

Deutsche Forschungsgemeinschaft

Sonderforschungsbereich 507

Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen
bei neurologischen Erkrankungen

Finanzierungsantrag 2002-2004



Deutsche Forschungsgemeinschaft
- Sonderforschungsbereiche -

53170 Bonn

Antrag auf Finanzierung des Sonderforschungsbereichs 507

"Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen"

"The role of non-neuronal cells in neurological disease"

gefördert als Vorlauf SFB seit 2. HJ 1995, endgültige Einrichtung 2.HJ 1998

für die Jahre 2002 – 2003 – 2004

Sprecherhochschule: Humboldt Universität zu Berlin

Sprecher des SFB:

Prof. Dr. Karl M. Einhäupl

Neurologische Klinik der Charité
Humboldt Universität Berlin
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin
Telefon: 030 45056-0031
Telefax: 030 45056-0932
karl.einhaeupl@charite.de

Berlin, den

Berlin, den

Geschäftsführung oder Sekretariat des SFB:

Prof. Dr. Ulrich Dirnagl

Experimentelle Neurologie der Charité
Humboldt Universität Berlin
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin
Telefon: 030 45056-0134
Telefax: 030 45056-0942
ulrich.dirnagl@charite.de

Prof.Dr. Karl Einhäupl
(Sprecher des SFB)

Prof. Dr. Jürgen Mlynek
(Präsident der Humboldt - Universität)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Allgemeine Angaben zum Sonderforschungsbereich 9
1.1	Forschungsprogramm 9
1.2.1	Übersicht über die Teilprojekte, gegliedert nach Projektbereichen 11
1.2.2	Übersicht über die im letzten Bewilligungszeitraum geförderten Teilprojekte, deren Fortführung nicht beabsichtigt ist 13
1.2.3	„Übersetzungsliste“ der Kennziffern von Projekten, welche neu eingruppiert wurden 14
1.3	Inhaltlich-strukturelles Umfeld und personelle Situation des Sonderforschungsbereichs 14
1.4	Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses 15
1.4.1	Verzeichnis der laufenden Dissertationen 15
1.4.2	Besondere Maßnahmen zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses 23
1.5	Alphabetische Liste der am Sonderforschungsbereich beteiligten Wissenschaftler 23
1.6	Verzeichnis der Forschungsthemen, an denen Wissenschaftler des Sonderforschungsbereichs mitarbeiten und die in anderen Verfahren der Deutschen Forschungsgemeinschaft oder anderer Zuwendungsgeber gefördert werden oder für die Förderungsanträge gestellt worden sind 25
1.7	In der Ordnung des Sonderforschungsbereichs vorgesehene Gremien (außer Mitgliederversammlung) und ihre personelle Zusammensetzung 30
2	Überblick über die bisherige und die beantragte Förderung des Sonderforschungsbereichs 31
2.1.1	Zusammenstellung der dem Sonderforschungsbereich bis einschließlich 2000 aus der Grundausrüstung (GA) zur Verfügung gestellten Sachmittel sowie des entsprechenden Ansatzes für 2001 31
2.1.2	Zusammenstellung der als Ergänzungsausstattung (EA) für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 2000 bewilligten und für die Haushaltsjahre 2001 bis 2003 beantragten Mittel 31
2.2	Anzahl der Mitarbeiter/innen, die aus der Grundausrüstung im Haushaltsjahr 2001 für die jetzt beantragten Teilprojekte zur Verfügung stehen werden 32
2.3	Anzahl der Mitarbeiter/innen, für die Personalmittel aus der Ergänzungsausstattung beantragt werden 33
	für das Haushaltsjahr 2002
	für das Haushaltsjahr 2003
	für das Haushaltsjahr 2004

		Seite
2.4	Als Ergänzungsausstattung beantragte Sondermittel für Sächliche Verwaltungsausgaben für das Haushaltsjahr 2002 für das Haushaltsjahr 2003 für das Haushaltsjahr 2004	36
2.5	Liste der Geräte über DM 20.000,-- (brutto) sowie der Fahrzeuge, die aus Mitteln für Sonderforschungsbereiche oder aus Mitteln der Grundausrüstung (HBFG, Mittel der Hochschule, des Landes) beschafft worden sind bzw. als Leihgabe der DFG zur Verfügung stehen oder deren Beschaffung 2000 aus Mitteln des Sonderforschungsbereichs oder anderer Förderungsverfahren vorgesehen ist	39
2.6	Liste der als Ergänzungsausstattung für die Haushaltsjahre 2002/2003/2004 beantragten Geräte über DM 20.000,-- (brutto) und Fahrzeuge	40
2.7	Angaben über Versuchstierhaltung	41
3	Darstellung des Programms nach Projektbereichen und Teilprojekten	43
	Projektbereich A	43
	A1, Cortical Spreading Ischaemia, Dreier/Einhäupl	47
	A5, Mikroglia bei der zerebralen Ischämie, Dirnagl/Priller	69
	A6, Endotheliale NO Synthase und zerebrale Gefäßreaktivität, Lindauer	87
	A7, Mikroglia und zerebraler Eisenstoffwechsel, Grune	109
	A8, Angiotensin II und zerebrale Ischämie, Unger/Blume	125
	Projektbereich B	143
	B6, Blut-Hirnschranke und Meningitis, Weber	145
	B9, Thrombin und Mikroglia, Hanisch	161
	B11, Glia- und T-Zellen bei Protektion und Reorganisation im ZNS, Nitsch	187
	B12, Oligodendrogliale Chemokinrezeptoren und Myelin, Brück/Stangel	207
	B13, Mechanismen des Immunprivilegs im ZNS, Bechmann/Gimsa	223
	B14, Das TRAIL-System bei der multiplen Sklerose, Zipp	245
	B15, ZNS-vermittelte systemische Immunsuppression, Woiciechowsky/Volk	263
	Projektbereich C	283
	C3, Gliazellen bei epileptogenen Prozessen, Heinemann	285
	C6, Signalwege bei Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone, Ullrich	309

	C7, Lysophospholipid-vermittelte Aktivierung von Mikrogliazellen, Eder	333
	C8, Physiologische Eigenschaften gliärer Tumore, Kettenmann	349
	C9, Molekulare Mechanismen der Invasion von Gliomzellen, v. Deimling	363
	Z, Sprecherhaushalt, Einhäupl	379
	Z2, Zwei-Photonen-Laserscanning Mikroskop, Einhäupl	387
4	Satzung des Sonderforschungsbereichs	391

1 Allgemeine Angaben zum Sonderforschungsbereich

1.1 Forschungsprogramm

”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 Nerventheilen vorhanden ist, welche sie zusammenhält und im ganzen mehr oder weniger seine Form gibt”. Rudolf Virchow (1871)

Obzwar Neuronen die empfindlichsten und für die Hirnfunktion wohl relevantesten zellulären Elemente des Gehirnes darstellen, sind nicht-neuronale Zellen für die normale Hirnfunktion sowie für praktisch alle Erkrankungen des Gehirnes von grösster Bedeutung. Neben den hochkomplexen Interaktionen zwischen neuronalen Zellen und Astroglia, Oligodendrozyten, Mikroglia, glatten Muskelzellen, Endothelzellen etc. wird immer deutlicher, dass insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen auch Elemente des peripheren Immunsystems grossen Einfluss auf das Überleben von neuronalen Strukturen haben. Es gibt dabei zunehmend Hinweise, dass sich eine Vielzahl zellulärer und molekularer Reaktionen auf pathologische Noxen im ZNS nicht einfach dem Schema destruktiv – protektiv zuordnen lassen, sondern sehr komplexe Beziehungen und Wechselwirkungen zwischen zerstörerischen und schutzbringenden Mechanismen existieren, ja dass der selbe Mechanismus beide Wirkungen haben kann. Seit seines Bestehens ist das globale Ziel des SFBs, die Interaktion von neuronalen und nicht-neuronalen Elementen in der Entstehung und im Verlauf von neurologischen Erkrankungen zu verstehen und dadurch neue Interventionsmöglichkeiten zu entwickeln. Diese können in der Blockade von Schadensmechanismen genauso bestehen wie in der Induktion protektiver Mechanismen. Aufgrund der Befunde der laufenden Untersuchungen sollen in der kommenden Antragsphase verstärkt auch die Interaktionen von Zellen des ZNS mit Zellen des Immunsystems in die Betrachtung Eingang finden.

Diese Entwicklungen und Erkenntnisse im internationalen wissenschaftlichen Umfeld haben die Bedeutung der nicht-neuronalen Zellen bei neurologischen Erkrankungen deutlich in das Zentrum einer klinisch orientierten Forschung gerückt. Die Interaktion zwischen Nervensystem und Glia/Immunsystem stellt dabei einen zentralen pathophysiologischen Mechanismus dar. Dies gilt über die „klassischen“ neuroimmunologischen Erkrankungen hinaus auch für Infektion, traumatische Schädigung und Ischämie des ZNS. Darüberhinaus ist die Rolle glialer Reaktionen für die Tumorphänomene im ZNS von entscheidender Bedeutung. Darauf hat der SFB im Verlauf der ablaufenden Förderperiode nicht nur reagiert, sondern hat auch selber durch seine Ergebnisse zu dieser Entwicklung beigetragen. Die Untersuchungen innerhalb der verschiedenen Projektbereiche haben sich seit Beginn dieses SFBs konsequenterweise unter der Perspektive eines gemeinsamen pathophysiologischen Mechanismus aufeinander zu bewegt. Diese wird durch vielfältige Kooperationen über die Grenzen der Projektbereiche hinweg belegt, die auch schon zu gemeinsamen Publikationen geführt haben. Während also in der Förderperiode des vorläufigen SFB's (1995-1998) und in der ersten des endgültig eingerichteten SFB's (seit 7/98) die Hypothesenbildung der einzelnen Projekte aus der Sichtweise der jeweiligen neurologischen Erkrankungen vorangetrieben wurde, stellt der SFB nun die Mechanismen Neuron-Glia-Immunologischer Interaktion in den Mittelpunkt seiner Untersuchungen.

Diese Zielsetzung spiegelt sich in den neu in den SFB aufgenommenen Projekten und in einer Neudefinition der Projektbereiche ebenso wider, wie in der Tatsache, daß Projekte, die diese Entwicklung nicht durchlaufen haben, nicht mehr im SFB vertreten sind. Die Stärkung der neuroimmunologischen Ausrichtung des SFB entspricht demnach nicht nur den Gutachterempfehlungen aus vergangenen Begutachtungen, sondern ist Ausdruck einer wissenschaftlichen Entwicklung innerhalb des SFB. Diese Ausrichtung ist deshalb auch nicht einfach Effekt der Aufnahme von Projekten zu „klassischen“ neuroimmunologischen Erkrankungen, sondern Ausdruck einer deutlichen Konvergenz in der Entwicklung der Projekte des SFB. Wir halten dies für einen wichtigen Reifungsprozess, der sogar zum Teil die Grenzziehung zwischen den Projektbereichen „A: Zerebrale Ischämie/Hypoxie“, „B: Entzündung“ und „C: Neurodegeneration und Tumore“ schwierig gemacht hat.

Die starke Integrationskraft des SFBs hat sich in den zurückliegenden Antragsperioden nicht nur strukturell manifestiert (siehe 1.3., und ausführlicher im Berichtsband), sondern führte auch zu mannigfaltigen gemeinsamen Kooperationen und dem Austausch von Methoden. Deutlich profitiert hat der SFB dabei durch die Integration neuroimmunologischer Ansätze. Die Zusammenführung neurophysiologischer und zellbiologischer Ansätze mit Strategien der Immunologie und Molekularbiologie vor dem Hintergrund klinischer Fragestellungen macht unseres Erachtens eine wesentliche Stärke dieses SFBs aus.

1.2.1 Übersicht über die Teilprojekte, gegliedert nach Projektbereichen

(bei Änderung der Kennziffer alte Kennziffer in Klammern, siehe auch 1.2.3)

Kennziffer	Titel	Fachgebiet und Arbeitsrichtung	Leiter/in, Institut, Ort
A Zerebrale Ischämie/Hypoxie			
A 1	'Cortical spreading ischemia': Ein neues Ischämieprinzip	Neurologie, Experimentelle Neurologie	Dreier/Einhäupl Neurol. Klinik/ Exp. Neurol. Charité Humboldt Universität
A 5	Fokale cerebrale Ischämie und induzierte Ischämietoleranz: Rolle von Makrophagen und Mikroglia	Neurologie, Experimentelle Neurologie	Dirnagl/Priller Neurol. Klinik/ Exp. Neurol. Charité Humboldt Universität
A 6	Rolle der endothelialen NO Synthase bei zerebraler Gefäßreaktivität: Beeinflussung der Enzymaktivität mittels HMG-CoA Reduktase-Inhibition und Einfluß auf die Infarkt volumenenentwicklung bei fokaler zerebraler Ischämie	Neurologie, Experimentelle Neurologie	Lindauer Neurol. Klinik/ Exp. Neurol. Charité Humboldt Universität
A 7	Rolle der Microglia im Eisen-Stoffwechsel des Gehirns: Schädigung Eisen-bindender Proteine bei Ischämie und Reperfusion	Biochemie	Grune Klinik für Phys. Medizin und Rehabilitation Charité Humboldt Universität
X A 8	Pro-regenerative Effekte von Angiotensin II AT2-Rezeptoren nach fokaler Ischämie im Rattenhirn.	Pharmakologie	Unger/Blume Institut für Pharmakol. und Toxikol. Charité Humboldt Universität
B. Inflammation			
B 6	Gliaaktivierung - Ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis	Experimentelle Neurologie, Neuroimmunologie	Weber/Braun Neurol. Klinik Charité Humboldt Universität
B 9	Signale und Signalprozesse glialer Aktivierung: Thrombin als zellulärer Stimulus	Neurobiologie, Biochemie	Hanisch Max-Delbrück- Centrum Berlin
B11 (C1)	Die Beteiligung von autoantigenspezifischen T-Zellen bei Protektion und Reorganisation des entorhinal-hippocampalen Systems	Anatomie	Nitsch Institut für Anatomie Charité Humboldt Universität

X	B12	Die Rolle von oligodendroglialen Chemokinrezeptoren bei der Myelinisierung und Demyelinisierung – funktionelle in vitro-in vivo Korrelationen	Neuro-immunologie, Molekularbiologie, Neurologie, Neuropathologie	Brück/Stangel Institut für Neuropathologie Charité Humboldt Universität/ Neurol. Klinik UKBF, FU Berlin
X	B13	Mechanismen des Immunprivilegs: Die Rolle von Gliazellen	Anatomie	Bechmann/ Gimsa Institut für Anatomie Charité Humboldt Universität
X	B14	Expression und funktionelle Bedeutung des TRAIL-Systems für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose	Neurologie, Neuro-immunologie	Zipp Neurol. Klinik Charité Humboldt Universität
	B15 (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 Neurochirurg. Klinik, Institut für Immunologie Charité Humboldt Universität
C. Neurodegeneration und Tumore				
	C 3	Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse	Physiologie	Heinemann Physiologisches Institut Charité Humboldt Universität
X	C 6	Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone: Signalwege oxidativ modifizierter Lipide	Anatomie	Ullrich Institut für Anatomie Charité Humboldt Universität
X	C 7	Physiologische Mechanismen der Lysophospholipid-vermittelten Aktivierung von Mikrogliazellen	Physiologie	Eder Physiologisches Institut Charité Humboldt Universität
	C 8 (B 1)	Physiologische Eigenschaften glialer Tumore	Zelluläre Neuro-wissenschaften	Kettenmann Max-Delbrück Centrum Berlin
	C 9 (B 10)	Molekulare Mechanismen der Invasion von Gliomzellen	Neuropathologie, Molekulare Neuroonkologie, Molekulargenetik	v.Deimling Institut für Neuropathologie Charité Humboldt Universität

Z. Zentralbereich				
	Z2	Multiphotonen Laser Scanning Mikroskop	Neurobiologie	Einhäupl Neurol. Klinik Charité Humboldt Universität
	Z	Sprecherhaushalt		Einhäupl Neurol. Klinik Charité Humboldt Universität

(Neue Teilprojekte sind mit **X** gekennzeichnet)

In der Vorbereitungsphase auf diese Beantragung haben sich die Mitglieder des SFB in Vorstands- und Plenumsitzungen intensiv mit der Frage auseinandergesetzt, welche Projekte am Fortsetzungsantrag beteiligt sein sollen. Zehn exzellente Projekte hatten einen Antrag auf Aufnahme in den SFB gestellt. In einem Antragskolloquium, bei dem alle Projekte (laufende wie neu aufzunehmende) sich vorgestellt haben, wurde dann insbesondere nach folgenden Kriterien über die Aufnahme/Fortführung entschieden:

- wissenschaftliche Leistungen (Vorleistungen bzw. aus dem laufenden Projekt)
- Kohärenz mit der Thematik des SFB)
- Interaktion (potentielle oder stattgefundene) mit den anderen Projekten des SFB
- Nachwuchsförderung

Nach intensiven Diskussionen wurde die nun vorliegende Projektstruktur einstimmig von den Mitgliedern verabschiedet. Einige hervorragende Projekte konnten bei Anwendung der o.g. Kriterien leider keine Berücksichtigung finden, drei Projekte des laufenden SFB stellen keinen Fortsetzungsantrag, die Projektleiter bleiben aber Mitglieder des SFB.

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

Kenn- ziffer	Titel	Leiter/in	gefördert	
			von – bis	mit TDM
A2	Einfluß von Astrozyten auf Gehirndothelzellen bei Hypoxie	Blasig	07/95 – 12/01	588,8
B8	Schmerzinhibition durch Migration Opiod-enthaltender Immunzellen in entzündetes Gewebe	Stein/Welte	07/98 – 12/01	274,6
C2	Expression und Regulation von Apolipoprotein E (APOE) in Gliazellen nach experimenteller und neuropathologischer Läsion (M. Alzheimer)	Ohm	07/95 – 12/01	821,3
C4	Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, freier Fettsäuren und der Glutathion-Spiegel in pathologisch veränderten und normalen Astrozyten	Müller	07/95 – 06/00	555,6

1.2.3. ‚Übersetzungliste‘ der Kennziffern von Projekten, welche neu eingruppiert wurden

Alte Kennziffer	Neue Kennziffer	Projektleiter
C1	B11	Nitsch
C5	B15	Woiciechowsky, Volk
B1	C8	Kettenmann
B10	C9	v.Deimling

1.3 Inhaltlich-strukturelles Umfeld und personelle Situation des Sonderforschungsbereichs

Der SFB 507 'Die Rolle nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen' wurde in der Phase der Neustrukturierung der Charité beantragt - zu einem Zeitpunkt, an dem eine Reihe von Berufungsverfahren noch offenstanden. Hochschulpolitisch erfolgte die Gründung des SFB vor der Beschlussfassung zur Fusion des Universitätsklinikums Charité mit dem Rudolf-Virchow-Klinikums, das ursprünglich an der Freien Universität angesiedelt war. Während der jetzigen Förderperiode hat sich die neurowissenschaftliche Szene in Berlin weiter konsolidiert und fokussiert. Hierbei spielte der SFB 507 eine wichtige Rolle.

Eine detaillierte Darstellung dieser Entwicklungen findet sich im Berichtsband. Hier sollen nur die wichtigsten Aspekte hervorgehoben werden:

Während der jetzigen Förderperiode konnte eine Reihe von neuen und innovativen Strukturen in den Neurowissenschaften an der Charité geschaffen werden:

- Die Neurologie hat eine von der Hermann und Lilly Schilling Stiftung geförderte Abteilung für Experimentelle Neurologie mit Stiftungslehrstuhl (Prof. Dirnagl) eingerichtet (1999), die mit modernen bildgebenden, biochemisch-molekularbiologischen und elektrophysiologischen Techniken arbeitet.
- Mit der Rufabwendung und Berufung von Prof. Weber konnte die Weiterentwicklung der Neuroinflammationsgruppe, mit dem Wechsel von Frau PD Zipp der Aufbau einer klinischen Neuroimmunologie gesichert werden.
- Ebenfalls an der Neurologie hat eine VW-Nachwuchsgruppe ihre Arbeit aufgenommen.
- Mit den Berufungen von Prof. von Deimling und Prof. Brück wurde ein Institut für Neuropathologie an der Charité etabliert und somit einer wichtigen Gutachterforderung nachgekommen. Hierdurch ist es zu einer wesentlichen Verstärkung auf dem Gebiet cerebraler Tumoren und der neuroimmunologischen Expertise gekommen. Diese Forschungsschwerpunkte fügen sich ausgezeichnet in den SFB ein.
- In der laufenden Antragsphase wurde ein Neurowissenschaftliches Forschungszentrum (NWFZ) gegründet, welches auf dem Charité Campus Mitte über ein eigenes Forschungshaus mit exzellenten Laboratorien für Nachwuchsgruppen verfügt. Neben einer Reihe von Mitgliedern des SFBs ist dort auch das Multiphotonen-konfokale Mikroskop des SFB (Z2) angesiedelt.
- Als neuer Direktor des Institutes für Pharmakologie wurde Herr Prof. Unger berufen, womit das Institut auch einen für den SFB interessanten wissenschaftlichen Schwerpunkt erhält. Herr Unger wurde in den SFB aufgenommen.

Wichtig für den SFB war auch die Entwicklung des Schwerpunktes Rheumatologie/Immunologie an der Charité. Mit dem dort angesiedelten Kompetenznetz des BMBF ‚Systemische entzündlich-rheumatische Krankheiten‘, dem in die neuen Räumlichkeiten in unmittelbarer Nähe zu den neurowissenschaftlichen Gruppen umgezogenen Deutschen Rheumaforschungszentrum, sowie dem SFB 421 ‚Protektive und pathologische Folgen der Antigenverarbeitung‘ existieren vielfältige Kooperationen, welche sich in gemeinsamen Publikationen und Antragstellungen niedergeschlagen haben.

