, et al. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes *J Neurosci* 14: 2924-2932, 1994.

White, R. J. and I. J. Reynolds Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure *J Neurosci* 16: 5688-5697, 1996.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

3.4.1 Glutathionspiegel in Neuronen und Gliazellen

In den trisomen Zellen fanden wir signifikant verminderte Spiegel von Glutathion (GSH), die unter Belastungssituationen auch zu einer entsprechenden Zunahme des neuronalen Zelltods führen. Diese GSH-Spiegel kommen als Fließgleichgewichte von Synthese und Verbrauch durch Oxydation zustande und können daher durch eine verminderte Synthese, einen erhöhten Verbrauch oder beides zusammen erklärt werden. Interessanterweise können die GSH-Spiegel durch vermehrte Synthese nach Gabe des Precursors Cystein (oder Cystin in Gegenwart von Glia) angehoben und damit der Zelltod signifikant gehemmt werden.

3.4.1 Ca-Homöostase und Ca-Signalgebung in Ts-16 trisomen versus diploiden Zellen des ZNS

Mit Hilfe des Ca-Farbstoffes Fura-2/AM ist es uns gelungen, einen altersabhängigen Anstieg der basalen Ca-Spiegel in trisomen gegenüber diploiden Astrozyten und Neuronen zu zeigen (Müller, Heinemann et al. 1997; Schuchmann, Müller et al. 1998). Zusätzlich kommt es zu einer massiven Verstärkung der ATP-abhängigen Ca-Aufnahme in subzelluläre Organellen, wie wir durch Permeabilisierung der Zellen und Auswaschen des zytosolischen Fura-2 zeigen konnten. Trotz dieser vermehrten Ca-Speicherung sind die astrozytären Ca-Antworten auf die Neurotransmitter Glutamat und Serotonin massiv unterdrückt (Müller, Heinemann et al. 1997). In den Neuronen löst kurze Glutamatstimulation dagegen nur relativ geringfügig reduzierte Ca-Anstiege aus. Aufgrund einer deutlich verlangsamten Rückbildung dieser Ca-Anstiege kommt es allerdings in den trisomen Zellen zu einem signifikanten Anstieg des Integrals der Ca-Konzentration über die Zeit (Schuchmann, Müller et al. 1998). Vermutlich aufgrund erhöhter UV-Photosensitivität und Bildung freier Radikale beobachteten wir auch zytosolische Ca-Erhöhungen insbesondere bei hochauflösenden Messungen mit starker mikroskopischer Vergrößerung.

In diploiden Astrozyten und Neuronen fanden wir mit dem rhod-2-Indikator für mitochondriales Ca ($[Ca]_m$) eine Blockade der mitochondrialen Ca-Aufnahme nach mitochondrialer Entkopplung mit carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazon (CCCP). Glutamatstimulation führt zu wesentlich längeranhaltenden $[Ca]_m$ -Signalen als Depolarisation mit 60mM $[K]_o$. Entleerung der Ca-Speicher durch Blockade der Ca-ATPase des glatten endoplasmatischen Reticulums (SERCA) mittels Thapsigargin blockierte den Anstieg von $[Ca]_m$ nach Glutamatstimulation. Oxidation von Dihydrorhodamin und dichlorodihydrofluorescein diacetate

(DCFDA) während Stimulation mit Glutamat bzw. hohem $[K]_o$ korrelierte im Mittel mit den Anstiegen von $[Ca]_m$. Laden der Zellen mit den Ca-Puffern BAPTA und EGTA konnte in niedriger Konzentration die Oxidation von DCFDA erheblich steigern, während eine hohe Konzentration zu einer vollständigen Hemmung führte.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ohm vom Anatomischen Institut der Charité wurden Untersuchungen zur Rolle des Amyloidproteins $\beta A4$ und von Apolipoprotein E auf die Ca-Homöostase hippokampaler Neurone und Astrozyten durchgeführt. Beide Proteine sind bekanntermaßen bei der Pathogenese des M. Alzheimer beteiligt. Unsere Untersuchungen zeigen, daß Apolipoprotein E durch $\beta A4$ ausgelöste Ca-Erhöhungen sowohl in Neuronen wie in Astrozyten erheblich verstärken kann. Diesem Mechanismus könnte eine kausale Bedeutung für den Untergang zentralnervöser Zellen beim M. Alzheimer zukommen (submitted).

Desweiteren wurden Auswirkungen des Peptids Cholecystokinin (CCK), das u.a. im Hippokampus in hoher Konzentration nachgewiesen wurde, auf hippokampale Astrozyten untersucht. Diese Untersuchungen zeigen, daß Cholecystokinin in vielen Astrozyten deutliche Ca-Erhöhungen auslöst. Dieser Effekt läßt sich auch bei Abwesenheit extrazellulären Ca auslösen, das auf eine intrazelluläre Freisetzung von Ca aus Speichern hinweist. Der Effekt wird offensichtlich durch den CCK-B Rezeptorsubtyp vermittelt, da der CCK-induzierte Ca-Anstieg durch CCK-B Antagonisten, aber nicht durch CCK-A Antagonisten blockiert wird. Da direkte neuronale Effekte von CCK eher subtil erscheinen, weisen diese Befunde möglicherweise auf Astrozyten als primäres Ziel neuronal freigesetzten CCK hin (J. Neurophysiol., in press).

3.4.2 Mitochondriale Funktion in Ts-16 trisomen versus diploiden Zellen des ZNS.

In hippokampalen Kulturen des Trisomie 16-Mausmodells konnten wir einen gegenüber diploiden Zellen vermehrten Zelltod nachweisen, der durch vermehrte Synthese des Schutzstoffes Glutathion nach Gabe von Cystin oder Cystein weitgehend verhindert werden (Stabel, Kleu et al. 1997; Schuchmann, Müller et al. 1998). Bei der Trisomie 16 zeigte sich dabei altersabhängig eine Erhöhung der Ca-Ruhe Spiegel (Müller, Heinemann et al. 1997; Schuchmann, Müller et al. 1998). Bei glutamatinduzierten Ca-Anstiegen zeigte sich in den trisomen Neuronen gegenüber diploiden Neuronen geringfügig verringerte Maximalwerte bei jedoch deutlich vergrößerten Integralen der $[Ca]_i$ Erhöhung über die Zeit aufgrund einer verlängerten Erholungszeit. Die mitochondriale Depolarisation infolge Ca-Aufnahme war dabei in trisomen Zellen deutlich größer und entsprechend dem Ca-Signal länger andauernd. Der Glutamatstimulierte Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies war in den trisomen Kulturen erheblich vergrößert. Die mit Autofluoreszenz gemessenen Verläufe von NAD(P)H zeigen einen initialen Abfall, der in den diploiden Zellen von einem kompensatorischen Überanstieg abgelöst wird. Diese Gegenkompensation fehlt in den trisomen Kulturen, es kommt lediglich zu einer langsamen Wiederannäherung an die unstimulierten Spiegel. Blockade der Komplexe I, III und IV der Atmungskette führen in den diploiden Kulturen zu einer deutlichen Hemmung der stimulierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den trisomen Kulturen keine Hemmung der Radikalenproduktion durch Blockade des I. Komplexes, d.h. es gibt eine funktionelle Störung dieses Komplexes bei der Trisomie 16.

3.4.3 Erregbarkeitsveränderungen durch Arachidonsäure und freie Radikale

In bezug auf die freien Fettsäuren konnten wir zeigen, daß Arachidonsäure den A-Strom in Neuronen mit sehr hoher Potenz unterdrückt. Dabei sind intrazellulär bereits pM-Konzentrationen wirksam, während extrazellulär etwa 100.000fache Konzentrationen vergleichbare Effekte auslösen. Unter Berücksichtigung eines Flächenanteils des Patches von 1/150 bis 1/400 ergibt sich daraus eine membranäre Diffusionshemmnis von etwa 1/15.000.000 bis 1/40.000.000. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Effektes sind aber trotzdem auch signifikante transmembranäre Effekte zu erwarten, etwa nach glialer Freisetzung von Arachidonsäure (AA). Die Unterdrückung des A-Stroms kommt nicht unter Beteiligung der Cyclooxygenase, der Lipoxygenase oder von Cytochrom P450 zustande, da Blockade dieser Enzyme den Effekt nicht verhindern. Der durch diese Enzyme nicht metabolisierte Analog ETYA ist in etwas höherer Konzentration ebenfalls wirksam, vermutlich durch spontanen Zerfall unter Freisetzung freier Sauerstoffradikale. Reduzierende Substanzen wie Ascorbinsäure oder GSH blockieren den Effekt, wobei GSH in der verwendeten Konzentration nur bei intrazellulärer Applikation wirksam ist. Zusammen mit der intrazellulären Wirksamkeit von Arachidonsäure ergibt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine intrazelluläre Oxydationsstelle, möglicherweise direkt am Kanal. Untersuchungen an Expressionssystemen zeigen entsprechende Oxydations-abhängige Modifikationen. Die entgegengesetzte Modulation in diesen Systemen könnte z.B. auf der molekularen Komposition der Kanäle beruhen. In juvenilen Zellen, von denen Veränderungen der Expression von A-Strom K-Kanal-Untereinheiten bekannt sind, konnten wir keinerlei Effekt der Arachidonsäure beobachten. Die Hemmung bestimmter A-Ströme durch Arachidonsäure kann vermutlich sowohl bei synaptischer Plastizität als auch bei Excitotoxizität prä- wie postsynaptisch unterstützend respektive schädigend wirksam werden.

- Müller, W., Meske, V., Berlin, K., Scharnagl, H., März, W., and Ohm, T.G., 1997. Risky ApolipoproteinE, an ω -agatoxin IVa-sensitive Ca-channel and Alzheimer's disease, submitted.
- Bittner, K., and Müller, W. 1998. Transmembrane diffusion and developmental stage determine blockade of I_A by arachidonic acid through channel oxidation in hippocampal cultures of the rat, submitted.
- Schuchmann S., Müller, W., and Heinemann, U., 1998. Altered Ca-signaling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mice - a model of Down syndrome., submitted.
- Schuchmann S., Müller, W., and Heinemann, U., 1998. Glutathione deficiency and neuronal death in hippocampal cultures from trisomy 16 mice - a model of Down syndrome., submitted.
- Müller, W., Heinemann, U., and Schuchmann S., 1997. Impaired Ca-signaling in astrocytes from the Ts-16 mouse model of Down's syndrome, *Neurosci. Lett.*, 223, 81-84. IF:2,318
- Müller, W., Berlin, K., and Heinemann U., 1997. Cholecystokinin evokes Ca-accumulations in hippocampal astrocytes by CCKB-receptor activation, *J. Neurophysiol.*, in press. IF: 3,578

Stabel-Burow, J., Kleu, A., Schuchmann, S., and Heinemann, U., 1997. Glutathione levels and nerve cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mouse - a model of Down syndrome. *Brain Res.* 765, 313-318. IF: 2,687

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

Erdmann, S., Burkhardt, H., and Müller, W., 1997. Mapping by Ca-imaging of a carboxyterminal active site of parathyroid hormone, submitted.

Egorov, A., Heinemann, U., and Müller, W., 1996. Activation of muscarinic M1 receptors reduces presumably presynaptic Ca-influx during blocked synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampal slice, *Neurosci. Lett.*, 214, 187-190. IF: 2,318

Alici, K., Müller, W., and Heinemann U., 1996. Effects of glutamate receptor agonists on presumed presynaptic Ca²⁺-signals in juvenile rat hippocampal area CA1, *Neurosci. Lett.*, 214, 17-20. IF: 2,318

Müller, W., and Swandulla, D. 1996. Perspectives in imaging of second messengers, invited review, *NIPS*, 11, 281-288. IF: 2,052

Erdmann S., Müller, W., Vornehm S., Bruckner P., Mayer H., von der Mark K., and Burkhardt H. 1996. Differential effects of parathyroid hormone fragments on collagen gene expression in chondrocytes. *J. Cell Biol.*, 135, 1179-1191. IF: 12,480

Müller, W., and Swandulla D., 1995. Synaptic feedback excitation has hypothalamic neural networks generate quasi-rhythmic burst activity, *J. Neurophysiol.* 73, 855-861. IF: 3,578

Bang⁺, H., Müller⁺, W., Hans, M., Brune, K. and Swandulla, D., 1995. Activation of Ca-signaling in neutrophils induced by the mast cell released immunophilin FKBP, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 3435-3438. IF: 10,520

+The first two authors contributed equally to this work.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

1. Wir wollen untersuchen, welche Rolle die mitochondriale Transitions-pore bei Ca-abhängigen Schadenskaskaden in diploiden und trisomen Zellen spielt. Dabei interessiert uns die Rolle der Transition für mitochondriale Energiebereitstellung und Produktion freier Radikale, die wir bestimmen als mitochondriale Ca-Aufnahme, Depolarisation, NAD(P)H-Spiegel und Produktion freier Radikale sowie neuronalem Zelltod nach unterschiedlichen Bealstungen mit Glutamat in diploiden und trisomen Astrozyten und Neuronen.

2. Wir wollen aufklären, wie im Detail intrazelluläre Ca-Freisetzung Ca-abhängige Schadenskaskaden in diploiden versus trisomen Astrozyten und Neuronen verstärkt. Dazu wollen wir die Auswirkung einer Hemmung der Ca-Freisetzung auf mitochondriale Funktion und Phospholipasen sowie neuronalen Zelltod nach Stimulation mit Glutamat in diploiden versus trisomen Astrozyten und Neuronen untersuchen. Dabei interessiert auch die Rolle kapazitati-

ven Ca-Einstroms nach Ca-Freisetzung für diese Schadensmechanismen in diploiden und trisomen Astrozyten.

3. Wir wollen untersuchen, welche pathophysiologischen Veränderungen in trisomen Zellen sekundär durch Störung des oxydativen Stoffwechsels zustandekommen, d.h. ob Normalisierung des oxydativen Stoffwechsels trisomer Zellen durch Gabe des Glutathion Precursors Cystin akut bzw. über längere Zeit zu einer Normalisierung der astrozytären Ca-Signalgebung, der Ca-Homöostase, der mitochondrialen Ca-Aufnahme, der ATP abhängigen Ca-Speicherung und der NAD(P)H-Reaktion nach Glutamatstimulation führt.

4. Mit Hilfe des Ts65Dn-Modells wollen wir o.g. Ziele auch an akuten und kultivierten Hirnschnitten verfolgen.

3.5.2 Methoden

1. Präparate

Die Untersuchungen sollen an hippokampalen Astrozytenkulturen und gemischten Kulturen von diploiden und Trisomie 16-Embryonen durchgeführt werden. Desweiteren sollen organotypische Kulturen und akute Hirnschnitte untersucht werden.

1.1 Astrozytenkulturen

Zur Zeit stellen wir Astrozytenkulturen aus dem Hippokampus von embryonalen und 1-6 Tage alten Tieren her. Nach Präparation des Gewebes wird dieses mit Enzymen inkubiert (Trypsin 0.25% " 15 min bei 350 Celsius) und anschließend in Gegenwart von DNase (400 IU/ml) in drei Stufen mechanisch dissoziiert. Die Zellen werden nach Zentrifugieren mit 600 g resuspendiert, gezählt und mit einer Dichte von ca. 20.000/cm² auf Deckgläschen ausgesät und solange kultiviert, bis der Gliarasen konfluent geworden ist. Durch Mediumwechsel mit kühlshrankkaltem Medium kommt es zu raschem und vollständigem Absterben neuronaler und mikroglialer Zellen.

1.2 Hippokampale Kulturen der Trisomie 16- Maus

Das bisher verwendete Zuchtprotokoll soll weiter genutzt werden. Die Kulturen werden an E16 angelegt, wobei die Zellen mit einer Dichte von 50.000 bis 60.000 Zellen pro Deckgläschen ausgesät werden sollen. Die trisomen Embryonen lassen sich anhand eines auffälligen Nackenödems und bereits leicht geöffneter Augen gut erkennen. Durch ein Karyogramm wird diese Klassifizierung zusätzlich abgesichert. Astrozytenkulturen aus normalen und trisomen Mäuseembryos entstehen, wenn wir die Kulturen so lange überleben lassen, bis alle Nervenzellen abgestorben sind oder durch Füttern mit kühlshrankkaltem Medium.

1.3 Akute Hirnschnitte und Organotypische Kulturen

Wir wollen akute Hirnschnitte und organotypische Kulturen des Hippokampus und des entorhinalen Kortex-Hippokampuskomplexes der Ts65Dn-Maus herstellen, wobei uns unsere Erfahrungen an Ratten zugutekommen werden. Für die Kultur werden die akut präparierten

Schnittpräparate auf angefeuchtete poröse (0.4 mm) Membranen (Millicell-CM, Millipore) ausgebreitet. Das Kulturmedium wird so bemessen, daß die Schnitte von unten durch die Membran ernährt und von oben aus der Gasphase mit Sauerstoff versorgt werden ('interface'-Technik). Der weitere Ablauf der Kultivierung im Brutschrank ist vergleichbar zu dem für dissoziierte Kulturen. Die organotypischen Kulturen des Hippokampus und des entorhinalen Kortex-Hippokampuskomplexes sollen in Kooperation mit R. Nitsch weiter entwickelt werden.

1.4 Akut isolierte Zellen

Fragestellungen subzellulärer Lokalisation von Prozessen soll ggf. wegen der besseren optischen Auflösung auch an akut isolierten Zellen untersucht werden. Wir haben einige Erfahrungen mit einer Vibrodissektionsmethode gewonnen, bei der neben Nervenzellen auch Gliazellen aus Hirnschnittpräparaten freigeschüttelt werden. Dazu wird eine Glaskapillare mit angeschmolzenem Bällchen auf interessierende Areale in einem Hirnschnittpräparat gesetzt und das Glasbällchen in hochfrequente (1 00 Hz) Schwingungen f_r ca. 100 ms versetzt. Unter visueller Kontrolle kann dann beobachtet werden, wie einzelne Zellen sich aus dem Schnittpräparat lösen und auf dem Kammerboden absetzen. Durch enzymatische Vorbehandlungen kann die Menge freigesetzter Zellen erheblich gesteigert werden.

2. Meßmethoden

Als Meßmethoden werden Ratio- und Einzelwellenlängen-Fluoreszenz-Imaging sowie Patch-clamp-Ableitung von Zellen in Kultur bzw. im Schnittpräparat angewandt. Mit diesen Methoden hat der Projektleiter wie die Abteilung Neurophysiologie insgesamt langjährige umfangreiche Erfahrung. Die Farbstoffe werden als membranpermeable Acetoxymethylester oder über Mikroelektroden/ Patchpipetten sowie extrazellulär angewandt. Im Schnittpräparat sollen einzelne Zellen über die Patchpipette gefärbt werden. Mit den vorhandenen Monochromatoren können die optimalen Wellenlängen für die verschiedenen Farbstoffe festgelegt werden. Messungen besonders schneller hochlokalisierter Signale sollen an einem NORAN OZ konfokalen Laser-Scan-Mikroskop in der Abteilung Neurophysiologie, bzw., wenn Phototoxizität die Messungen beeinträchtigt, mit Zweiphotonenanregung an einem BIORAD konfokalen Mikroskop in Zusammenarbeit mit der AG Dirnagl in der Experimentellen Neurologie durchgeführt werden.