Das neurowissenschaftliche Forschungsumfeld, welches sich um den SFB gruppiert, ist weiterhin sehr dynamisch, es laufen derzeit einer Reihe gemeinsamer Forschungsinitiativen, welche im Berichtsband detailliert aufgeführt sind. Zu nennen sind hier

- der Transregio-SFB ‚Mesiale Temporallappenepilepsien‘,
- eine SFB – Initiative aus dem Innovationskolleg ‚Theoretische Biologie‘ (positiv vorbegutachtet),
- die Etablierung eines klinischen Forschungsschwerpunktes ‚Neuroimmunologie‘ im Rahmen des BMBF-Programms ‚Verbesserung der Leistungsfähigkeit der klinischen Forschung‘
- Nach positiver Vorbegutachtung zur Antragstellung aufgefordert sind:
 - das ‚Berlin Neuroimaging Center‘ (DFG - Programm)
 - ein Antrag innerhalb der BMBF Ausschreibung für ‚Kompetenznetze in der Schmerzforschung‘.
 - ein Antrag innerhalb des Initiative ‚GerMenNet‘ (German Meningitis Network, BMBF Kompetenznetzwerk)

Im Zeitraum des laufenden Antrages konnte die Vernetzung der Berliner neurowissenschaftlichen Gruppen und Projekte, weiter vorangetrieben werden. Ausdruck findet dies am besten im regelmässigen gemeinsamen Treffen aller neurowissenschaftlichen Verbundprojekte in Berlin, welche sich mit über 200 Teilnehmern ein Wochenende Zeit nehmen zum Gedankenaustausch und zur Anbahnung von Kooperationen.

Eine Reihe von Berufungen haben den SFB personell verstärkt (v.Deimling, Brück) bzw. konsolidiert (Weber, Dimagl). Rufe an andere Universität erhalten und abgelehnt haben Nitsch, Weber, Heinemann, die Habilitationsverfahren von Grune, Eder und Hanisch konnten abgeschlossen, die von Lindauer und Bechmann eröffnet werden.

1.4 Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

1.4.1 Verzeichnis der laufenden Dissertationen

Projektbereich A

Teilprojekt A1 Dreier/Einhäupl

Görner, Astrid

Verminderung der Kalium-induzierten Blutflußsteigerung bei spontanhypertensiven Schlaganfallratten im Vergleich zum Wildtyp

Tille, Katrin

Der Einfluß von Vasodilatoren auf die Cortical Spreading Ischaemia

Kleeberg, Jörg

Endothelin-1 induziert Leão's Cortical Spreading Depression in der Ratte. Ein Modell für einen endothelialen Trigger von Migräneuren?

Major, Sebastian

Induktion der Cortical Spreading Ischaemia durch NO-Senkung und Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase mit Ouabain bei der Ratte

Windmüller, Olaf

Veränderung extrazellulärer Ionenkonzentrationen während Cortical Spreading Ischaemia bei der Ratte

Masry, Haythem
Cortical Spreading Ischaemia bei spontan hypertensiven Schlaganfall-Ratten

Teilprojekt A5 Dirnagl/Priller

Heinze, Matthias
GFP-Markierung hämatopoietischer Zellen

Fernandez Klett, Francisco
Untersuchung der Rolle der Perizyten bei der Blutfluss-regulation im Kapillarnetz des Gehirns

Böntert, Matthias
Knochenmarkszellen und ihre Abkömmlinge differenzieren sich zu Mikrogliazellen, aber nicht zu GFAP-positiven Astrozyten

Wehner, Tim
Identifizierung aus dem Knochenmark entstammender Zellen im adulten Mausgehirn und Abgrenzung dieser Zellen von ortsständigen Mikrogliazellen

Teilprojekt A6

Kunz, Alexander
Interaktion von H⁺ und NO bei der zerebrovaskulären Reaktivität auf Azidose: Untersuchungen in einem in vitro Arterienpräparat

Brodowsky, Renate
Interaktion von physiologisch erhöhten Kaliumkonzentrationen und NO sowie Beteiligung von Kaliumkanälen: Untersuchungen in einem in vitro Präparat zerebraler Arterien

Scheckenbach, Klaus
Verlust zerebrovaskulärer Reaktivität auf Hyperkapnie nach Cortical Spreading Depression (CSD): Rolle der NOS

Lobsien, Elmar
Rolle von Kaliumkanälen bei der zerebrovaskulären Reaktivität auf pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentrationen und deren Modulation durch NO: Untersuchungen in einem in vitro Arterienpräparat

Vogt, Johannes
Rolle von Kaliumkanälen bei der zerebrovaskulären Reaktivität auf Azidose: Untersuchungen in einem in vitro Arterienpräparat

Seitz, Iris
Mechanismen der gestörten Gefäßreaktivität nach Cortical Spreading Depression (CSD) als pathophysiologisches Korrelat der Migräneaura: Untersuchungen am Modell der isolierten Zerebralarterie.

Teilprojekt A7 Grune

Kunstmann, Steffen
Untersuchungen zum 4-Hydroxynonenal in posthypoxischen Hirnkapillarendothelzellen

Ullrich, Oliver

Funktion und Regulation des nukleären 20S Proteasoms beim Abbau oxidativ geschädigter Histone in humanen K562 Zellen

Teilprojekt A8 Unger/Blume

Chmurzynski, Christoph
Signaltransduktion des Angiotensin AT2-Rezeptors

Reinecke, Kirstin
Pro-regenerative Funktion des Angiotensin AT2-Rezeptors am Modell des gequetschten Ischiadicus-Nerven in vivo

Zhao, Yi
Einfluss des AT2-Rezeptors auf Differenzierung und Apoptose in Uterus-Zellen

Projektbereich B

Teilprojekt B6 Weber/Braun

Keilwert, Niko
Effekt von 5HT1 Agonisten in der Frühphase der experimentellen Pneumokokkenmeningitis

Manz, Rahel
Induktion von iNOS in zerebralen Endothelzellen durch Pneumokokkenzellwände

Rüter, Nina
Rolle der PARP in der Entstehung neuronaler Schäden in der experimentellen Meningitis

Halle, Annett
Induktion von Apoptose in primären zerebralen Endothelzellen durch *S.pneumoniae*

Stenke, Daniela
Induktion von Apoptose durch unterschiedliche Zellwandcharakteristika von *S.pneumoniae* in primären zerebralen Endothelzellen

Teilprojekt B9 Hanisch

Pavlovic, Sanja
Characterization of microglial activation in tissue culture

Häusler, Georg
Gliale Chemokine in bakteriellen Infektionen des ZNS

Øren, Anita
Neuroimmunologische Wechselwirkungen von Astrozyten und Mikrogliazellen mit TH1 und TH2 Zellen

Peter, Susanne
Kommunikation von T-Zellen und Mikrogliazellen

Kwidzinski, Erik
Zur Rolle derIDO für das Immunprivileg des ZNS

Steiner, Barbara

FasL-induzierte T Zell-Apoptose durch Astrozyten
Lossau, Sandra
Expression von Todesliganden auf Gliazellen nach entorhinaler Läsion der Ratte

Kovac, Adam
Transneuronale Apoptose im Hippocampus nach experimenteller Deafferenzierung

Bergmann, Juri
Heterogenität von Perivaskulären Zellen im ZNS

Bräuer, Anja
Isolierung und Analyse läSIONSinduzierter Gene des Rattenhirns

Klötting, Anna
Expressionsanalyse eines Monozyten- zu Makrophagen- Differenzierungsfaktors

Steup, Andreas
Expression und Funktion neuronaler Leitmoleküle im Hippocampus

Savaskan, Nicolai
Axonale Wegfindung im Hippocampus nach entorhinaler Läsion

Eyüpoglu, Ilker
Die Rolle von Mikrogliazellen bei dendritischem Umbau und axonalem Sprouting nach entor-hinaler Läsion

Teilprojekt B11 Nitsch (früher C1)

Peter, Susanne
Kommunikation von T-Zellen und Mikrogliazellen

Diestel, Antje
Regulation und Funktion mikroglialer Adhäsionsmoleküle bei Neurodegeneration und Neuroprotektion

Bräuer, Anja
Isolierung und Analyse läSIONSinduzierter Gene des Rattenhirns

Klötting, Anna
Expressionsanalyse eines Monozyten- zu Makrophagen- Differenzierungsfaktors

Steup, Andreas
Expression und Funktion neuronaler Leitmoleküle im Hippocampus

Savaskan, Nicolai
Axonale Wegfindung im Hippocampus nach entorhinaler Läsion

Eyüpoglu, Ilker
Die Rolle von Mikrogliazellen bei dendritischem Umbau und axonalem Sprouting nach entor-hinaler Läsion

Teilprojekt B12 Brück/Stangel

Curter, Peggy
Die Rolle von IL-6 bei der Wallerschen Degeneration

Lingfeld, Guenaelle
Axonaler Schaden in chronischen MS-Läsionen

Hülle, Andrea
Sequentielle Myelinprotein-Expression bei der Myelinisierung

Corell, Alexandra
Expression von Wachstumsfaktoren in MS-Läsionen

Glas, Michael
Mutationen in Apoptose-assoziierten Genen als mögliche Prädispositionsfaktoren der MS

Jagoda, Timm
Expression von Myelinprotein-mRNA bei der Myelinisierung

Herrmann, Isabel
Expression von Zytokinen im ZNS während IVIg-Behandlung der EAE

Pul, Refik
Vergleich der Wirkung verschiedener IVIg-Präparate auf Mikroglia -Funktionen in vitro

Bernard, Dirk
Einfluß von polyklonalem IgM auf die Interaktion von Oligodendrozyten und Mikroglia

Franziska, Zobel
Expression von Chemokinrezeptoren auf Oligodendrozytenvorläuferzellen der Ratte

Uta Henke
Expression von Chemokinrezeptoren auf CG4 Zellen

Teilprojekt B13 Bechmann/Gimsa

Øren, Anita
Neuroimmunologische Wechselwirkungen von Astrozyten und Mikrogliazellen mit TH1 und TH2 Zellen

Bergmann, Juri
Heterogenität von Perivaskulären Zellen im ZNS

Kwidzinski, Erik
Zur Rolle derIDO für das Immunprivileg des ZNS

Steiner, Barbara
FasL-induzierte T Zell-Apoptose durch Astrozyten

Lossau, Sandra
Expression von Todesliganden auf Gliazellen nach entorhinaler Läsion der Ratte

Kovac, Adam
Transneuronale Apoptose im Hippocampus nach experimenteller Deafferenzierung

Teilprojekt B14 Zipp

Dörr, Jan

Funktionelle Charakterisierung des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems in humanen T-Zell- und Targetzell-Populationen

Gniadeck, Paul

Bestimmung der Apoptoserate von T-Zellen unter IFN-beta-Therapie

Ehrlich, Stefan

Die Funktion von CD95-Splice-Varianten bei der Regulation der Apoptosesuszeptibilität von T-Zellen

Waiczies, Sonia

Die Vulnerabilität von T-Helfer-Subpopulationen

Weber, Alexandra

Prädisponierende Polymorphismen in der Multiplen Sklerose

Rückert, Sandra

Autoantigen-spezifische T-Zell-Quantifizierung

Teilprojekt B15 Woiciechowsky/Volk (früher C5)

Daberkow, Nadja

Systemische Immunveränderungen nach intra-cerebroventrikulärer Applikation proinflammatorischer Zytokine

Elepfandt, Peter

Mechanismen der IL-1-induzierten Invasion von Immunzellen ins Gehirn mit den Folgen einer abakteriellen Meningoencephalitis

Böhme, Jan

Die Bedeutung des sympathischen Nervensystems und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse für die Endotoxin-induzierte anti-inflammatorische Reaktion

Nietsche, Gerit

Mechanismen der IL-1-induzierten Astroglie. Rolle von Interleukin 6 und 10

Projektbereich C

Teilprojekt C3, C7 Heinemann, Eder

Axmacher, Nikolai

Modellierung und experimentelle Validierung des Einflusses der intrazellulären GABA-Konzentration auf die Effizienz inhibitorischer Synapsen

Balkhausen, Katrin

Serotonerge Modulation hochfrequenter (200Hz) Oszillationen im Hippokampus der Ratte

Breustedt, Jörg-Michael

Pharmakologische und physiologische Untersuchungen zum Glyzin-Rezeptor im Hippocampus adulter Ratten

Eilers, Alexander

Effekte von Barium auf stimulus-induzierte Kaliumsignale in der CA1-Region normaler, gekindelter und chronisch epileptischer Ratten.

Gutschmidt, Uwe

Stimulus-induzierte Veränderungen des Ionenmilieus im Extrazellulärraum des Hippokampus der adulten Ratte.

Hoffmann, Ulrike

Regulation und Inhibition hypoxischer und hyperoxischer Zellschäden im neonatalen hippocampalen Slice-Kultur-Modell

Iserhot, Claudia

Glutamattransport und exzitatorische synaptische Transmission im medialen entorhinalen Cortex

Jauch, Regina

Gliale Kalium-Regulation: Untersuchungen an gesunden Ratten, Connexin43-defizienten Mäusen und humanen OP-Resektaten von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappen-Epilepsie.

Jungclaus, Mathias

Wirkung von Losigamone auf spontane und evozierte synaptische Ströme in kultivierten hippocampalen Neuronen

Kivi, Anatol

Effekte von Barium und Cäsium auf stimulusinduzierte Kalium-Signale im Hippokampus:
Untersuchungen an Hirnschnittpräparaten juveniler Ratten und humaner OP-Resektate von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappen-Epilepsie.

Kovács, Richard

Low Mg²⁺-Epilepsie-Modell in der organotypischen hippocampalen Hirnschnittkultur: Anfallsbedingter Zelltod und mögliche Ursachen

Maier, Nikolaus

Aktivitätsabhängige Modulierung hochfrequenter (200Hz) Netzwerk-Oszillation im Hippokampus der Ratte

Sabau, Adriana

Altersabhängigkeit der antikonvulsiven Wirkung von Tiagabin in vitro

Schilling, Tom

Morphologische, immunphänotypische und elektrophysiologische Eigenschaften deaktivierter muriner Mikroglia in vitro.

Stenkamp, Kerstin

Neuromodulation: Dopaminerge Beeinflussung glutamaterger Transmission im entorhinalen Kortex und pH-Modulierbarkeit von hippocampalen Gamma-Oszillationen

Pomper, Jörn

Einfluß des Sauerstoffpartialdrucks auf den Zelltod in hippocampalen Hirnschnitt-Kulturen

Weissinger, Florian

Analyse epileptiformer Aktivität während der postnatalen Entwicklung der Ratte im kombinierten Hirnschnittpräparat. Einsatz des intrinsischen optischen Signals.

Wozny, Christian

Untersuchung der Ausbreitung epileptischer Aktivität vom entorhinalen Cortex (EC) zur Area CA1 in Pilocarpin-behandelten Tieren

Teilprojekt C6 Ullrich

Keck, Susi

Regulation des Turnovers und der posttranslationalen Modifikation des tau-Proteins unter oxidativem Streß

Ciftci, Özlem

Zelluläre Mechanismen der protektiven Funktion der Poly-ADP-Ribose-Polymerase in humanen Leukämiezellen

Selle, Astrid

Regulation und funktionelle Bedeutung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase während Differenzierung und Retrodifferenzierung humaner Leukämiezellen

Teilprojekt C8 Kettenmann (früher B1)

Kresse, Wolfgang

Zink Homoöstatik in Gliazellen

Rappert, Angelika

Charakterisierung von Chemokinrezeptoren auf Mikrogliazellen in vitro und in situ

Schipke, Carola

Lokalisation und Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren auf Gliazellen

Geissler, Daniel

Synthese und Photochemie von 'caged' Biomolekülen zur Analyse von Rezeptorsystemen im Zentralnervensystem

Pavlovic, Sanja

Characterization of microglial activation in tissue culture

Ellinghaus, Agnes

Wechselwirkung glialer Hirnzellen mit gliomatösen Tumorzellen

Teilprojekt C9 v. Deimling (früher B10)

Wick, Antje

Mutations- und Deletionsanalyse des GDNF/RET-Korezeptors GFRA-1 in humanen Gliomen

Antweiler, Sven

Prognostische Bedeutung von TP53, EGFR, PTEN und DMBT1 Mutationen in Glioblastomen

Schmitz, Ulrike

INI1 Mutationen in intrakraniellen Tumoren

Urban, Nina

Die Bedeutung der Allelverluste auf den chromosomalen Armen 1p und 19q für die Prognose von Glioblastomen

Eum, Jo-Hum
 Mutationsanalyse von MIX1 in neuroektodermalen Tumoren

1.4.2 Besondere Maßnahmen zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

Der SFB ist von seiner Alterstruktur her sehr ‚jung‘, die Mehrzahl der Antragsteller sind Nachwuchswissenschaftler. Daneben existieren innerhalb des SFB eine Vielzahl von strukturierten Massnahmen zur Förderung von Lehre und wissenschaftlichem Nachwuchs, diese sind im Detail im Berichtsband aufgeführt und sollen deshalb hier nur skizziert werden:

Das oben bereits genannte Neurowissenschaftliche Forschungszentrum fördert Nachwuchswissenschaftler durch Bereitstellung von Laborräumen und Forschungsinfrastruktur. Die Medizinischen Fakultät vergibt Habilitationsstipendien, von diesen profitieren mehrere Antragsteller. Auch die von der Forschungskommission der Charité vergebenen Forschungs-AIP Stellen kamen SFB Projekten unmittelbar zugute, und förderten den Austausch von klinischen und experimentellen Ansätzen und Fragestellungen. Das GRK 238 ‚Schadensmechanismen im ZNS: Einsatz bildgebender Verfahren‘ steht in sehr enger Beziehung zum SFB 507. Das Graduiertenkolleg bildet Graduierte in einer Vielzahl neurobiologischer Untersuchungstechniken aus, wobei der Schwerpunkt auf bildgebende Messverfahren gesetzt wird. Getragen von Mitgliedern des SFB hat sich an der Charité eine Initiative gebildet, die sich um die Einrichtung eines internationalen Master-MD/PhD Studienganges ‚Medical Neurosciences‘ bemüht, diese nimmt derzeit ihren Weg durch die akademischen Gremien. Erwähnt seien schliesslich auch die neurowissenschaftlichen Methodenkurse, welche von Mitgliedern des SFB veranstaltet werden und einmal jährlich angeboten werden.

1.5 Alphabetische Liste der am Sonderforschungsbereich beteiligten Wissenschaftler

GA: Grundausrüstung

EA: Ergänzungsausrüstung

	Name, Vorname akad. Grad	Fachrichtung	genaue Bezeichnung des Hochschulinsti- tuts/ der beteiligten Einrichtung außerhalb der Hochschule	GA oder EA	Teil- projekt Kenn- ziffer
x	Bechmann, Ingo, Dr.med.	Neuro- anatomie, Zellbiologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA	B13
	Blasig, Ingolf	Neurobiologie	Forschungsinstitut f. Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch	GA	§
x	Blume, Annegret, Dr. rer. nat.,	Pharmakologie	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Charité, HU	GA	A8
x	Braun, Johann S., Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, HU	GA	B6
x	Brück, Wolfgang, Prof. Dr. med	Neuropatho- logie	Institut für Neuropathologie der Charité	GA	B12
x	Deimling von, Andreas Prof. Dr.	Neuropathologie	Institut für Neuropathologie, Charité, HU	GA	C9
	Diestel, Antje, Dipl. Biol.	Zellbiologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	EA	C1
x	Dirnagl, Ulrich, Prof. Dr. med.	experimentelle Neurologie	Experimentelle Neurologie, Charité, HU	GA	A5
x	Dreier, Jens Dr. med.	Neurologie	Experimentelle Neurologie, Charité, HU	GA	A1

X	Eder, Claudia, PD Dr.rer.nat.	Physiologie	Institut für Physiologie, Charité, HU	GA	C7
X	Einhäupl, Karl M. Prof. Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, HU	GA	A1
	Ellinghaus, Agnes	Neurobiologie	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin	EA	C8
	Gabriel, Siegrun, Dr. med.	Neurophysiologie	Johannes-Müller-Institut für Physiologie Charité, HU	EA	C3
X	Gimsa, Ulrike, Dr.rer.nat.	Neuro-anatomie, Immuno-logie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA	B13
	Grundström, Eva; Dr.	Biologie	Charité	EA	B14
X	Grune, Tilman, PD Dr.	Bio-chemie	Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation, Charité, HU	GA	A7
X	Hanisch, Uwe-Karsten, PD Dr.	Neurobiologie, Biochemie	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Zelluläre Neurowissenschaften	GA	B9
X	Heinemann, Uwe, Prof. Dr.	Neurophysiologie	Johannes-Müller-Institut für Physiologie Charité, HU	GA	C3
	Hoffmann Olaf, Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, HU	„Gerok“ Stelle	B6
	Holtkamp, Nikola	Biologie	Institut für Neuropathologie, Charité, HU	EA	C9
	Kann, Oliver Dr. med.	Neurophysiologie	Johannes-Müller-Institut für Physiologie Charité, HU	GA	C3
X	Kettenmann, Helmut; Prof.Dr.	Neurobiologie	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin	GA	C8
	Klee, Rolf, Dr.med.	Neurologie, Neurophysiologie	Neurologische Klinik und Physiologisches Institut, Charité, HU	GA	§
	Klett, Francisco Fernandez	experimentelle Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, HU	GA	
	Kuhn, Susane	Neurobiologie	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin	EA	C8
	Kwidzinski, Erik, Dipl. Biol.	Neuro-immunologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA	B13
X	Lindauer, Ute Dr. med. vet.	Experimentelle Neurologie	Experimentelle Neurologie, Charité, HU	GA	A6
	Mehlhase, Jana	Bio-chemie	Neurowissenschaftliches Forschungszentrum, Charité, HU	EA	A7
	Müller, Wolfgang, PD Dr.med.	Neurophysiologie	Neurowissenschaftliches Zentrum, Charité, HU	GA	§
	Ninnemann, Olaf, Dr. rer.nat.	Molekular-biologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA	C1
X	Nitsch, Robert, Prof. Dr. med.	Anatomie, Zell- und Neurobiologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA	C1
	Ohm, Thomas G., Prof.Dr.med	Anatomie, Zell- und Neurobiologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA	§
	Øren, Anita, Dipl. Biophys. Doktorandin	Neuro-immunologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA	B13
	Pavlovic, Sanja	Neurobiologie,	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare	GA	B9

	Biochemie	Medizin Zelluläre Neurowissenschaften		
	Peter, Susanne, Dipl. Biol.	Neuro-immunologie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GRK 238/EA C1
	Petzold, Gabor, Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, HU	EA A1
X	Priller, Josef, Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, Humboldt-Universität, Berlin	GA
	Rupprecht, Stefan, Dr. med.	Neurochirurgie	Klinik für Neurochirurgie, Charité, HU	EA C5
	Schuh-Hofer, Sigrid Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, HU	EA A6
X	Stangel, Martin, Dr. med.	Neurologie	Klinik für Neurologie, UKBF, FU Berlin	GA B12
	Stein, Christoph, Prof.Dr.med.	Anästhesiologie	Institut für Anästhesiologie, UKBF, FU Berlin	GA §
X	Ullrich, Oliver, Dr.med., Dr.rer.nat.,	Neuroanatomie	Institut für Anatomie, Charité, HU	GA C6
X	Unger, Thomas, Prof. Dr. med.	Pharmakologie	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Charité, HU	GA A8
X	Volk, Hans-Dieter, Prof. Dr. med.	Immunologie	Institut für Medizinische Immunologie, Charité, HU	GA C5
X	Weber Jörg R., Prof. Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik, Charité, HU	GA B6
X	Woiciechowsky, Christian, PD Dr. med.	Neurochirurgie	Klinik für Neurochirurgie, Charité, HU	GA C5
X	Zipp, Frauke, PD Dr. med.	Neurologie, Neuroimmunologie	Neurologie, Charité, HU	GA B14

(Mitglieder im Sinne der Ordnung des Sonderforschungsbereichs sind mit X vor dem Namen gekennzeichnet, assoziierte Mitglieder mit einem § in der Projektspalte)

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

Forschungsthema	Name(n) des (r) beteiligten Wissenschaftler(s)	Zuwendungsgeber und Aktenzeichen oder Antragsdatum	Kennziffer des im SFB beantragten Teilprojekts
Is the coupling between neuronal metabolism and cerebral blood flow altered in patients after subarachnoid haemorrhage	Dreier, Unterberg, Villringer	TP Antrag ,Berlin Neuroimaging Center' an die DFG, Zentren für Bildgebung in den Klinischen Neurowissenschaften' positiv vorbegutachtet	A1
Kompetenznetz Schlaganfall	Einhäupl	BMBF	A1
Klinische Forschergruppe ,Neue nichtinvasive bildgebende Verfahren in der Neurologie'	Einhäupl	DFG	A1
Berlin Neuroimaging Center	Einhäupl	BMBF (beantragt, positiv vorbegutachtet)	A1
Adaptive CNS changes due to repetitive nociceptive input: an experimental approach in animals to the understanding of chronic headache syndromes	Brune, Ellrich, Penschuck, Gühring, Zeilhofer, Messlinger, Arnold, Reuter, Dirnagl	Antrag an das BMBF, Kompetenznetz Schmerz (positiv vorbegutachtet)	A5

Neurovascular coupling and BOLD contrast in neurological disorders	Dirnagl, Wenzel, v.Brevern, Lempert	TP2, <u>Antrag</u> ‚Berlin Neuroimaging Center‘ an die DFG, Zentren für Bildgebung in den Klinischen Neurowissenschaften‘ positiv vorbegutachtet	A5
Physiologische und pathophysiologische Grundlagen funktioneller Bildgebung im ZNS	Dirnagl, Lindauer	Projekt 1B, Klinische Forschergruppe ‚Neue nichtinvasive Bildgebende Verfahren in der Neurologie‘ (Laufzeit bis 12/01)	A5, A6
Fokale cerebrale Ischämie und induzierte Ischämietoleranz	Dirnagl	Projekt im DFG-Graduiertenkolleg GRK 238	A5
HMG-CoA Reduktasehemmer zur Schlaganfallprophylaxe: Auswirkungen auf endotheliale NOS, zerebralen Blutfluß und zerebrovaskuläre Reaktivität	Dirnagl, Endres	Projekt A5 im Kompetenznetz ‚Schlaganfall‘	A5
Untersuchungen zum Abbau oxidierter extrazellulärer gehirnspezifischer Proteine durch die Mikroglia	Grune	DFG Gr 1240/9-1	A7
Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems während oxidativen Stresses	Grune	DFG Gr 1240/10-1	A7
Turnover and posttranslational modification of tau in hippocampal neurones during oxidative stress	Grune	DFG UI 177/2-1	A7
Ethanol-induzierter oxidativer Stress: Bedeutung für die Toxizität und Proteinkatabolie in humanen Hepatozyten	Grune	Else Kröner-Fresenius-Stiftung	A7
Mitochondrienstabilisation während der zellulären Alterung	Grune	BASF AG	A7
Bedeutung des Angiotensin-Rezeptors AT2 für die Regulation von Differenzierung, Regeneration und Apoptose	Unger	SFB 415, Projekt A6	A8
Angiotensin II/AT1-Rezeptor-vermittelte Transkription im Gehirn: Komponenten der Signaltransduktion und Zielgene	Blume	SFB 415, Projekt C2	A8
Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems auf den neurologischen Status und die Gewebereorganisation nach fokaler Ischämie im Gehirn der Ratte	Unger, Blume	Forschungszentrum Integrative Neurowissenschaften (FZIN), Projekt IV-3, Universität Kiel	A8
Wirkung der Angiotensin-AT1-/AT2-Rezeptorantagonisten auf das Ausmaß der neurologischen Ausfälle und die Expression induzierbarer Transkriptionsfaktoren (ITFs) nach fokaler Ischämie	Unger	Forschungsmittel der Universität Kiel	A8
The role of AT1 and AT2 receptors in ventricular function after experimental myocardial infarction in rats.	Unger	Novartis Pharma AG, Basel	A8
Centrally mediated effects of the AT1 receptor antagonist candesartan (CV-11974) and prodrug candesartan cilexetil (TCV-116)	Unger	Astra-Zeneca GmbH, Wedel	A8
Comparative genomics of hypertension and hypertensive end-organ damage.	Unger	Genomic Network, BMBF	A8

Molekulare Mechanismen der durch <i>N.meningitidis</i> ausgelösten Meningitis – die Rolle von LBP	Weber J.R. Schumann R.R.	DFG WE 1981/1-1	B6
Apoptose vermittelte Begrenzung der akuten inflammatorischen Infiltration im ZNS	Felderhoff-Müser U. Weber J.R.	Sanderstiftung 99.091.1	B6
Bacterial triggers of neuronal apoptosis and their in vivo relevance for brain damage in pneumococcal meningitis	Braun J.S. Weber J.R.	Meningitis research foundation; Bristol UK.	B6
Host response to meningitis causing pathogens	Braun J.S. Weber J.R.	BMBF (Kompetenznetz) positiv vorbegutachtet	B6
Characterization of microglial activation in tissue culture	Pavlovic, Sanja	Graduiertenkolleg GRK 238 der Humboldt-Universität Berlin, "Anwendung bildgebender Verfahren bei neurologischen Erkrankungen", gefördert seit 14.03.2000	B9
Neuronal apoptosis during autoimmunity	Nitsch	BMBF – German Israeli Collaboration /15.1.01	B11
Selenproteine – Biochemische Grundlagen und klinische Bedeutung	Nitsch	DFG Ni 344/12-1	B11
Die Rolle von Mikrogliazellen bei Erkrankung des Nervensystems	Nitsch	DFG Be 2272/1-1	B11
Molekulare Mechanismen der Ausbildung, Stabilisierung und Reorganisation entorhinaler-hippocampaler Interaktion	Nitsch	SFB 515/A5	B11
Schadensmechanismen im Nervensystem – Einsatz bildgebender Verfahren	Nitsch	GRK 238/1	B11
Astrozyten in Neuroinflammation	Gimsa, Nitsch	Hertie-Stiftung	B11, B13
Axonpathologie bei der Autoimmunitätsmarkung	Brück	DFG/Br 1274/6-1	B12
Chemokine-Wallersche Degeneration	Brück	DFG/Br 1274/5-2	B12
Mikroglia-Remyelinisierung	Brück, Stangel	DFG Antragsdatum 12.01.01	B12
Stressproteine-MS/EAE	Brück	Hertie-Stiftung 1.319.110.01-02	B12
MS-Subtypen	Brück	Hertie-Stiftung 2/540/99	B12
Clinico-pathological correlate of the MS lesion	Brück	American MS Society RG 3185-A-2	B12
Expression von Chemokinrezeptoren in oligodendroglialen Zellen der Ratte	Stangel	Hertie-Stiftung 2/518/99	B12
Mikrogliale Phagozytose	Bechmann, Nitsch	DFG Be 2272	B13
T-zelluläre Expression und Bedeutung Apoptose-regulierender Proteine für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose	Zipp	DFG Zi 448/7-1, Vorläuferprojekt für das im SFB beantragte Projekt	B14
Ex vivo-Quantifizierung Autoantigen-spezifischer Immunantwort bei Multipler Sklerose	Zipp	Hertie-Stiftung 191/00/18	B14
Unterscheiden sich T-Helfer-Subtypen (Th-1/Th-2) bei Multipler Sklerose in ihrer Vulnerabilität gegenüber Apoptose-Stimuli ?	Zipp	Hertie-Stiftung 2/501/99	B14
Molekulare Mechanismen von Immunglobulinen und deren Bedeutung für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose	Zipp	OKTA-Pharma	B14

Immunmodulation bei chronischer Entzündung des Nervensystems	Zipp	Charité-Antrag Klinische Forschung BMBF (beantragt) positiv vorbegutachtet	B14
Pathophysiologische Untersuchungen zur Impfung in der Multiplen Sklerose	Zipp	DMSG (beantragt)	B14
The role of apoptosis-associated genes in inflammatory disease of the central nervous system (EAE)	Zipp/Brocke	GIF (beantragt)	B14
Regulation of neuronal apoptotic cell death in autoimmune inflammatory disorders of the central nervous system (EAE)	Brocke /Zipp/Soffer/Nitsch	Joint German-Israeli Research Program BMBF (beantragt)	B14
Rolle der Glutamat-uptake-Moleküle bei der erregenden synaptischen Übertragung in der hippocampalen Formation und im Kleinhirn	Draguhn, Gloveli, Heinemann	DFG : HE 1128/11-1 Bewilligungsdatum: 27.1.97	C3
Ursachen gestörten Lernverhaltens bei Tieren mit Kindlingepilepsie	Heinemann	DFG: SFB 515	C3
Klinische und kognitive Neurowissenschaft:	Heinemann	GRK 423	C3
Reorganisation hippocampaler Netzwerke bei Temporallappen-Epilepsie	Behr, Lehmann, Heinemann	DFG: Transregio SFB (beantragt)	C3
Muskarinische Transmission und Ca ²⁺ -Signalgebung im enthorinalen Kortex-Hippokampus (EC-HC)-Komplex bei akuten und chronischen Epilepsiemodellen	Müller, Heinemann	DFG: Transregio SFB (beantragt)	C3
Neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin im unreifen Gehirn: Untersuchungen an juvenilen Hirnschnittkulturen der Ratte.	Maier, Heinemann	Wilhelm Sander Stiftung	C3
Wirkungen von Serotonin auf neuronales Verhalten, epileptiforme Aktivität und Hypoxietoleranz im kombinierten Kortex-Hippokampuspräparat der normalen und der genetisch veränderten Ratte und Maus	Heinemann	DFG: HE 1128/13	C3
Deaktivierende Zytokine	Volk	SFB 421 TPB2	C5
CMV Reaktivierung	Prösch/Volk/Krüger	SFB 421 TPB4	C5
Toleranzinduktion	Tullius/Volk	DFG Tu63/6-1	C5
Tolerance associated Genes	Volk/Sawitzki	ROTRF Stiftung	C5
Regulation of IL-10 in IBD	Volk	EU TMR Program	C5
Infectious Tolerance	Kupiec/Volk/Busitil	NIH	C5
Antiviral response in tolerance	Kern/Reinke/Volk/Radbruch/Schneider-Mergener	NIH	C5
Senkung Immunogenität für Tissue Engeneering	Seifert/Volk/Ritter	BMBF Tissue Engeneering – mdl. Zusage	C5
Turnover and posttranslational modification of tau in hippocampal neurons during oxidative stress	Ullrich	DFG (UL 177/2-1)	C6
Mikroglia-Schwerpunkt Die Rolle der Mikrogliazellen bei Erkrankungen des Nervensystems Koordinierungsarbeiten	Kettenmann	DFG 329/12-2	C8

Mikroglia-Schwerpunkt Physiologische und funktionelle Eigenschaften ramifizierter Mikroglia in situ und Veränderung dieser Eigenschaften während Aktivierung durch experimentelle Läsion	Boucsein	DFG Ke 329/13-2	C8
SFB 515-96 Mechanismen entwicklungs- und erfahrungsabhängiger Plastizität des Nervensystems B3: Neuron-Glia-Interaktion. Bedeutung glialer Transmitterrezeptoren im Cerebellum	Filipov	SFB 515-96	C8
Graduiertenkolleg GRK 238/1-96 Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz von bildgebenden Verfahren	Pavlovic, Kresse	Graduiertenkolleg GRK 238/1-96	C8
Graduiertenkolleg GRK 268/1-97 Dynamik und Evolution zellulärer und makromolekularer Systeme	Rappert	Graduiertenkolleg GRK 268/1-97	C8
Mechanisms of zinc signaling and transport in glial cells of the central nervous system	Kettenmann	GIF I-588-099.01/98	C8
EU-Projekt Targeting astrocytes to disrupt inflammation neurodegeneration coupling: application to Alzheimer's disease	Arnold	QLK6-CT99-02203	C8
HEKA Softwareumsetzung für ein integriertes Auswertesystem zur simultanen Zellanalyse mittels Imaging- und Patch- Clamp-Technologie	Lucius	AiF KF 0049204KJS0	C8
Interaction between astrocytes and subtypes of neurons - a combined morphological and physiological approach with novel transgenic models	Kettenmann, Kooperation mit Bogomoletz Institute Kiew	DFG eingereicht	C8
Exploration of synaptic organization in the brain: A novel approach using high speed dynamical imaging of the synapse with submicron and submillisecond resolution	Kettenmann	EU eingereicht	C8
Klinische und molekulare Charakterisierung plexiformer Neurofibrome in Patienten mit NF1	Deimling von, Andreas Prof. Dr.	Krebshilfe 70-2794-De 1	C9
Molekulare Diagnostik zentralnervöser Tumoren	Deimling von, Andreas Prof. Dr.	Krebshilfe 70-2385-Wi 2	C9
Mutationsanalyse des DMBT1 Gens	Deimling von, Andreas Prof. Dr.	Krebshilfe 10-1318-De 1	C9
Determination of genetic alterations associated with progression of human astrocytomas	Deimling von, Andreas Prof. Dr.	NATO CLG 977284	C9

1.7 In der Ordnung des Sonderforschungsbereichs vorgesehene 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: Prof. Dr. Ulrich Dirnagl Prof. Dr. Helmut Kettenmann Prof. Dr. Robert Nitsch Prof. Dr. Uwe Heinemann (als Sprecher des GRK)
Sekretär	Prof. Dr. Ulrich Dirnagl

2 Überblick über die bisherige und die beantragte Förderung des Sonderforschungsbereichs

2.1.1 Zusammenstellung der dem Sonderforschungsbereich aus der Grundausstattung (GA) (bei Fortsetzungsanträgen) im letzten Förderungszeitraum zur Verfügung gestellten Sachmittel sowie des entsprechenden Ansatzes für 2002

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto)

Haus-halts-jahr	GA Hochschule			GA beteiligte Einrichtungen außerhalb der Hochschule			GA Sachmittel insgesamt
	SV	I	Summe	SV	I	Summe	
2. HJ 1998	123.4	400	523.4	7.5		7.5	530.9
1999	201.3	440.5	641.8	15	25	40	681.8
2000	199	130	329	15	25	40	369
2001	200	95	295	15	25	40	335
2002	227	0	227	15	25	40	267

(Alle Angaben in TDM)

2.1.2 Aufstellung der als Ergänzungsausstattung (EA) für den Sonderforschungsbereich bis einschließlich 2001 bewilligten (nur bei Fortsetzungsanträgen) und für die Haushaltsjahre 2002 bis 2004 beantragten Mittel

PK: Personalkosten

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto)

Haushalts-jahr	Ergänzungsausstattung			gesamt
	PK	SV	I	
1995	444,5	278,3		722,8
1996	912,3	358,7		1.271,0
1997	889,6	405,1		1.294,7
1998	545,1	324,9	552,5	1.422,5
1999	1.380,3	507,9	43,3	1.888,2
2000	1.397,4	490,4		1.887,8
2001	1.381,2	460,6		1.841,8
Zwischensumme				10.328,8
2002	1730	865,3	79,4	2.674,7
2003	1730	656,8	0	2.386,8
2004	1730	630,8	0	2.360,8

(Alle Angaben in TDM)

2.2 Anzahl der Mitarbeiter/innen, die aus der Grundausrüstung 2002 für die jetzt beantragten Teilprojekte zur Verfügung stehen werden

Besoldungsgruppe/ Vergütungsgruppe	Anzahl der beteiligten Mitarbeiter/innen (ohne beratende Wissenschaftler/innen)
Wissenschaftliches Personal	
C 4 / Sondervertrag	7
C 3 / A 16	3
C 2 / A 15	1
C 1 / A 14	3
A 13	0
BAT I	0
BAT Ia	0
BAT Ib	2
BAT IIa	14,5
Summe wissenschaftliches Personal	30,5
Wissenschaftliche Hilfskräfte	
Studentische Hilfskräfte	
Nichtwissenschaftliches Personal	
BAT III	0
BAT IVa	3
BAT IVb	4
BAT Va/b	0,125
BAT Vc	1,5
BAT VIb	0
BAT VII - X/MTL	0
Summe nichtwissenschaftliches Personal	8,625

2.3 Anzahl der Stellen, für die Personalmittel als Ergänzungsausstattung beantragt werden 2002

Teil- pro- jekt	Son- der- ver- trag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa/2	Summe Sond.- BAT IIa/2	wiss. stud. Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/Vb	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII-X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insg. (ohne Hilfs- kräfte)
A1			1		1									0	1
A5				1	1					1				1	2
A6					0					1				1	1
A7				1	1					0,5				0,5	1,5
A8				2	2									0	2
B6				1	1									0	1
B9					0					1				1	1
B11			1		1						1			1	2
B12				2	2									0	2
B13					0							1		1	1
B14			1		1							1		1	2
B15			1		1									0	1
C3		1			1	1						1		1	2
C6				1	1									0	1
C7				1	1									0	1
C8			1	1	2									0	2
C9			1		1							1		1	2
Z2					0									0	0
Z					0	1						1		1	1
insg.	0	1	6	10	17	2	0	0	0	3,5	1	5	0	9,5	26,5
(+/-) ¹⁾		+1	-1	+1	+1	+2				+1,5	+1	+2		+4,5	+5,5

¹⁾ Veränderungen (+/-) gegenüber dem jeweiligen Vorjahr

2003

Teil- pro- jekt	Son- der- ver- trag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa/2	Summe Sond.- BAT IIa/2	wiss. stud. Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/Vb	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII-X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insg. (ohne Hilfs- kräfte)
A1			1		1									0	1
A5				1	1					1				1	2
A6					0					1				1	1
A7				1	1					0,5				0,5	1,5
A8				2	2									0	2
B6				1	1									0	1
B9					0					1				1	1
B11			1		1						1			1	2
B12				2	2									0	2
B13					0							1		1	1
B14			1		1							1		1	2
B15			1		1									0	1
C3		1			1	1						1		1	2
C6				1	1									0	1
C7				1	1									0	1
C8			1	1	2									0	2
C9			1		1							1		1	2
Z2					0									0	0
Z					0	1						1		1	1
insg.	0	1	6	10	17	2	0	0	0	3,5	1	5	0	9,5	26,5
(+/-) ¹⁾															

¹⁾ Veränderungen (+/-) gegenüber dem jeweiligen Vorjahr

2004

Teil- pro- jekt	Son- der- ver- trag	BAT I-Ib	BAT IIa	BAT IIa/2	Summe Sond.- BAT IIa/2	wiss. stud. Hilfskräfte	BAT III	BAT IVa	BAT IVb	BAT Va/Vb	BAT Vc	BAT VIb	BAT VII-X, MTL	Summe BAT III-X und MTL	insg. (ohne Hilfs- kräfte)
A1			1		1									0	1
A5				1	1					1				1	2
A6					0					1				1	1
A7				1	1					0,5				0,5	1,5
A8				2	2									0	2
B6				1	1									0	1
B9					0					1				1	1
B11			1		1						1			1	2
B12				2	2									0	2
B13					0							1		1	1
B14			1		1							1		1	2
B15			1		1									0	1
C3		1			1	1						1		1	2
C6				1	1									0	1
C7				1	1									0	1
C8			1	1	2									0	2
C9			1		1							1		1	2
Z2					0									0	0
Z					0	1						1		1	1
insg.	0	1	6	10	17	2	0	0	0	3,5	1	5	0	9,5	26,5
(+/-) ¹⁾															

¹⁾ Veränderungen (+/-) gegenüber dem jeweiligen Vorjahr

Als Ergänzungsausstattung beantragte Mittel für Sächliche Verwaltungsausgaben **2002**

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

Teil- pro- jekt	Bücher und Zeit- schriften	Kleingeräte bis DM 20.000,- (brutto)	Verbrauchs- mittel und Versuchs- tiere	Reisemittel*	Vervielfälti- gungen*	Verlags- kosten*	Gastwissen- schaftler- mittel*	Kolloquien*	Sonstiges*	Gesamt
	(512)	(515)	(522)	(527)	(532)	(533)	(534)	(535)	(547)	
A1		52,2	27							79,2
A5			28,8							28,8
A6			20,7							20,7
A7		5	24							29
A8			40							40
B6		19,2	41,3							60,5
B9			25							25
B11			35							35
B12			25							25
B13			20							20
B14			30							30
B15		24,2	25							49,2
C3		48,2	31							79,2
C6			25							25
C7		48,7	24							72,7
C8			25							25
C9			20							20
Z2										0
Z			17	76,5	5	17	76,5	9		201
insg.	0	197,5	483,8	76,5	5	17	76,5	9	0	865,3
(+/-)		+197,5	+143,2	+16,5	+5	+17	+16,5	+9		+404,7

(Alle Angaben in DM)

2003

Teilprojekt	Bücher und Zeitschriften (512)	Kleingeräte bis DM 20.000,- (brutto) (515)	Verbrauchsmittel und Versuchstiere (522)	Reisemittel* (527)	Vervielfältigungen* (532)	Verlagskosten* (533)	Gastwissenschaftlermittel* (534)	Kolloquien* (535)	Sonstiges* (547)	Gesamt
A1			27							27
A5			28,8							28,8
A6			20,7							20,7
A7			24							24
A8			40							40
B6			41,3							41,3
B9			25							25
B11			35							35
B12			25							25
B13			20							20
B14			30							30
B15			25							25
C3			31							31
C6			25							25
C7			24							24
C8			25							25
C9			20							20
Z2										0
Z			17	76,5	5		76,5	15		190
insg.	0	0	483,8	76,5	5	0	76,5	15	0	656,8
(+/-)		-197,5						+6		-191,5