3.5.3 Arbeitsprogramm und 3.5.4 Zeitplan

1. An Astrozyten und Neuronen in Hippokampuskulturen diploider und trisomer Mäuse wollen wir in 6-8 Monaten vergleichend die Rolle der mitochondrialen Transitionsproteine bei Calciumabhängigen Schadenskaskaden in diploiden und trisomen Zellen untersuchen. Als Parameter für die mitochondriale Transition soll der Cyclosporin A-hemmbarer Anteil der mitochondrialen Depolarisation gemessen werden. Dazu wird die mitochondriale Depolarisation vor und nach Cyclosporin A Applikation während verschieden starker Glutamatbelastungen qualitativ, wie bisher, mit Rhodamin 123 gemessen. Die Depolarisation soll auch ratiometrisch quantitativ mit JC-1 (5,5',6,6' - tetrachloro-1,1',3,3' -tetraethyl benzimidazolo carbocyanine iodide), einem ratiometrischen Indikator für das Mitochondrienpotential, bestimmt werden. Wir

wollen klären, ob die Veränderung der mitochondrialen Permeabilität eine verstärkte Ca-Aufnahme und damit mitochondriale Depolarisation bewirkt oder ob die Depolarisation die Ca-Aufnahme elektrochemisch hemmt. Für diese Untersuchungen werden die Kulturen mit rhod-2 durch Inkubation geladen und die mitochondriale Ca-Aufnahme nach Glutamatstimulation in Kontrolle und nach Superfusion von 0.2 μM Cyclosporin A gemessen. Durch Applikation von Ionomycin nach Permeabilisierung und Entleerung nicht-mitochondrialer Speicher mit Thapsigargin bzw. Cyclopiazonic acid (CPA) soll versucht werden, auch absolute mitochondriale Ca-Mengen zu bestimmen. Durch Messung der NAD(P)H-Spiegel erhalten wir zusätzlich zum Mitochondrienpotential Hinweise auf den Energieumsatz und können durch Vergleich mit der Produktion freier Radikale Veränderungen der Korrelation zwischen Energieumsatz und Produktion freier Radikale durch die mitochondriale Transition bestimmen. Schließlich wollen wir die Bedeutung der mitochondrialen Transition und der o.a. zu messenden Veränderungen für neuronalen Zelltod bestimmen. Die NAD(P)H Spiegel werden wie gehabt mittels Autofluoreszenz, Produktion freier Radikale mit DCFDA und dihydro-Rhodamine123 sowie Zelltod mit Ethidiumbromid bestimmt. Stimuliert wird mit verschiedenen langen Glutamatexpositionen bzw. Ca-Expositionen nach Zellpermeabilisierung. Dabei wäre es wegen der bei Fluoreszenzanregung mit kurzen Wellenlängen nicht vermeidbaren Phototoxizität, die nach Permeabilisierung besonders problematisch ist, außerordentlich interessant, die Ergebnisse auch mit Zweiphotonenanregung zu validieren. Diese Technik soll daher parallel in Zusammenarbeit mit der AG Dirnagl innerhalb etwa 6-8 Monaten im Rahmen des beantragten SFB-Zentralprojektes Z2 etabliert werden. Für die Zweiphotonenmessungen werden 4-6 Monate veranschlagt.

2. Analog zu Punkt 1 wollen wir an Astrozyten und Neuronen in Hippokampuskulturen diploider und trisomer Mäuse in 6-8 Monaten vergleichend die Rolle der intrazellulären Ca-Freisetzung bei Ca-abhängigen Schadenskaskaden in diploiden und trisomen Zellen untersuchen. Dazu soll mittels Hemmung der Ca-ATPase des endoplasmatischen Retikulums (ER) durch Superfusion mit Thapsigargin bzw. CPA der Anteil freigesetzten Calciums bei der mitochondrialen Ca-Aufnahme mit dem mitochondrialen Ca-Farbstoff rhod-2 und indirekt als mitochondriale Depolarisation (Rhodamin 123) nach Stimulation mit Glutamat gemessen werden. Insbesondere wollen wir versuchen zu klären ob es dabei durch kapazitiven Ca-Einstrom in Astrozyten zu einer langanhaltenden mitochondrialen Ca-Aufnahme und Depolarisation kommt. Dies soll einerseits durch Depletion von extrazellulärem Ca und andererseits durch Blocker des kapazitiven Ca-Einstroms (SKF96365, La^{3+}), sowohl ohne als auch mit vorheriger Entleerung der Ca-Speicher mit Thapsigargin, während und nach Glutamatexposition untersucht werden. Mit Cyclosporin A wollen wir anhand eines als unter Punkt 1 des Arbeitsprogramms (siehe dort) als geeignet ermittelten Parameters, z.B. mitochondriale Depolarisation, prüfen, ob intrazelluläre Ca-Freisetzung zur mitochondrialen Permeabilitätstransition beiträgt. Die Bedeutung der intrazellulären Ca-Freisetzung für den Energieumsatz im Verhältnis zur Produktion freier Radikale wollen wir anhand der NAD(P)H-Spiegel (Autofluoreszenz) im Verhältnis zur Produktion freier Radikale (dihydro-Rhodamin 123, DCFDA) bestimmen und mit dem neuronalen Zelltod (Ethidiumbromid) zu korrelieren versuchen. Diese Zusammenhänge sollen natürlich wieder in Kontrolle und nach Stimulation mit Glutamat in diploiden und trisomen Astrozyten und Neuronen bestimmt werden. Mit Hilfe spezifischer Blocker der Ca-abhängigen Phospholipasen beziehungsweise der mitochondrialen Atmungskette (Komplexe III, IV) soll die anteilige Herkunft der freien Radikale durch Vergleich der Signale in Kontrolle und nach Blockade einzelner der genannten Enzyme unter den verschiedenen Bedingungen geklärt werden. Für diese Untersuchungen werden 8-10 Monate veranschlagt.

3. Wir wollen in weiteren 5-7 Monaten untersuchen, welche pathophysiologischen Veränderungen in trisomen Zellen primär bzw. sekundär durch Störung des oxydativen Stoffwechsels zustandekommen. Hierbei interessieren insbesondere positive Rückkoppelungen zu den o.g. Schadenskaskaden. Dazu wollen wir den oxydativen Stoffwechsel trisomer Zellen wie gehabt durch Gabe des Glutathion-Precursors Cystin (bzw. Cystein in neuronal-angereicherten Kulturen) akut bzw. über längere Zeit (2-4 Wochen) normalisieren. Durch Vergleich der folgenden pathophysiologisch signifikant veränderten Parameter in behandelten und unbehandelten trisomen Zellkulturen wollen wir akute und Langzeitauswirkungen des erhöhten oxydativen Stress charakterisieren: Glutamat- und Serotonin-evozierte astrozytäre Ca-Signalgebung, astrozytäre und neuronale Ca-Homöostase in Ruhe und nach Glutamatbelastung, mitochondriale Ca-Aufnahme nach Stimulation mit Glutamat oder Depolarisation mit hohem Kalium, ATP-abhängige intrazelluläre Ca-Speicherung in mit Digitonin permeabilisierten Zellkulturen sowie NAD(P)H-Synthese nach Glutamat-Stimulation. Die Messung dieser Parameter ist unter Punkt 1 beschrieben. Cystin wird steril mit dem Kulturmedium gefüttert.

4. In den restlichen 9 Monaten wollen wir o.g. Ziele mit Hilfe des Ts65Dn-Modells auch an akuten und kultivierten Hirnschnitten verfolgen. Die organotypische Kultur nach der Stoppani-Methode ist in der Abteilung Neurophysiologie etabliert. Die organotypische Kultur eignet sich für die Anwendung der membranpermeablen Farbstoffe besser als akute Hirnschnitte, da hier die durch die Präparation akut geschädigten oberflächlichen Schichten in Kultur eliminiert werden. Die Messung der freien Radikale durch extrazelluläre Applikation von Farbstoffen ist für akute Hirnschnitte publiziert (Bindokas, Jordan et al. 1996). An akuten Hirnschnitten wollen wir mit konfokaler Mikroskopie von den nicht geschädigten inneren Schichten der Schnitte ableiten. Hier wird insbesondere auch die Zwei-Photonen-Anregung in Zusammenarbeit mit der AG Dirnagl aufgrund besserer Eindringtiefe in das Gewebe und besserer Auflösung auch in der longitudinalen Achse die Erfolgsaussichten erheblich verbessern. Desweiteren wollen wir versuchen, in Patch-clamp-Einzelzelleableitungen im akuten Hirnschnitt Farbstoffe über die Pipette intrazellulär zu applizieren, insbesondere mitochondriale Depolarisation mit Rhodamine123 und JC-1 und mitochondriale Ca-Aufnahme mit rhod-2 messen. Bei der Messung der NAD(P)H Spiegel entfällt aufgrund der Autofluoreszenz das Problem der Farbstoffapplikation.

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Das Teilprojekt steht in engem Zusammenhang mit dem von Frau Eder und Herrn Heine mann, mit denen in bezug auf gliale Veränderungen bei Epilepsie sowie methodisch bei der Hirnschnittkultur zusammengearbeitet werden wird. In bezug auf Physiologie und Morphologie der Hirnschnittkultur bestehen auch starke gemeinsame Interessen mit dem Projekt von Herrn Nitsch. Mit dem Projekt von Herrn Ohm besteht eine Zusammenarbeit auf dem Gebiet ApolipoproteinE vermittelter Ca-Signale, die fortgesetzt werden soll. Mit dem Projekt Dirnagl ist eine enge Zusammenarbeit bei der konfokalen Zweiphotonen-Laser-Scan-Mikroskopie geplant. Ergebnisse aus dem Projekt Blasig (A5, freie Radikale) und Grune (Eisen-bindende Proteine) werden unser Vorgehen sicher beeinflussen. Die Erfahrungen von Herrn Kettenmann (B 1, physiologische Eigenschaften von Gliazellen, optische Methoden) werden uns wertvolle Anregungen geben können.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
IIa	0,5	IIa	0,5	19,800	IIa	0,5	39,600	IIa	1,0	85,200	IIa	1,0	39,600
Va	0,5	Va	0,5	15,300	Va	0,5	30,600	Va	0,5	30,600	Va	0,5	15,300
zusammen		zus.		35,100	zus.		70,200	zus.		115800	zus.		54,900
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		522		10.000	522		20.000	522		20.000	522		10.000
		zusammen		10.000	zusammen		20.000	zusammen		20.000	zusammen		10.000
I		Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		40.000			-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	Engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	W. Müller, PD Heisenberg- Stipendiat	Physiologie	Inst.f.Physiologie d. Charité	30	7/95	Heisenberg- Stipendium
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Uwe Heinemann, Prof. Dr. med.	Physiologie	Inst.f.Physiologie d. Charité	B (2)	7/95	C4
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	K. Berlin, Dipl.Ing.	Physiologie	Inst.f.Physiologie d. Charité	10	7/95	Va/2
	H. Siegmund, Dr. Ing.	PC Hard- und Software	Inst.f.Physiologie d. Charité	5	7/95	Ib
	H.-J. Gabriel, Dr. Ing.	Feinmechanik/ Elektronik	Inst.f.Physiologie d. Charité	5	7/95	Ib
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	K. Bittner Dipl. Chem.	Physiologie	Inst.f.Physiologie d. Charité	40	4/96	IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	K. Berlin Dipl. Ing.	Physiologie	Inst.f.Physiologie d. Charité	20	7/95	Va/2

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Dr. med. habil. W. Müller übernimmt die Projektplanung und Konzeption der Experimente sowie die Einarbeitung und Anleitung der Mitarbeiter. Er hilft bei der Durchführung schwieriger Experimente und bei der Publikation von Ergebnissen.

Prof. Dr. med. Uwe Heinemann bringt seine Erfahrungen mit dem Ts 16-Mausmodell, dem Glutathionstoffwechsel und der Mitochondrienphysiologie in das Projekt ein und hilft bei der Vorbereitung von Publikationen.

N.N., Studentische Hilfskraft, die im Rahmen dieses Projektes eine experimentelle medizinische Doktorarbeit durchführt. Er/Sie erlernt die Imaging Technik und untersucht Teilaspekte der Beziehung zwischen freiem Ca und reaktiven Sauerstoffspezies in Ts-16 Zellen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

K. Berlin bereitet die Experimente vor und hilft bei der Durchführung (Anfertigen von Lösungen und Elektroden, Messungen und Auswertungen, Mithilfe bei Justierarbeiten der UV-Anregung, Erstellen von Abbildungen).

H. Siegmund betreut und wartet die Meßcomputer und erstellt Computerprogramme für Datenaufnahme/ Meßung und Auswertung.

H.J. Gabriel betreut und wartet die Meßelektronik/ Verstärker und entwirft und erstellt in Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt Meßaufbauten und Mikromanipulation.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung

Eine BAT Iia/2 Stelle für **Frau Dipl.-Chem. K. Bittner** (BAT Iia ab Jan. 1999). Frau Bittner führte bisher sehr erfolgreich die Patch-clamp-Messungen, die Herstellung hippokampaler Zellkulturen und erste Imaging-Experimente zur Freisetzung freier Fettsäuren durch. Sie hat sich in die Thematik von Schadenskaskaden sehr erfolgreich eingearbeitet und bringt für diese Thematik als Chemikerin auch beste Voraussetzungen mit. Sie soll die Experimente zu Ca-abhängigen Phospholipasen sowie wesentliche Teile der Experimente zu mitochondrialen Schadensprozessen durchführen. Sie soll nach Abschluß ihrer Promotion Mitte bis Ende 1999 als *Postdoc* weiter im Projekt gehalten werden.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausstattung

Eine BAT Va/2 Stelle für **Frau Dipl. Ing. K. Berlin**. Sie legt seit 2 Jahren mit viel Erfolg dissoziierte Zellkulturen an und soll sowohl die dissoziierten Zellkulturen der Trisomie 16-Mäuse und diploiden Geschwister als auch die Himschnitt-Kulturen der segmentalen Ts65Dn Trisomie-Mäuse anlegen. Frau Berlin wird als Vollzeitkraft benötigt, 50% des Arbeitslohnes werden aus der GA getragen (s.o. 4)).

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	DM 3.000	DM 6.000	DM 6.000	DM 3.000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt	DM 10.000	DM 20.000	DM 20.000	DM 10.000

Verbrauchsmaterial, pro Jahr

Versuchstiere weitgehend aus der Grundaustattung Ts65Dn-Mäuse (Jackson Lab, USA)	DM 2.500
Verbrauchsmaterial für die Zellkultur (Präparationspipetten, Medien, Seren, Hormone)	DM 2.700
Einmal-Plastikartikel wie Kulturschalen, Pipetten, Sterilfilter, Zentrifugenröhrchen	DM 2.600
Millipore-Membranen für die Hirnschnittkulturen	DM 3.000
Gase für Zellkultur und Hirnschnittexperimente (CO ₂ , Carbogen)	DM 2.800
Chemikalien und Testsubstanzen (TTX, Pharmaka)	DM 2.300
Farbstoffe (Fura-2, rhod-2, DCFDA, JC-1 etc.)	DM 2.100
Xe-Bogenlampen	
Optische und mechanische Kleinteile (Filter, Halter, etc.)	DM 2.000
<hr/>	
Summe Verbrauchsmaterial	DM 20.000

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Alle Preisangaben in DM einschließlich Mehrwertsteuer, Transportkosten usw.

<i>Bezeichnung des Gerätes</i>	<i>beantragt für das Haushaltsjahr</i>			
	<i>Einzelpreis 2. Hj. 1998</i>	<i>Einzelpreis 1999</i>	<i>Einzelpreis 2000</i>	<i>Einzelpreis 1. Hj. 2001</i>
<i>Polychromatisches Beleuchtungssystem mit Kondensator und Filtermodulen</i>	40.000	-	-	-
<i>Summe</i>	40.000	-	-	-

Das Polychromatische Beleuchtungssystem der Firma T.I.L.L. Photonics hat sich in vielen Labors außerordentlich bewährt und besticht durch Wirtschaftlichkeit und hohe Intensität des Anregungslichtes bei freier Wahl der Anregungswellenlänge. Beliebige Wechsel der Anregungswellenlänge sind außerordentlich schnell möglich (< 5 ms). Aufgrund des Einsatzes einer ganzen Reihe verschiedener Farbstoffe, z.T. in Kombination miteinander, kommt nur eine monochromatische Lichtquelle in Frage. Unser selbstgebautes bisheriges Anregungssystem ist mit dichroischen Spiegeln für 2 Wellenlängen (Fura-2) konstruiert und deswegen nur sehr eingeschränkt für andere Farbstoffe verwendbar. Dazu müssten dichroische Spiegel und Filter gekauft werden, wobei insbesondere jeder Austausch der dichroischen Spiegel mit aufwendigen Justierarbeiten verbunden ist. Aufgrund mechanischer Verschlüsse im UV-Strahlengang ist es zudem störanfällig.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C5

3.1.1 Thema:

Untersuchungen zur Kommunikation zwischen Neural- und Immunzellen mittels akuter und chronischer intracerebro-ventrikulärer Applikation pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Tierversuch.

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Klinische Immunologie / Psychoneuroimmunologie / Infektionsimmunologie

3.1.3 Leiter:

Oberarzt

Dr. med. Christian Woiciechowsky

geb. am 24. 06. 1962, deutsch

Neurologisch-Neurochirurgische Klinik, Abteilung für Neurochirurgie,
Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität zu Berlin,
Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin

Tel. (030) 450 60714, FAX (030) 450 60900

Privatadresse: 14089 Berlin, Sakrower Landstr. 23-29

Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

Institutsdirektor

geb. am 13. 05. 1953, deutsch

Institut für Medizinische Immunologie,
Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin,
Schumannstr. 20/21, 10098 Berlin

Tel. (030) 2802 5501, FAX (030) 2802 5461

Privatadresse: 10178 Berlin, Rathausstr. 11

email: volkklim@comcom.rz.charite.hu-berlin.de

Ist die Stelle des Leiters / der Leiterin des Projektes befristet?

(x) nein () ja, befristet bis zum :

3.1.4 Aktenzeichen DFG-Projekt:

wir derzeit gefördert unter AZ (Laufzeit 98/99): Wo 621/2-2

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

Untersuchungen am Menschen	()	ja	(x)	nein
klinische Studien im Bereich der				
somatischen Zell- oder Gentherapie	()	ja	(x)	nein
Tierversuche	(x)	ja	()	nein
gentechnologische Versuche	()	ja	(x)	nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998	62,4	30		92,4
1999	125	61		186
2000	125	61		186
1. Hj. 2001	62,4	30		92,4

3.2 Zusammenfassung

Unsere Arbeitsgruppe hat Untersuchungen zu den Auswirkungen steriler Traumata des Zentralnervensystems (ZNS) auf das periphere Immunsystem sowohl an Patienten (elektive neurochirurgische Eingriffe, Schädelhirntrauma) als auch am Rattenmodell der intracerebroventrikulären Applikation proinflammatorischer Zytokine durchgeführt. Zusammenfassend konnten wir zeigen, daß sterile ZNS-Traumata zur lokalen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führen. Schon wenige Stunden nach dem operativen Trauma läßt sich eine Deaktivierung der Blutmonozyten (verminderte HLA-DR-Antigenexpression und Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α -Freisetzungskapazität) nachweisen. Dem gehen erhöhte Interleukin (IL)-10 Plasmaspiegel und eine vermehrte Fähigkeit der Monozyten zur IL-10 Sekretion voraus. Ein Persistieren dieses Zustandes signalisiert ein erhöhtes Infektionsrisiko. Um die Hypothese zu überprüfen, daß die lokal gebildeten proinflammatorischen Zytokine ursächlich in die Entstehung dieses Phänomens involviert sind, wurde ein entsprechendes Rattenmodell aufgebaut. In der Tat konnten wir durch kontinuierlich intracerebro-ventrikuläre Applikation von TNF- α oder IL-1 β über zwei Tage das Phänomen der peripheren Monozytendeaktivierung simulieren, wobei die Effekte bei IL-1 β stärker ausgeprägt waren. Dies war gleichzeitig mit einer Entzündung im Liquorraum und Zellinfiltration ins Hirnparenchym verbunden, und es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Schwere der lokalen Entzündung und der Schwere der systemischen immunsuppressiven Effekte. Im Rahmen des SFB sollen die Mechanismen dieses für Trauma, Streß und Infektion klinisch relevanten Phänomens weiter aufgeklärt werden, wobei die Schwerpunkte auf der Charakterisierung der intrazerebralen Zielzellen der proinflammatorischen Zytokine und der Regulation dieses Prozesses liegen sollen. Besonderes Interesse gilt der Kommunikation zwischen den ortsständigen Immunzellen und Blutimmunzellen.

3.3 Stand der Forschung

Die Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem auf zentraler und peripherer Ebene ist zunehmend in das Interesse der modernen Forschung gerückt. Diese Kommunikation findet durch Zell-Zell-Kontakt und die Sekretion von Neurotransmittern, Hormonen und Zytokinen statt. In den letzten Jahren versteht man zunehmend die enge Vernetzung dieser Systeme und

die partielle Redundanz der benutzten Mediatoren (Lipton und Catania, 1997; Ottaviani und Franceschi, 1997; Panerai und Sacerdote, 1997). Die Balance dieser Systeme ist nicht nur für die Regulation neuronaler Prozesse, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Integrität des Gesamtorganismus unter physiologischen und pathophysiologischen (Streß, Trauma, Infektion, Ischämie) Bedingungen essentiell.

Aus didaktischen Gründen lassen sich prinzipiell drei Ebenen der Interaktion zwischen ZNS und Immunzellen darstellen:

- Kommunikation zwischen Immunzellen, neuroendokrinen und neuronalen Zellen, die sich physiologischerweise im ZNS befinden;
- zusätzliche Beeinflussung dieser Regelkreise durch Immunzellen, die bei Entzündung unterschiedlichster Genese aus der Peripherie in das ZNS infiltrieren;
- Beeinflussung peripherer Immunzellen durch Mediatoren des neuroendokrinen und neuronalen Systems.

Im Rahmen unseres Projektes soll der Zusammenhang dieser drei Ebenen demonstriert werden.

Es ist lange bekannt, daß das ZNS durch systemisch gebildete/applizierte Zytokine beeinflusst wird. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β , die in selektiven Hirnbereichen (z.B. Hypothalamus) die Blut-Hirn-Schranke passieren können und zur Fieberinduktion, Appetitlosigkeit, Fatiguesymptomatik etc. führen. Weniger gut charakterisiert sind die biologischen Effekte, die lokal im ZNS gebildete Zytokine vermitteln. Bisher haben sich derartige Studien vor allem auf die pathophysiologischen Situationen bei Infektionen des ZNS (bakterielle Meningitis) oder Autoimmunprozessen (Multiple Sklerose) konzentriert. Jedoch werden im ZNS Zytokine auch in großen Mengen nach sterilen Traumata (elektive neurochirurgische Eingriffe, isoliertes Schädel-Hirn-Trauma, Ischämie/Reperfusion) freigesetzt (Lit. incl. eigene). So lassen sich z. B. nach elektivem neurochirurgischen Eingriff für mehrere Tage sehr hohe (ng/ml-Bereich) Konzentrationen an IL-6, IL-8, aber auch TNF- α und IL-1 β im drainierten Liquor, nicht aber im Blutplasma nachweisen (siehe Arbeitsbericht).

Es ist davon auszugehen, daß diese Zytokine die Funktion neuronaler und nicht-neuronaler Zellen im ZNS beeinflussen. Durch die Zytokin-induzierten Endothelzellveränderungen sind Veränderungen des intrazerebralen Blutflusses anzunehmen, was wiederum indirekte Effekte auf die genannten Zellen hat.

Für uns war vor allem die Frage von Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen diesen Phänomenen im ZNS und der Funktion des peripheren Immunsystems besteht, da klinisch auffällt, daß Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma, neurochirurgischem Eingriff oder Ischämie/Reperfusion (Stroke) ein stark erhöhtes Infektionsrisiko entwickeln. In der Tat konnten wir einen Zusammenhang zwischen Entzündung im ZNS (Freisetzung proinflammatorischer Zytokine) und Depression des peripheren Immunsystems sowohl im Human- als auch im Rattensystem beobachten (siehe Arbeitsbericht).

Die Hemmung von Immunfunktionen unter Streßbedingungen ist ein bekanntes Phänomen, jedoch sind die Mechanismen noch ziemlich spekulativ. Am besten ist der Einfluß der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HHA) auf periphere Immunfunktionen untersucht. Jedoch lassen sich damit nicht alle Phänomene erklären (z. B. hohe IL-10 Sekretion). Ein Spaltprodukt des Adrenokortikotropin (ACTH) - das α -MSH (Melanotropin) - hat sich aufgrund der Studien der letzten Jahre zu einem interessanten Mediator der zentral vermittelten negativen Regulation des Immunsystems entwickelt (Lipton und Catania, 1997). Auch β -Endorphine sind Kandidaten mit immunsuppressiven Eigenschaften (Panerai und Sacerdote,

1997). Schließlich können die Neurotransmitter des vegetativen Nervensystems - Adrenalin und Noradrenalin - immunmodulierende Effekte vermitteln. Für das Zusammenspiel der Systeme und die Induktionsmechanismen unter verschiedenen pathophysiologischen Zuständen im ZNS gibt es bislang nur Hypothesen.

Da IL-1 β in unserem experimentellen System den stärksten Effekt vermittelt, sollen kurz die bekannten Effekte von IL-1 im ZNS referiert werden. IL-1 ist ein typisches proinflammatorisches Zytokin, das während einer Entzündung, Verletzung oder Infektion produziert wird. Dabei werden zwei Formen von IL-1 unterschieden, IL-1 α und IL-1 β , wobei beide Formen an dieselben IL-1-Rezeptoren binden, wenngleich mit geringfügig differenter Affinität, und vergleichbare biologische Wirkungen entfalten. Neben den sezernierten Formen von IL-1 gibt es auch ein membranassoziiertes IL-1, das in der Hauptmenge der α -Form entspricht. IL-1 wird vorwiegend von aktivierten Makrophagen gebildet, kann jedoch auch von anderen Immun- und Nichtimmunzellen produziert werden, u.a. von Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Astrozyten, Mikroglia. Es gibt Hinweise, daß praktisch alle nukleären Zellen fähig sind, IL-1, wenngleich in unterschiedlichen Quantitäten, nach Stimulation zu synthetisieren. IL-1 ist ein pleiotrop wirkender Mediator mit lokalen (autokrinen und parakrinen) und systemischen (endokrinen) Effekten. Systemisch induziert IL-1 eine Akute-Phase-Reaktion in der Leber und stimuliert T-Helfer-Zellen zur Produktion und Sekretion von IL-2 und zur Expression von IL-2-Rezeptoren. IL-1 β induziert auch die Synthese von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und fördert somit die Migration von Immunzellen aus dem Blut ins Gewebe. Zudem ist IL-1 β ein Schlüsselzytokin mit zentraler Wirkung. Es kann zentrale Effekte auslösen, indem systemisch freigesetztes IL-1 β über die circumventrikulären Organe (Organum vasculosum Laminae terminalis, Subfornikalorgan, Area postrema) mit reduzierter Blut-Hirn-Schranke das ZNS erreicht und an zentrale IL-1-Rezeptoren bindet (Haour et al. 1995; Saper und Breder, 1992; Takao et al. 1995). Dabei ist die Bedeutung von IL-1 als endogenes Pyrogen für die Stimulation der neuroendokrinen Achse und Aktivierung des sympathischen Nervensystems wesentlich (Ichijo et al. 1994; Terao et al. 1994). So erhöht systemisch appliziertes IL-1 die lokale Corticotropin Releasing Faktor (CRF)-Freisetzung und die Induktion der ACTH- und Cortisol synthese. Außerdem bewirkt IL-1 eine katabole Stoffwechsellage, eine Veränderung des Freßverhaltens mit Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Anorexie (Busbridge et al. 1993; Kent et al. 1994; Otterness et al. 1988). Diese Effekte haben vorwiegend ihre Bedeutung bei systemischen Infektionen, wo IL-1 als Mediator des Immunsystems im ZNS wirkt und somit den geschlossenen Regelkreis zwischen ZNS und Immunsystem mit negativen Feed back-Mechanismen (Saper und Breder, 1992) bildet.

Auf der anderen Seite kann IL-1 auch lokal im ZNS produziert werden. Stimulatoren der IL-1-Synthese sind dabei Trauma, Infektion oder Ischämie. Die Zellen der IL-1-Synthese können eingewanderte Immunzellen, Mikroglia und Astrozyten, aber auch Ganglienzellen sein (Lotan und Schwartz, 1994; Taupin et al. 1993; Tchelingirian et al. 1993). Durch die lokale Synthese von IL-1 β und TNF- α im ZNS nach Trauma werden Proliferation von Gliazellen und Reparations- und Regenerationsprozesse ausgelöst (Rothwell und Strijbos, 1995; Toulmond und Rothwell, 1995). Die Erkenntnisse wurden vorwiegend an Zellkulturexperimenten und an *in vivo* Trauma- und Ischämie modellen gewonnen. Dabei existieren teilweise widersprüchliche Aussagen zur Bedeutung der proinflammatorischen Zytokine sowie der Infiltration der geschädigten Region mit Immunzellen (Mikroglia, Makrophagen). Einerseits scheinen Makrophagen die Regeneration im ZNS zu fördern, beispielsweise durch die Induktion von Wachstumsfaktoren wie „nerve growth factor“ (NGF) (Hirschberg und Schwartz, 1995; Lotan und Schwartz, 1994). Andererseits können sie durch die Freisetzung von sogenannten „Neuron killing molecules“, Proteasen und Sauerstoffradikalen einen Ganglienzelluntergang induzieren (Lotan und Schwartz, 1994; Walker et al. 1995). Weiterhin konnte gezeigt

werden, daß anti-inflammatorische Substanzen wie Corticosteroide oder IL-10 die Regeneration im ZNS unterstützen (Balasingam und Yong, 1996; Lotan und Schwartz, 1994). Dabei ist die Zusammenarbeit und gegenseitige Beeinflussung von Immun- und Neuralzellen *in vivo* wenig erforscht. Insgesamt kann festgestellt werden, daß der Zusammenhang zwischen lokalen Entzündungsprozessen im ZNS und systemischen Effekten nahe liegt und durch die bereits gewonnenen Erkenntnisse partiell unterlegt werden konnte. Zur Erforschung der genauen Mechanismen der Zellmigration ins Hirnparenchym, der Kommunikation zwischen Immun- und Neuralzellen sowie der Ankoppelung an andere Systeme (neuroendokrine Achse, sympathisches Nervensystem) sind weiterführende Studien erforderlich, wobei mit der chronischen intracerebro-ventrikulären IL-1 β -Applikation ein Modell existiert, das es ermöglicht, diese Prozesse im einzelnen zu untersuchen.

Literatur

- Balasingam, V. und Yong, V.W. (1996) Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J. Neurosci.* 16, 2945-2955.
- Busbridge, N.J., Dascombe, M.J. und Rothwell, N.J. (1993) Chronic effects of interleukin-1 beta on fever, oxygen consumption and food intake in the rat. *Horm. Metab. Res.* 25, 222-227.
- Haour, F., Marquette, C., Ban, E., Crumeyrolle Arias, M., Rostene, W., Tsiang, H. und Fillion, G. (1995) Receptors for interleukin-1 in the central nervous and neuroendocrine systems. Role in infection and stress. *Ann. Endocrinol. Paris.* 56, 173-179.
- Hirschberg, D.L. und Schwartz, M. (1995) Macrophage recruitment to acutely injured central nervous system is inhibited by a resident factor: a basis for an immune-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 61, 89-96.
- Ichijo, T., Katafuchi, T. und Hori, T. (1994) Central interleukin-1 beta enhances splenic sympathetic nerve activity in rats. *Brain Res. Bull.* 34, 547-553.
- Kent, S., Rodriguez, F., Kelley, K.W. und Dantzer, R. (1994) Reduction in food and water intake induced by microinjection of interleukin-1 beta in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Physiol. Behav.* 56, 1031-1036.
- Lipton, J.M. und Catania, A. (1997) Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol. Today* 18, 140-145.
- Lotan, M. und Schwartz, M. (1994) Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J.* 8, 1026-1033.
- Ottaviani, E. und Franceschi, C. (1997) The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol. Today* 18, 169-174.
- Ottersness, I.G., Seymour, P.A., Golden, H.W., Reynolds, J.A. und Daumy, G.O. (1988) The effects of continuous administration of murine interleukin-1 alpha in the rat. *Physiol. Behav.* 43, 797-804.
- Panerai, A.E. und Sacerdote, P. (1997) Beta-endorphin in the immune system: a role at last?. *Immunol. Today* 18, 317-319.

- Rothwell, N.J. und Strijbos, P.J. (1995) Cytokines in neurodegeneration and repair. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13, 179-185.
- Saper, C.B. und Breder, C.D. (1992) Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog. Brain Res.* 93, 419-428.
- Takao, T., Hashimoto, K. und De Souza, E.B. (1995) Modulation of interleukin-1 receptors in the neuro-endocrine-immune axis. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13, 167-178.
- Taupin, V., Toulmond, S., Serrano, A., Benavides, J. und Zavala, F. (1993) Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J. Neuroimmunol.* 42, 177-185.
- Tchelingerian, J.L., Quinonero, J., Booss, J. und Jacque, C. (1993) Localization of TNF alpha and IL-1 alpha immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus. *Neuron* 10, 213-224.
- Terao, A., Oikawa, M. und Saito, M. (1994) Tissue-specific increase in norepinephrine turnover by central interleukin-1, but not by interleukin-6, in rats. *Am. J. Physiol.* 266, R400-4.
- Toulmond, S. und Rothwell, N.J. (1995) Interleukin-1 receptor antagonist inhibits neuronal damage caused by fluid percussion injury in the rat. *Brain Res.* 671, 261-266.
- Walker, D.G., Kim, S.U. und McGeer, P.L. (1995) Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains. *J. Neurosci. Res.* 40, 478-493.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Allgemeines:

Unser Projekt „Neurogene Immunmodulation“ wurde sofort nach der Gewährung der Sachbeihilfe durch die DFG initiiert. Der Fortgang der Arbeiten war jedoch durch den Umzug der Neurochirurgie incl. des tierexperimentellen Labors von der Charité in das Virchow-Klinikum zeitweilig beeinträchtigt. Neben dem Zeitverlust durch den Umzug war die Durchführung der immunologischen Methoden (Zellkultur, ELISA etc.) durch die räumliche Trennung zwischen tierexperimentellem Labor und den Laboratorien des Institutes für Medizinische Immunologie zunächst erschwert. Die bewilligte BAT-IIa-Stelle wurde zum 01.02.96 besetzt. Die eingestellte Biochemikerin, Frau Dr. rer. nat. Britta Schöning, konnte sich schnell in die fachlichen Belange des Themas einarbeiten. Frau Dr. Schöning wurde auch schnell mit tierexperimentellen Arbeitsweisen vertraut. Nach Absolvierung eines Tierschutzkurses konnte sie über ein Stufenprogramm selbständig einen Teil des tierexperimentellen Programms bewältigen und Doktoranden anleiten.

Nach einer Anfangsphase konnte sich unsere Arbeitsgruppe im neurochirurgischen Labor des Virchow-Klinikums etablieren und die Tierexperimente durchführen, wobei optimale Bedingungen für Inhalationsnarkose, mikrochirurgische Operationstechniken und Stereotaxie existieren. Zur Aufarbeitung der Zellkulturen wurde eine lokale Kooperation mit Nutzung von Sterilbank und Brutschrank geschaffen. Die erforderliche labortechnische Ausrüstung wurde

allmählich aus verschiedenen Mitteln komplettiert und durch Multi-User-Einrichtungen ergänzt.

Zusätzlich zum beantragten Arbeitsprogramm wurden in enger Kooperation mit Frau Prof. Gisela Stoltenburg (Instituts für Neuropathologie) umfangreiche histologische und immunhistologische Untersuchungen zur Beurteilung der lokalen Effekte der intracerebro-ventrikulären Applikation von Zytokinen durchgeführt.

Weiterhin wurden neben den beantragten Arbeiten im Rattensystem die immunologischen Untersuchungen im Humansystem an Patienten mit elektivem neurochirurgischen Eingriff bzw. Schädel-Hirn-Trauma fortgeführt.

I. Humanstudien

Neurochirurgische Patienten wurden hinsichtlich des Phänotyps und der Funktion ihrer peripheren Blutmonozyten engmaschig im postoperativen Verlauf untersucht.

Alle Patienten zeigten innerhalb weniger Stunden nach OP eine verminderte Expression von HLA-DR - der Tiefpunkt war normalerweise am Tag 1 nach OP erreicht und die Werte normalisierten sich spätestens innerhalb einer Woche. Ein besonders extremer Abfall und vor allem die Persistenz des Phänomens über >48 hr war mit einem signifikant erhöhtem Infektionsrisiko assoziiert (P1, P2). Die 14 der 57 Patienten mit infektiösen Komplikationen zeigten signifikant verminderte monozytäre HLA-DR-Antigenexpressionsspiegel ($p < 0.0001$). Von 10 Patienten, die eine Infektion entwickelten, zeigten 9 zuvor <30 % HLA-DR+ Monozyten (Norm: >85 %) (P2). Der Abfall der HLA-DR-Expression war parallel zu dramatisch erhöhten Zytokinpiegeln im Liquor dieser Patienten (P2, P3). Im Plasma waren jedoch keine Zytokine nachweisbar, was gegen eine operativ bedingte Translokation von Darmbakterien bzw. LPS als Ursache der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine spricht. Außerdem zeigen diese Beobachtungen, daß die Zytokine offenbar im ZNS gebildet werden, da der schnelle Anstieg eher gegen infiltrierende Entzündungszellen als Quelle der Zytokine spricht. An einer speziell unter dieser Fragestellung konzipierten Studie konnten wir zeigen, daß die Zytokin-freisetzung für IL-6 und IL-8 unabhängig vom operierten Kompartiment ist, während TNF- α und IL-1-Rezeptorantagonist (ra) in hohen Konzentration im Liquor nach neurochirurgischen Eingriffen mit einer signifikanten Verletzung des Gehirns gefunden wurde. Dieser Effekt könnte durch die zusätzliche Stimulation von Astrozyten und anderen Nichtimmunzellen bedingt sein (P3).

Es stellte sich weiterhin die Frage nach der Ursache des HLA-DR Abfalles auf Monozyten. Hohe ACTH- und Cortisolplasmaspiegel 2-8 Stunden nach OP deuten auf die Aktivierung der HHA-Achse hin. In der Tat konnten wir an dermatologischen Patienten zeigen, daß eine Kortikosteroidtherapie (high dose-Schema) zu einem temporären Abfall der HLA-DR-Antigenexpression auf Monozyten führt, wobei Grad und Dauer ebenfalls mit dem Infektionsrisiko korrelieren (P2). Dies könnte für eine Rolle der HHA-Achse bei der Vermittlung des o.g. Phänomens nach OP sprechen. Jedoch konnten wir in umfangreichen *in vitro*-Experimenten keinen direkten Effekt von Steroiden auf die monozytäre HLA-DR-Antigenexpression beobachten; d.h. daß *in vivo* indirekte Effekte involviert sein müssen (nicht publizierte Beobachtungen).

In weiteren Untersuchungen beobachteten wir (P4), daß die phänotypischen Veränderungen (HLA-DR Abfall) mit funktionellen Veränderungen der Monozyten assoziiert waren - so war die Fähigkeit, nach einem LPS-Reiz TNF- α zu produzieren, drastisch eingeschränkt. Mit Erholung des Phänotyps erholte sich auch die Funktion. Eine ähnliche Assoziation hatten wir zuvor auch schon bei septischen Patienten beobachtet (Randow et al. J.Exp.Med. 1995, Döcke et al. Nature Med. 1997).

Interessanterweise ging diesem Phänomen der peripheren Monozytendeaktivierung nach neurochirurgischem Eingriff ein Anstieg der IL-10 Plasmaspiegel und der IL-10 Sekretionskapazität der Monozyten voraus. IL-10 ist einer der wichtigsten anti-inflammatorischen Mediatoren und IL-10 ist *in vitro* und *in vivo* (eigene unveröffentlichte Beobachtungen im Rahmen einer IL-10 Studie bei Psoriasis) in der Lage, die monozytäre HLA-DR Antigenexpression und TNF α -Sekretion zu hemmen, d.h. den beschriebenen Phänotyp zu simulieren. In der Tat konnte „postoperatives“ Plasma von Patienten mit verminderter HLA-DR-Expression die HLA-DR-Expression und TNF- α -Sekretion von Monozyten gesunder Testprobanden *in vitro* hemmen, was durch anti-IL-10 Antikörper zumindest partiell revertierbar war (P4, unveröffentlicht). Als nächstes stellte sich die Frage, ob Kortikosteroide IL-10 induzieren. Im Gegensatz zu einer älteren Publikation im Maussystem waren wir nicht in der Lage, einen Effekt von Cortisol, Prednisolon, Methylprednisolon oder Dexamethason auf die spontane oder LPS-induzierte IL-10 Produktion humaner Monozyten zu registrieren, obwohl diese Substanzen, wenngleich schwächer als IL-10, die TNF- α -Sekretionskapazität hemmen können (unveröffentlicht).