(Alle Angaben in DM)

2004

Teilprojekt	Bücher und Zeitschriften (512)	Kleingeräte bis DM 20.000,- (brutto) (515)	Verbrauchsmittel und Versuchstiere (522)	Reisemittel* (527)	Vervielfältigungen* (532)	Verlagskosten* (533)	Gastwissenschaftlermittel* (534)	Kolloquien* (535)	Sonstiges* (547)	Gesamt
A1			27							27
A5			28,8							28,8
A6			20,7							20,7
A7			24							24
A8			29							29
B6			41,3							41,3
B9			25							25
B11			35							35
B12			25							25
B13			20							20
B14			30							30
B15			25							25
C3			31							31
C6			25							25
C7			24							24
C8			25							25
C9			20							20
Z2										0
Z			17	76,5	5		76,5			175
insg.	0	0	472,8	76,5	5	0	76,5		0	630,8
(+/-)			-11					-15		-26

(Alle Angaben in DM)

- 2.5 Liste der Geräte über DM 20.000,- (brutto) sowie der Fahrzeuge, die aus Mitteln des Sonderforschungsbereichs oder aus Mitteln der Grundausstattung (HFBG, Mittel der Hochschule, des Landes) beschafft worden sind oder als Leihgabe der DFG zur Verfügung stehen, oder deren Beschaffung 2001 aus Mitteln des Sonderforschungsbereichs oder anderer Förderungsverfahren beabsichtigt ist

Bezeichnung des Gerätes	Anschaffungsjahr	Anschaffungspreis in TDM	eingesetzt in den Teilprojekten	finanziert durch SFB/HFBG/Hochschule/Land oder Leihgabe
Laser Doppler System 5000 (Perimed)	1998	57,3	A1	DFG
Durchflußzytometer	2000	100	B14	Hochschule
Zell-Harvester/Beta-Counter	2000	30	B14	Hochschule
Multiphoton Confokales Mikroskop	1999	800	A5,B6, B11,B13,C3	DFG/ Hochschule
Phosphorimager	2000	140	A1,A5,A6, B6	Stiftung
Light Cyler	2000	120	A1,A5,A6, B6	Stiftung
Fluoreszenz MTP Reader	2000	100	A1,A5, B6, A7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Fluoreszenz Mikroskop mit Dokumentationseinrichtung	2000	136	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Fluoreszenz Mikroskop mit Dokumentationseinrichtung	1999	95	A1,A5, A6, B6	Stiftung
Flüssigkeitsszintillationszähler	2000	165	A1,A5,B,6A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Kryopräservierungsanlage	2000	41	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Durchflußzytometer	2000	116	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
<i>fortgesetzt</i>				

<i>Bezeichnung des Gerätes</i>	<i>Anschaffungs-jahr</i>	<i>Anschaffungs-preis in TDM</i>	<i>eingesetzt in den Teilprojekten</i>	<i>finanziert durch SFB/HBFG/Hochschule/Land oder Leihgabe</i>
Geldokumentationsanlage	2000	22	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
HPLC	2000	93	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Kontaminationsmonitor	2000	29	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Spektralfluorimeter	2000	29	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Strahlenschutzsystem	2000	28	A1,A5,B6,A 7,B14, B15, C3,Z2	Hochschule
Summe:		2101		

2.6 Liste der als Ergänzungsausstattung für die Haushaltsjahre 2002 / 2003 / 2004 beantragten Geräte über DM 20.000,- (brutto) und Fahrzeuge

Teilprojekt	Bezeichnung des Geräts (ggf. mit Typenbezeichnung)	beantragt für das Haushaltsjahr		
		Einzelpreis 2002	Einzelpreis 2003	Einzelpreis 2004
A1	8-Kanal-Recorder DASH 8n (Astro-Med)	26,5		
A7	Hypoxiekammer	52,9		
B15	mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II	24,2		
Summe:		79,4		

(Preisangaben in TDM einschl. MwSt. und Transportkosten usw.)

2.7 Angaben zur Versuchstierhaltung

Teil- pro- jekt	Tierart	Anzahl	durch- schnittl. Haltungs- dauer in Tagen	Beschaf- fungskosten		Haltungs- kosten		vorhan- dene Tier- pflieger- stellen der GA	Ort der Tierhaltung *
				pro Tier	insges.	pro Tier	insges.		
A1	Ratten	300	7	41,5	12450	2,20	660	0,1	EN
A5	C57Bl/6	33	220 (Zucht)	14	462	0,8		''	''
''	SV129	33		25	825	0,8		''	''
''	(C57Bl/6 x SV129)xC57B L/6	40		-	-	0,8		''	''
''	iNOS -/-	27		-	-	0,8		''	''
''	LIF -/-	27		-	-	0,8		''	''
''	MT-I/-II -/-	27		1000 (Zucht)	1000	0,8		''	''
''	CNTF -/-	27		-	-	0,8		''	''
A6	Ratten Wistar	50	18	41,5	2075	5,50	275	''	''
''	Ratten SHR- SP, WKY	67	74	30	2010	23,25	1558	''	''
''	Mäuse	7	18	14	98	2,20	14	''	''
A7	Ratten	100	1			5	500		A
A8	Ratten	200	14	50	10000	GA	GA	3	IPT
B6	Mäuse	80	7	25	2000	0,8	64	0,1	EN
''	Ratten	150	7	41,5	6225	2,20	330	''	''
B9	Mäuse	1000	0	3	3000				MDC
B11	Ratten	300	14	5	1500	10	3000	1	A
''	Mäuse	400	1	5	2000	10	4000	1	''
B12	Mäuse	200	30	10	2000	10	2000	0	''
''	Mäuse neugeb.	200	0	5	1000				''
B13	Mäuse	130	60	10	1300	12	1580	1	''
B15	Ratten	300	10	25	7500	0,25	750		CVK
C3	Ratten	180	8	5	900	0,25	360	Fakultät	ZTT
''	Ratten	180	56	5	900	0,25	2,52	''	ZTT/TP
''	Mäuse	60		15	900	0,10	50,40	''	TP
C6	Mäuse	125	60	0	0	16	2000	1	A
C7	Mäuse	30	365		100		1900	Fakultät	ZTT
C8	Ratten	50	7	40	2000	8	400		MDC
''	Mäuse	10	permanent				180		''
''	Mäuse	20	14	15	300	1,50	30		''
''	Mäuse	80		3	240				-
C9	Mäuse	20	10						CVK
insgesamt:		4009		<i>pro Tier</i>	<i>insges.</i>	<i>pro Tier</i>	<i>insges.</i>	7,4	
					50273		19260		

*EN = Experimentelle Neurologie; A = Anatomie; IPT = Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité; CVK = Forschungshaus Charité Campus Wedding; ZT = Zentrale Tierhaltung Tucholskystrasse; TP = Tierraum Physiologie; MDC = Tierhaus des MDC

3 Darstellung des Programms nach Projektbereichen und Teilprojekten

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

- A 1** 'Cortical spreading ischemia': Ein neues Ischämieprinzip
Dreier/Einhäupl
- A 5** Fokale cerebrale Ischämie und induzierte Ischämietoleranz: Rolle von Makrophagen und Mikroglia
Dirnagl/Priller
- A 6** Rolle der endothelialen NO Synthase bei zerebraler Gefäßreaktivität: Beeinflussung der Enzymaktivität mittels HMG-CoA Reduktase-Inhibition und Einfluß auf die Infarkt volumenentwicklung bei fokaler zerebraler Ischämie
Lindauer
- A 7** Rolle der Microglia im Eisen-Stoffwechsel des Gehirns: Schädigung Eisen-bindender Proteine bei Ischämie und Reperfusion
Grune
- A 8** Pro-regenerative Effekte von Angiotensin II AT2-Rezeptoren nach fokaler Ischämie im Rattenhirn
Unger/Blume

Zusammenfassende Darstellung des Projektbereiches A

Gehirngewebe ist ausserordentlich Hypoxie/Ischämie-empfindlich: Globale oder fokale Einschränkung der Substratzufuhr führt zur Induktion komplexer Schadens- aber auch Protektions- und Regenerationskaskaden. Klinisch imponiert der Ausfall der neuronalen Funktion, wobei aber auch nicht - neuronale Zellen für das Schicksal des betroffenen Gewebes und damit der klinischen Symptomatik von herausragender Bedeutung sind: - endotheliale Zellen produzieren anti-adhäsive und Blutfluss-steigernde Faktoren (z.B. NO, Projekt A6), wohingegen die Hochregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen wesentlich für die Rekrutierung von hämatogenen Zellen ins Gehirn (Projekt A5) verantwortlich ist, auch wird durch die strukturelle und/oder funktionelle Störung der Endothelzelle das Hirnparenchym Bluteiweisen und hämatogenen Zellen exponiert; - Astrozyten puffern die gestörte Ionen- und Transmitterhomöostase, produzieren trophische Faktoren (Projekt A8), können aber auch inflammatorische Proteine exprimieren, welche den Schaden vergrößern; - Mikroglia kann ebenfalls trophe und antiradikalische Faktoren induzieren bzw. das für die destruktive Radikalbildung wichtige Eisen binden (Projekt A7), bei starker Aktivierung aber selbst Radikale produzieren und phagozytieren; - Oligodendrozyten sind ausgesprochen Hypoxie-sensitiv, ihr Untergang kann dazu führen, dass eigentlich erfolgreiche primäre Protektion von Neuronen durch Verlust der axonalen Projektionen klinisch unwirksam bleibt; - Zellen aus dem Blutstrom wandern ins Parenchym ein (Projekt A5), dort nehmen sie an destruktiven inflammatorischen Vorgängen teil, können aber möglicherweise auch protektive Proteine und Mechanismen induzieren; - bei der Subarachnoidalblutung kommen massiv Erythrozyten in Kontakt mit dem Hirnparenchym, deren Zerfallsprodukte (K^+ , Hb) nach Tagen dann den gefürchteten Vasospasmus auslösen können (Projekt A1).

Die Projekte des Bereiches A fokussieren also auf den Beitrag nicht-neuronaler Zellen bei der Hypoxie/Ischämie des Gehirnes, wobei durch die sehr vielfältigen zellulären Targets und experimentellen Ansätze starke Komplementarität und Synergie entsteht. Dies manifestiert sich in einer Vielzahl existierender bzw. geplanter Kooperationen innerhalb des Projektbereichs, aber auch mit anderen Mitgliedern des SFBs. Umgekehrt profitiert der Projektbereich stark von der methodischen (Slice Kulturen, Morphologie, Immunhistochemie, etc.) und inhaltlichen (Inflammation, Immunologie, gliale Signaltransduktion etc.) Expertise. Letztendliches gemeinsames Ziel der Projekte ist es, destruktive Mechanismen bei der Hypoxie/Ischämie zu identifizieren und deren therapeutische Inhibition zu induzieren, sowie endogen protektive Mechanismen zu charakterisieren und die Möglichkeit von deren therapeutischer Induktion zu untersuchen.

Das Projekt Dreier / Einhüpl (A1) hat einen möglicherweise klinisch hochrelevanten Mechanismus ('Cortical spreading ischemia') entdeckt, der für den verzögerten Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung mitverantwortlich sein könnte. Die Antragsteller wollen nun die genauen Mechanismen der Induktion der Cortical spreading ischemia, insbesondere im Vergleich zum lange bekannten Phänomen der Cortical spreading depression, untersuchen, wobei der Fokus zunächst auf der Na-K-ATPase liegt. Eingesetzt werden in vivo und in vitro elektrophysiologische, spektroskopische, und biochemische Techniken. Ziel ist es in dem Projekt auch, den prädiktiven Wert des Modells in Bezug auf die klinische Situation weiter zu belegen um daraus mögliche Therapiestudien zu entwickeln. Eine bereits etablierte und erfolgreiche Zusammenarbeit besteht insbesondere mit A6 und C3, wobei sich nun auch gemeinsame Ansätze mit A7 abzeichnen.

Dirnagl / Priller (A5) wollen das Maus-Knochenmarkschimärenmodell (in Kombination mit knock-out bzw. transgenen Strategien) einsetzen, um für eine Reihe von beim Schlaganfall protektiven bzw. destruktiven Proteinen (iNOS, MTI/II, LIF) deren zelluläre Quelle (parenchymal vs. hämatogen) aufzuklären. Dabei wird auch die Frage beantwortet werden, welche Leukozyten-Subpopulationen zu welchem Zeitpunkt nach Induktion der fokalen zerebralen Ischämie an der Invasion ins ZNS teil? Letztendlich will das Projekt dazu beitragen, die pathophysiologische Rolle von hämatogen eingewandernden Zellen (insbesondere im Vergleich zur ortsständigen Mikroglia) beim Schlaganfall besser zu verstehen und neue Therapiestrategien gegen die inflammatorische Komponente des Schlaganfalles zu entwickeln. Das Projekt steht in enger Kooperation mit einer Reihe von anderen Gruppen des SFB, z.B. B6, B11, B13, und C8, insbesondere natürlich mit dem Projektbereich Inflammation, der auch grosses Interesse an der Chimärentechnologie hat.

Im Projekt Lindauer (A6) werden primär vaskuläre Mechanismen untersucht, wobei vor allem das Endothel und die endotheliale Nitric Oxide Synthase im Vordergrund stehen. In der zurückliegenden Antragsperiode konnte die Rolle von NO für die zerebrale Vasoreaktivität weiter aufgeklärt werden, wobei der überraschende Befund erhoben wurde, dass das NO im wesentlichen modulatorisch und nicht als Mediator wirkt, und dass die Quelle dieses NO primär die neuronale Isoform des Enzymes ist. Es stellt sich daher nun die Frage nach der Bedeutung und der Funktion der endothelialen NOS unter physiologischen (funktionelle Aktivierung) und pathophysiologischen (Schlaganfall) Bedingungen. Dabei wird sich Frau Lindauer auch auf die klinisch hochrelevanten Effekte von HMG-CoA Reduktase Hemmern (Statine) auf die endotheliale NOS konzentrieren, und den klinischen Aspekt durch die Verwendung von spontan hypertensiven Ratten weiter hervorheben. Dahinter steckt die klinische Hypothese, dass chronische Statinbehandlung bei Schlaganfallrisikopatienten einen positiven Einfluss auf deren zerebrale Gefässreaktivität haben könnte. Diese in vitro (Modell der isolierten Zerebralarterie) und in vivo durchgeführten Experimente bedienen sich systemphysiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Assays. Abgesehen von den bereits etablierten Kooperationen (A1, A5, B5) ergeben sich interessante Anknüpfungspunkte mit dem neuen Projekt A8.

Das Projekt Grune (A7) untersucht die Rolle der Mikroglia für den Eisenstoffwechsel des Gehirnes, wobei es sich besonders auf die relevante Signaltransduktion in mikroglialen Zellen nach Hypoxie und Reoxygenierung konzentriert, eine pathophysiologische Situation unter der Radikalspezies eine wichtige Rolle für den Gewebeschaden spielen. Die Regulation von Ferritin, Transferrinrezeptor, sowie der regulatorischen Proteine IRP-1 und -2 stehen hier im Zentrum. Das Projekt will damit einerseits grundlegende Mechanismen der Eisenaufnahme und -Speicherung in Mikroglia erklären und darüber

hinaus die Störung der Eisenhomöostase nach zerebraler Ischämie verstehen. Auch hier sind sowohl protektive als auch destruktive Mechanismen der Mikroglia denkbar.

Neu im Projektbereich dazugekommen sind Unger/Blume (A8). Die Antragsteller konnten eine überraschende Rolle für das Peptidhormon Angiotensin II (AngII) und dessen Rezeptoren (AT1-R, AT2-R) für die Ausprägung von Schaden als auch die Regeneration nach verschiedenen Läsionen sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem beschreiben. Blockade des AT1-R war beim Schlaganfall neuroprotektiv, ein Effekt der auf die normale Signaltransduktion des AT2-R angewiesen war. Sowohl auf Rezeptorebene, als auch bezügl. der beteiligten Zelltypen (Astrozyten, Mikroglia, Neuronen) liegen hier offensichtlich sehr komplexe Interaktionen vor, welche in diesem Projekt insbesondere bezüglich protektiver und regenerativer Aspekte näher charakterisiert werden sollen. Vor allem gliale Zellen scheinen hier eine entscheidende Rolle zu spielen, weshalb das Projekt nicht nur methodisch (in-situ Hybridisierung, Immunhistochemie, Transfektion etc.) sondern auch inhaltlich eine grosse Bereicherung für den Projektbereich darstellt. Umgekehrt kann das Projekt von der hier vorhandenen grossen Expertise in der in vitro und in vivo Modellierung des Schlaganfalles und der Identifikation und Kultur glialer Zellen profitieren.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A1

3.1.1 Thema:

“Cortical spreading ischaemia: Ein neues Ischämieprinzip”

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neurologie

3.1.3 Leiter/in:

Dr. Dreier, Jens P., 11.09.1965 /

Neurologische Klinik der Charité, 10098 Berlin

Telefon: +49-30-2802-2815

Telefax: +49-30-2802-5047

E-Mail: jens.dreier@charite.de

Prof. Dr. Einhäupl, Karl M., 11.01.1947

Neurologische Klinik der Charité, 10098 Berlin

Telefon: +49-30-2802-2815

Telefax: +49-30-2802-5047

E-Mail: karl.einhaeupl@charite.de

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

Dr. Jens Dreier

ja, befristet bis zum 31.12.2001 _____

Prof. Dr. Karl M. Einhäupl

nein

3.1.4 Das Projekt wird in keinem anderen Verfahren der DFG gefoerdert

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

Eine Tierversuchsgenehmigung zur Durchführung der genannten Untersuchungen liegt vor (G0346/98) sowie die Zustimmung der Ethikkommission der Charité zu den Untersuchungen an menschlichen Hirnschnitten.

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
1995	47,4	14,7	-	62,1
1996	99,6	20,4	-	120,0
1997	99,6	20,4	-	120,0
1998	90,0	20,2	-	110,2
1999	88,8	27,7	57,3	173,8
2000	90,0	20	-	110,0
2001	94,8	20	-	114,8
Zwischen-summe	628,8	143,4	57,3	832,5
2002	94,8	79,2	26,5	200,5
2003	94,8	27,0	-	121,8
2004	94,8	27,0	-	121,8

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Gegenstand der hier vorgeschlagenen Untersuchungen ist die ‚Cortical Spreading Ischaemia‘ (CSI), ein von uns im Verlauf des Projektes A1 entdecktes, neues Ischämieprinzip. Die CSI wird durch eine Cortical Spreading Depression (CSD) ausgelöst, die als Folge einer veränderten vaskulären Reaktivität nicht zu einer Hyperämie, sondern zu einer Ischämie führt. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, daß zerebrale Ischämien durch eine Inversion der Kopplung zwischen neuronaler Aktivierung und regionalem Blutfluß möglich sind.

Die Veränderung der vaskulären Reaktivität wird hervorgerufen durch eine Senkung der corticalen NO-Konzentration in Kombination mit einem zweiten Faktor, z.B. einer Erhöhung der subarachnoidalen K⁺-Konzentration. Die Senkung der corticalen NO-Konzentration kann z.B. durch topische Applikation des NO-scavengers Oxy-Hämoglobin oder durch den NO-Synthase-Inhibitor Nitro-L-Arginin (L-NNA) erreicht werden. Die Erhöhung der subarachnoidalen K⁺-Konzentration wirkt möglicherweise über eine Herabregulation der Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase (Hajek et al., 1996). Basierend auf dieser Hypothese konnten wir in einer Pilotstudie zeigen, daß CSI auch durch eine Kombination aus L-NNA mit dem Inhibitor der Na⁺-K⁺-ATPase Ouabain hervorgerufen werden konnte. Diese Hypothese möchten wir in der vor uns liegenden Antragsperiode weiterverfolgen.

Oxy-Hb und K⁺ sind Produkte der Hämolyse und werden im Subarachnoidalraum beim Menschen nach Subarachnoidalblutung (SAB) freigesetzt. In zeitlicher Korrelation mit der Hämolyse treten beim Menschen Infarkte der Hirnrinde auf. Daraus ergibt sich die Hypothese, daß CSI das pathophysiologische Korrelat dieser sogenannten delayed ischaemic neurological deficits (DINDs) nach SAB sein könnte. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten wir nachweisen, daß das pathomorphologische Bild nach CSI mit teils laminären und teils keilförmigen Infarkten der Hirnrinde dem bekannten Muster nach DINDs entspricht.

Mit Hilfe der kraniellen Fenstertechnik, Einsatz von Laser-Doppler-Flußmessungen, ionensensitiven Mikroelektroden in vivo bei der Ratte sowie in vitro-Untersuchungen an Hirnschnitten von Ratte und Mensch (Temporallappenresektate nach epilepsiechirurgischem Eingriff) möchten wir spezifische Mechanismen der CSI im Vergleich zur CSD weiteruntersuchen.

Insbesondere interessieren uns in vivo der positive prädiktive Wert unseres Modells für validierte Verfahren, die in der Klinik zur Therapie von DINDs eingesetzt werden. Wir möchten die Pilotstudie zur Induktion von CSI durch Ouabain statt erhöhter subarachnoidaler K⁺-Konzentration ausbauen (Dosis-Wirkungskurven, Kombination auch mit Oxy-Hb, Messungen der corticalen K⁺-Konzentration unter Ouabain). Ferner soll getestet werden, ob auch andere Faktoren, die CSD-artige Depolarisationen

auslösen können wie z.B. die Penumbra einer fokalen Ischämie oder das Peptid Endothelin-1 (ET-1), in Kombination mit NO.-Senkung CSI-artige Blutflußabfälle induzieren. Darüberhinaus möchten wir die Veränderungen extrazellulärer Ionenkonzentrationen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , pH) und des Extrazellulärvolumens bei CSI im Vergleich zu CSD messen. Im Hirnschnitt sollen insbesondere der direkte Effekt der erhöhten baseline K^+ -Konzentration auf die Ausprägung von Ionenänderungen, Extrazellulärvolumen und Ausbreitung CSD-artiger Depolarisationen studiert werden. Außerdem möchten wir wissen, ob die in den in vivo-Untersuchungen beobachtete CSD-Schwellensenkung durch Erniedrigung der NO.-Konzentration auch in vitro nachweisbar ist.