Was könnte dann der Induktor des peripheren IL-10 nach Neuro-OP sein ?

Detaillierte Studien zur Lokalisation des Eingriffes ergaben, daß vor allem die Entfernung infratentorialer Tumoren mit Hirnstammkompression zu einer ausgeprägten postoperativen Immundepression und hohen IL-10 Spiegel führte (P4). Dieselbe Gruppe zeigte intraoperativ signifikant häufiger Zeichen einer adrenergen Stimulation (Blutdruckanstieg). In der Tat konnten wir zeigen, daß Katecholamine in (patho)physiologisch relevanten Dosierungen die monozytäre IL-10 Sekretion *in vitro* stimulieren. Sie induzieren eine schnelle (Minuten) transkriptions- und translationsunabhängige Freisetzung von IL-10 ohne weitere Stimuli. Darüber hinaus regulieren sie in einer „zweiten Welle“ (Stunden) die Neusynthese-abhängige IL-10 Sekretion synergistisch mit LPS, TNF- α oder anderen Stimuli herauf. Letztere Effekte laufen offenbar über eine direkte Aktivierung des IL-10 Promoters durch Katecholamine via Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (Meisel et al. Eur.J.Immunol. 1996, Platzner et al., Int. Immunology in press). Die Katecholamineffekte sind durch Hemmer der Proteinkinase A (cAMP-Pathway) und Propranolol (β -Rezeptorblocker) hemmbar, was die Spezifität unterstreicht. Dies bedeutet, daß die Aktivierung des adrenergen Systems nach Reizung im ZNS zur Deaktivierung peripherer Monozyten führt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung desselben Phänomens in Patienten nach isoliertem Schädelhirntrauma und Mittelhirneinklemmung sowie nach Herzinfarkt weiter untermauert (P4) - d.h. lokale oder generalisierte Streßreaktion kann via Katecholamin- und IL-10-Freisetzung zur Immundepression führen. Diese Gegenregulation ist in der akuten „Stress-Response“-Phase zur Vermeidung überschießender Entzündungsreaktionen sicher biologisch sinnvoll. Bei Dysregulation und Persistenz dieses Phänomens kommt es jedoch zu einem erhöhtem Infektionsrisiko, das sich durch die moderne Intensivmedizin noch verstärkt.

Eine weitere Patientengruppe mit ZNS-Pathologie zeigt eine verminderte systemische Immunkompetenz, und zwar Patienten mit Glioblastomen. In der Literatur ist vorwiegend die Beeinträchtigung der Lymphozytenfunktion beschrieben (Kuppner et al. J.Neurosurg. 1989). Dabei sollen von Glioblastom-Zellen produzierte Zytokine (TGF- β , IL-10) bedeutsam sein. Der Weg der Beeinflussung der systemischen Immunreaktion durch lokal im ZNS produzierte Zytokine blieb bislang jedoch spekulativ. Unsererseits wurde untersucht, ob Glioblastom-Patienten neben der bekannten Störung der Lymphozytenfunktion auch eine gestörte Monozytenfunktion haben. Tatsächlich konnten wir bei diesen Patienten im Vergleich zu Patienten mit benignen Gliomen eine verminderte Zahl HLA-DR-positiver Monozyten und eine herabgesetzte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach LPS-Stimulation nachweisen. Die

Tumorentfernung führte zur teilweisen Verbesserung der Immunlage (P5). Der Mechanismus dieser Störung konnte unsererseits bei diesen Patienten bislang nicht geklärt werden.

II. Rattensystem

Um die Mechanismen der bei Patienten mit ZNS-Pathologien beobachteten systemischen Immunphänomene besser studieren zu können und eventuelle Interventionsstrategien zu entwickeln, haben wir ein Rattenmodell zur Simulation dieser Situationen etabliert. Trauma, Streß, Ischämie/Reperfusion aber auch Infektionen des ZNS führen zur lokalen Zytokinfreisetzung, vor allem IL-1 β und TNF- α , und diese Zytokine gelten als Schlüsselmediatoren für alle nachgeschalteten lokalen und systemischen Effekte. Dabei ist allerdings wenig verstanden, welchen Anteil die im ZNS vorhandenen Zellen (Mikroglia, Astrozyten, Endothelzellen etc.) und welchen die nach Endothelzellaktivierung infiltrierenden Immunzellen haben.

Wir haben uns daher entschlossen, ein Modell zu etablieren, das die verschiedenen Traumafornen zusammenführt und bei den genannten Schlüsselzytokinen IL-1 β und TNF- α ansetzt. Dabei erschien uns die subakute zerebrale Applikation der Zytokine über ein Pumpensystem als günstig, da diese die Bedingungen - wie sie nach Trauma existieren - am besten simuliert. Der Schwerpunkt unserer Untersuchungen lag auf den der lokalen Zytokinfreisetzung folgenden Effektorketten.

Etablierung und Optimierung des Modells

Das Modell konnte schnell etabliert werden, da bereits Erfahrungen mit der Technik der intrazerebralen Applikation von Substanzen mittels ALZET-Pumpen bestanden. Es erfolgte noch eine Optimierung der mikrochirurgischen Vorgehensweise (Bohrerkühlung, Absaugung), um jegliches zusätzliche zerebrale Trauma auszuschließen und eine gute Kontrollgruppe (NaCl in Pumpe) zu sichern, die lediglich den Einfluß der Narkose auf die Immunparameter widerspiegelt. Weiterhin wurde das Prinzip der retrobulbären Blutentnahme perfektioniert, um die Einflüsse kontaminierter Blutentnahmen bzw. Beeinträchtigung der Tiere durch die Blutentnahme zu minimieren. Das Prinzip der Hirnasservierung für die Immunhistologie wurde ebenfalls im Verlauf verfeinert, um Gefrierartefakte zu vermeiden. Für die zusätzlich ins Programm genommenen Untersuchungen am Liquor und an Lymphknoten wurden die Techniken der Liquorgewinnung und Lymphknotenentnahme in unserem Labor etabliert. Weiterhin war von Vorteil, daß mit Beginn des Projekts Ratten-rekombinantes IL-1 β und TNF- α zur Verfügung stand und alle Widrigkeiten der Arbeit mit kreuzreagierenden humanen bzw. Maus-IL-1 umgangen werden konnten. Außerdem konnten auch alle Zytokinbestimmungen mit Rattenspezifischen ELISA's durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der ersten Studien an dem nun gut etablierten Modell lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Allgemeines

Aufgrund der gekürzten Mittel wurden zunächst die Wirkungen der pro-inflammatorischen Zytokine (TNF- α und IL-1 β) untersucht. Durch die dabei gewonnen Ergebnisse wurde das Projekt zunehmend auf die Auswirkungen der IL-1 β Applikation ausgerichtet, da die Effekte deutlicher ausgeprägt waren (siehe unten).

Einfluß auf Körpergewicht und Verhalten der Tiere (P6)

Unser Modell der subakuten cerebralen Applikation von IL-1 β konnte die bekannten Effekte der intracerebro-ventrikulären und systemischen Bolusgaben von IL-1 β hinsichtlich Abnahme des Körpergewichts und Inaktivität, was insgesamt als „sick syndrome“ bezeichnet wird, bestätigen. Dieses Phänomen konnte im weiteren Verlauf als guter Indikator für die Funktionstüchtigkeit des Systems genutzt werden. Die beschriebenen Effekte waren bei TNF- α nur andeutungsweise vorhanden und fehlten bei Vehikeltieren.

Untersuchungen Liquor (P6)

Die Untersuchungen des Liquors zeigten, daß die intracerebro-ventrikuläre Applikation von IL-1 β eine sterile Meningoencephalitis induziert, mit dramatisch hohen Zellzahlen im Liquor. Dieser Effekt war bei TNF- α nur marginal vorhanden. Da in früheren Untersuchungen zur zentralen Wirkung von IL-1 keine Liquoruntersuchungen gemacht worden waren, drängte sich die Frage nach der Bedeutung der Immunzellen im Liquor für das sogenannte „sick syndrome“ auf. Zur weiteren Klärung einer Entzündungsreaktion im Liquor wurde TNF- α im Liquor bestimmt. Es zeigt sich jedoch, daß nur wenn TNF- α in den Liquorraum appliziert wurde, dieses Zytokin auch im ELISA gemessen werden konnte. Die übrigen Liquors (einschließlich die der IL-1 β -Tiere) zeigten keine meßbaren TNF- α -Spiegel.

Histologische/immunhistologische Untersuchungen des Gehirns (P7)

Histologie

Neben der beschriebenen Infiltration des Liquorraums war nach IL-1 β -Applikation auch eine ausgeprägte Infiltration des Hirnparenchyms und der Meningen mit Immunzellen zu beobachten, entsprechend dem Bild einer Meningoencephalitis. Dabei war die Infiltration bei intraventrikulärer Gabe generalisiert und bei der lokalen Applikation in den Hypothalamus lokal begrenzt, was für eine Verteilung des in den Liquor applizierten IL-1 β über den Extrazellularraum in das gesamte Cerebrum spricht. Interessanterweise war nach TNF- α Applikation nur eine geringere Entzündung zu beobachten. Zur weiteren Charakterisierung der Infiltration wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt.

Immunhistologie

Die Immunhistologie wurde zur Beantwortung der folgenden Fragen ins Programm genommen:

Welche Zellen infiltrieren ?

Wie erfolgt die Infiltration? Kommt es zur Endothelzellaktivierung (Expression von Adhäsionsmolekülen) ?

Gibt es Hinweise für eine Gliareaktion ?

Dabei wurden folgende Antikörper genutzt:

ED1 zur Markierung von Gewebemakrophagen,

MRC OX-6 zur Markierung von Ratte I-A-Antigen (entspricht MHC Klasse II-Antigenen) auf antigenpräsentierenden Zellen,

MRC OX-39 zur Markierung von aktivierten T-Lymphozyten,

MRC OX-52 zur Markierung von T-Lymphozyten,
1A29 zur Darstellung der ICAM-1-Expression auf Endothelzellen
Anti-GFAP zur Markierung von reaktiv veränderten Astrozyten.
Lektin I B4 aus *Griffonia simplicifolia* zur Darstellung der Mikroglia.

Die immunhistologischen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen (P7):

Die infiltrierenden Immunzellen sind vorwiegend Neutrophile Granulozyten und Makrophagen, nur vereinzelt Lymphozyten. Die Infiltration wird von einer ICAM-1 Expression in Endothelzellen und Mikroglia begleitet. Da aus der Literatur bekannt ist, daß IL-1 β die ICAM-1 Expression induzieren kann, ist anzunehmen daß dies in unserem Modell der wesentliche Mechanismus der Infiltration ist. Außerdem kommt es zu einer Mikrogliaaktivierung. In Langzeitversuchen deutet sich eine stärkere GFAP Expression nach IL-1 β -Applikation an, was eine Induktion von GFAP durch IL-1 β auch *in vivo* vermuten läßt.

Veränderungen im peripheren Blut und systemische Immunreaktionen (P6)

- Leukozytenzahl/Differential-Blutbild (P6)

Die zentrale IL-1-Applikation führte zu einer akuten Lymphopenie, die auch nach 48 Stunden bestehen blieb, während die Gesamtleukozytenzahl nach 48 Stunden, verglichen mit den präoperativen Werten identisch war. Gleichzeitig kam es zu einer Granulozytose, was mit einer Aktivierung der HHA-Achse zu erklären wäre.

- Zytokin- und Hormonspiegel im Plasma (P6)

Die ACTH-Spiegel im Plasma variierten jedoch bei allen Gruppen (incl. Kontrollen) stark, was am ehesten durch operativen Streß und Handling zu erklären ist. Tendenziell zeigten jedoch die IL-1-Tiere höhere Werte nach 4 Stunden, was mit Daten der Literatur korreliert. Somit könnte die Stimulation der HHA-Achse in der Akutphase teilweise für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. Um den Einfluß der Achse auszuschließen, soll in der nächsten Phase eine Gruppe mit hypophysektomierten Tieren untersucht werden. Die andauernden Immunveränderungen nach 48 Stunden sind jedoch sicherlich nicht über diesen Weg zu erklären. Desweiteren konnte weder TNF- α noch IL-10 bei einem Tier im Plasma gefunden werden, wobei die frühesten IL-10-Bestimmungen nach 2 Stunden durchgeführt wurden. Eine Aktivierung des Sympathicus durch IL-1 β - was aus der Literatur bekannt ist - könnte jedoch, ähnlich den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen, zu einer perakuten IL-10-Freisetzung innerhalb von Minuten führen. Deshalb sollen in der nächsten Phase auch kurzfristige IL-10-Bestimmungen im Minutenintervall erfolgen.

- Ex vivo LPS-induzierte TNF- α /IL-10-Sekretionskapazität (P6)

Die ex vivo LPS-induzierte TNF- α -Sekretionskapazität zeigte klar, daß nach intracerebraler IL-1 β Applikation mit resultierender Meningoenzephalitis die systemische Immunreaktivität stark vermindert ist. Die Sekretionskapazität für TNF- α sank nach 4 Stunden bis auf ca. 20% der präoperativen Werte und erholte sich während des Beobachtungszeitraumes nicht. Die IL-10 Sekretionskapazität hingegen war in der Akutphase (nach 4 Stunden) deutlich gesteigert, normalisierte sich jedoch nach 48 Stunden. Diese Beobachtungen konnte auch teilweise in Milzzellkulturen bestätigt werden.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

- Asadullah K, Woiciechowsky C, Liebethal C, Doecke WD, Volk HD, Vogel S, v. Baehr R: Immunodepression following neurosurgical procedures. **Crit Care Med** **23**:1976-1983, 1995
- Asadullah K, Woiciechowsky C, Doecke WD, Egerer K, Kox W, Vogel S, Sterry W, Volk HD: Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection - immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. **Eur J Emergency Med** **2**:184-190, 1996
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Glöckner F, Volk HD, Vogel S: Different release of cytokines into the cerebrospinal fluid following surgery for intra- and extra-axial brain tumors. **Acta Neurochir** **139**:619-624, 1997
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Schöning B, Glöckner F, Döcke WD, Volk HD: Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: Effect of tumor extirpation. **J Neuroimmunol** (*in press*)
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Schöning B, Glöckner F, Döcke WD, Volk HD: Brain-mediated Immunosuppression in Neurosurgical Patients through Activation of the Sympathetic Nervous System (in Vorbereitung für resubmission)
- Woiciechowsky C, Schöning B, Asche K, Daberkow N, Döcke WD, Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD: Peripheral monocyte deactivation following intracerebral application of TNF- α und IL-1 β in rats (kurz vor Fertigstellung)
- Schöning B, Woiciechowsky C, Asche K, Daberkow N, Lanksch WR, Volk HD, Stoltenburg G: Cell migration into the central nervous system resulting from cerebral infusion of pro-inflammatory cytokines (submitted 9/97)

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema: siehe Punkt 3.3.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Nachdem das Tiermodell zum Studium der Kommunikation zwischen Immun- und Neuralzellen sowie zur Frage der neurogenen Beeinflussung systemischer Immunprozesse etabliert wurde, soll Ziel der weiteren Untersuchungen die Aufklärung der Mechanismen der lokalen und systemischen Effekte einer akuten und subakuten intracerebro-ventrikulären Applikation von IL-1 β sein.

Unser Modell stellt sich derzeit wie folgt dar:

Eine zentrale Applikation von IL-1 β (die der Freisetzung von IL-1 β im Rahmen von lokalen Immunprozessen nach Trauma, Streß, Infektion oder Ischämie/Reperfusion entspricht) führt einerseits zu lokalen Effekten (Endothelzellaktivierung, Infiltration mit mononukleären Zel-

len, Gliareaktion) und andererseits zu systemischen Effekten (Deaktivierung der peripheren Monozyten, Heraufregulation der LPS-induzierbaren IL-10-Synthese).

Daraus leiten sich folgende Fragen ab:

- I. Läßt sich die lokale Entzündungsreaktion weiter charakterisieren?
- II. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Entzündung im Gehirn und der systemischen Immundepression mit Deaktivierung des Monozytensystems?
- III. Was ist der zentrale Mechanismus der systemischen Deaktivierung, welche anderen Systeme sind beteiligt?
- IV. Gibt es Effekte auf weitere Komponenten des Immunsystems?

Die Untersuchungen sollen unser Verständnis zu den Mechanismen der Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem weiter vertiefen und neue therapeutische Strategien für die Intervention bei Trauma/Streß/Ischämie-bedingter ZNS-vermittelter systemischer Immundepression liefern.

Die an unserem gut definierten Modell gewonnenen Erkenntnisse sollen auch an komplexeren Modellen (mechanisches Trauma, Ischämie/Reperfusion) evaluiert werden, um ihre klinische Signifikanz weiter zu verifizieren.

3.5.2 Methoden

Im Rahmen des Projektes werden die nachfolgenden Methoden praktiziert und sind bereits etabliert:

Mikrochirurgische Operationen und Stereotaxien in Inhalationsnarkose an der Ratte.

Blutentnahmen aus dem retro-orbitalen Venenplexus.

Durchführung von Stimulationen mit Endotoxin an Vollblutzellkulturen zur Frage Zytokinrelease.

Entnahme von Hals- und Inguinallymphknoten, Isolation der Zellen und Durchführung von Stimulationen mit Concavalin A zur Frage Stimulierbarkeit von Lymphozyten.

Entnahme von Gehirn und Anfertigen von Gefrierpräparaten und Paraffinschnitten für histologische und immunhistologische Untersuchungen zur Charakterisierung von Zellen und Adhäsionsmolekülen.

ELISA zur Messung von Zytokinen im Plasma und nach Zellstimulation.

Methoden, die derzeit etabliert werden:

in situ Hybridisierung zum Nachweis von mRNA für ICAM und Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β).

quantitative PCR aus Hirngewebe zum Nachweis der Zytकिनexpression.

3.5.3 Arbeitsprogramm

Zur Erreichung der Zielsetzung sollen folgende Haupt- bzw. Teilfragen im Rahmen der Studien beantwortet werden:

I. Läßt sich die lokale Entzündungsreaktion weiter charakterisieren ?

Welche Zytokine werden nach lokaler IL-1 β Applikation sekundär induziert ?

Nachweis der Zytokingenexpression mittels quantitativer RT-PCR aus Hirngewebe (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP1- α , IFN- γ , IL-12 p35/40).

Welche Zellen produzieren welche Zytokine ?

Lokalisation der Zytokin-produzierenden Zellen mittels Immunhistologie (Zytokine siehe 1.) und evtl. durch in situ-Hybridisierung.

II. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Entzündung im Gehirn und der systemischen Immundepression mit Deaktivierung des Monozytensystems?

Kann durch die systemische Applikation von Antikörpern gegen Zelladhäsionsmoleküle (Anti-ICAM-1) die Entzündung im Gehirn (Infiltration, Gliareaktion, Endothelzellaktivierung) und damit die systemische Immundepression verhindert werden? Vorbehandlung der Ratten mit einem Anti-rat-ICAM-Antikörper, der im bakteriellen Meningitismodell (Kooperation Dr. Weber, Neurologie) die Zellmigration in den Liquor effektiv verhindert.

Kann durch lokale Verabreichung anti-inflammatorisch wirkender Pharmaka (Phosphodiesterasehemmer, Prostaglandinsynthesehemmer, Kortikosteroide) die Lokalreaktion und damit die systemische Immundepression beeinflusst werden? Die Applikation der Pharmaka (Pentoxifyllin, Dexamethason, Indomethacin) erfolgt parallel mit der IL-1 β Applikation.

III. Was ist der zentrale Mechanismus der peripheren Deaktivierung, welche anderen Systeme sind beteiligt?

Kann Hypophysektomie (Aufhebung der HHA-Achse) die systemische Immundepression verhindern ?

Kann die Hemmung von Proteinkinasen (Tyrosinkinase-, Proteinkinase (PK) A-, PKC-Hemmer), der IL-1-induzierten „nuclear factor kappa b“ (NF κ B)-Aktivierung (Radikalscavenger) bzw. der induzierbaren NO-Synthetaseaktivität (iNOS) die systemischen Effekte beeinflussen ?

Die kommerziell verfügbaren Inhibitoren, mit denen in der Immunologie umfangreiche Erfahrungen an *in vitro*-Systemen vorliegen, und für die Vorstellungen zur *in vivo* Dosierung aufgrund der Arbeiten anderer Gruppen (z. B. Kooperationspartner Dr. Weber, Neurologie) existieren, werden parallel mit IL-1 β appliziert.

Beeinflusst die pharmakologische Blockierung der Neurotransmitter des Sympathicus/Parasympathicussystems die systemische Immundepression ?

Es soll zunächst eine Sympathicusganglienblockade mit Chlorisondamin und eine periphere β -Blockade mit Propranolol erfolgen. Bei positivem Effekt sollte eine weitere Charakterisierung mit Subtypen-spezifischen Rezeptorblockern durchgeführt werden.

IV. Gibt es Effekte auf weitere Komponenten des Immunsystems?

Sind die lymphozytären Funktionen beeinflusst ?

Gibt es einen Unterschied zwischen regionalen und peripheren Lymphknoten ?

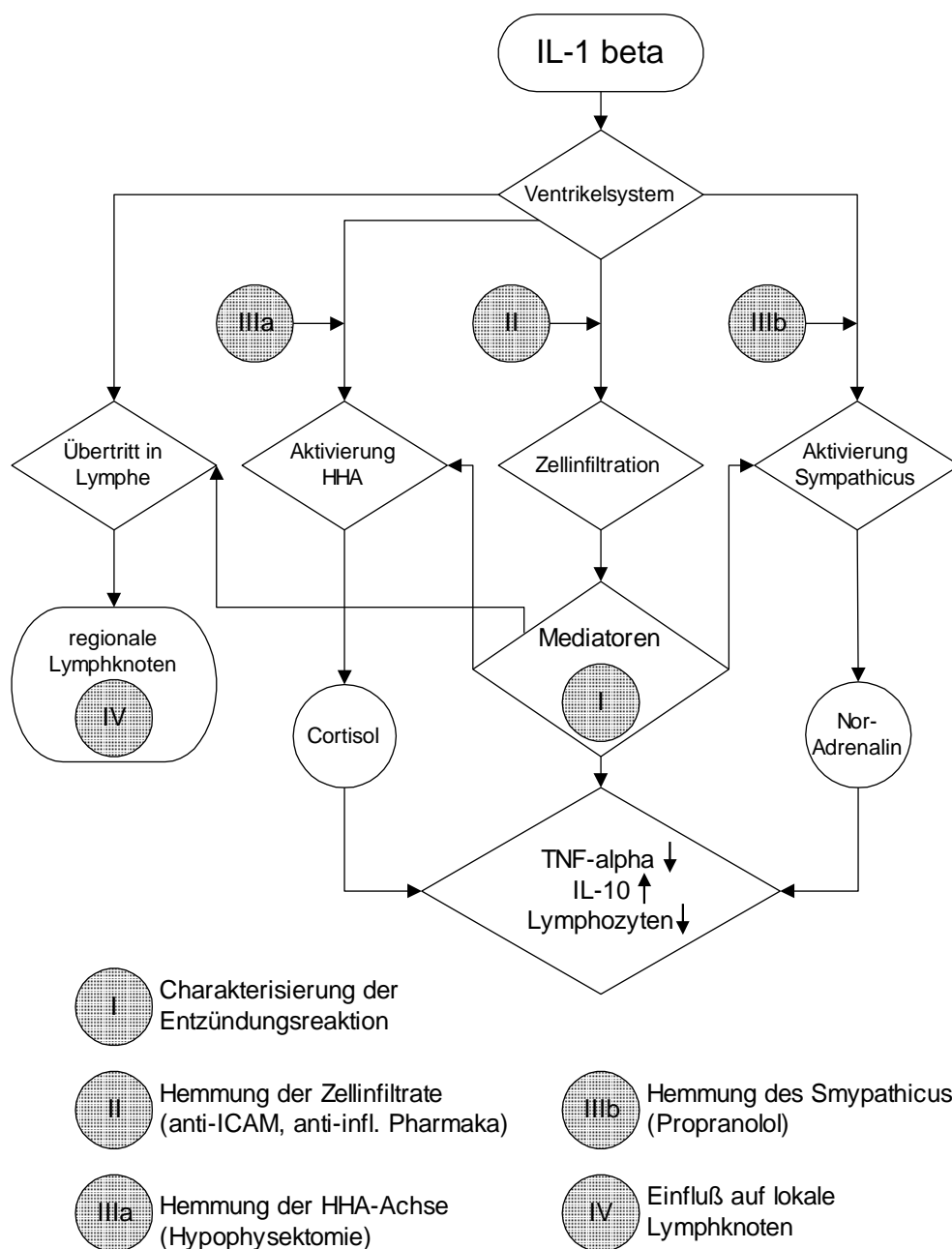
Zur Beantwortung der beiden Fragen werden neben den monozytären Funktionen auch lymphozytäre Funktionen untersucht - siehe unten

V. Welche lokalen und systemischen Effekte verursacht eine Pneumokokeninduzierte Meningitis

Welche systemischen Effekte (Zytokinproduktion nach Endotoxinstimulation) werden ausgelöst, besteht ebenfalls eine verminderte TNF- α Sekretion und erhöhte IL-10 Sekretion wie nach IL-1 β Applikation?

Wie ist die Induktion von IL-1 β im Hirn nach Applikation von Pneumokokkenzellwänden? Anwendung von quantitativer PCR und in situ Hybridisierung zur Charakterisierung der IL-1 β produzierenden Zellen.

Übersicht über das Arbeitsprogramm (Fließschema)



Versuchsablauf

Am etablierten Tiermodell der chronischen intracerebro-ventrikulären Applikation von IL-1 β sollen weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Der experimentelle Versuchsaufbau zur Zytokinapplikation erfolgt wie bereits im Erstantrag bzw. im Arbeitsbericht formuliert. Entsprechend dem Arbeitsprogramm werden die zur Beantwortung der gestellten Fragen notwendigen Untersuchungen wie folgt durchgeführt:

Basisversuchsablauf

Tag -1 (präoperativ)	Blutentnahme ca. 500 μ l für Stimulationstests und Plasmaasservierung
Tag 0 (OP-Tag)	Implantation der ALZET-Pumpe zu intracerebro-ventrikulären IL-1 β -Applikation (10,0 ng/h = 1 μ g in 0,1 ml)
Tag 0 (+2 Stunden)	Blutentnahme ca. 500 μ l für Stimulationstests und Plasmaasservierung
Tag 0 (+4 Stunden)	Blutentnahme ca. 500 μ l für Stimulationstests und Plasmaasservierung
Tag 2 (+48 Stunden)	Blutentnahme ca. 500 μ l für Stimulationstests und Plasmaasservierung Tötung der Tiere Entnahme tiefer cervicaler Lymphknoten und inguinaler Lymphknoten Liquorgewinnung Entnahme von Gehirn und Kryofixierung für Immunhistologie, RT-PCR und <i>in situ</i> Hybridisierung

Im einzelnen erfolgt die Materialaufarbeitung wie folgt:

Alle Methoden sind in der Arbeitsgruppe des Projektleiters am Virchow-Klinikum, dem Institut für Medizinische Immunologie (Mitantragsteller) bzw. dem Institut für Neuropathologie (Kooperationspartnerin: Frau Prof. Stoltenburg) etabliert.

Vollblutstimulation

entspricht dem bereits im Erstantrag formulierten Protokoll.

Bestimmung nachfolgender Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA

TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-4 mittels kommerziell erhältlicher Tests.

Bestimmung nachfolgender Hormone im Plasma

ACTH, Corticosteron mittels kommerziell erhältlicher Teste.

Lymphknotenuntersuchungen

Isolation der Lymphknotenzellen und Stimulierung der Zellen mit polyklonalen T-Zell- (Concavalin A 1 μ g/ml bzw. anti-CD3 mAb 100 ng/ml +/- IL-2 2 IU/ml) oder B-Zell- (LPS 25 μ g/ml, SAC 10 μ g/ml) Stimulatoren für 2-3 Tage. Die Stimulationsuntersuchungen dienen vorwiegend dem Vergleich zwischen cervicalen (Liquor drainiert zu 50%) und inguinale Lymphknoten (Kontroll-Lymphknoten, da keine Liquordrainage) hinsichtlich:

- IFN- γ und IL-4 Sekretion mittels ELISA (Th1/Th2-Antwort)
- Proliferation mittels 3 H-Thymidineinbau

Untersuchungen am Gehirn

Immunhistologischer Nachweis der Zellinfiltration sowie der ICAM-1 Expression an Kryoschnitten (vgl. S 13 zu verwendeten Antikörpern). Außerdem soll immunhistochemisch versucht werden, Zytokin-produzierende Zellen im Gehirn (TNF- α , IL-1, IL-10, MIP-1 α , IL-12) zu ermitteln. Weiterhin soll der Nachweis von Zytokin-mRNA (TNF- α , IL-6, IL-1 β , MIP-1 α , IL-12p35/p40) mittels quantitativer RT-PCR und *in situ* Hybridisierung durchgeführt werden.

Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen den lokalen Effekten und der peripheren Monozytendeaktivierung erfolgen nachfolgende Blockungsexperimente

Vorbehandlung der Tiere mit Anti-ICAM-Antikörpern bzw. Fucoidin entsprechend den Erfahrungen der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Weber (SFB 507), am Meningitis-Modell. Die Blockierung von ICAM-1 müßte die Zellmigration verhindern, wenn die IL-1 β induzierte ICAM-1-Expression der wesentliche Mechanismus ist. Es wäre dann zu klären, welchen Einfluß die fehlenden Immunzellen für die systemischen Veränderungen haben. Das heißt, bleibt die Monozytendeaktivierung trotz fehlender Immunzellen im Gehirn fortbestehen, so sind zentrale IL-1-Rezeptoren wesentlich und IL-1 β induziert die systemischen Effekte durch direkte Wirkung am Rezeptor. Kommt es jedoch zu einer Reduktion oder gar zum Verschwinden der systemischen Effekte, so wären die ins Gehirn eingewanderten Immunzellen für die Effekte verantwortlich. Daraus würden sich neue Fragen der Ankoppelung der Immunzellen an Neuralzellen ergeben (welche Mediatoren sind von Bedeutung). Es soll eine Gruppe (10 Tiere) zusätzlich zum Basisversuch anti-rat-ICAM mAb appliziert bekommen. Der weitere Versuchsablauf ist entsprechend dem Basisversuch.

Zur weiteren Charakterisierung der Mechanismen der Zellinfiltration im ZNS und ihrer Bedeutung für die systemischen Immunreaktionen sollen auch pharmakologische Entzündungsinhibitoren (Indomethazin, Pentoxiphyllin) eingesetzt werden. Diese Pharmaka sollen gleichzeitig in einer Pumpe mit dem IL-1 β appliziert werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß für einen direkten zentralen IL-1 β -Mechanismus auch die Induktion von Prostaglandin in Astrozyten diskutiert wird, und daß Prostaglandin Hypothalamuszellen zur CRF-Freisetzung stimuliert. Somit würde mit der Applikation von Prostaglandinsynthesehemmern auch die direkte zentrale IL-1 β -Wirkung gehemmt werden, was zu einer wesentlichen Reduzierung der systemischen Effekte führen müßte.

Zur Frage des zentralen Mechanismus der peripheren Deaktivierung sollen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

Kann eine Ausschaltung der HHA-Achse durch transaurikuläre Hypophysektomie vor der Implantation der ALZET-Pumpen die systemische Immundepression verhindern ?

An dieser Tiergruppe werden die gleichen Versuche wie im Basisablauf beschrieben mit ausgeschalteter Hypophyse durchgeführt.

Die Bedeutung von Proteinkinasen und von Radikalbildung für die beschriebenen Phänomene soll durch die gleichzeitige Applikation entsprechender Inhibitoren in einem Pumpsystem mit IL-1 β untersucht werden.

Um den Einfluß des Sympathicus und insbesondere der IL-1 β bedingten Sympathicusaktivierung für die systemischen Immunprozesse zu charakterisieren, soll eine sympathische Ganglienblockade mit Chlorisondamin und periphere β -Blockade mit Propranolol versucht werden. Die einzelnen Versuche erfolgen dann entsprechend dem Basisversuchsablauf.

3.5.4 Zeitplan

Vergleiche die genaue Fragestellung und Wege der Beantwortung entsprechend Arbeitsprogramm im Abschnitt 3.5.3

Hj. 1998 Charakterisierung der lokalen Entzündungsreaktion gemäß Punkt 3.5.3.I.

1999 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Entzündung im Gehirn und der systemischen Immundepression mit Deaktivierung des Monozytensystems entsprechend dem Punkt 3.5.3.II.

2000 Analyse des zentralen Mechanismus der peripheren Deaktivierung und der Beteiligung anderer Systeme gemäß Punkt 3.5.3.III.

1.Hj 2001 Klärung, welche lokalen und systemischen Immuneffekte im Tiermodell der Pneumokoken-induzierte Meningitis entstehen entsprechend Punkt 3.5.3.V.

Parallel zu den oben genannten Untersuchungen soll gleichzeitig die Frage geklärt werden, ob es Effekte auf weitere Komponenten des Immunsystems gibt. Dazu sollen verschiedene Analysen der lymphozytären Funktionen erfolgen, wobei die zentrale Stimulation jeweils gleich ist (vgl. 3.5.3.IV).

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Die besondere Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereiches wird dadurch bestimmt, daß lokale und systemische Immunveränderungen nach Applikation von IL-1 β an einem definierten Tiermodell *in vivo* untersucht werden, während andere Arbeitsgruppen (Weber, Nitsch, Hass) vorwiegend lokale (direkte) Interaktionen zwischen Immun- und Neuralzellen untersuchen. Die systemischen Veränderungen resultieren aus einer Aktivierung von Ganglienzellen durch Mediatoren des Immunsystems (Zytokine). Daraus ergibt sich eine Stimulation des neuroendokrinen Systems und des sympathischen Nervensystems mit Auswirkungen auf Immunzellen. Somit orientiert sich dieses Projekt auf die Untersuchung beider komplexer Systeme und ihrer Regelkreise.

Die Aufdeckung der grundlegenden Mechanismen sollte dann an konkreten Trauma- und Infektionsmodellen hinsichtlich ihrer Bedeutung überprüft werden. Dabei gilt besonderes Interesse der Zusammenarbeit mit dem Projekten von Herrn Dr. Weber, Herrn Prof. Dr. Nitsch, Herrn PD Dr. Hass und Herrn PD Dr. Dirnagel. Am Modell der Pneumokokken-induzierten Meningitis (Dr. Weber) sollten folgende Fragen geklärt werden: Welche wesentlichen Immunmediatoren werden durch die Pneumokokkenzellwände in ortständigen Immun- und Nichtimmunzellen induziert und welche Bedeutung hat IL-1 β für die Infiltration des Hirnparenchyms? Welche Auswirkung hat die Pneumokokken-induzierten Meningitis auf die systemische Immunkompetenz?

Am Modell der entorhinalen Läsion (Prof. Dr. Nitsch) mit Auswirkung auf hippocampale Bahnen sollte die Frage des Einflusses des limbischen Systems auf die systemische Immunkompetenz untersucht werden. In dieser Hinsicht wäre zu evaluieren, inwieweit dieses Modell zur Klärung von Phänomenen der Psychoneuroimmunologie genutzt werden könnte.

Die Untersuchungen im Projekt von PD Dr. Hass könnten ebenfalls am *in vivo* Modell der intracerebralen Applikation von IL-1 β , wo eine starke Infiltration mit monozytären Zellen

nachgewiesen wurde, verifiziert werden. Die Methoden von PD Dr. Hass würden helfen, die Differenzierung zwischen aktivierter Mikroglia und eingewanderten Blutmonozyten zu erleichtern, und daher das vorliegende Projekt gut ergänzen.

Weiterhin ergeben sich interessante Ansatzpunkte zu dem geplanten Projekt „Pharmakologisch induzierte Ischämietoleranz im ZNS: Rolle der Mikroglia“ (PD Dr. Dirnagel), das sich mit der Regulation der Aktivierung der Mikroglia bei ischämischen Prozessen beschäftigt. Da zwischen Ischämie und Entzündung ein enger Zusammenhang besteht, stellt sich die logische Frage nach ähnlichen Effekten auf Infiltration und systemischer Immundepression in diesem Modell.

Darüber hinaus werden die Gruppen den Austausch von Reagenzien (Antikörper, rekombinante Zytokine etc.) und Methoden (quantitative PCR, ELISA, FACS etc.) intensivieren. Der Projektgruppe von Dr. Weber wurde bereits ein anti-Ratten-TNF α -Antikörper zu Verfügung gestellt und die Technik der quantitativen PCR vermittelt, im Gegenzug wird gerade der Bezug eines von der AG Weber bereits getesteten anti-Ratten-ICAMI-Antikörper organisiert.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
 SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
 I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997 Verg.-Gr.	2. Hj. 1998				1999			2000			1. Hj. 2001			
	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	
		BAT IIa	1,0	42.600	BAT IIa	1,0	85.200	BAT IIa	1,0	85.200	BAT IIa	1,0	42.600	
		BAT IIa	0,5	19.800	BAT IIa	0,5	39.600	BAT IIa	0,5	39.600	BAT IIa	0,5	19.800	
zusammen		Zusammen		62.400	zusammen		124.800	zusammen		124.800	zusammen		62.400	
SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM		Kostenkategorie oder Kennziffer	
	Verbrauchsmaterial		30.350		Verbrauchsmaterial		60.700		Verbrauchsmaterial		60.700		Verbrauchsmaterial	
	Zusammen		30.350		zusammen		60.700		zusammen		60.700		zusammen	
I	Mittel für Investitionen insgesamt:				Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	Dr. Ch. Woiciechowsky	Neurochirurgie	Virchow-Klinikum	4 Stunden		BAT Ib
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Prof. Dr. H.-D. Volk	Immunologie	Charité	4 Stunden		C3
	Prof. Dr. G. Stoltenburg	Neuropathologie	Virchow-Klinikum	4 Stunden		C3
	N.N. (stud. Hilfskraft)	Neurochirurgie	Virchow-Klinikum	10 Stunden		
	3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Ch. Liebenthal (Laborin- geneurin) J. Kopetzki (MTA)	Immunologie Neurochirurgie	Charité Virchow-Klinikum	2 Stunden 2 Stunden	
Ergänzungsausstattung	Dr. B. Schöning	Biochemie	Virchow-Klinikum	38,5 Stunden		BAT IIa
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	N.N.	Doktorand Biologie		19,25 Stunden		BAT IIa
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Die wissenschaftlichen Mitarbeiter der Grundausrüstung verknüpfen die unterschiedlichen wissenschaftlichen Spezifikationen.

Herr Dr. Ch. Woiciechowsky ist als Projektleiter für die wissenschaftlichen Fragestellungen und die Betreuung der operativen Tätigkeiten sowie für alle Abschnitte des Versuchsablaufs verantwortlich.

Herr Prof. Dr. H.-D. Volk ist verantwortlich für die immunologischen Methoden (Zellkulturen mit Stimulation, PCR, ELISA) und die damit verbundenen Fragestellungen.

Frau Prof. Dr. Stoltenburg ist für die Durchführung der Immunhistologien und der *in situ* Hybridisierung verantwortlich.