3.3 Stand der Forschung

3.3.1 CSI und Migräne-induzierte Infarkte

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, hämodynamisch oder als primäre Folge einer Vasokonstriktion. Dem Parenchym wird dabei keine ursächliche mechanistische Bedeutung zuerkannt. Ein Ischämietyp existiert jedoch, für den ein davon abweichender Pathomechanismus postuliert wurde. Dabei handelt es sich um die sogenannten Migräne-induzierten Infarkte (Headache Classification Committee, 1988). Für diese Form des Hirninfarkts wird angenommen, daß ein primäres Ereignis des Parenchyms über sekundäre Veränderungen der Gefäße eine Ischämie auslöst (Bogousslavsky et al., 1988; Broderick, 1997; Moen et al., 1987). So führten Bogousslavsky und Mitarbeiter eine prospektive, kontrollierte klinische Studie zur Ätiopathogenese Migräne-induzierter 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 Migräne-induzierter Infarkte beimessen, war die sogenannte Cortical Spreading Depression (CSD), die als das pathophysiologische Korrelat der Migräneaura gilt (Lauritzen, 1994; Leão und Morison, 1945).

CSD führt unter physiologischen Bedingungen zu einer kurzdauernden wandernden Hyperämie, gefolgt von einer längerdauernden milden Oligämie (Lauritzen, 1994). Die adäquate Oxygenierung des Gewebes unter physiologischen Bedingungen reflektiert sich histopathologisch im Fehlen neuronaler Nekrosen (Nedergaard und Hansen, 1988). Dies ist vereinbar mit dem typischen Verlauf der Migräneaura, die meist nicht zum Infarkt führt. Unter pathologischen Bedingungen könnte die Blutflußantwort jedoch gestört sein, so daß die CSD eine Ischämie induziert und damit einen Migräne-induzierten Infarkt. Dieser Vorgang versteckt sich hinter der Formulierung von Bogousslavsky und Mitarbeitern (1988): "the neuronal metabolism-blood flow cascade ... may lead to irreversible cellular necrosis". Mit der Messung der Cortical Spreading Ischaemia bei der Ratte ist zum ersten Mal der experimentelle Nachweis gelungen, daß Ischämien tatsächlich als Folge einer invertierten Kopplung zwischen neuronaler Aktivierung und Blutfluß entstehen können (Dreier et al., 1998). Die Auslösung derartiger Ischämien als Folge von Hämolyseprodukten im Subarachnoidalraum impliziert jedoch zunächst eine andere mögliche pathophysiologische Bedeutung des Phänomens, die nicht unbedingt mit Migräne assoziiert sein muß.

3.3.2 CSI und ‚Delayed Ischaemic Neurological Deficits‘ nach Subarachnoidalblutung

Die natürliche Quelle von Hämoglobin (Hb) und K^+ im Subarachnoidalraum unter pathologischen Bedingungen sind lysierende Erythrozyten nach 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. Die subarachnoidale Oxy-Hb-Konzentration erreicht ihr Maximum am Tag 7 nach der Blutung (Pluta et al., 1998). Die berichteten Werte reichen von 500 μ M im

subarachnoidalen Hämatom (Ohta et al., 1980), über 100 μM im perivaskulären Raum der A. cerebri media (Pluta et al., 1998) bis zu 30 μM im Liquor (Ohta et al., 1980; White et al., 1987). Eine extrazelluläre Akkumulation dieser Faktoren findet also anscheinend im Gerinnsel an der Cortexoberfläche statt. Da das Gerinnsel die Hirnrinde quasi ummauert, ohne daß eine natürliche Barriere existiert, ist eine allmähliche Diffusion der Hämolyseprodukte in die oberen Cortexschichten anzunehmen. Damit kommen das neuronal-astrozytäre Netzwerk und die corticalen Arteriolen wie in unseren Experimenten in direkten Kontakt mit den Hämolyseprodukten. Im Gegensatz zu unseren Experimenten verlaufen Hämolyse- und Diffusionsvorgang beim Patienten jedoch über einen Zeitraum von Tagen, so daß die Äquilibrierungszeit unter den natürlichen Bedingungen eher länger ist.

Der klinische Verlauf der SAB wird nun häufig durch das Auftreten der ‚delayed ischaemic neurological deficits‘ (DINDs) 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 (Brouwers et al., 1993; Fisher et al., 1980). So beschreiben Fisher et al. (1980), daß ein subarachnoidales Blutgerinnsel größer als 5 x 3 mm im CT oder Blutschichten von mehr als 1 mm in Fissuren und Cisternen praktisch immer zu DINDs führten. Aus diesem Grunde werden seit der Erstbeschreibung der DINDs 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 aber auf dem angiographisch sichtbaren Vasospasmus und nicht in der Mikrozirkulation, obwohl der positive prädiktive Wert der Angiographie für die Entwicklung eines DIND nur ~33% beträgt. Ein Münzwurf hat vergleichsweise einen um 17% höheren positiven prädiktiven Wert von 50% (Vora et al., 1999). Darüberhinaus finden sich, passend zu einem im wesentlichen mikrozirkulatorischen Problem, als pathomorphologisches Substrat der DINDs nicht Territorialinfarkte, sondern in über 90 % weitverteilte corticale Mikroinfarkte (Neil-Dwyer et al., 1994; Stoltenburg-Didinger, 1997; Stoltenburg-Didinger und Schwarz, 1987). Interessanterweise sind die infarzierten corticalen Areale nicht durch die normalen vaskulären Territorien begrenzt, was zu einem Spreading Depression-Mechanismus passen würde. Die von uns nachgewiesene Lokalisation der Hirninfarkte nach CSI der Ratte mit teilweise laminären vor allem aber keil- und glockenförmigen Infarkten der Hirnrinde entspricht dem Muster nach DINDs beim Menschen ebenso wie die mikroskopisch sichtbaren histopathologischen Veränderungen (Dreier et al., 2000).

Das dritte Argument, welches mikrozirkulatorische bzw. direkt neuronal-gliale Mechanismen im Pathomechanismus von DINDs hervorhebt, bezieht sich auf die Wirksamkeit der prophylaktischen Therapie mit L-Typ-Calcium-Kanal-Antagonisten wie Nimodipin. Nimodipin reduzierte das relative Risiko eines schlechten Outcomes nach SAB in einer Metaanalyse signifikant um 24% (Feigin et al., 1998). Diese Risikoreduktion erklärte sich durch eine signifikante Reduktion der Schwere und Frequenz von DINDs. Der angiographisch sichtbare Vasospasmus wurde durch Nimodipin jedoch nicht beeinflusst (Allen et al., 1983; Espinosa et al., 1984; Petruk et al., 1988). In unseren tierexperimentellen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß Nimodipin die durch L-NNA und erhöhte subarachnoidale K^+ -Konzentration induzierte CSI in eine CSD mit praktisch normaler Blutflußantwort zurückverwandelte (Dreier et al., 1998). Die Induktion von CSI durch Hämoglobin und Kalium, die kortikale Lokalisation, die Kreuzung vaskulärer Territorien und die Nimodipin-Sensitivität unterstützen also eine mögliche Verbindung zwischen CSI und DINDs.

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 das extrazelluläre Gleichstrom-(engl. direct current [DC])-Potential aufgezeichnet. Die initialen spontanen Veränderungen in allen Parametern waren übereinstimmend mit den typischen Änderungen bei CSD in Tierexperimenten (Dreier et al., 1998; Lauritzen, 1994). 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; Dreier et al., 1998; Fabricius et al., 1995). Die CSI ist quasi eine verstärkte und verlängerte Version dieser kurzen initialen CSD-induzierten Hypoperfusion (Dreier et al., 1998). 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 DINDs bestehen, könnte die pathophysiologische Charakterisierung unseres Modells zur Optimierung der Therapie beitragen. Trotz Nimodipin stellen die DINDs 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. Migräne-induziertem Hirninfarkt und DINDs, formulierten wir im letzten Fortsetzungsantrag die Hypothese, daß DINDs möglicherweise eine Subgruppe Migräne-induzierter Infarkte darstellen und daß Migräne daher ein Risikofaktor für DINDs sein könnte (Dreier et al., 1998; 2000). Dies stimulierte in der jetzt zurückliegenden Antragsperiode einen Case-Report (Dreier et al., eingereicht) und eine retrospektive klinische Studie, die von Herrn PD Valdueza in Kooperation mit der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf initiiert und durchgeführt wurde. Die Studie bezog sich auf ein Patientenkollektiv, das zwischen 1989 und 1998 mit SAB aufgenommen worden war. Sie umfaßte 40 unselektierte Patienten im Alter zwischen 18 und 60 Jahren mit SAB, Hunt und Hess Grad 1 – 3 und DIND sowie ein ebenso großes Alters- und Geschlechts-gematchtes Kontrollkollektiv (SAB ohne DIND). Während 43% der Patienten mit DIND vor der Blutung an einer Migräne gelitten hatten, wiesen nur 23% der Kontrollpatienten eine Migräneanamnese auf. Der Unterschied war trotz der kleinen Studienpopulation schwach signifikant (Valdueza et al., in Vorbereitung).

Literatur

- 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
- Beutler E (1995) Composition of the erythrocyte. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ eds. *Williams Hematology*, McGraw-Hill, pp 364-369
- Bogousslavsky J, Regli F, Van Melle G, Payot M, Uske A (1988) Migraine stroke. *Neurology* 38:223-227
- 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
- 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
- Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhäupl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1998). Nitric oxide scavenging by haemoglobin 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* 18:978-990
- Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhäupl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space induce cortical spreading ischemia and focal necrosis in rats, a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage? *J Neurosurg* 93, 668-676
- Dreier JP, Sakowitz O, Benndorf G, Unterberg A, Valdueza JM Migrainous aura-like symptoms starting several minutes after the onset of subarachnoid hemorrhage. eingereicht
- Duckrow RB (1993) A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res* 618:190-195
- 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
- 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
- Feigin VL, Rinkel GJ, Algra A, Vermeulen M, van Gijn J (1998) Calcium antagonists in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Neurology* 50:876-883

- Fisher CM, Kistler JP, Davis JM (1980) Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6:1-9
- Headache Classification Committee of the International Headache Society (1988) Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. *Cephalgia* 8(Suppl7):1-96
- 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
- Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura The spreading depression theory. *Brain* 117:199-210
- Leão AAP, Morison RS (1945) Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 8:33-45
- 18 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
- MacDonald RL, Weir BKA (1991) A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22:971-982
- 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
- 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
- Nedergaard M, Hansen AJ (1988) Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449(1-2):395-398
- Neil-Dwyer G, Lang DA, Doshi B, Gerber ChJ, Smith PWF (1994) Delayed cerebral ischaemia: the pathological substrate. *Acta Neurochir (Wien)* 131:137-145
- Ohta T, Kajikawa H, Yoshikawa Y (1980) Cerebral vasospasm and hemoglobins: clinical and experimental studies. In: Wilkins RH, ed. *Cerebral arterial spasm. Proceedings of the second international workshop, Amsterdam, the Netherlands 1979, Baltimore, Williams & Wilkins*, pp 166-172.
- 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.
- 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
- Pluta RM, Afshar JK, Boock RJ, Oldfield EH (1998) Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 88:557-561
- Robertson EG (1949) Cerebral lesions due to intracranial aneurysms. *Brain* 72:150-185
- Stobbe H (1991) *Untersuchungen von Blut und Knochenmark*, Berlin, Verlag Gesundheit GmbH
- 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
- 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
- Valdúeza JM, Kremer C, Dreier JP, Lammers G, Lohmann F, Dirnagl U, Hansen HC Is migraine a risk factor for delayed ischaemic neurological deficit after subarachnoid hemorrhage? (in Vorbereitung)
- Vora YY, Suarez-Almazor M, Steinke DE, Martin ML, Findlay JM (1999) Role of transcranial Doppler monitoring in the diagnosis of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 44(6):1237-1247
- White RP, MacLeod RM, Muhlbauer MS (1987) Evaluation of the role hemoglobin in cerebrospinal fluid plays in producing contractions of cerebral arteries. *Surg Neurol* 27:237-242

3.4 Eigene Vorarbeiten

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

Erhöhte subarachnoidale K⁺-Konzentration und entweder NO.-scavenging durch Hämoglobin oder NO.-Synthase (NOS)-Inhibition mit Nitro-L-Arginin (L-NNA) induziert eine Transformation der Blutflußantwort auf CSD von einer ‚Cortical Spreading Hyperaemia‘ in eine ‚Cortical Spreading Ischaemia‘ (CSI) in Thiopental-anästhetisierten Ratten mit kranialer Fensterpräparation (Dreier et al., 1998). Messung der freien Sauerstoffradikalproduktion mit Lucigenin-induzierter Chemilumineszenz zeigt bei normaler CSD keine Veränderung der Radikalproduktion, während CSI das typische Radikalproduktionsmuster transientscher Ischämien in anderen in vivo-Ischämie-Modellen (Peters et al., 1998) zeigt.

CSI führt zu corticalen Hirninfarkten, deren Lokalisation und histopathologisches Muster mit dem von DINDs beim Menschen übereinstimmt (Dreier et al., 2000).

NO.-abhängige und NO.-unabhängige Vasodilatoren können die CSI wieder in eine normale CSD zurückverwandeln. Die Verzögerung der neuronalen Repolarisation unter NO.-Senkung und Erhöhung der subarachnoidalen K⁺-Erhöhung ist hauptsächlich aber nicht nur Folge der Ischämie, wie vergleichende Untersuchungen an Hirnschnitten der Ratte zeigen (Dreier et al., 2001).

Chronische Transsektion des N.nasociliaris, der trigeminale perivaskuläre Nerven für den frontalen Cortex führt, vermindert die ‚Cortical Spreading Hyperaemia‘ im frontalen Cortex um 23 ± 13 %. Kombinierte chronische Transsektion von N. nasociliaris und Parasympathicus reduziert die ‚Cortical Spreading Hyperaemia‘ um 55 ± 19 %, d.h. sowohl trigeminale als auch parasympathische perivaskuläre Nerven sind an der Blutflußantwort auf CSD beteiligt (Reuter et al., 1998).

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., 1998).

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 hämodynamischen 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 Hämoglobinoxxygenierung initial, während sie unter Normalbedingungen ansteigt (Wolf et al., 1997). Damit existiert ein charakteristisches Muster der Periinfarktdepolarisationen, das mit Hilfe der Nahinfrarotspektroskopie darstellbar ist.

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., 1998).

Darüberhinaus konnten wir zeigen, daß NOS-Inhibition unter physiologischen Bedingungen zu einer Unterdrückung der K⁺-induzierten Blutflußsteigerung führt (Dirnagl und Dreier, 1997; Dreier et al., 1995). Applikation eines NO.-Donors unter NOS-Inhibition restituiert die normale K⁺-induzierte Blutflußsteigerung.

Folgende Vorarbeiten zum angewandten Methodenspektrum wurden von uns durchgeführt:

Kranielle Fenstertechniken: Dreier et al., 1995; 1998; 2000; 2001

Zerebrales Multiparametermonitoring bei CSD (simultan: kraniales Fenster, Nahinfrarotspektroskopie, Elektrophysiologie, pO₂-Elektrode und Laser-Doppler Blutfluß): Wolf et al., 1996

Ischämie Modelle, fokal: Wolf et al., 1997; Peters et al., 1998; global: Dirnagl et al., 1993

Laser-Doppler Blutflußmessung: Dreier et al., 1995; 1998; 2000; 2001; Wolf et al., 1996

Messung mit ionensensitiven Mikroelektroden in Hirnschnitten der Ratte: Dreier et al., 1990; 1991; 1998; 2001

Histochemie und Immunhistochemie: Dreier et al., 2000

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

- 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
- Dirnagl U, Villringer A, Gebhardt R, Haberl RL, Einhäupl KM (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain microcirculation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:353-360
- Dirnagl U, Thoren P, Villringer A, Sixt G, Them A, Einhäupl 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
- Dreier JP, Heinemann U (1990) Late low magnesium-induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Neurosci Lett* 119:68-70
- Dreier JP, Heinemann U (1991) Regional and time dependent variations of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp Brain Res* 87:581-596
- 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
- Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhäupl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1998) Nitric oxide scavenging by hemo-globin 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* 18:978-990
- Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhäupl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space induce cortical spreading ischemia and focal necrosis in rats, a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage? *J Neurosurg* 93, 668-676
- Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2001) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol* 531:515-526
- 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* 783:188-193
- Lindauer U, Dreier J, Angstwurm K, Rubin I, Villringer A, Einhäupl 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
- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased formation of reactive oxygen species following permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(2):196-205
- Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U (1998) Perivascular nerves contribute to cortical spreading depression-associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* 274: H1979-1987
- Sakowitz OW, Wolfrum S, Sarrafzadeh AS, Stover JF, Dreier JP, Dendorfer A, Benndorf G, Lanksch WR, Unterberg AW (2001) Relationship of Cerebral Energy Metabolism and Extracellular Nitrate / Nitrate Concentrations in Patients following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* (in press)
- Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U (2001) The cerebrovascular response to elevated potassium – role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett* (in press)
- 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, Einhäupl K, Dirnagl U (1997) Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during perinfarct depolarizations in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:950-954

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1 Ziele

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

Revertieren Nimodipin bzw. der Plasmaexpander Hydroxyethylstärke (HAES 6%) die Cortical Spreading Ischaemia (CSI) in eine reguläre Cortical Spreading Depression (CSD), wenn die CSI durch Oxy-Hb und erhöhte subarachnoidale K^+ -Konzentration ausgelöst wird? (Studie A)

Wird die Cortical Spreading Ischaemia auch durch NO-Senkung und Inhibition der Na^+ - K^+ -ATPase mit Ouabain induziert? (Studie B)

Wie verändern sich die extrazellulären Ionenkonzentrationen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , pH) und das Extrazellulärvolumen bei Cortical Spreading Ischaemia im Vergleich zur regulären Cortical Spreading Depression? (Studie C)

Löst die Kombination von ET-1 und NO-Senkung Cortical Spreading Ischaemia aus? (Studie D)

Werden in der Penumbra einer fokalen Ischämie Cortical Spreading Ischaemia-artige Blutflußabfälle ausgelöst, wenn die NO-Konzentration abgesenkt ist? (Studie E)

Welche Bedeutung hat cGMP für die Entstehung der Cortical Spreading Ischaemia? (Studie F)

Wie verändern sich die extrazellulären Ionenkonzentrationen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , pH), das Extrazellulärvolumen und das intrinsische optische Signal in Hirnschnitten der Ratte bzw. des Menschen während Cortical Spreading Depression-artiger Depolarisationen in Gegenwart physiologischer artifizierender cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF), bzw. erhöhter baseline K^+ -Konzentration in der ACSF ($[K^+]_{ACSF}$), bzw. Ouabain, bzw. Hypoxie? (Studie G)

Wie verändert sich die K^+ -Schwellenkonzentration zur Auslösung CSD-artiger Depolarisationen durch NO (Messung extrazellulärer Ionenkonzentrationen bzw. des intrinsischen optischen Signals) in Hirnschnitten der Ratte bzw. des Menschen? (Studie H)

Ist Migräne ein Risikofaktor für DINDs nach SAB beim Menschen? (Studie I)

3.5.2 Methoden

Spezies, Narkose, Präparation:

Die vorgeschlagenen *in vivo* 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 Tierversuche werden unter Thiopental-Anästhesie (100 mg / kg KG i.p., bei Bedarf Nachinjektion) durchgeführt.

Folgende physiologische Parameter werden während des Experiments kontinuierlich gemessen und digital registriert: Endexpiratorischer pCO_2 (Heyer Infrarot- CO_2 -Analysator Artema), arterieller Blutdruck, rektale Körpertemperatur. Arterielle Blutgase (AVL-Blutgasanalysator) und Hämatokrit werden in geeigneten Abständen ermittelt.

Bei der kraniellen Fenstertechnik wird nach Entfernung eines z.B. 4 x 5 mm großen Knochenstückchens über dem parietalen Cortex die Dura mater entfernt und das Fenster mit einem Deckgläschen geschlossen. Kontinuierliche Superfusion einer ACSF (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 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 ist 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. 500 µm³. Es wird das Multi-functional laser-Doppler System 5000 von Perimed eingesetzt.

Elektrophysiologie (ionensensitive Mikroelektroden):

Die ionensensitiven Elektroden mit Spitzendurchmessern von 2 – 3 µm werden nach der Methode von Lux und Neher (1973) gebaut. Dabei wird ein Ionenaustauscher verwendet, eine ölige Flüssigkeit, die für das Meßion spezifische Carriermoleküle enthält, so daß ein selektiver Transport zwischen den Elektrolyten zu beiden Seiten des Austauschers stattfinden kann. Ist das Meßion zu beiden Seiten des Austauschers unterschiedlich konzentriert, kommt es zu einer Diffusion des Meßions, die einen Nettostrom antreibt. Infolge der Ladungsverschiebung wird über den Austauscher ein Potential aufgebaut, das der Ionenumverteilung entgegenwirkt. Im Gleichgewicht dieser Kräfte gilt dann die Nernstsche Gleichung, aus der das Verhältnis der Konzentrationen des Meßions zu beiden Seiten der Membran berechnet werden kann. Auf diese Weise können die absoluten, extrazellulären Konzentrationsänderungen von K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ und pH bestimmt werden, wenn ihre Baselinewerte bekannt sind. Änderungen des Extrazellulärums können erfaßt werden, indem Tetrapropylammonium (TPA⁺) in einer Konzentration von 2 mM in der ACSF gelöst wird. TPA⁺ ist aufgrund seiner Größe und Ladung im wesentlichen auf das extrazelluläre Kompartiment beschränkt. Der flüssige K⁺-sensitive Ionenaustauscher Corning resin 477317 ist in Gegenwart quarternärer Ammonium-Ionen gegenüber K⁺ praktisch blind und kann daher zur Messung der extrazellulären TPA⁺-Konzentration verwendet werden.

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 cerebrosinalen Flüssigkeit umspült.

Humane Neocortex- oder Hippocampusschnitte von Patienten werden verwendet, die an einer pharmakoresistenten Form einer mesialen Temporallappenepilepsie leiden. Nach einem Aufklärungsgespräch wird die Einwilligung des Patienten in die Studie eingeholt. Die Studie erfolgt mit dem Einverständnis der lokalen Ethikkommission. Das Gewebe wird noch im OP in kalter (4 °C), mit Carbogen angereicherter spezieller ACSF inkubiert. Die Na⁺-Konzentration dieser ACSF ist reduziert, um einen Hypoxie-induzierten Einstrom von Natrium in Neurone zu verhindern. Der Transport aus dem OP in das Labor dauert 30 Minuten.