Die studentische Hilfskraft wird aus Mitteln der universitären Forschungsförderung bezahlt und leistet Hilfestellung bei den Operationen und Zellkulturen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Frau Liebenthal und Frau Kopetzki erfüllen Aufgaben bei ELISA bzw. Histologie.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1. Ein(e) wissenschaftliche(r) Mitarbeiter(in) Postdoc

Die umfangreichen tierexperimentellen und immunologischen Arbeiten können nicht durch das vorhandene Personal in ihrer Gesamtheit bewältigt werden, da sie mit ihrem erheblichen Zeitaufwand eine Ganztags-Tätigkeit darstellen. Die Antragsteller sind durch ihre Tätigkeit als Direktor (Prof. Volk) bzw. Oberarzt (Dr. Woiciechowsky) in die tägliche Routinearbeit eingebunden und können nur neben der normalen Arbeitszeit das Projekt betreuen.

Für die tierexperimentellen Arbeiten ist ein hohes Maß an Selbständigkeit des Mitarbeiters notwendig (außerdem müssen entsprechende Zertifikate für die Durchführung dieser Experimente vorliegen). Zudem sind methodisch anspruchsvolle immunologische Analysen wie ELISA, quantitative RT-PCR, *in situ* Hybridisierung und Immunhistologie durchzuführen, die Vorkenntnisse in der Laborarbeit erfordern und schnell erlernt werden sollten, da diese ebenfalls selbständig durchzuführen sind. Mit der bereits eingestellten Frau Dr. Schöning existiert eine Mitarbeiterin, die hervorragend in die zu untersuchende Problematik eingearbeitet ist und sowohl den tierexperimentellen Versuchsablauf als auch die analytischen Methoden beherrscht. Frau Dr. Schöning hat sich zu einer zentralen Person im Projekt entwickelt und leitete auch die zusätzlich zur DFG-Projektfinanzierung involvierten Doktoranden an. Deshalb ist es sehr wichtig für das Gelingen des Projektes, daß Frau Dr. Schöning weiterbeschäftigt wird.

2. Ein(e) wissenschaftliche(r) Mitarbeiter(in) Doktorand(in).

Der (die) Doktorand(in) soll vor allen Dingen den Fragekomplex IV bearbeiten, d.h. die Erweiterung der Untersuchungen hinsichtlich der potentiellen Effekte auf lymphozytäre Funktionen. Dies ist ein abgeschlossener Themenkreis, der sich aber fest in das Gesamtprojekt einfügt.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung entfällt

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundaustattung voraussichtlich zur Verfügung	5.000	10.000	10.000	5.000
werden als Ergänzungsausstattung beantragt				
Verbrauchsmittel	30.350	60.700	60.700	30.350
<i>Summe</i>	30.350	60.700	60.700	30.350

a) Begründung Verbrauchsmaterialien

ALZET-Minipumpen, Modell 2001, 100 Stück/Jahr	4.000 DM/a
Brain infusion Kit für ALZET-Pumpen, 100 Stück/Jahr	900 DM/a
Laborchemikalien	2.000 DM/a
Labormaterial (Röhrchen, Gefäße, Objektträger etc.)	3.000 DM/a
ELISA-Kit für Zytokinbestimmungen	25.000 DM/a
Primer für in situ Hybridisierung/RT-PCR	5.000 DM/a
Antikörper für Immunhistologie	5.000 DM/a
Zytokine für intrazerebrale Applikation	10.000 DM/a
Versuchstiere Art: Ratte 250 - 350 g à 24,- DM, Zahl: 200	4.800 DM/a
Schriftverkehr, Anfertigung von Dias für Vorträge, Filme zur Archivierung der Immunhistologien	1.000 DM/a
Summe	60.700 DM/a

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

PROJEKTBEREICH Z
Zentralprojekte
(Projektbereichsleiter: Prof.Dr.K.M.Einhäupl)

Z2 Zwei-Photonen-Laserscanning Mikroskop (DPLSM)
Einhäupl

Z Sprecherhaushalt
Einhäupl

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt Z2

3.1.1 Thema:

Zwei-Photonen-Laserscanning Mikroskop (DPLSM)

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Physiologie, Pathophysiologie, Neurologie, Neuophysiologie, Neuroimmunologie

3.1.3 Leiter/in:

*Prof. Dr. med. Einhäupl, Karl (geb.:11.1.1947)**

Neurologische Klinik der Charité

Schumannstr. 20/21

10098 Berlin

Tel. 030/ 2802-3228

Fax 030/ 2802-5047

email einhaeupl@neuro.charite.hu-berlin.de

Der Sprecher stellt diesen Antrag für alle Teilprojekte, die mit diesem Gerät arbeiten werden.
Bereits jetzt sind mit konkreten Projekten beteiligt:

Müller (C4)

Dirmagl (A5)

Nitsch (C1)

Lindauer/Klee (A6)

Weber/Einhäupl (B6)

Hanisch (B2)

Eder/Heinemann (C3)

3.1.4 Das Projekt wird derzeit nicht in einem anderen Verfahren der
DFG gefördert.

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

Untersuchungen am Menschen	()	ja	(x)	nein
klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie	()	ja	(x)	nein
Tierversuche	(x)	ja	()	nein
gentechnologische Versuche	(x)	ja	()	nein

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haus-halts-jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungsausgaben	Investition	gesamt
2. Hj. 1998			650.000	650.000
1999				
2000				
1. Hj. 2001				

3.2. Zusammenfassung

Die neue Technik der Zwei-Photonen-Laserscanning Mikroskopie (Two Photon Laser Scanning Microscopy, DPLSM), eine Weiterentwicklung der Konfokalen Mikroskopie, ermöglicht die Untersuchung von Funktionszusammenhängen in intakten Geweben bei im Vergleich zur konventionellen Fluoreszmikroskopie erheblich erhöhter Eindringtiefe und stark verminderter Phototoxizität. Diese Eigenschaften der Technik machen sie interessant für eine Vielzahl von Projekten des SFB. Das Gerät soll im Institut für Physiologie aufgestellt werden, und dort allen am SFB beteiligten Gruppen zur Verfügung gestellt werden. Momentan verknüpfen 7 Gruppen konkrete Projekte mit der DPLSM. Die Anschaffung des Gerätes wird wesentliche Impulse besonders für die zellphysiologisch orientierten Projekte erbringen und eine neue Dimension der funktionellen Analyse ermöglichen. Neben diesem innovativen Impuls wird zudem durch das gemeinsame Arbeiten vieler Gruppen des SFBs ein starker integrativer Effekt von der DPLSM ausgehen. Das dem SFB assoziierte Graduiertenkolleg, das sich spezifisch mit bildgebenden Verfahren auseinandersetzt, wird ebenfalls stark von dieser innovativen Technologie profitieren. Obzwar man in den Neurowissenschaften davon ausgeht, daß die DPLSM in den nächsten Jahren einen wichtigen Beitrag bei der Beantwortung einer Vielzahl von Fragestellungen leisten wird, bei denen es um die Funktion zellulärer Strukturen in einem intakten neuronal-glialen Gewebsverband geht, verfügen erst wenige Gruppen weltweit über die Technik. Ein Gerät dieser Art, welches die Untersuchung der Interaktion von Zellen im intakten neuronal – gliäl – (vaskulären) Gewebsverband ermöglicht, ist in besonderem Maße zum Einsatz in unserem SFB geeignet, der sich ja gerade die Untersuchung dieser Zusammenhänge zum Gegenstand gewählt hat.

Der Einsatz der DPLSM im SFB könnte sich auf die hier vorhandene Expertise auf dem Gebiet der Bildverarbeitung und konventioneller sowie konfokaler Mikroskopie, die sehr guten personellen und räumlichen Voraussetzungen stützen und den Berliner Schwerpunkt zu bildgebenden Methoden in den Neurowissenschaften weiter stärken.

3.5. Methode und Ziele, Arbeitsprogramm und Zeitplan

Die Methode der DPLSM stellt eine herausragende Weiterentwicklung der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie dar. Das Prinzip des Gerätes beruht darauf, daß Fluoreszenzfarbstoff-

moleküle nicht wie bisher durch Absorption eines Photons im UV-Bereich, sondern durch gleichzeitige Absorption von zwei Photonen mit der halben Energie im IR-Bereich angeregt werden. Durch die quadratische Abhängigkeit von der Photonendichte wird die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffmolekülen außerhalb des optischen Fokus stark reduziert. Gerade neuronales Gewebe streut Licht im UV-Bereich sehr stark, während Licht im IR-Bereich wesentlich tiefer in das Gewebe eindringt. Gegenüber der konventionellen konfokalen Mikroskopie erlaubt die Methode der DPLSM daher eine wesentlich verbesserte Auflösung in axialer Richtung bei gleichzeitig deutlich verringerter Phototoxizität und verringertem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe (Denk and Svoboda, 1997). Der Laser kann zwischen 690 und 1080 nm abgestimmt werden und ist damit für fast alle bekannten Farbstoffe geeignet, insbesondere für Ca-green, Fluo-3, rhod-2, Rhodamine und Dihydrorhodamin, JC-1, Hydroethidine, Dichlorofluorescein sowie zum Freisetzen von 'caged compounds'.

Die wesentlichen Vorteile für die im Rahmen des SFB 507 geplanten Untersuchungen sind die Möglichkeiten, bei verringerter Schädigung des Gewebes tiefer in Hirnschnittpräparate und in den Cortex in situ vorzudringen. Es wurde mit dieser Methode erstmals möglich, Calciumtransienten in einzelnen postsynaptischen 'Spines' auch in tieferen Schichten von Hirnschnitten darzustellen, wo das Gewebe am wenigsten durch die Präparation beeinträchtigt ist (Denk et al. 1994; Denk et al. 1995; Yuste, R. and Denk, 1995). Darüberhinaus erlaubte die Methode erstmals neuronale Calciumsignale auch in vivo darzustellen (Svoboda et al. 1997).

Ein Gerät dieser Art, welche die Interaktion von Zellen im intakten neuronal – glial – (vaskulären) Gewebsverband ermöglicht, ist in besonderem Masse zum Einsatz in unserem SFB geeignet, der sich ja gerade die Untersuchung dieser Zusammenhänge zum Gegenstand gewählt hat. Wir könnten damit eine Reihe von ungelösten Fragestellungen bei nicht-neuronalen pathophysiologischen Schadensmechanismen in Angriff nehmen (s.u.) und darüber hinaus andere Fragestellungen, die bereits bearbeitet werden, wesentlich detaillierter untersuchen.

Innerhalb unseres SFB bestehen ausgezeichnete Voraussetzungen für die Implementation dieser neuen Technik. Ganz wesentlich ist dabei die Expertise in mikroskopischer Bildgebung und Funktionsanalyse sowie konfokaler Mikroskopie. Innerhalb des SFB haben besonders Dr. Müller, Dr. Dirnagl, Prof. Nitsch sowie Prof. Kettenmann auf diesen Gebieten langjährige Erfahrung. Durch das im wesentlichen von Mitgliedern des SFB getragene Graduiertenkolleg (Sprecher Prof. Heinemann), das sich ganz besonders mit mikroskopischen Techniken befaßt ('Schadensmechanismen bei ZNS Erkrankungen: Einsatz bildgebender Verfahren') besteht ebenfalls eine inhaltliche, methodische und personelle Basis für die DPLSM; das Kolleg könnte von der Verfügbarkeit dieser Technologie zudem sehr stark profitieren.

Herr Dr. Müller hat umfangreiche Erfahrung mit der hochauflösenden konventionellen und konfokalen Mikrofluorometrie in Zellkulturen und Hirnschnittpräparaten. Erfahrungen liegen vor mit den Ca-Farbstoffen Fura-2, Ca-green, Fluo-3, rhod-2 (mitochondriales Ca), den Radikalfarbstoffen Dihydrorhodamin123, dichlorofluoresceindiacetate, hydroethidine, Farbstoffen für Chlorid (SPQ u.a.) und Mitochondrienpotential (Rhodamin 123; Schuchmann et al, 1998; Müller et al. 1997a; Müller et al. 1997b; Müller and Swandulla 1996; Bang et al. 1995; Connor et al. 1994; Müller and Connor 1993; Müller et al. 1992; Müller and Connor 1992; Müller and Connor 1991a; Müller and Connor 1991b; Connor and Müller 1991) sowie Imaging von transgener Expression von grünem fluoreszierendem Protein (GFP).

Dr. Dirnagl und Frau Dr. Lindauer befassen sich seit Jahren mit der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie und ihrer Anwendung zum Studium der zerebralen Mikrozirkulation, insbe-

sondere der Endothel-Leukozyten Interaktion (Villringer et al., 1989; Dirnagl et al., 1991; Villringer et al., 1991; Dirnagl et al., 1994b; Villringer et al., 1994; Lindauer et al., 1996; Lorenzl et al., 1993; Weber et al., 1997, Barfod et al., 1997), Übersichten: (Dirnagl et al., 1992; Villringer et al., 1992; Dirnagl et al., 1994a; Villringer and Dirnagl, 1993). Dabei konnten sowohl die Möglichkeit als auch die Probleme dieses Ansatzes erhellt werden. Als Hauptproblem des bisherigen Einsatzes erwies sich dabei die relativ geringe Eindringtiefe und das Problem der Phototoxizität. Die TPSLM bringt hier entscheidende Fortschritte.

In der Arbeitsgruppe Nitsch ist die Technik der konfokalen Lasermikroskopie zur Visualisierung axonal transportiertem und phagozytiertem Tracer eingesetzt worden (Bechmann and Nitsch, 1997). Durch die Etablierung einer entorhinal-hippocampalen Komplexschnittkultur, die den Tractus perforans in situ erhält (Kluge et al., 1998), ist nun die Möglichkeit von in situ Untersuchungen in diesem System gegeben. Die Infrarot-Videomikroskopie, die für das Aufsuchen einzelner Zellen und den Einsatz der Einzelzell-PCR geeignet ist, erlaubt keine Darstellung von fluoreszenzmarkiertem Tracer. Hier ist die TPSLM der methodisch einzig gangbare Weg.

In der Arbeitsgruppe Kettenmann besteht umfangreiche Erfahrung mit bildgebenden Verfahren, Anwendung konfokaler Mikroskopie auf physiologische Fragestellungen, mikroskopischer Einsatz der Laserpinzette sowie Programmierung von Datenaufnahme und Auswerteprogrammen (z.B. Kirischuk et al. 1995; Müller et al. 1992).

3.5.3. Arbeitsprogramm

Teilprojekt (Müller, C4):

Dieses Teilprojekt befasst sich mit Ca-abhängigen Schadensmechanismen, insbesondere Produktion reaktiver Radikale in Mitochondrien und durch Aktivierung von Phospholipasen. Hier spielen Ca-Signale in zellulären Kompartimenten eine wesentliche Rolle. Bei Messungen der Ca-Signale wie des oxydativen Metabolismus der Zellen kommt es dabei durch die Phototoxizität von UV-Licht und kurzweiligem Licht (300-500 nm) zu artifiziellen Störungen, die die Messmöglichkeiten und Interpretation der Ergebnisse unerwünscht stark einschränken. Darüberhinaus spielt für dieses Projekt auch die verbesserte Reichweite in die Tiefe von Gewebe eine wichtige Rolle. Messungen an Zellkulturen sind wegen der bekannten Entwicklungsstörungen nur eingeschränkt auf die in vivo Situation übertragbar. Ähnliches gilt für die oberflächlichen Schichten von Hirnschnitten aufgrund der Präparationsschäden. Für pathophysiologisch relevante Daten sind deshalb insbesondere auch Messungen in der Tiefe von Hirnschnittpräparaten wichtig. Diese sollen auch an entsprechenden transgenen Tiermodellen durchgeführt werden. Weiterführend ist daran gedacht, auch in vivo Messungen in Zusammenarbeit mit der AG Dirnagl durchzuführen.

Teilprojekt (Dirnagl, A5):

Das Projekt befaßt sich mit der Rolle von Mikroglia und Leukozyten bei zerebraler Ischämie und Prækonditionierung. Mikroglia/Leukozyten werden durch Transfektion bzw. in transgenen Modellen durch endogene Expression des Fluoreszenzmarkers Green Fluorescent Protein (GFP) markiert. Mittels DPLSM in vivo soll in GFP-transgenen Tieren und den GFP-Knochenmarkschimären die Adhäsion und Migration von Zellen aus dem Blutstrom in das

Parenchym sowie die Morphologie- und damit Aktivitätsveränderungen von ortsständigen Mikrogliazellen untersucht werden. Hierzu bei beatmeten Mäusen nach temporoparietaler Kraniotomie und Entfernung der Dura mater Implantation eines kraniellen Fensters. Kontinuierliches Monitoring von systemischem Blutdruck über A.femoralis Katheter und des endexpiratorischen pCO₂ (SAR 830 Mouse Ventilator and IR - CO₂ Monitor). Das Tier wird in spezieller Maus-Stereotaxie auf computerisiertem XYZ - Tisch fixiert und mittels DPLSM durch das kranielle Fenster untersucht. Dies wird unmittelbar nach Verschluss der mittleren Zerebralarterie (MCA) und zu ausgewählten Zeitpunkten nach Reperfusion (siehe Versuchsplan des Projektes) durchgeführt. Zelluläre Auflösung ist für über 250 µm Eindringtiefe im Rattenkortex beschrieben (Svoboda, Tank, et al. 1996, Svoboda, Denk, et al. 1997). Die DPLSM ist damit die einzige Technik, welche uns durch das kranielle Fenster bei der Maus den parietalen Kortex optisch erreichen läßt und Leukozyten-Endothelinteraktion GFP exprimierender Zellen (v.a. in Venolen) beobachtet sowie Veränderungen der Morphologie GFP - exprimierender Mikrogliazellen verfolgt werden können.

Teilprojekt (Nitsch, C1):

Das two-photon konfokale Mikroskop (TPSLM) soll zur Analyse fluoreszenzmarkierter Gliazellen in organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen in situ, der Effekte der Transformationsexperimente in situ sowie dem Studium der Aktivierung von Gliazellen durch neuronale Schädigung in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur in situ eingesetzt werden.

Das two-photon konfokale Mikroskop erlaubt das direkte Monitoring vormarkierter (Mini Ruby-fluoreszenzmarkierter oder EGFP-transfizierter) Gliazellen in der lebenden organotypischen Kultur auch in den mittleren Schichten. Hierbei wird eine Auflösung erreicht, die die direkte Visualisierung von Phagozytoseprozessen ermöglicht. In unserer Arbeitsgruppe ist ein begasbarer Miniaturbrutschrank zur Kultivierung von Slicekulturen unter einem aufrechten Mikroskop entwickelt worden. Diese Einrichtung läßt sich auch unter dem beantragten two-photon konfokalen Mikroskop adaptieren. Diese Kammer ermöglicht eine langandauernde sowie eine repetitive Analyse der Slicekulturen. Zur Zeit wird dieser Setup auch für Einzel-Zell PCR Analysen eingesetzt. Ein direktes Monitoring würde es erlauben, ein Verständnis der Pathophysiologie der Gliazell-Neuron-Interaktion zur erarbeiten und auch die Dynamik dieser Phänomene zu verstehen. Für die Etablierung eines interventionistischen Ansatzes (unter Anwendung von Pharmaka, Antikörpern oder Liganden) ist diese Verständnis unabdingbare Voraussetzung.

Teilprojekt (Lindauer/Klee, A6):

Neben der im Projekt beschriebenen verfügbaren Methodik würde der Einsatz der DPLSM zur Untersuchung der Kopplungsvorgänge auf subzellulärer Ebene in der glatten Muskelzelle allein bzw. im Verband mit benachbarten Endothelzellen und perivaskulären Neuronen im intakten Gefäß weitere wichtige Informationen liefern. Wir planen die Darstellung von Calcium-Veränderungen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen zerebraler Gefäße unter Verwendung Ca²⁺ -konzentrationsabhängiger Fluoreszenzfarbstoffe unter dem Einfluß unterschiedlicher NO-Konzentrationen. Daneben wäre es auch von Interesse, mittels eines NO-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffs (z.B. Dihydrofluorescein) mögliche Veränderungen dieses Bioradikals in Endothelzellen und dessen Einfluß auf die benachbarten glatten Muskelzellen (Erfassen von Membranpotentialveränderungen mittels spannungsabhängiger Fluoreszenzfarbstoffe, z.B. styryl-dyes) unter Applikation von Kalium zu untersuchen. Der Vorteil des Einsatzes der DPLSM am isolierten Ze-

rebralgefäß liegt hier wie bei den anderen Projekten primär in der reduzierten Phototoxizität und der verbesserten Eindringtiefe.