Messung intrinsischer optischer Signale im Hirnschnitt:

Für die Messungen werden die Hirnschnitte von unten mit Hilfe einer Halogenlampe durchleuchtet. Infrarotlicht wird über einen Interferenz Bandpaß Filter erzeugt. Die Hirnschnitte werden durch ein aufrechtes binokulares Mikroskop betrachtet, an das eine CCD Kamera angeschlossen ist.

Das gesamte Videosignal wird mit Hilfe eines Frame-grabber Boards in Linien konvertiert, die eine bestimmte Anzahl von Pixeln enthalten. Die Bilder werden im PC gespeichert. Das Ziel der Untersuchungen ist, Änderungen der intrinsischen optischen Aktivität zu erfassen. Daher dient das erste Bild einer Serie als Kontrolle, die von jedem folgenden Bild subtrahiert wird. Die Subtraktionsbilder zeigen dann an, in welchem Areal des Hirnschnitts sich die Lichttransmission über die Zeit ändert. Den

Subtraktionsbildern können auch Fehlfarben zugeordnet werden, um den räumlichen Verlauf von Transmissionsänderungen besser zu illustrieren.

Messung der Aktivität der corticalen Na^+/K^+ -ATPase

Das anzuwendende Assay folgt der Methode nach Scharschmidt et al. (1979) in der Modifikation für das Rattengehirn nach Marzatico (1989). Diese Methode ist im Vergleich zu alternativen Verfahren (Messung des freien Phosphats, Messung des ^{86}Rb -Uptakes) zuverlässiger und einfacher durchzuführen. Sie folgt der Überlegung, die Produktion von ADP durch die Na^+/K^+ -ATPase unter Verwendung von Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase an die Oxidation von NADH zu koppeln.

Messung des cGMP-Spiegels im Cortex:

Ea wird ein kommerzieller Kit verwendet (cGMP Enzymimmunoassay, Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech).

3.5.3 Arbeitsprogramm

Revertieren Nimodipin bzw. der Plasmaexpander Hydroxyethylstärke (HAES 6%) die Cortical Spreading Ischaemia (CSI) in eine reguläre Cortical Spreading Depression (CSD), wenn die CSI durch Oxy-Hb und erhöhte subarachnoidale K^+ -Konzentration ausgelöst wird? (Studie A):

Es ist bekannt, daß Schwere und Frequenz von DINDs durch prophylaktische Therapie mit dem Ca^{2+} -Antagonisten Nimodipin gesenkt werden können. Außerdem wirkt sich ein hochnormaler Volumenstatus günstig aus. Wir wollen daher testen, ob diese Faktoren CSI, die durch Oxy-Hb und erhöhte subarachnoidale K^+ -Konzentration ausgelöst wird, wieder in normale CSD retransformiert. Für CSI, die durch L-NNA und erhöhte subarachnoidale K^+ -Konzentration induziert wurde, konnte ein Effekt von Nimodipin bereits von uns nachgewiesen werden (Dreier et al., 1998). Für die Korrelation mit der Klinik ist die Kombination mit Oxy-Hb allerdings relevanter.

Standardpräparation eines kraniellen Fensters unter Thiopental-Narkose mit CBF- und DC-Potentialmessung, Auslösung einer CSD über einen Schornstein (KCl), die in das geschlossene kranielle Fenster hineinwandert und dort durch Superfusion von ACSF mit erhöhter K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_{\text{ACSF}}$) (20 mM) und Hämoglobin (2 mM) in eine CSI umgewandelt wird, Vergleich mit zusätzlicher intravenöser Applikation des L-Typ- Ca^{2+} -Antagonisten Nimodipin (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG/h) bzw. von Hydroxyethylstärke (HAES) (6%) (5 ml/h)

In jeder Gruppe etwa $n = 10$, $n = 30$

Wird die Cortical Spreading Ischaemia auch durch NO-Senkung und Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase mit Ouabain induziert? (Studie B):

In dieser Studie wollen wir untersuchen, ab welchem Konzentrationsbereich Ouabain in Kombination mit L-NNA bzw. Oxy-Hb CSI auslöst. Die Blutflußänderungen werden mit Hilfe des Multi-functional-Laser-Doppler-Systems 5000 (Perimed, Schweden) simultan im frontalen Bereich des Fensters sowie in zwei unterschiedlichen Tiefen im kaudalen Fensterbereich gemessen. Die Ausbreitung der CSI wird dokumentiert.

Mit Hilfe von ionensensitiven Mikroelektroden wollen wir untersuchen, ob Ouabain zu einer vergleichbaren Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]_{\text{o}}$) im Cortex führt wie die Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration.

Weiterhin wollen wir untersuchen, ob die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase im Cortex durch eine Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration in ähnlicher Weise erniedrigt wird wie durch Ouabain.

Standardpräparation (s.o.) mit CBF- und DC-Potentialmessung, Auslösung einer CSD über einen Schornstein (KCl), Superfusion im Bereich des geschlossenen Fensters, in das die CSD hineinwandert mit (1) physiologischer ACSF; (2) L-NNA (1 mM); (3) Ouabain (5 μM); (4) Ouabain (50 μM); (5) L-NNA (1mM) + Ouabain (5 μM); (6) L-NNA (1 mM) + Ouabain (50 μM); (7) Hb (2 mM); (8) Hb (2 mM) + Ouabain (5 μM); (9) Hb (2 mM) + Ouabain (50 μM); (10) Hb (200 μM) + Ouabain (50 μM)

In jeder Gruppe etwa $n = 8$, $n = 80$

Messung von $[K^+]_o$ im Cortex (~100 μ m Tiefe) bei Superfusion von ACSF mit erhöhter K^+ -Konzentration (35 mM) und Ouabain (50 μ M) im Paarvergleich

n = 6

Bestimmung der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase im Cortex bei Superfusion von (1) erhöhter K^+ -Konzentration (35 mM), (2) Ouabain (50 μ M) und (3) physiologischem Liquor

In jeder Gruppe etwa n = 5, n = 15

Also insgesamt n = 101

Wie verändern sich die extrazellulären Ionenkonzentrationen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , pH) und das Extrazellulärvolumen bei Cortical Spreading Ischaemia im Vergleich zur regulären Cortical Spreading Depression? (Studie C)

Verglichen werden CSIs, die durch Hb und erhöhte subarachnoidale K^+ -Konzentration ausgelöst werden mit CSDs, die zunächst in Gegenwart physiologischer ACSF und dann erhöhter subarachnoidaler K^+ -Konzentration in Abwesenheit von Hb getriggert werden. Die Ionenkonzentrationsänderungen werden mit Hilfe von Mikroelektroden gemessen. Die Ionenmessungen erfolgen in einer Tiefe von 100 μ m. Zwei verschiedene Ionenkonzentrationen können kaudal im Fenster mit zwei geklebten Elektroden erfaßt werden (Abstand der Elektrodenspitzen 10 bis 20 μ m) und zusätzlich wird eine weitere ionensensitive Elektrode frontal positioniert. Laser-Dopplersonden werden so positioniert, daß sie kaudal und frontal im Bereich der Mikroelektroden messen. Zur Messung des Extrazellulärvolumens wird TPA^+ eingewaschen, welches selbst nur geringe Modifikationen CSD-artiger Depolarisationen erzeugt. Zur Bestimmung der Baselinekonzentrationen der Ionen im Gewebe wird bei der Ratte unter Beatmung eine Liquorpunktion durchgeführt.

Präparation eines offenen kraniellen Fensters,

Jeweils 3 verschiedene Ionenmessungen in einem Experiment, in jeder Gruppe etwa n = 7, d.h. Studie C insgesamt n = 42

Löst die Kombination von ET-1 und NO-Senkung Cortical Spreading Ischaemia aus? (Studie D)

In der zurückliegenden Antragsperiode untersuchten wir, ob auch andere Vasokonstriktoren als NO-Senker in Kombination mit erhöhter subarachnoidaler K^+ -Konzentration eine CSI auslösen können. Wir testeten zunächst ET-1, da für dieses vasokonstriktorisch wirkende Peptid, welches gleichzeitig ein neuronaler und astroglialer Modulator ist, eine herausragende Bedeutung für den Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung diskutiert wird. Dabei stellten wir überraschenderweise fest, daß ET-1 auch bei physiologischer subarachnoidaler K^+ -Konzentration CSDs triggert. Wir fanden heraus, daß bei der Entstehung der ET-1-induzierten CSDs der ET_A - und der ET_B -Rezeptor sowie Phospholipase C und der NMDA-Rezeptor beteiligt sind, jedoch nicht Protein Kinase C. Die Induktion der CSDs durch ET-1 war assoziiert mit einer corticalen Mikroregion, in der histologisch ein selektiver neuronaler Schaden festgestellt wurde. Da ET-1 in Hirnschnitten keine CSD-artigen Depolarisationen induzierte, ist am ehesten eine Mikroschämie durch eine primäre Vasokonstriktion in einem mikroskopisch kleinen corticalen Areal für die Entstehung dieser Depolarisationen verantwortlich zu machen. Eine CSI im Sinne der sekundären Ischämie als Folge neuronaler Depolarisation wurde weder durch ET-1 alleine noch durch die Kombination von ET-1 und erhöhter subarachnoidaler K^+ -Konzentration induziert. Nach Abschluß dieser Studie wollen wir auf den Ergebnissen aufbauen und untersuchen, ob ET-1 statt CSD eine CSI induziert, wenn es mit einem NO-Senker kombiniert wird. Wenn dies der Fall ist, wollen wir testen, ob die Kombination von NO-Senkung und ET-1-Erhöhung ebenfalls zu einer Aktivitätsminderung der Na^+/K^+ -ATPase führt. Dazu soll aus Cortexgewebe die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase bestimmt werden. Es ist bekannt, daß ET-1 in verschiedenen Geweben die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase moduliert. Eine Aktivierung dieses Enzyms durch ET-1 wurde z.B. in Hirnkapillarendothel, vermittelt durch ET_A Rezeptoren (Kawai et al., 1995), und eine Inhibition via ET_B Rezeptor-Aktivierung in kultivierten ciliaren Epithelzellen (Prasanna et al., 2001) gefunden. In ähnlicher Weise wurden auch im zentralen Nervensystem aktivierende und inhibierende Effekte von ET-1 auf die Na^+/K^+ -ATPase nachgewiesen (Shah und Jandhyala, 1993; Taberner et al., 1996).

Standardpräparation (s.o.) mit CBF- und DC-Potentialmessung. Löst die Kombination von ET-1 und L-NNA (1 mM) bzw. Hb (2 mM) CSI aus (mit anschließender Bestimmung der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, Kontrollgruppe siehe Studie B)? Revertieren der ET_A -Antagonist BQ-123 bzw. der ET_B -Antagonist BQ-788 CSI in CSD, wenn die CSD-artige Depolarisation unter L-NNA in Kombination mit erhöhter subarachnoidaler K^+ -Konzentration entsteht (Vergleich mit CSI unter L-NNA und erhöhter subarachnoidaler K^+ -Konzentration)?

In jeder Gruppe etwa $n = 8$, d.h. Studie D insgesamt $n = 40$

Werden in der Penumbra einer fokalen Ischämie Cortical Spreading Ischaemia-artige Blutflußabfälle aus-gelöst, wenn die NO-Konzentration abgesenkt ist? (Studie E)

Eine fokale Ischämie soll durch Mediaokklusion mit dem Häkchen ausgelöst werden. In dieser Studie wollen wir untersuchen, ob es bei Periinfarktdepolarisationen unter NO-Synthase-Inhibition (L-NNA) bzw. NO-scavenging (Oxy-Hb) zu CSI-verwandten Blutflußveränderungen kommt. Dies könnte einer der Gründe sein, warum eine Hemmung der NO-Synthase im Frühstadium einer fokalen Ischämie zu einer Infarkt volumenzunahme führt. Vereinbar mit einem CSI-Mechanismus wird allgemein angenommen, daß die Verminderung der NO-Konzentration am ehesten über einen Blutfluß-senkenden Effekt in der Penumbra eines Hirninfarkts schädigend wirkt. Wenn tatsächlich CSI-artige Blutflußveränderungen gefunden werden, wollen wir zusätzlich auch in diesem Projekt die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase bestimmen.

Standardpräparation (s.o.) mit CBF- und DC-Potentialmessung, Spontaninduktion von Periinfarktdepolarisationen durch permanente Mediaokklusion mit der Häkchenmethode. Vergleich zwischen Superfusion einer physiologischen ACSF und einer Superfusion mit ACSF, die entweder L-NNA, Hb oder den Guanylatcyclase-Inhibitor ODQ enthält.

In jeder Gruppe etwa $n = 8$, d.h. Studie E insgesamt $n = 32$

Welche Bedeutung hat cGMP für die Entstehung der Cortical Spreading Ischaemia? (Studie F):

Ein Teil der Wirkungen von NO wird durch Aktivierung der Guanylatcyclase und Produktion von cGMP vermittelt. Wir wollen daher testen, ob durch die Kombination des potenten und selektiven Inhibitors der NO-sensitiven Guanylatcyclase ODQ in Kombination mit einer Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration ebenso wie durch NO-Senkung CSI ausgelöst wird. Es soll dabei auch festgestellt werden, ob die K^+ -Schwelle zur Auslösung einer CSD-artigen Depolarisation durch ODQ ebenso gesenkt wird wie durch NO-Senkung. Dies sollte nicht der Fall sein, da wir vermuten, daß die Schwellensenkung Folge einer herabgesetzten Reaktion von NO mit Thiolgruppen einer regulierenden Redoxstelle des NMDA-Rezeptors ist (Lipton et al., 1993). Durch die Verminderung dieser Redoxreaktion dürfte die Rezeptoraktivität ohne Beteiligung von cGMP verstärkt werden, was die Entstehung von CSD-artigen Depolarisationen fördert. Wir wollen ferner den Effekt des cGMP-Agonisten und Vasodilatators 8-bromo-cGMP im Vergleich zum Effekt des NO-Donors NO-Spermin auf CSI untersuchen. Die Reduktion der cGMP-Spiegel im Cortex durch L-NNA bzw. Hb in Kombination mit einer Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration soll bestimmt werden.

Standardpräparation (s.o.) mit CBF- und DC-Potentialmessung. Wird durch die Kombination von ODQ mit einer Erhöhung der subarachnoidalen baseline K^+ -Konzentration eine CSI im kraniellen Fenster erzeugt? Bei welcher subarachnoidalen K^+ -Konzentration liegt die Schwelle zur Induktion einer CSD-artigen Depolarisation in Gegenwart bzw. Abwesenheit von ODQ? Welchen Effekt hat der cGMP-Agonist 8-bromo-cGMP im Vergleich zum NO-Donor NO-Spermin auf CSI, die durch L-NNA in Kombination mit Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration (35 mM) ausgelöst wird? Welchen Effekt hat der cGMP-Agonist 8-bromo-cGMP im Vergleich zum NO-Donor NO-Spermin auf CSI, die durch Hb in Kombination mit Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration (35 mM) ausgelöst wird? Messung der corticalen cGMP-Spiegel bei Tieren, bei denen CSI entweder durch L-NNA oder Hb in Kombination mit einer Erhöhung der subarachnoidalen K^+ -Konzentration ausgelöst wird im Vergleich zu Tieren, bei denen nur eine CSD-artige Depolarisation durch erhöhte subarachnoidale K^+ -Konzentration ohne gleichzeitige NO-Senkung ausgelöst wird.

In jeder Gruppe etwa $n = 8$ bzw. cGMP-Bestimmungen $n = 5$, d.h. Studie F insgesamt $n = 63$

Wie verändern sich die extrazellulären Ionenkonzentrationen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , pH), das Extrazellulärvolumen und das intrinsische optische Signal in Hirnschnitten der Ratte bzw. des Menschen während Cortical Spreading Depression-artiger Depolarisationen in Gegenwart physiologischer artifizierender cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF), bzw. erhöhter baseline K^+ -Konzentration in der ACSF ($[K^+]_{ACSF}$), bzw. Ouabain, bzw. Hypoxie? (Studie G)

Ziel dieser Studie ist es, die neuronal-astroglialen Aspekte der CSI, die unabhängig von der cerebralen Zirkulation sind, in einem System zu charakterisieren, daß besser manipulierbar ist als das *in vivo*-Modell. Es sollen nicht nur Untersuchungen an Rattengewebe sondern auch an menschlichen Hirnschnitten erfolgen, um zu prüfen, inwieweit die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Wir wollen in Studie G vier verschiedene Situationen in Hirnschnitten von Ratten und Menschen vergleichen:

1 Normoxische CSD, die in physiologischem Gewebe propagiert. Dazu wird eine CSD durch Droplet-Applikation einer 300 mM KCl-Lösung an einem Punkt im Hirnschnitt ausgelöst. Von dort propagiert die CSD in das physiologische Gewebe.

2 Ob Erhöhung der baseline $[K^+]_{ACSF}$ an einem gegebenen Ort im Hirnschnitt präsent ist oder nicht, spielt für den Verlauf der CSD an diesem Ort eine Rolle. So wissen wir z.B. aus Hirnschnittuntersuchungen an der Ratte, daß normoxische CSDs in Gegenwart einer erhöhten baseline $[K^+]_{ACSF}$ signifikant verlängert sind (Dreier et al., 2001). Wir vermuten, daß diese Verzögerung der Repolarisation eine wichtige Rolle für die CSI spielt, da dies die Phase ist, in der sich *in vivo* unter NO^- -Senkung eine Vasokonstriktion beobachten läßt. Wird diese Phase also über einen direkten neuronal-astroglialen Mechanismus verlängert, verlängert sich die Phase, in der ATP während verminderter Energiezufuhr verbraucht wird, so daß die zellulären Energiereserven dann irgendwann für eine Repolarisation nicht mehr ausreichen. Da an die fortbestehende neuronale Depolarisation *in vivo* die Vasokonstriktion gekoppelt ist, verbleibt das Gewebe über diesen Circulus vitiosus im Zustand der Ischämie.

3 Die Verzögerung der Repolarisation durch erhöhtes baseline $[K^+]_{ACSF}$ steht möglicherweise in Zusammenhang mit einer Herabregulation der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase (Hajek et al., 1996). Daher wollen wir zusätzlich untersuchen, ob eine direkte partielle Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain die untersuchten Parameter in ähnlicher Weise verändert.

4 Für die Spätphase der CSI spielt die Unfähigkeit zur Repolarisation CSD-artiger Depolarisationen durch Energiemangel eine herausragende Rolle (Dreier et al., 2001). Der Zusammenhang zwischen Repolarisation CSD-artiger Depolarisationen und Energieversorgung wurde erstmals 1947 von Leão am Kaninchen demonstriert. Exemplarisch möchten wir diese Beziehung an menschlichen Hirnschnitten demonstrieren, indem K^+ -induzierte CSDs unter Normoxie und transients Hypoxie verglichen werden.

Folgende Parameter unter den vier vorstehend angegebenen Bedingungen sollen untersucht werden: Änderungen extrazellulärer Ionenkonzentration ($[K^+]_o$, $[Na^+]_o$, $[Ca^{2+}]_o$, $[Cl^-]_o$, pH), Größe des Extrazellulärraums (TPA⁺-Elektroden), Propagation (Ableitung mit vier Elektroden in definierten Abständen und Messung der intrinsischen optischen Signale).

Hirnschnittpräparation (s.o.), Messung von DC-Potential und extrazellulären Ionensignalen mit mehreren Mikroelektroden (Propagation), Messung des intrinsischen optischen Signals mit CCD-Kamera und Frame-grabber Board, Erzeugung von CSD durch Droplet-Applikation von KCl unter folgenden Bedingungen: Gruppe 1: (1) Physiologische ACSF; (2) Transiente Erhöhung der baseline $[K^+]_{ACSF}$ von 3 auf 20 mM; (3) physiologische ACSF; (4) Einwaschen von Ouabain (10 μ M); (5) Auswaschen. Gruppe 2: (1) Physiologische ACSF; (2) Transiente Erhöhung der baseline $[K^+]_{ACSF}$ von 3 auf 20 mM; (3) physiologische ACSF; (4) partieller Austausch von O_2 in der Gasphase durch N_2 ; (5) Physiologische ACSF und Normoxie.

Jeweils 4 verschiedene Ionenmessungen in einem Experiment bzw. Kombination des intrinsischen optischen Signals mit einer Ionenmessung, in jeder Gruppe (Ratte) etwa $n = 15$, d.h. Studie G (Ratte) insgesamt $n = 30$, in jeder Gruppe (Mensch) etwa $n = 15$, d.h. Studie G (Mensch) insgesamt $n = 30$

Wie verändert sich die K^+ -Schwellenkonzentration zur Auslösung CSD-artiger Depolarisationen durch NO (Messung extrazellulärer Ionenkonzentrationen bzw. des intrinsischen optischen Signals) in Hirnschnitten der Ratte bzw. des Menschen? (Studie H)

Beim Vergleich der K^+ -Schwellen zur Auslösung von CSD-artigen Depolarisationen *in vivo* fiel in zwei Studien auf, daß die Schwellen durch NO-Senkung deutlich reduziert wurden (von einem Bereich zwischen 45 – 130 mM $[K^+]_{ACSF}$ auf 20 – 35 mM) (Dreier et al., 2000; 2001). Dafür könnte einerseits eine Verminderung des cerebralen Blutflusses eine Rolle spielen, da die K^+ -Pufferung über die Endfüßchen der Astrozyten eine Beziehung zum Blutfluß aufweist (Paulson and Newman, 1987). Wichtiger ist aber möglicherweise die in Studie F bereits erwähnte Heraufregulation des NMDA-Rezeptors durch NO-Senkung (Lipton et al., 1993). Zur Klärung der Frage, ob eher ein vaskulärer oder ein neuronaler Mechanismus involviert ist, wollen wir die Abhängigkeit der K^+ -Schwellen von NO nun *in vitro* untersuchen. Zum Vergleich soll die Mg^{2+} -Konzentration im Hirnschnitt gesenkt werden, die ebenfalls zu einer stärkeren Aktivität des NMDA-Rezeptors führt.

Hirnschnittpräparation (s.o.), Messung von DC-Potential, $[K^+]_o$ und intrinsischem optischen Signal, Erzeugung von CSD durch Droplet-Applikation von KCl. Dann ansteigende $[K^+]_{ACSF}$, bis CSD spontan auftritt in Abwesenheit von NO-modulierenden Substanzen (Gruppe 1), in Gegenwart des NO-Senkers L-NNA (Gruppe 2) und des NO-Donors NO-Spermin (Gruppe 3) bzw. nach Absenken von $[Mg^{2+}]_{ACSF}$ in Abwesenheit einer NO-modulierenden Substanz (Gruppe 4).

In jeder Gruppe (Ratte) etwa n = 10, in jeder Gruppe (Mensch) etwa n = 10, d.h. Studie H insgesamt n = 80

Ist Migräne ein Risikofaktor für DINDs nach SAB beim Menschen? (Studie I)

Aus der Spreading Depression-Theorie der Migräneaura und der Spreading Ischaemia-Theorie der DINDs nach SAB resultiert, daß Migräne möglicherweise ein Risikofaktor für DINDs ist. Wie bereits erwähnt, haben wir an einer retrospektiven Studie in Zusammenarbeit mit Herrn PD Valdueza und dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf teilgenommen, die diesen Zusammenhang untersuchte. Dabei hatten signifikant mehr Patienten Migräne, die ein DIND entwickelten als solche ohne DIND. Wir sind dabei, eine prospektive Beobachtungsstudie in Kooperation mit Herrn Prof. Unterberg und Herrn Dr. Sakowitz in der Abteilung für Neurochirurgie des Virchow-Klinikums und Herrn PD Dr. Valdueza (Neurosonologie) durchzuführen. Die Studie befindet sich in der Pilotphase. Bisher ist dabei ein Casereport entstanden, in dem erstmals das Auftreten Migräneaura-artiger Symptome in der Initialphase der Subarachnoidalblutung bei zwei Migränepatienten beschrieben wird. Diese beiden Patienten entwickelten im Verlaufe auch DINDs. Daß CSD-artige Depolarisationen in der Frühphase nach SAB im Tierexperiment auftreten, wurde kürzlich von Busch et al. (1998) beschrieben.

Es wird bei SAB-Patienten der Charité (Virchow-Klinikum) ein Fragebogen erhoben bzgl. Kopfschmerzanamnese, Initialsymptomatik der SAB und vaskulären Risikofaktoren. Die Patienten werden regelmäßig von JPD transkranial gedoppelt und der klinische Verlauf wird dokumentiert. Die Auswertung wird stratifiziert abhängig von der Fisher-Graduierung (Menge des Bluts im initialen Computertomogramm).

Literatur:

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

- Busch E, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME (1998) Diffusion MR imaging during acute subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 29:2155-2161
- 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
- Hajek I, Subbarao KV, Hertz L (1996) Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na^+ , K^+ -ATPase activity in cultured mouse neurones and astrocytes. *Neuro-chem Int* 28:335-342
- Kawai N, Yamamoto T, Yamamoto H, McCarron RM, Spatz M (1995) Endothelin-1 stimulates Na^+ , K^+ -ATPase and Na^+ - K^+ - Cl^- cotransport through ETA receptors and protein kinase C-dependent pathway in cerebral capillary endothelium. *J Neurochem* 65:1588-1596

Leão AAP (1947) Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 10:409-414

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632

Lux HD, Neher E (1973) The equilibration time course of $[K^+]_o$ in cat cortex. *Exp Brain Res* 17:190-205

Marzatico F, Gaetani P, Rodriguez y Baena R, Silvani V, Fulle I, Lombardi D, Ferlenga P, Benzi G (1989) Experimental subarachnoid hemorrhage. Lipid peroxidation and Na^+,K^+ -ATPase in different rat brain areas. *Mol Chem Neuropathol* 11:99-107

Paulson OB, Newman EA (1987) Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237:896-898

Prasanna G, Dibas A, Hulet C, Yorio T (2001) Inhibition of Na^+/K^+ -ATPase by endothelin-1 in human non-pigmented ciliary epithelial cells. *JPET* 296:966-971

Scharschmidt BF, Keeffe EB, Blankenship NM und Ockner RK. (1979) Validation of a recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg- and NaK-ATPase activity. *J Lab Clin Med* 93: 790-799

Shah J, Jandhyala BS (1993) Physiological significance of Na^+/K^+ -ATPase activity in the central nervous system and endogenous sodium-pump inhibitors in the neural regulation of arterial blood pressure. *J Cardiovasc Pharmacol* 22(Suppl 2):13-15

Taberner A, Giaume C, Medina JM (1996) Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* 16:187-195

3.5.4 Zeitplan

Alle beschriebenen *in vivo*-Ansätze sind bereits im Labor der Experimentellen Neurologie realisiert, es kann unmittelbar mit den Untersuchungen begonnen werden. Die Hirnschnittuntersuchungen werden in Fortführung der Kooperation mit Herrn Prof. Heinemann (Teilprojekt C3) zumindest teilweise in der Abteilung für Neurophysiologie durchgeführt. Die *in vitro*-Methoden sind dort etabliert. JPD besitzt durch eine dreijährige Doktorarbeit bei Herrn Prof. Heinemann und nachfolgende Projekte umfangreiche Erfahrungen mit Hirnschnittuntersuchungen. Die verwendeten kombinierten Hirnschnittpräparate der Ratte wurden von Dreier und Heinemann (1991) entwickelt. Im ersten Antragsjahr sollen die Studien A bis D durchgeführt werden. Hierzu müssen zusätzlich zu den bereits vorliegenden Experimenten etwa 150 Experimente erfolgreich abgeschlossen werden, bei einer Erfolgsquote der Präparation von etwa 70 % also insgesamt ~214 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. Die Studien G und H sollen bereits im ersten Antragsjahr begonnen werden, da das menschliche Hirngewebe nur diskontinuierlich vorhanden ist (etwa 50 – 60 Operationen im Jahr). Die Studie I wird ebenfalls über den gesamten Antragszeitraum weitergeführt. Pro Jahr ist mit etwa 20 – 30 Patienten zu rechnen, die die Studienkriterien erfüllen. Durch die Ergebnisse der einzelnen Studien ist mit einer Modifikation der Protokolle zu rechnen, so daß darüber hinausgehende Aussagen zum Zeitplan nicht möglich sind.

<i>Zeitraum</i>	<i>Studien</i>	
<i>(2001)/2002</i>	<i>A - D</i>	<i>G - I</i>
<i>2003</i>	<i>E, F</i>	
<i>2004</i>		

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Eine enge Kooperation besteht mit dem Teilprojekt A5 Dirnagl/Priller. Herr Prof. Dirnagl war Mit Antragsteller im A1-Projekt in den beiden zurückliegenden Antragsperioden. Alle projektspezifischen Publikationen sind gemeinsam mit ihm durchgeführt worden. Das A5-Projekt beschäftigt sich mit der Rolle von Mikroglia beim Schlaganfall, was insbesondere eine Zusammenarbeit bei histologischen Fragestellungen anbietet. Diese erfolgte in der zurückliegenden Antragsperiode insbesondere über Herrn

Dr. Priller (Dreier et al., 2000 sowie histologische Veränderungen nach corticaler Applikation von Endothelin-1).

Eine enge Kooperation des Projekts besteht auf inhaltlicher und methodischer Ebene auch mit Prof. Heinemann und Frau Dr. Sigrun Gabriel (C3). Es existieren bereits zahlreiche gemeinsame Publikationen (z.B. Dreier et al., 2001).

Ferner besteht eine enge Kooperation auch mit Frau Dr. Lindauer (A6) (Dreier et al., 1995; 1998; 2000; 2001; Lindauer et al., 1996).

Anknüpfungspunkte existieren mit dem Projekt Blume/Unger, da Endothelin-1 und das Renin Angiotensin-System eng miteinander gekoppelt sind. Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor. Es ist anzunehmen, daß die CSI durch Angiotensin II verstärkt wird, während AT-Rezeptor-Antagonisten die CSI möglicherweise antagonisieren. Ein weitere Kooperation koennte sich ueber die Na⁺/K⁺-ATPase mit dem Projekt A7 Grune entwickeln.

Kooperationspartner außerhalb des Sonderforschungsbereichs sind Prof. M. Lauritzen (Neurophysiologie, University of Copenhagen; Spreading Depression, Dreier et al., 1998), Prof. I. Victorow (Brain Research Institute, Moskau; Histologie, Dreier et al., 2000), Prof. A. Villringer (Klinische Forschergruppe, Neurologie, Charité; Dreier et al., 1995; 1998), Prof. A. Unterberg (Neurochirurgie, Charité), Dr. O. Sakowitz (Neurochirurgie, Charité), PD Dr. J. Valdueza (Neurologie, Neurosonologie, Charité), Dr. M. Kohl (Neurologie, Charité), Dr. G. Arnold (Neurologie, Charité, Kopfschmerzambulanz; Migräne, Dreier et al., 2001), Dr. T. Lehmann (Neurochirurgie, Charité).

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

		Bewilligung 2001¹⁾			2002			2003			2004		
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	
		Ia	1	94800	Ia	1	94800	Ia	1	94800	Ia	1	94800
		zus.:	1	94800	zus.:	1	94800	zus.:	1	94800	zus.:	1	94800
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		
				522	27024		27024				27024		
				515	52166								
I				Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			
				26500									

¹⁾ nur bei Fortsetzungsanträgen

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	derzeit Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1. Dreier, Jens P. Dr. med.	Neurologie, Experimentelle Neurologie	Neurologie, Experimentelle Neurologie	10/Woche		BAT 1b
	2. Einhäupl, Karl M. Prof. Dr. med.	Neurologie	Neurologie	2/Woche		
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter						C4
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	3. Petzold, Gabor Dr. med.	Neurologie	Neurologie	40/Woche		BAT IIa
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter						

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern 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 dreieinhalb 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. Zwei medizinische Doktoranden haben ihre Arbeiten über die CSI unter seiner Betreuung fertiggestellt. Drei weitere Doktoranden haben den experimentellen Teil ihrer Doktorarbeiten abgeschlossen und schreiben ihre Arbeiten. Zwei medizinische Doktoranden werden zur Zeit von ihm betreut, die sich mit der CSI befassen.
2. Einhäupl, Karl M. Prof. Dr. med. : Als Chefarzt der Neurologischen Klinik und Vorsitzender des Wissenschaftsrats kann Herr Einhäupl neben der Betreuung anderer Projekte ca. 2 Stunden / Woche dem Projekt widmen. Herr Einhäupl wird die Projektplanung und Konzeption der Versuche gemeinsam mit Herrn Dreier übernehmen. Er besitzt eine jahrzehntelange Erfahrung in der Therapie von DINDs nach SAB. Insbesondere als Oberarzt der neurologischen Intensivstation im Klinikum Großhadern in München, wurde eine große Zahl dieser Patienten von ihm behandelt. Dieser Zeit entstammen mehrere Publikationen, die sich teilweise mit klinischen und teilweise grundlagenwissenschaftlichen Aspekten der DINDs beschäftigen. Herr Einhäupl wird sich im Rahmen unseres Projekts insbesondere für die Entwicklung der klinischen Aspekte einsetzen.

Haberl R, Hiller E, Riess H, Prosiogl M, Einhäupl KM (1984) Erhöhte Thromboxan-B2-Spiegel bei Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung. In: Beck EA (ed) Thrombose- und Hämostaseforschung. Stuttgart, New York, Schattauer Verlag, pp 247-248

Haberl R, Hiller E, Riess H, Prosiogl M, Einhäupl KM (1985) Bedeutung von Thromboxan-A2 für die Pathogenese des zerebralen Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung. In: Gänshirt H, Berlit P, Haack G (eds) Kardiovaskuläre Erkrankungen und Nervensystem. Berlin, Springer Verlag, pp 259-262

Diener HC, Einhäupl KM (1988) Zerebrale Blutungen. In: Brandt T, Dichgans J, Diener HC (eds) Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. Stuttgart, Verlag Kohlhammer, pp 259-261

Wick M, Fink W, Pfister W, Einhäupl KM, Huber M, Fateh-Moghadam A (1988) Ferritin in cerebrospinal fluid differentiation between cerebral nervous system haemorrhage and traumatic spinal puncture. J Clin Pathol 41:809-814

Haberl RL, Anneser HW, Einhäupl KM (1989) Angiotensin II induces endothelium dependent vasodilation of rat cerebral arterioles. Am J Physiol:H1840-H1846

Dirnagl U, Villringer A, Gebhardt R, Haberl RL, Schmiedek P, Einhäupl KM (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain cortical microcirculation *in vivo*. J Cereb Blood Flow Metab 11:353-360

Haberl RL, Decker PJ, Piegras A, Einhäupl KM (1991) Is L-arginine the precursor of an EDRF in the cerebral microcirculation? J Cardiovasc Pharmacol 17(Suppl 3):15-18

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

Beantragt wird eine wissenschaftliche Assistentenstelle nach BAT IIa für Dr.med. Gabor Petzold zur:

- Durchführung der Tierexperimente
- Auswertung der Experimente
- Aufbau eines Hirnschnitt-Meßplatzes, Durchführung der Hirnschnittexperimente

Präsentation der Ergebnisse, Verfassen von Manuskripten etc.

Herr Petzold ist ein junger Neurowissenschaftler, der im November 1999 als Arzt im Praktikum zu dem Teilprojekt stieß. Schon während seiner Promotion ("Magna Cum Laude") in der Forschungsgruppe für Molekulare Neurobiologie (Prof. H. W. Müller) der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf trat er als engagierter, grundlagenwissenschaftlich wie klinisch-neurologisch orientierter Mediziner hervor. Neben seiner Dissertation (Petzold, 1999) entsprang dieser Zeit eine international beachtete Veröffentlichung (Bosse et al., 2000). Vom Physikum bis zum Ende seines Studiums war Herr P. Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes. Dies ermöglichte Herrn P. die Teilnahme an mehreren Sommerakademien mit neurowissenschaftlichen Themen sowie klinisch-neurologisch orientierte Gastaufenthalte in New York und London. Während seines "Praktischen Jahr"-Tertials am National Hospital for Neurology London orientierte sich Herr P. wissenschaftlich wie klinisch durch Arbeit in der dortigen Kopfschmerzprechstunde unter Prof. P. J. Goadsby in Richtung neurovaskulärer Themen. Diese Orientierung hat Herr P. in Berlin konsequent und zielstrebig weiterverfolgt. Sämtliche im Teilprojekt angewandten Methoden hat Herr P. in kürzester Zeit erlernt. Dies hat sich bereits in einem Artikel im Journal of Physiology (London) niedergeschlagen. Darüber hinaus hat Herr P. durch die während seiner Promotion erlangte biochemische und molekularbiologische Expertise das Methodenspektrum des Teilprojekts deutlich erweitert. Dies wird beispielsweise anhand des Na⁺-/K⁺-ATPase-Aktivitätsassays ersichtlich, das von Herrn P. etabliert wurde. Das wissenschaftliche Engagement von Herr P. wird durch die Betreuung eines medizinischen Doktoranden seit Anfang 2001 ergänzt. Neben seiner wissenschaftlichen Tätigkeit ist Herr P. in der Kopfschmerzprechstunde der Neurologischen Poliklinik tätig, so daß eine enge Verzahnung wissenschaftlicher und klinischer Schwerpunkte gegeben ist. Durch die hiermit und durch Arbeit auf allgemeinen neurologischen Stationen und zerebrovaskulären Spezialstationen (Stroke Unit Düsseldorf) begonnene klinische Ausbildung wird die wissenschaftliche Zusammenarbeit im Teilprojekt um eine klinische Komponente erweitert. Einerseits ist so durch eine sich mit Herrn Dreier abwechselnde klinische Rotation eine kontinuierliche wissenschaftliche Tätigkeit im Teilprojekt gegeben, andererseits eine Beteiligung an der Akquirierung, Betreuung und Untersuchung von Studienpatienten im Rahmen der geplanten klinischen Studie möglich.

Petzold G (1999) Molekularbiologische Charakterisierung von rMDC15: Postläsionale, entwicklungsabhängige und organspezifische Expression und zelluläre Lokalisation im peripheren und zentralen Nervensystem der Ratte. Univ.-Diss., Düsseldorf

Bosse F, Petzold G, Greiner-Petter R, Pippirs U, Gillen C und Müller HW (2000) Cellular localization of the rat CR11-7/rMDC15 disintegrin mRNA in PNS and CNS and regulated expression after nerve injury. Glia 32: 313-327

Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2001) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. J Physiol 531:515-526

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausstattung voraussichtlich zur Verfügung:	6000	6000	6000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausstattung	27.024 + 52.166	27.024 -	27.024 -

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

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

2 Mikromanipulatoren MX-3 (SCIENCE PRODUCTS GmbH, Hofheim, Deutschland)
zusammen: DM 14900

Begründung: Unbedingt notwendig zur Positionierung der Mikroelektroden in den Hirnschnitten. Der MX-3 ist ein Mikromanipulator der Mittelklasse, für den im Labor von Herrn Prof. Heinemann ausreichend Erfahrungen für diese Anwendung existieren.

Campden NVSLM1 Vibratom (WPI, Berlin, Deutschland): DM 12466

Begründung: Wird zur Herstellung der Hirnschnitte benötigt.

Master 8, programmierbarer Stimulator (SCIENCE PRODUCTS GmbH, Hofheim, Deutschland): DM 8300

Begründung: Die Verwendung elektrischer Stimulationen ist eine Basismethodik im Hirnschnitt, ohne die der Untersucher praktisch blind ist. Insbesondere zur Überprüfung der Vitalität bzw. Regeneration der Hirnschnitte wird routinemäßig Reiz-induzierte Aktivität ausgelöst, z.B. nach CSD, Hypoxie, etc. Es könnte in den Experimenten darüberhinaus sinnvoll werden, Effekte der verwendeten Pharmaka auf CSD mit Hilfe elektrischer Stimulationen weiterzuuntersuchen. Bei einigen der Fragen könnte es auch interessant sein, CSD elektrisch auszulösen und damit die Applikation von K^+ zu umgehen. Der Master 8 ist ein Klassiker für solche Anwendungen und bietet eine große Flexibilität und unkomplizierte Handhabung.

Monochrome CCD-Kamera (Sony XC-75): DM 2500

Fototubus (HU) + C-Mount-Adapter (0,5x) (Leica, Bensheim, Deutschland): DM 2600

Halogenlampe, Infrarotfilter verschiedener Wellenlänge: DM 2000

Frame-grabber Board und Software (LabVIEW WIN/IMAQ Vision Advanced/IMAQ PCI-1408/HiQ) (National Instruments Germany GmbH): DM 6600

PC mit CD-Brenner: DM 2800

Begründung: Die Geräte dienen der Messung intrinsischer optischer Signale. Infrarotlicht wird hier mit Hilfe einer Halogenlampe und Infrarotfilter erzeugt. Das System mit CCD-Kamera, welches über Fototubus und C-Mount-Adapter auf unser Leica-Mikroskop (MZ-6) aufgesetzt werden kann, dient der Analog-Erfassung der optischen Änderungen im Hirnschnitt. Mit Hilfe des Frame-grabber Boards und der Software von National Instruments Germany werden die analogen Daten digitalisiert und gehen in den Rechner, wo eine Nachverarbeitung einfach möglich ist. Der CD-Brenner ermöglicht ein übersichtliches Archivieren der Daten. Diese Lösung ist erheblich preiswerter als der Erwerb einer Digitalkamera (über 20 TDM).

Verbrauchsmaterial und Versuchstiere pro Jahr

1. Versuchsratten, Ratten zur Gewinnung von frischem Hämoglobin

Wistar Ratten: 300 Stück à DM 41,5 (zugrundegelegt sind die Kosten in 2000 inkl. Transportkosten, Verbrauch in 2000: 380 Tiere) + DM 2,2 Tierhaltungskosten: DM 13110

Begründung: Die Tiere werden von Charles River Deutschland bezogen und können in der Tierhaltung der Experimentellen Neurologie nur kurzfristig verbleiben.

2. Chemikalien

Narkotika und Chemikalien zur Präparation: Halothan, Pentobarbital, Paladur etc. DM 2.000

Substanzen zur topischen Superfusion: Endothelin-1, ET-1-Antagonisten, L-NNA, NO-Spermin, 8-bromo-cGMP, ODQ, etc.: DM 5.800

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

3. Sondergase zum Begasen des künstlichen Liquors, Blutgasanalyse: DM 2.200

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 1.000

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

6. Speichermedien zur Datenspeicherung (ZIP-Disketten, Disketten etc.): DM 1000

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 Thermopapier benötigt.