Teilprojekt (Weber/Einhäupl B6 und Hanisch, B2):

Ein Schwerpunkt des Projekts ist die Untersuchung von Leukozyten Endothelinteraktion an Cortexvenolen nach Induktion von bakterieller Meningitis. Die DPLSM würde uns ermöglichen an tiefen bisher nicht erreichbaren Gefäßabschnitten die Schritte der Adhäsion funktionell darzustellen und die wichtige Frage klären, wie diese in unterschiedlichen Tiefen im Vergleich zu den Meningen ablaufen. Vorstellbar wäre auch die optische Darstellung morphologischer Veränderung am aktivierten Leukozyten nach Überwindung der Blut-Hirnschranke.

Teilprojekt (Eder/Heinemann, C3):

Dieses Teilprojekt befaßt sich mit Schadensmechanismen während und nach konvulsiver Aktivität. Das konfokale Mikroskop wird die lokalisierte Untersuchung von Änderungen des intrazellulären pHs, der zytoplasmatischen und mitochondrialen Kalziumkonzentration, der Produktion freier Radikale und des Mitochondrienmembranpotentials während und nach konvulsiver Aktivität in organotypischen Hirnschnittkulturen erlauben. Von besonderem Interesse sind Vorgänge an aktivierten Mikrogliazellen.

Gerätebeschreibung

Das DPLSM besteht im wesentlichen aus

- (1) Einem gepulsten, stimbaren Laser, z.B. Ti-Saphir-Laser zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe
- (2) einer Scanning Einrichtung zur Abtastung des Präparates mit dem Laser
- (3) einem aufrechten Mikroskop mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern, vorzugsweise Olympus BX 50
- (4) mehreren Detektionseinheiten
- (5) einem Rechner mit Software zur Steuerung der Datenaufnahme und Auswertung

Das beantragte DPLSM soll an einen vorhandenen elektrophysiologischen Meßplatz, der mit einem aufrechten Olympus BX50 Mikroskop ausgestattet ist, angeschlossen werden. Für Messungen in vitro und in vivo werden von der Werkstatt leicht austauschbare Meßtische mit den notwendigen Anschlüssen und Manipulatoren für die jeweiligen Aufgaben angefertigt. Mit der aus Hausmitteln bereitgestellten Elektrophysiologieausrüstung und Anästhesieeinrichtung wird Imaging in Kombination mit intrazellulärer Ableitung mit scharfen Mikroelektroden und Patch-Clamp Pipetten oder mit extrazellulärer Ableitung von Feldpotentialen und Ionenverschiebungen an Zellkulturen, akuten und kultivierten Hirnschnitten sowie in vivo an Ratten bzw. Mäusen am kraniellen Fenster möglich sein.

Gerätewahl

Scanning-Einrichtung:

Scanning-Einrichtungen werden derzeit von mehreren Firmen angeboten. Die Firma Biorad ist gegenwärtig die einzige, die ein Komplettsystem anbietet. Alternativ können die Gerätekomponenten direkt von den Herstellern bezogen und selbst montiert werden. In diesem Fall bieten sich als Alternativen zu Biorad die Scan-Einrichtungen von Leica, Olympus und Zeiss an. Dabei erscheint augenblicklich die Software von Zeiss für physiologische Messungen am geeignetsten. Auch die Software von Olympus scheint sehr geeignet, aufgrund der erst kürzlichen Vorstellung dieses Systems fehlt es allerdings noch an umfangreichen Erfahrungen aus der Praxis. Aufgrund der umfangreichen Programmiererfahrung für Bildaufnahme und Verarbeitung in der Abteilung Neurophysiologie (Dr. Siegmund, Dr. Müller und Diplomanden der Informatik) sind wir auch in der Lage, die Software durch eigene Programmierung zu ergänzen und zu für unsere Probleme anzupassen.

Laser:

Für die DPLSM sind nur Laser geeignet, die Femtosekundenpulse erzeugen können. Solche Laser werden von den Firmen Coherent und Spectra Physics angeboten, wobei gegenwärtig die Laser der Firma Coherent am geeignetsten erscheinen (Ti-Saphir Laser: Mira 900-F, Femtosekunden-Version, gepulst von einem Verdi CW green Laser, Vorteile: läuft stabiler und ist leichter zu justieren als der Laser von Spectra Physics).

Aufstellungsort

Das Institut für Physiologie der Charité bietet optimalen Raum für die Aufstellung eines DPLSM. Es ist vorgesehen, das Gerät im Raum 3891.03 003 aufzubauen. Die räumlichen Voraussetzungen (Belastbarkeit der Decken bis 500 kg/qm) für die Aufstellung der Laser und des elektrophysiologischen Meßplatzes sind gegeben. Der Raum ist ausreichend groß für die Anästhesieeinrichtung und die in vitro sowie die in vivo Meßaufbauten (kraniales Fenster). Der Raum ist als Meßraum der Gentechnik-Sicherheitsstufe S1 abgenommen. Die bisher benötigte externe Kühlung der Laser entfällt. Die Laser können mit normaler Netzspannung betrieben werden.

Durch die Lokalisation im Institut für Physiologie der Charité ist eine unmittelbare effiziente Betreuung und Wartung des Meßaufbaus und der Aufnahme- und Auswerteprogramme durch Dr. med. Dipl. Phys. Wolfgang Müller, Dr. ing. Hans-Jürgen Gabriel und Dr. ing. Herbert Siegmund gewährleistet. Für die Lösung mechanischer und elektronischer / elektrischer Probleme stehen die entsprechenden Werkstätten des Instituts für Physiologie zur Verfügung (Herr Pavel, Herr Strahl, Herr Friedrich).

Dr. Matthias Kohl ist ein Physiker, der sich auf optische Techniken und Laser-Technologie spezialisiert hat. Er arbeitet an der Neurologischen Klinik in der Klinischen Forschergruppe ‚Neue Bildgebende Verfahren in der Neurologie‘ und steht diesem Projekt in Fragen der Optik und Lasertechnik zur Verfügung. Herr Dipl. Ing. Willi Fritsch (Neurologische Klinik) hat ebenfalls langjährige Erfahrung in optischen Aufbauten und Mikroskopie und soll zur technischen Betreuung des DPLSM mit herangezogen werden.

3.5.4. Zeitplan und Nutzungsaufteilung

Für den Aufbau des Systems und der Peripherie für die verschiedenen Aufgabenstellungen veranschlagen wir ca. 6 Monate. Danach wird der Zugang zum Meßaufbau nach gleichen Teilen für die verschiedenen Arbeitsgruppen geregelt. Als vernünftige zusammenhängende Experimentierzeit werden 2 Monate angesehen. Der Zugang wird daher grundsätzlich wie folgt geregelt: Monate 1-2 AG Müller, Monate 3-4 AG Dirnagl, Monate 5-6 AG AG Nitsch, Monate 7-8 AG Eder/Heinemann, Monate 9-10 AG Lindauer/Klee, Monate 11-12 AG Harnisch. Bei zukünftigem Bedarf weiterer Arbeitsgruppen des SFB wird die Liste entsprechend erweitert. Nach Erreichen des Endes wird wieder von vorne begonnen. Bei zwischenzeitlichem Bedarf für einzelne Meßtage oder für den Tausch von Meßperioden aufgrund des Fortgangs eines individuellen Projektes sprechen sich die betroffenen Arbeitsgruppen untereinander ab.

Literatur

- Bang, H., Müller, W., Hans, M., Brune, K. and Swandulla, D., 1995. Activation of Ca-signaling in neutrophils induced by the mast cell released immunophilin FKBP, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 3435-3438.
- Barfod, C., Akgören, N., Fabricius, M., Dirnagl, U., and Lauritzen, M. (1997) Erythrocyte recruitment during hypo- and hypercapnia and locally evoked increases of cerebral blood flow. *Acta Physiol Scand* 160, 123-132.
- Bechmann, I., and Nitsch, R. (1997b) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia*. 20:145-154.
- Connor, J.A., Pozzo Miller, L.D., Petrozzino, J.J. and Müller, W., 1994. Calcium signaling in dendritic spines of hippocampal neurons. *J.Neurobiol.* 25, 234-242.
- Connor, J.A. and Müller, W., 1991. Primary and secondary Ca²⁺ concentration changes resulting from transmitter stimulation in dendrites of neurones from the mammalian hippocampus. *Ann. NY Acad. Sci.* 635, 100-113.
- Denk, W. and Svoboda, K. , 1997. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick *Neuron* 18: 351-357.
- Denk, W., Delaney, K. R., Gelperin, A., Kleinfeld, D., Strowbridge, B. W., Tank, D. W. and Yuste, R. , 1994. Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy *J Neurosci Methods* 54: 151-162.
- Denk, W., Sugimori, M. and Llinas, R. , 1995. Two types of calcium response limited to single spines in cerebellar Purkinje cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8279-8282.
- Dirnagl, U., Lindauer, U., Them, A., Pfister, W., Einhäupl, K.M., and Villringer, K.M. (1994a) Subsurface microscopical visualization of brain tissue in vivo: present, problems, and prospects. *Micron* 24, 611-622.
- Dirnagl, U., Niwa, K., Sixt, G., and Villringer, A. (1994b) Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in the rat is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 25, 1028-1038.

- Dirnagl, U., Villringer, A., and Einhäupl, K.M. (1992) In-vivo confocal laser scanning microscopy of the cerebral microcirculation. *J Microscopy* **165**, 147-158.
- Dirnagl, U., Villringer, A., Gebhardt, R., Haberl, R.L., and Einhäupl, K.M. (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain cortical microcirculation in vivo. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* **11**, 353-360.
- Kirischuk S, Moller T, Voitenko N, Kettenmann H, Verkhratsky A. (1995) ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* **15**, 7861-7871.
- Kluge, A., Hailer, N.P., Horvath, T.L., Bechmann, I., and Nitsch, R. (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro. (Hippocampus, im Druck)
- Lindauer, U., Dreier, J.P., Angstwurm, K., Villringer, A., Einhäupl, K.M., and Dirnagl, U. (1996) Role of nitric oxide synthase inhibition in leukocyte- endothelium interaction in the rat pial microvasculature. *J.Cereb.Blood.Flow.Metab.* 1143-1153.
- Lorenzl, S., Koedel, U., Dirnagl, U., Ruckdeschel, G., and Pfister, H.W. (1993) Imaging of leukocyte-endothelium interaction using in vivo confocal laser scanning microscopy during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J.Infect.Dis.* **168**, 927-933.
- Müller, W., Heinemann, U., and Schuchmann S., 1997. Impaired Ca-signaling in astrocytes from the Ts-16 mouse model of Down's syndrome, *Neurosci. Lett.*, **223**, 81-84.
- Müller, W., Berlin, K., and Heinemann U., 1997. Cholecystokinin evokes Ca-accumulations in hippocampal astrocytes by CCKB-receptor activation, *J. Neurophysiol.*, **78**, 1997-2001.
- Müller, W., and Swandulla, D. 1996. Perspectives in imaging of second messengers, invited review, *NIPS*, **11**, 281-288.
- Müller, W. and Connor, J.A., 1993. High resolution microfluorometry of Ca²⁺ signalling in dendrites and spines of central neurones. *Jap. J. Physiol.* **43**, S131-137.
- Müller, W., Petrozzino, J.J., Griffith, L., Danho, W. and Connor, J.A., 1992. Specific involvement of Ca²⁺ Calmodulin dependent kinase in muscarinic slow excitation and Ca²⁺ changes in hippocampal CA3 pyramidal neurons, *J. Neurophysiol.* **68**, 2264-2269.
- Müller, W. and Connor, J.A., 1992. Ca²⁺ signalling in postsynaptic dendrites and spines of mammalian neurones in brain slice. *J. Physiol. (Paris)* , **86**, 57-66.
- Müller, W. and Connor, J.A., 1991a. Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺ responses. *Nature* **354**, 73-76.
- Müller, W. and Connor, J.A., 1991b. Cholinergic input uncouples Ca²⁺ changes from K-conductance activation and amplifies intra-dendritic Ca²⁺ changes in hippocampal neurons. *Neuron* **6**, 901-905.
- Muller T, Moller T, Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H (1992) Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* **256**, 1563-1566.

- Schuchmann S., Müller, W., and Heinemann, U., 1998. Changes of Ca-levels, NAD(P)H, and mitochondria potential in neurons from the Ts-16 mouse model of Down's syndrome, submitted.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. and Tank, D. W. , 1997. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons *Nature* 385: 161-165.
- Villringer, A. and Dirnagl, U. (1993) Towards imaging of cerebral blood flow and metabolism on a microscopical scale in vivo. *Adv Exp Med Biol* **333**, 193-213.
- Villringer, A., Dirnagl, U., and Einhäupl, K.M. (1992) Microscopical visualization of the brain in vivo. In: *Visualization in biomedical microscopies. 3D-imaging and computer applications*, 161-181. Edited by Kriete, A., Weinheim, VCH.
- Villringer, A., Dirnagl, U., Them, A., Schürer, L., Krombach, F., and Einhäupl, K.M. (1991) Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc.Res* **42**, 305-315.
- Villringer, A., Haberl, R.L., Dirnagl, U., Anneser, F., Verst, M., and Einhäupl, K.M. (1989) Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res.* **504**, 159-160.
- Villringer, A., Them, A., Lindauer, U., and Dirnagl, U. (1994) Capillary perfusion of the rat brain cortex: an in vivo confocal microscopy study. *Circ Res* **75**, 55-62.
- Weber, J.R., Angstwurm, K., Rosenkranz, T., Lindauer, U., Burger, W., Einhäupl, K.M., and Dirnagl, U. (1997) Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis in rats. *Neurosci.Lett.* **226**, 17-20.
- Yuste, R. and Denk, W. , 1995. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration *Nature* 375: 682-684.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bevilligung 1997	2. Hj. 1998				1999			2000			1. Hj. 2001			
	Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
zusammen			zusammen			zusammen			zusammen			zusammen		
SV	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM		Kostenkategorie oder Kennziffer	
	zusammen				zusammen				zusammen				zusammen	
I	Mittel für Investitionen insgesamt:				Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			
	650.000													

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung	1) PD Dr.med. W. Müller	Physiologie	Physiologisches Insti- tut	10		Heisenberg- Stip.
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	2) PD Dr.med. U.Dirnagl	exp. Neurologie	Neurologische Klinik	5		Heisenberg- Stip.
	3) Prof. Dr. med. U. Heinemann	Physiologie	Physiologisches Insti- tut	1		C4
	4) Prof. Dr.med. K. Einhäupl	Neurologie	Neurologische Klinik	1		C4
	5) Dr.rer.nat.M.Kohl	Optik, Physik	Neurologische Klinik	4		BAT IIa
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	6) Dr.ing. H.-J. Gab- riel	Physiologie	Physiologisches Insti- tut	5		BAT Ib
	7) Dr. ing. H. Sieg- mund	Physiologie	Physiologisches Insti- tut	5		BAT Ib
	8) Dipl.Ing. Willi Fritsch	Physik, Elektro- technik	Neurologische Klinik	5		BAT III
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

PD Dr.med. W. Müller ist für das Gerät verantwortlich. Er soll in Kooperation mit den Lieferfirmen und dem technischen Personal des Institutes für den Betrieb des Gerätes sorgen.

PD Dr.med. U.Dirnagl beteiligt sich am Aufbau des Gerätes und ist für die Ableit- und Narkoseeinrichtungen für in vivo Arbeiten verantwortlich.

Dr.rer.nat. M.Kohl wird bei Fragen der Lasertechnik (Tuning) und des Aufbaues der optischen Anlage beteiligt sein.

(Prof. Dr. med. U. Heinemann sorgt für die Infrastruktur, für räumliche Installation und Betrieb des Gerätes.

Prof. Dr. med. K. Einhäupl, Sprecher des SFB, vertritt die Interessen der Gesamtheit der Projekte.

Prof. Dr. med. R. Nitsch ist für die Einrichtung zur Langzeitableitung von slice-Kulturen verantwortlich.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Dr.ing. H.-J. Gabriel und Dipl.Ing. Willi Fritsch helfen bei feinmechanischen und optischen Justierungen / Anpassungen und Anfertigungen und betreuen die elektrophysiologischen Geräte.

Dr. ing. H. Siegmund betreut die Computer Hard- und Software.

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Alle Preisangaben in DM einschließlich Mehrwertsteuer, Transportkosten usw.

<i>Bezeichnung des Gerätes</i>	<i>beantragt für das Haushaltsjahr</i>			
	<i>Einzelpreis 2. Hj. 1998</i>	<i>Einzelpreis 1999</i>	<i>Einzelpreis 2000</i>	<i>Einzelpreis 1. Hj. 2001</i>
<i>Zwei-Photonen- Lasersanning-Mikroskop</i>	<i>650.000</i>			
<i>Summe</i>	<i>650.000</i>			

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt Z

3.1.1 Thema: Zentrales Verwaltungsprojekt

3.1.3 Leiter:

Prof. Dr. med. Einhäupl, Karl (geb.:11.1.1947)*

Neurologische Klinik der Charité

Schumannstr. 20/21

10098 Berlin

Tel. 030/ 2802-3228

Fax 030/ 2802-5047

email einhaeupl@neuro.charite.hu-berlin.de

3.1.6. Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächliche Ver-waltungsausga-ben	Investition	Gesamt
bis 1995	23,1	43,0		66,1
1996	48,3	70,0		118,3
1997	48,3	116,4		164,7
1. Hj. 1998	24,6	43,2		67,8
Zwischen-summe	144,3	272,6		416,9
2. Hj. 1998	24,6	99,5	-	124,1
1999	49,2	174,0	-	223,2
2000	49,2	180,0	-	229,2
1. Hj. 2001	24,6	82,5	-	107,1

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

- PK : Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)
- SV : Sächliche Verwaltungsmittel (Begründung vgl. 3.7.2)
- I : Investitionen (Geräte über DM 20.000.-; Begründung vgl. 3.7.3)

PK Bewilligung 1997		2. Hj. 1998			1999			2000			1. Hj. 2001		
Verg.-Gr.	Anzahl	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM	Verg.-Gr.	Anzahl	Betrag in DM
VIb	1	VIb	1	24.600	VIb	1	49.200	VIb	1	49.200	VIb	1	24.600
zusammen	1	zus.	1	24.600	zus.	1	49.200	zus.	1	49.200	zus.	1	24.600
SV		Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer		Betrag in DM
		Sachmittel		6.000			12.000			12.000			6.000
		Reisekosten (527)		38.250			85.500			91.500			38.250
		Gastwissenschaftler (540)		38.250			76.500			76.500			38.250
		Druckkosten (531b)		17.000									
		zusammen		99.500	zusammen		174.000	zusammen		180.000	zusammen		82.500
I		Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:			Mittel für Investitionen insgesamt:		
		-			-			-			-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit * gekennzeichnet.

	Name, akad. Grad Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hoch- schule oder der außeruniv. Ein- richtung	Mitarbeit im Teil- projekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stel- le im SFB tätig seit	derzeitige Ein- stufung in BAT ...
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)	Prof.Dr.K.Einhäupl PD Dr.U.Dirnagl	Neurologie exp. Neurologie	Neurologische Klinik Neurologische Klinik	3 5	1995 1995	C4 Heisenberg-S.
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftliche Mit- arbeiter (einschl. Hilfs- kräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Matzerath Dagmar		Neurologische Klinik	40	1995	VIb

Z Einhäupl (Sprecherhaushalt)

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Prof.Dr.K.M.Einhäupl (Sprecher)

PD Dr.U.Dirnagl (Sekretär)

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

entfällt

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

entfällt

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Fremdsprachensekretärin Dagmar Matzerath (BAT VIb)

In diesem Projekt ist das SFB-Sekretariat angesiedelt. Die Beteiligung der verschiedenen universitären und außeruniversitären Institute verlangt die Ausrüstung des Sekretariats mit einer selbständig arbeitenden, erfahrenen Kraft, die neben den üblichen verwaltungs- und personaltechnischen Aufgaben auch die koordinatorischen Aufgaben eines Wissenschaftlichen Sekretärs innerhalb des SFB übernehmen soll. Unter diese Aufgaben fallen u.a. die Organisation von Gastwissenschaftleraufenthalten und die Betreuung der Gastwissenschaftler, die Organisation von Symposien, Kolloquien und Workshops mit ausländischen Wissenschaftlern und die Abstimmung der Themen und Termine mit diesen. Für die Bewältigung dieser Aufgaben ist flexibles, eigenverantwortliches und engagiertes Organisieren Voraussetzung, Erfahrung in der Abwicklung von wissenschaftlichen Veranstaltungen und Zuverlässigkeit und Verantwortungsbewußtsein im Umgang mit den dafür zur Verfügung stehenden Mitteln. Die Rechtfertigung der Eingruppierung nach BAT Vb resultiert auch aus diesem hohen Maß an Eigenverantwortlichkeit, das weit über den Verantwortungsbereich, in dem Sachbearbeiter üblicherweise arbeiten, hinausgeht. Außerdem werden hervorragende Sprachkenntnisse in mindestens zwei Fremdsprachen in Wort und Schrift verlangt, da die Kraft selbständig die Korrespondenz mit den Gastwissenschaftlern erledigen soll.

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2. Hj. 1998	1999	2000	1. Hj. 2001
Für sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung	3.000	6.000	6.000	3.000
werden als Ergänzungsausrüstung beantragt	99.500	174.000	18.000	882.500

Z Einhäupl (Sprecherhaushalt)

Verbrauchsmaterial (Titel 522)

Büromaterial, Computerzubehör pro Jahr

DM 12.000,--

Reisekosten (Titel 527)

Reisemittel werden gemeinsam für alle Projekte des SFB beantragt:

Vor allem jüngeren Wissenschaftlern soll die Möglichkeit gegeben werden, zu Forschungsaufenthalten in auswärtige Labors zu reisen, um die dort etablierten Techniken zu erlernen und um gemeinsame Projekte durchzuführen. Außerdem soll jungen Wissenschaftlern die Möglichkeit gegeben werden, auf internationalen wissenschaftlichen Kongressen und Symposien Ihre Arbeiten vorzustellen. Es muß darauf hingewiesen werden, daß seit 1996 Mitglieder des SFB nun bei Stellung von Anträgen auf Reisekostenzuschuß ausnahmslos auf den SFB verwiesen werden. Der SFB stellt damit für seine Mitglieder i.d.R. das einzige Mittel dar, Reisemittel für Kongressbesuche nach Übersee zu erhalten. Für jedes Projekt werden 4500 DM beantragt. Damit kann für den Projektleiter und einen Wissenschaftlichen Mitarbeiter eine Kongressreise nach USA (z.B. zum Neuroscience Meeting finanziert werden), die Summe ist also extrem knapp kalkuliert. Für den Gesamt-SFB werden also pro Jahr 76.500 DM beantragt. Ausserdem beantragen wir Mittel zur Veranstaltung der Projektbereichs-Symposien, sowie eines Symposiums des gesamten SFB. Die Projektbereichs-Symposien, bei denen auswärtige Gäste präsentiert haben und die einzelnen Projekte vorgestellt haben, waren sehr erfolgreich und führten zur verstärkten Interaktion im SFB sowie einer sehr guten Ausenpräsentation im Berliner Raum. Insofern die Projektbereiche neu strukturiert wurden, und eine Reihe neuer Projekte dazugekommen sind, planen wir für das Frühjahr 1999 nochmals Symposien der Bereiche A, B, und C, auch um die Integration der neuen Projekte zu fördern. Hierfür beantragen wir insgesamt 9.000 DM für 1999 (3.000 DM pro Projektbereich zur Einladung von 4-5 Wissenschaftlern). Im Frühjahr 2.000 wollen wir dann ein internationales Symposium des gesamten SFB veranstalten, bei dem ca. 10 renommierte Wissenschaftler aus dem In- und Ausland eingeladen werden. Dieses Symposium soll dann national und international angekündigt werden und die Aktivitäten des SFBs über die Grenzen Berlins hinaus diskutieren und präsentieren. Hierfür beantragen wir für das Jahr 2.000 15.000 DM.

Folgende Sprecher sind derzeit in der Diskussion (das endgültige Programm steht noch nicht fest):

Basbaum (San Francisco), **Bauer** (Salzburg), **Blalock** (Alabama), **Bockaert** (Montpellier), **Catania** (Milano), **Choi** (St.Louis), **Couraud** (Paris), **de Boer** (Leiden), **de Coursey** (Chicago), **del Zoppo** (LaJolla), **Dermietzel** (Ulm), **Fischer** (Düsseldorf), **Haddad** (Yale), **Kieffer** (Strasbourg), **Kloetzl** (HU Berlin), **Lauritzen** (Kopenhagen), **Lindvall** (Lund), **Lipton** (Texas), **Mattson** (Lexington), **Michaelson** (Tel Aviv), **Miller** (Chicago), **Phillips** (Gainesville), **Richter** (Goettingen), **Riepe** (Ulm), **Sontheimer** (Birmingham), **Spatz** (Bethesda), **Staddon** (London), **Tauber** (FU Berlin), **Weissleder** (Boston), **Wekerle** (Martinsried)

Z Einhäupl (Sprecherhaushalt)

Es werden also folgende Reisemittel beantragt

1998 (2.HJ)

38. 250 DM Reisemittel für Wissenschaftler des SFB

1999

76.500 DM Reisemittel für Wissenschaftler des SFB

9.000 DM für Projektbereichssymposien

2000

76.500 DM Reisemittel für Wissenschaftler des SFB

15.000 DM für internationales SFB Symposium

2001 (1.HJ)

38. 250 DM Reisemittel für Wissenschaftler des SFB

Mittel zur Finanzierung von Gastwissenschaftlern (Titel 540)

Gastwissenschaftler aus renommierten auswärtigen Labors sollen eingeladen werden, um innerhalb des SFB neue Techniken einzuführen, Seminare und Vorträge zu halten, und um jungen Wissenschaftlern die Diskussion und Kontaktaufnahme mit bekannten und erfahrenen Kollegen zu ermöglichen. Dies hat sich in der bisherigen Antragsperiode ausgesprochen bewährt, und eine wesentliche Quelle des Technologie und methodischen know-how Imports dargestellt. Zur Finanzierung der Anreise und des Aufenthaltes von Gastwissenschaftlern aus dem In- und Ausland werden DM 76.500 DM (d.h. 4.500 DM pro Projekt) pro Jahr beantragt.

Druckkosten und Vervielfältigungen (Titel 531b)

Drucken und Binden des Finanzierungsantrages (1998-2001)	DM 10.000,--
Drucken und Binden des Ergebnisberichtes (1998-2001)	DM 7.000,--

3.7.3 Investitionen (Geräte über DM 20.000.- brutto und Fahrzeuge)

Es werden keine Investitionen beantragt.

Satzung des SFB 507

- Ordnung des Sonderforschungsbereiches

§ 1

Der Sonderforschungsbereich "Die Bedeutung nicht neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen" besteht aus einem Zusammenschluß von Forschungsgruppen der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität, des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der freien Universität, des Max Delbrück Zentrums für Molekulare Medizin und des Institutes für Molekulare Pharmakologie, die gemeinsam von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert werden. Organisation und Tätigkeit des Sonderforschungsbereiches folgen den Richtlinien des Wissenschaftsrates und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

§ 2

Ziel des Sonderforschungsbereiches ist eine Intensivierung der neurologischen Grundlagenforschung. Durch Informationsaustausch und Zusammenarbeit der in ihrer wissenschaftlichen Tätigkeit selbständigen und unabhängigen Forschungsgruppen werden Grundlagenforschung und klinisch bezogene Forschung miteinander verbunden mit dem Ziel gegenseitiger Anregung und enger Kooperation. Die Überprüfung neuer Methoden und Forschungsergebnisse auf ihre Relevanz für die Klinik ist ein wesentliches Anliegen des Sonderforschungsbereiches.

§ 3

Der Sonderforschungsbereich ist gegliedert in Projektbereiche und Teilprojekte. Dabei bilden inhaltlich verwandte Teilprojekte einen Projektbereich.

§ 4

- (1) Mitglieder des Sonderforschungsbereiches sind die Leiter der Teilprojekte.
- (2) Zu Mitgliedern können außerdem Forscher gewählt werden, deren wissenschaftliche Erfahrung für den Sonderforschungsbereich wertvoll ist. Die Zahl dieser zusätzlichen Mitglieder sollte drei nicht übersteigen.
- (3) Die Mitgliedschaft dauert drei Jahre. Sie kann verlängert werden. Sie kann auf eigenen Wunsch des Mitglieds beendet werden. Sie erlischt durch Beendigung des Teilprojektes oder Aberkennung der Mitgliedschaft.
- (4) Mit der Befürwortung eines neu beantragten Teilprojektes durch die Mitgliederversammlung wird der Antragsteller gleichzeitig vorläufiges Mitglied. Er erwirbt die endgültige Mitgliedschaft mit der Genehmigung des Teilprojektes durch die DFG, bei Ablehnung des Teilprojektes erlischt die vorläufige Mitgliedschaft.

Satzung

(5) Die Mitglieder sind zu gegenseitiger Unterstützung und Beratung verpflichtet. Sie sind zur Nutzung der Einrichtungen des SFB nach Maßgabe der Ordnung berechtigt.

§ 5

Organe des Sonderforschungsbereiches sind die Mitgliederversammlung, der Vorstand und die Projektbereichsversammlung.

§ 6

(1) Die Mitgliederversammlung besteht aus den Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches.

(2) Die Mitgliederversammlung tagt mindestens zweimal im Jahr.

(3) Die Mitgliederversammlung ist beschlußfähig, wenn mindestens zwei Drittel der Mitglieder anwesend sind. Nach Eintritt in die Tagesordnung erfolgt eine Überprüfung der Beschlußfähigkeit nur auf Antrag.

(4) Die Einberufung der Mitgliederversammlung erfolgt durch den Sprecher mittels schriftlicher Einladung mit einer Frist von mindestens acht Werktagen.

(5) Auf Wunsch des Vorstandes oder von mindestens drei Mitgliedern muß der Sprecher die Mitgliederversammlung spätestens innerhalb von drei Wochen einberufen.

(6) Die vorläufige Tagesordnung wird von dem Sprecher im Benehmen mit dem Vorstand festgesetzt.

(7) Jedes Mitglied ist berechtigt, die Aufnahme von Tagesordnungspunkten bei dem Sprecher zu beantragen. Die Anträge müssen mindestens zehn Tage vor der Mitgliederversammlung bei dem Sprecher eingegangen sein. Lehnt der Sprecher die Aufnahme des Antrages ab, so kann das Mitglied Widerspruch einlegen, über den die Mitgliederversammlung entscheidet.

(8) Anträge, die später als im Absatz 7 angegeben eingegangen sind, können bei Zustimmung einer Mehrheit der anwesenden Mitglieder nachträglich in die Tagesordnung aufgenommen werden.

(9) Der Sprecher oder ein Mitglied des Vorstandes leitet die Mitgliederversammlung.

(10) Beschlüsse werden mit einfacher Mehrheit gefaßt, sofern die Geschäftsordnung nichts anderes vorsieht.

(11) Abstimmungen erfolgen in der Regel durch Akklamation, in Personalangelegenheiten schriftlich. Auf Antrag eines Mitgliedes muß geheim abgestimmt werden.

(12) Die Mitgliederversammlung beschließt die Satzung des Sonderforschungsbereiches und ihre Änderung. Hierfür bedarf es jeweils einer Zweidrittel-Mehrheit der stimmberechtigten Mitglieder.

(13) Die Projektbereichsleiter und der Sprecher werden von der Mitgliederversammlung gewählt. Für die Abwahl eines Mitglieds dieser Gremien ist eine Mehrheit von Dreiviertel der stimmberechtigten Mitglieder erforderlich.

(14) Die Mitgliederversammlung entscheidet auf Vorschlag des Vorstandes über die Aufnahme neuer Mitglieder mit der Mehrheit der Stimmen der stimmberechtigten Mitglieder und über die Aberkennung der Mitgliedschaft mit der Zweidrittel-Mehrheit der stimmberechtigten Mitglieder.

(15) Die Mitgliederversammlung nimmt den jährlichen Rechenschaftsbericht des Vorstandes entgegen und entlastet den Vorstand.

(16) Die Mitgliederversammlung bestimmt auf Vorschlag des Vorstandes den Zeitpunkt und die Gestaltung der in der Regel jährlich einmal zu veranstaltenden Mitarbeitersymposien.

§ 7

Sie ist beschlußfähig, wenn Zweidrittel der Mitglieder anwesend sind.

§ 8

(1) Der Vorstand besteht aus dem Sprecher, einem Stellvertreter, und den gewählten Leitern der verschiedenen Projektbereiche.

(2) Die Amtszeit des Vorstandes beträgt drei Jahre. Eine Wiederwahl ist zweimal möglich.

(3) Der Vorstand ernennt einen Sekretär, der beratend an den Vorstandssitzungen teilnimmt und für die Umsetzung der Beschlüsse der Organe des Sonderforschungsbereiches sorgt.

(4) Der Vorstand prüft die Forschungsvorhaben der Antragsteller auf ihre wissenschaftliche Qualifikation und auf ihre Beziehung zum Thema des Sonderforschungsbereiches.

(5) Der Vorstand koordiniert die Interessen der einzelnen Projektbereiche und Teilprojekte und wirkt auf einen kollegialen Interessenausgleich hin.

(6) Der Vorstand redigiert die Arbeitsberichte der einzelnen Mitglieder und erarbeitet im Einvernehmen mit dem Mitglied die endgültige Fassung. Er gibt den Gesamtbericht des Sonderforschungsbereiches heraus.

(7) Der Vorstand beschließt über Umdispositionsanträge und über die Verteilung von Mitteln, die nicht durch Bewilligungsbescheid der Deutschen Forschungsgemeinschaft den einzelnen Teilprojekten zugesprochen sind.

(8) Der Vorstand wirkt an der Erstellung des Gesamtfinanzierungsantrages mit. Er überprüft die Finanzierungsanträge zu den Teilprojekten und kann im Einvernehmen mit den Teilprojektleitern Änderungen vornehmen.

(9) Der Vorstand entscheidet über programmändernde Finanzierungsmaßnahmen während des laufenden Förderungszeitraumes.

- (10) Er berät über die Beschaffung von größeren Geräten.
- (11) Der Vorstand schlägt der Mitgliederversammlung die Aufnahme von Mitgliedern und die Aberkennung der Mitgliedschaft vor.
- (12) Der Vorstand trägt die personalpolitische Gesamtverantwortung für den Sonderforschungsbereich. Er fügt den Anträgen der Teilprojektleiter auf Einstellung eines Mitarbeiters oder auf Verlängerung des Dienstvertrages an die Universitätsverwaltung eine Stellungnahme bei. Er nimmt auch zu Entlassungen von Mitarbeitern Stellung.
- (13) Der Vorstand organisiert die wissenschaftlichen Veranstaltungen des SFB und unterbreitet der Mitgliederversammlung Vorschläge über die Arbeitssymposien.
- (14) Der Vorstand führt die Beratungen mit den Hochschulleitungen und den Institutsleitungen des Max Delbrück Zentrums sowie des Institutes für Molekulare Pharmakologie über Fragen der Grundausrüstung und andere für den SFB grundsätzliche Haushalts- und Personalfragen.
- (15) Der Vorstand ist für alle Fragen zuständig, die nach der Ordnung nicht in die Zuständigkeit eines anderen Gremiums oder des Sprechers fallen.
- (16) Der Vorstand ist beschlußfähig, wenn mindestens drei seiner Mitglieder anwesend sind.
- (17) Vorstandsbeschlüsse bedürfen der Mehrheit der Stimmen der Mitglieder des Vorstandes. Bei Stimmgleichheit entscheidet die Stimme des Sprechers.
- (18) Jedes Mitglied des Sonderforschungsbereiches, das von einem Vorstandsbeschluß betroffen ist, kann gegen den Beschluß Widerspruch einlegen. Über den Widerspruch entscheidet die Mitgliederversammlung.

§ 9

- (1) Der Sprecher führt die laufenden Geschäfte und vertritt den Sonderforschungsbereich nach außen. Er leitet die Sitzungen des Vorstandes und der Mitgliederversammlung und beruft diese Sitzungen ein.
- (2) Der Sprecher kann in dringenden Fällen Entscheidung treffen und Weisungen erteilen, die sonst eines Beschlusses des Vorstandes oder der Mitgliederversammlung bedürfen. Er hat in diesen Fällen nachträglich die Genehmigung des zuständigen Gremiums einzuholen, das er erforderlichenfalls ohne Beachtung der Frist nach § 6, Absatz 4, einberufen kann.
- (3) Der Sprecher ist berechtigt, sich über die Tätigkeit der Teilprojekte zu informieren.
- (4) Der Sprecher verwaltet die Mittel des Sonderforschungsbereiches und kann Beträge bis zu DM 2.500,- den Antragstellern unmittelbar zuweisen lassen.

§ 10

Beschlüsse von Gremien des Sonderforschungsbereiches, die Institute oder Abteilungen der Universität betreffen, bedürfen der Zustimmung der Leiter der betroffenen Einrichtungen.

§ 11

(1) Der Projektbereichsleiter sowie die Leiter der zu einem Projektbereich zusammengefaßten Teilprojekte und die an deren Forschungsprojekten beteiligten Professoren und wissenschaftlichen Mitarbeiter bilden eine Projektbereichsversammlung.

(2) Die Projektbereichsversammlung kann ein Mitglied zum Projektbereichsleiter vorschlagen. Die Wahl erfolgt durch die Mitgliederversammlung.

(3) Der Projektbereichsleiter leitet die Projektbereichsversammlung.

(4) Die Projektbereichsversammlung fördert die gegenseitige Information, Unterstützung und Abstimmung der Teilprojekte.

(5) Mitglieder aus anderen Projektbereichen des Sonderforschungsbereiches können zu den Projektbereichsversammlungen eingeladen werden.

(6) Der Projektbereichsleiter wirkt auf eine Koordinierung der Teilprojekte und einen kollektiven Interessenausgleich hin. Er vertritt die Interessen des Projektbereiches im Vorstand.

§ 12

(1) Die Teilprojektleiter sind für die Organisation der in ihrem Bereich geförderten Forschungsprojekte sowie für den sachgerechten Einsatz der ihnen zugewiesenen Mittel verantwortlich.

(2) Die Teilprojektleiter entscheiden über den Einsatz der ihnen bewilligten Geräte und über die Möglichkeit der Mitbenutzung dieser Geräte durch Forscher, die in anderen Teilprojekten des Sonderforschungsbereiches tätig sind. Sie sind verantwortlich für eine optimale Nutzung der Geräte und ihre Wartung.

(3) Die Teilprojektleiter stellen über den Vorstand Anträge auf Einstellung wissenschaftlicher und nichtwissenschaftlicher Mitarbeiter an die Verwaltung.

(4) Antragsrecht auf Mittelzuweisung haben innerhalb des Sonderforschungsbereiches nur die Teilprojektleiter.

(5) Eine Ausnahme bilden Anträge auf Reisekostenzuschüsse, die auch von anderen, im Bereich des Sonderforschungsbereiches tätigen Wissenschaftlern an den Vorstand gestellt werden können.

§ 13

Diese Satzung ist seit 4.8.1995 in Kraft.

Berlin 1998

Redaktion: U. Dirnagl und T. Wolf

Drucklegung am 26.02.98

gedruckt und gebunden bei

Schmohl & Partner

Berlin - Weißensee