Summe Verbrauchsmaterial pro Jahr

DM 27.014

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

	Beantragt für das Haushaltsjahr		
	2002	2003	2004
Summe:	26.500		

(Alle Preisangaben in DM einschl. MwSt., Transportkosten etc.)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Investitionen

für 2002

8-Kanal-Recorder DASH 8n (Astro-Med)

DM

26500

Begründung: Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* registrieren wir simultan bis zu 8 Spannungs-Signale gleichzeitig (z.B. Projekt C: 2 geklebte ionensensitive Elektroden kaudal im Fenster, eine ionensensitive Elektrode frontal + 2 CBF-Messungen). Zur Datenanalyse der spontan auftretenden Änderungen müssen kontinuierliche Aufzeichnungen über einen Zeitraum von in der Regel mehreren Stunden (insbesondere *in vivo*) erfolgen. Dabei ist eine orientierende Bewertung des Kurvenverlaufs während des Versuchs für die erfolgreiche Durchführung der Experimente von großem Nutzen, die optimal übersichtlich über einen Chart-Recorder möglich ist. Bei der späteren Datenanalyse wird über den direkten und übersichtlichen Vergleich der unterschiedlichen Kurvenverläufe, die mit dem Chart-Recorder erstellt wurden, insbesondere in der Screening-Phase zu Beginn der Datenauswertung die Analyse sehr erleichtert. Der 8-Kanal-Recorder von Astro-Med ist optimal für diese Aufgaben gerüstet. Er bietet darüberhinaus auch die Möglichkeit einer Digitalisierung der Daten mit einer hohen Sampling-Rate, die der von uns bisher *in vivo* verwendeten deutlich überlegen ist (20 kHz im Vergleich zu 1 Hz). Es ist darüber möglich trotz langer Registrierungszeiten auch AC Signale, d.h. EEG-Signale darzustellen, die für Leão's "spreading depression of spontaneous EEG activity" eine große Bedeutung haben. Mit einem älteren Modell, einem 4-Kanal-Chart-Recorder ebenfalls von Astro-Med, haben wir im Labor bzgl. Qualität und Service bereits sehr gute Erfahrungen gemacht.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A5

3.1.1 Thema: Rolle hämatogener Zellen und residenter Mikroglia bei der zerebralen Ischämie

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung: Neurologie, experimentelle Neurologie, Schlaganfallforschung

3.1.3 Leiter:

Prof. Dr. med. Dirnagl, Ulrich, 09.08.1960

Neurologische Klinik der Charité
Humboldt-Universität
10098 Berlin

Tel: +49 30 2802 8318

Fax: +49 30 2802 5047

e-mail: ulrich.dirnagl@charite.de

Dr. med. Priller, Josef, 26.09.1970

Neurologische Klinik der Charité
Humboldt-Universität
10098 Berlin

Tel: +49 30 2802 8448

Fax: +49 30 2802 5047

e-mail: josef.priller@charite.de

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

Prof. Dirnagl:

nein

Dr. Priller:

ja, befristet bis zum 31.12.2001*

*wird verlängert

3.1.4 entfällt

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
bis 1998	19,8	9,5	-	29,3
1999	39,6	19,0	-	58,6
2000	39,6	19,0	-	58,6
2001	42,0	19,0	-	61,0
Zwischen-summe				
2002	109,2	28,8	-	138
2003	109,2	28,8	-	138
2004	109,2	28,8	-	138

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Eine Differenzierung der pathophysiologischen Rolle einwandernder Blutzellen von ortständiger Mikroglia bei der zerebralen Ischämie ('Schlaganfall') ist bis heute nur unvollständig gelungen. Dies ist weitgehend darauf zurückzuführen, dass Monozyten/Makrophagen des Blutes immunohistochemisch nicht von aktivierter Mikroglia zu unterscheiden sind. Im beantragten Projekt soll eine im Rahmen der laufenden Förderungsperiode etablierte und charakterisierte Knochenmarkschimäre verwendet werden, bei der Zellen des peripheren Blutes das *grün fluoreszierende Protein* (GFP) exprimieren. Zur Erzeugung der Chimären werden hämatopoetische Stammzellen mit Hilfe eines Retrovirus mit dem Marker GFP transduziert und in Knochenmark-depletierte Empfängertiere transplantiert. Die genetisch modifizierten Stammzellen rekonstituieren anschliessend das Blutbild der Empfängertiere. Mit Latenz wandern GFP-markierte Blutzellen in das zentrale Nervensystem (ZNS) ein und differenzieren sich dort nach 4 Wochen selbst zu Mikroglia. Zuvor exprimieren ausschliesslich periphere Leukozyten GFP, während die ortständige Mikroglia kein Markerprotein trägt. Mit Hilfe dieser Knochenmarkschimären sollen drei Fragenkomplexe beantwortet werden:

1) Was ist der differentielle Beitrag der Expression von *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *methallothionein* (MT)-I/-II oder *leukemia inhibitory factor* (LIF) nach fokaler zerebraler Ischämie in hämatogen eingewanderten Leukozyten versus ortständigen ZNS-Populationen (Glia, Neurone)? Allen drei Faktoren kommt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie zu. Unklar ist jedoch, welchen Anteil hämatogene bzw. ortständige Zellen haben. Die Frage kann unter Verwendung von gewebspezifischen iNOS, MT-I/-II und LIF 'Knockout' (-/-)-Mäusen untersucht werden. Diese generieren wir durch Transplantation von Wildtyp-Knochenmark in (-/-)-Mäuse, wodurch das betreffende Gen (je nach Untersuchungszeitpunkt und Gehirnregion) im ZNS nicht präsent ist, aber in peripheren Leukozyten exprimiert wird. Umgekehrt kann durch Transplantation von (-/-)-Knochenmark in Wildtyp-Mäuse ein Ausschalten des Gens in hämatogenen Zellen erreicht werden.

2) Welche Leukozytensubpopulationen nehmen zu welchem Zeitpunkt an der Invasion des ischämischen ZNS teil? In welcher Relation hierzu steht die mikrogliale Aktivierung? Zur Beantwortung dieser Fragen

sollen immunhistochemische und FACS-Untersuchungen auf immunologisch relevante Oberflächenantigene an GFP-markierten und endogenen Zellen erfolgen.

3) Können Leukozyten einen trophischen Faktor in das ischämische Gehirn transportieren? Da hämatogene Zellen in grossem Umfang in das Infarktareal einwandern, könnten diese als zelluläre Vektoren für potentiell relevante Gene dienen. Dieser Ansatz soll exemplarisch durch Rekonstitution von CNTF-defizienten Mäusen mit CNTF-produzierendem Knochenmark überprüft werden.

Die geplanten Untersuchungen sollen dazu beitragen, die pathophysiologische Rolle peripherer Leukozyten und ortständiger Mikroglia beim Schlaganfall besser zu verstehen, und eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien gegen die inflammatorische Komponente des Schlaganfalles zu schaffen.

3.3 Stand der Forschung

Der 'Schlaganfall' (fokale zerebrale Ischämie) führt zu einer umschriebenen Entzündungsreaktion im betroffenen Hirngewebe. Diese ist gekennzeichnet durch die Expression proinflammatorischer Mediatoren, veränderte Endothel Eigenschaften, die Transmigration von Leukozyten in das Hirnparenchym und die Aktivierung von ortständigen immunkompetenten Zellen des ZNS. Abgesehen von Rekanalisierung durch Lyse innerhalb der ersten 3 Stunden nach Symptombeginn existiert derzeit keine wirksame neuroprotektive Strategie beim Schlaganfall. Nur ca. 5 % der Schlaganfallpatienten können in einem frühen (erste 3-6 Stunden) Zeitfenster einer Therapie zugeführt werden. Deshalb richtet sich die Hoffnung einer pharmakologischen Neuroprotektion beim Schlaganfall auf die Beeinflussung verzögerter Schadensmechanismen wie Inflammation und Apoptose (Dirnagl et al. 1999).

In der frühen, exzitotoxischen und Periinfarktdepolarisations-Phase nach fokaler zerebraler Ischämie werden freie Radikale gebildet, die zur Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NFκB führen (Übersicht in Bowie und O'Neill, 2000). NFκB wird eine Regulation der Genexpression von iNOS, Cyclooxygenase 2, p53 und Adhäsionsmolekülen wie VCAM und ICAM-1 zugeschrieben. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle für die nachfolgende Inflammation und den programmierten Zelltod. Unterstützt durch die NFκB-vermittelte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 (Buttini et al., 1994), TNFα (Liu et al., 1994) und durch veränderte Endothel Eigenschaften (Poher und Cotran, 1990; Patel et al., 1991), kommt es bereits Stunden nach einer zerebralen Ischämie zur Einwanderung hämatogener Zellen in das Infarktgebiet. Auch die residenten immunkompetenten Zellen des ZNS, die Mikrogliazellen, reagieren umgehend auf den Gewebsschaden (Gehrmann et al., 1992; Morioka et al., 1992).

Es ist noch unklar, ob Mikroglia und einwandernde Leukozyten eine differentielle Rolle nach fokaler zerebraler Ischämie spielen. Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen gibt es Hinweise, dass einwandernde Leukozyten den ischämischen Schaden vergrössern (Clark et al., 1991). Im Falle der Mikroglia fanden sich hingegen sowohl Anzeichen für eine protektive Funktion (Bruce et al., 1996; Fedoroff et al., 1997) als auch Ergebnisse, die auf eine detrimental Rolle deuten (Guilian und Robertson, 1990). Dabei ist zu erwähnen, dass Mikroglia je nach Funktionszustand toxische Radikale und lytische Enzyme oder protektive Regenerationsfaktoren sezernieren können (Kreutzberg et al., 1996).

Die inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2) wird 24-48 Stunden nach zerebraler Ischämie exprimiert (Iadecola et al., 1995; Iadecola et al., 1997). Dem Enzym wird ein wesentlicher Beitrag zum verzögerten ischämischen Schaden zugeschrieben. So haben iNOS-defiziente Mäuse 96 Stunden nach Okklusion der A. cerebri media signifikant kleinere Infarkte als Wildtyp-Kontrollen, während nach 24 Stunden noch keine Unterschiede festzustellen waren (Iadecola et al., 1997). Dies liesse sich dadurch erklären, dass die iNOS-Expression auf infiltrierende Leukozyten beschränkt war. Die Leukozyten wanderten in normaler Zahl in den Infarkt ein. Es gibt aber auch Studien, die eine iNOS-Expression in Mikroglia nach zerebraler Ischämie beschreiben (Loihl und Murphy, 1998; Loihl et al., 1999). Letztlich ist diese pharmakologisch relevante Frage bis heute ungeklärt. Wäre iNOS nur in peripheren Blutzellen induzierbar, würde dieser Zellpopulation bei Ischämie ein grösseres Schädigungspotential als den Mikroglia zukommen.

Metallothionein-II (MT-II) ist nach eigenen Forschungsergebnissen in einem Pool von 25.000 analysierten unterschiedlichen Transkripten (*serial analysis of gene expression*) das am stärksten induzierte Gen nach fokaler zerebraler Ischämie (Trendelenburg et al., in Revision, Abb.1). Wir konnten zeigen, dass MT-I/-II-defiziente Mäuse signifikant grössere Infakte als Wildtyp-Kontrollen haben. Umgekehrt schützt die Überexpression von MT-I vor fokaler zerebraler Ischämie (van Lookeren Campagne et al., 1999). Im Hinblick auf die zelluläre Expression von MT-I/-II werden Mikroglia und Astrozyten favorisiert (Neal et al., 1996; Penkowa et al., 1999; Penkowa und Hidlago, 2000). In diesem Fall käme den Mikrogliazellen eine protektive Rolle bei zerebraler Ischämie zu.

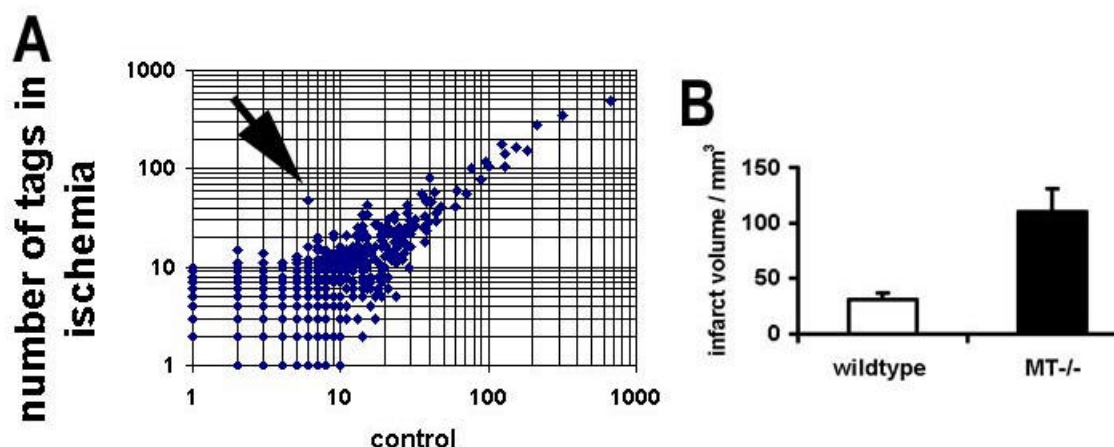


Abbildung 1 A: MT-II ist das 14 h nach fokaler cerebraler Ischämie in der Maus am signifikantesten hochregulierte Gen (Pfeil) (Serial analysis of Gene Expression, SAGE). Datenpunkte entsprechen verschiedenen Transkripten. X- und Y Achsen repräsentieren absolute Tag-Zahlen. B: MTI/II knockout Mäuse haben signifikant grössere Infarkt volumina verglichen mit Wildtypkontrollen ($p < 0.0001$) (Trendelenburg et al. in Revision)

Schliesslich ist der *leukemia inhibitory factor (LIF)* als neuropoetisches Zytokin an der Aktivierung von Mikroglia und an der Einwanderung von Makrophagen nach Läsion peripherer Nerven oder des ZNS beteiligt (Sugiura et al., 2000). In LIF-Knockout-Mäusen fand sich eine allgemein herabgesetzte Entzündungsreaktion. LIF wird auch nach zerebraler Ischämie vermehrt freigesetzt (Suzuki et al., 2000). Die gezielte Ausschaltung von LIF sollte demnach eine Aussage über die Funktion von Mikroglia und Leukozyten im Rahmen der zerebralen Ischämie erlauben.

Ein ganz anderer Ansatz wird mit neurotrophen Faktoren verfolgt. Die intrathekale Administration von BDNF führte nach globaler zerebraler Ischämie zu einer Reduktion des neuronalen Zelltodes und zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion (Kiprianova et al., 1999). Heterozygote BDNF-Knockout-Mäuse haben grössere Infarkte als Wildtyp-Kontrollen (Endres et al., 2000). Auch Neurotrophin-4 kommt eine protektive Rolle zu. Im Falle des *ciliary neurotrophic factor (CNTF)* ist die Datenlage nicht eindeutig. CNTF wird 3-7 Tage nach transients globaler Ischämie vor allem in den Regionen des neuronalen Schadens maximal exprimiert (Park et al., 2000). Wird CNTF eine Woche vor und eine Woche nach zerebraler Ischämie infundiert, ergibt sich ein Trend in Richtung Neuroprotektion im Hippocampus (Ogata et al., 1996). Die Verwendung von Knockout-Mäusen könnte hier Klärung bringen. Durch den zusätzlichen Einsatz der Knochenmarkstransplantation liesse sich CNTF selektiv in peripheren Blutzellen exprimieren. Diese könnten den trophischen Faktor dann an den Ort des ischämischen Schadens transportieren, was sich auch im Hinblick auf die physiologisch eher späte Induktion von CNTF nach zerebraler Ischämie anbieten würde.

Literatur

- Bowie und O'Neill, *Biochem Pharmacol*, 2000, 59, 13-23.
 Bruce et al., *Nat Medicine*, 1996, 2:788-794.
 Buttini et al., *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, 23, 126-134.
 Clark et al., *Stroke*, 1991, 22:877-883.
 Dirnagl et al., *Trends Neurosci*, 1999, 22:391-397

- Endres et al, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20, 139-144.
 Fedoroff et al., *Neurosci Biobehav Rev*, 1997, 21:187-191.
 Gehrman et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 1992, 12, 257-269.
 Guilian und Robertson, *Ann Neurol*, 1990, 27:33-42.
 Iadecola et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995, 15, 378-384.
 Iadecola et al., *J Neurosci*, 1997, 17, 9157-9164.
 Kiprianova et al., *J Neurosci Res*, 1999, 56, 21-27.
 Kreutzberg, *Trends Neurosci*, 1996, 19:312-318.
 Liu et al., *Stroke*, 1994, 25, 1481-1488.
 Loihl et al., *Brain Res*, 1999, 830, 155-164.
 Loihl und Murphy, *Prog Brain Res*, 1998, 118, 253-267.
 Morioka et al., *Acta Neuropathol*, 1992, 83, 149-157.
 Neal et al., *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1996, 22, 243-247.
 Ogata et al., *Acta Neurochir*, 1996, 138, 580-583.
 Park et al., *Brain Res*, 2000, 861, 345-353.
 Patel et al., *J Cell Biol*, 1991, 112, 749-760.
 Penkowa et al., *J Neurosci*, 1999, 19, 2535-2545.
 Penkowa und Hidalgo, *Glia*, 2000, 32, 247-263.
 Pober und Cotran, *Transplantation*, 1990, 50, 537-544.
 Sugiura et al., *Eur J Neurosci*, 2000, 12, 457-466.
 Suzuki et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20, 661-668.
 Trendelenburg et al., *J Neurosci (in revision)*
 van Lookeren Campagne et al., *J Neurosci*, 2000, 20, 5200-5207.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Die Vorarbeiten sind im Berichtsband ausführlich geschildert, hier sollen nur die wichtigsten Befunde kurz zusammengefasst werden:

Knochenmarkschimären

Im Rahmen der vorausgegangenen Förderungsperiode konnte die Technik der GFP-Markierung hämatopoetischer Stammzellen und die Knochenmarkstransplantation etabliert werden. Die Chimären konnten auch anderen Gruppen des SFB und nationalen bzw. internationalen Kollaboratoren zugänglich gemacht werden.

Wir fanden in den GFP-Knochenmarkschimären nach Transplantation von retroviral GFP-markierten oder GFP-transgenen (unter der Kontrolle des β -Aktin-Promoters) hämatopoetischen Zellen:

- einen signifikanten Austausch perivaskulärer Zellen mit den GFP-markierten Blutzellen, welcher erstmals quantifiziert werden konnte (Bechmann, Priller et al., in Revision).
- eine signifikante Differenzierung hämatogener Zellen zu Mikroglia. Diese Zellen konnten immunhistochemisch, morphologisch und ultrastrukturell als Mikroglia identifiziert werden, und ihre Einwanderungskinetik charakterisiert werden (Priller et al., zur Veröffentlichung eingereicht).
- keine astrogliale Differenzierung GFP-markierter Blutzellen (siehe auch unten), weder nach Transplantation des Knochenmarks von Tieren, welche GFP unter Kontrolle des GFAP-Promoters exprimieren (Nolte et al. 2001), noch nach Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie als etabliertem Stimulus für die astrogliale Differenzierung (Eglitis et al., 1999).
- eine neuronale Differenzierung hämatogener Zellen. Ein Jahr nach der Knochenmarkstransplantation waren vereinzelt Purkinje-Zellen im Kleinhirn bis in den weitverzweigten Dendritenbaum und in das Axon GFP-markiert (Priller et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

In vitro konnten wir die Genese von Mikroglia aus GFP-markierten Knochenmarkszellen durch Kokultur mit Astrozyten oder hippocampalen Slices reproduzieren (Wehner, Böntert et al., zur Veröffentlichung eingereicht). In diesen *in vitro* Kokultur-Experimenten wurde keine Entstehung von GFAP-positiven Astrozyten aus GFP-markiertem Knochenmark oder aus Knochenmarkszellen einer transgenen Maus, die GFP unter dem GFAP-Promoter exprimiert, beobachtet.

Wichtig erscheint im Zusammenhang mit den neu beantragten Versuchen, dass wir in der laufenden Antragsphase bereits Erfahrung in der Transplantation von transgenen Knochenmarkszellen (siehe oben und detailliert im Berichtsband) sammeln konnten.

Fokale zerebrale Ischämie

Maus (auch knock-out, z.B. Endres et al 2000) und Rattenmodelle (z.B. Wiegand et al 1999) der zerebralen Ischämie sind in unserer Gruppe seit Jahren etabliert (siehe auch Publikationsverzeichnis im Berichtsband).

Die GFP-Knochenmarkschimären wurden zu einem Zeitpunkt einer transienten Mediaokklusion von 60 Minuten Dauer unterzogen, wo in Striatum und Kortex noch keine GFP-markierten Mikroglia nachweisbar sind (4 Wochen nach Transplantation). Erwartungsgemäss fand sich in der ischämischen Hemisphäre eine sehr rasche Aktivierung der ortständigen Mikroglia und eine massive Infiltration GFP-positiver Leukozyten. Verzögert kam es zur Einwanderung GFP-exprimierender Makrophagen in das Infarktgebiet, die teilweise zu Mikroglia differenzierten (Priller et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass im Rahmen der Inflammation nach zerebraler Ischämie eine Differenzierung von Blutzellen in Mikroglia des ZNS erfolgen kann.

Ex vivo-Untersuchung von Mikroglia und Leukozyten nach zerebraler Ischämie

In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Kettenmann (MDC) wurden kortikale Hirnschnitte von Ratten nach intravitraler Leukozytenfärbung mit Rhodamin 6G und Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie auf die Aktivierung ortständiger Mikroglia und auf die Einwanderung von Rhodamin-markierten Leukozyten untersucht (Lyons et al., 2000). Es zeigte sich unter anderem, dass intrinsische Mikroglia in der Randzone des Infarkts elektrophysiologische Eigenschaften von Leukozyten (spannungsabhängige ein- und auswärtsgerichtete Kaliumströme) annehmen.

Multiphoton Laser Scanning Mikroskopie im Hirnschnitt-Präparat

Im akuten Hirnschnitt von transgenen Mäusen, welche GFP unter der Kontrolle des β -Actin Promoters exprimieren, liess sich mit Hilfe der Multiphoton Laser Scanning Mikroskopie die Konstriktion und Dilatation von Kapillaren dokumentieren und quantifizieren (Fernandez-Klett et al., Manuskript in Vorbereitung). Zum ersten Mal gelang damit ein direkter funktioneller Hinweis auf eine aktive Regulation des Gefässdurchmessers im Kapillarbett.

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

Chimärentechnik (siehe auch Berichtsband):

Bechmann, Priller et al., *Eur J Neurosci, in Revision*

Fokale zerebrale Ischämie (Modell), u.a.:

Katchanov et al. *J Neurosci* (2001) in press

Endres et al., *J Neurosci* (2000) 20:3175-3181

Wiegand et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*(1999) 19:1229-37

Histochemie und Immunhistochemie, u.a.:

Dreier JP et al. *J Neurosurg* (2000) 93:658-66

Victorov IV et al. *Brain Res Protocols* (2000);5:135-139

Lyons et al., *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20, 1537-1549.

Transfektion:

Priller J, et al. *Ann Neurol* (1997) 42: 265-9

sonst. in 3.4. zitierte Arbeiten:

Brazelton et al., *Science*, 2000, 290, 1775-1779.

Eglitis et al., *NeuroReport*, 1999, 10, 1289-1292.

Nolte et al., *Glia*, 2001, 33, 72-86.3.5

Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)**3.5.1 Ziele**

Die Relevanz inflammatorischer Schadensmechanismen bei der zerebralen Ischämie wurde bereits eingangs dargestellt. Bis heute ist eine Differenzierung des Beitrags ortständiger Mikroglia von der Funktion einwandernder Leukozyten nur unvollständig gelungen. Dies wäre jedoch bedeutungsvoll, wenn mit Hilfe pharmakologischer und molekularbiologischer Methoden die Funktion von Entzündungszellen im Rahmen des Infarktgeschehens gezielt manipuliert werden soll. Es gibt Hinweise, dass die Aktivierung von Mikroglia nach zerebraler Ischämie mit einer protektiven Aufgabe assoziiert sein könnte. Leider ist die morphologische und histochemische Unterscheidung von aktivierten Mikroglia und Monozyten/ Makrophagen des peripheren Blutes bislang nicht möglich.

Als Ziele des Projektes werden deshalb definiert:

- Durch retroviralen Gentransfer sollen hämatopoietische Zellen und deren myeloide Nachkommen mit GFP markiert werden und so in einem begrenzten Zeitfenster nach Knochenmarkstransplantation von Mikroglia des ZNS unterscheidbar sein. Die GFP-markierten Zellen aus dem Infarktgebiet sollen auf die Expression von immunologisch relevanten Oberflächenantigenen untersucht werden. Dies gilt in gleicher Weise für die GFP-negative Population.

Hypothesen: In einer frühen postischämischen Phase exprimieren aktivierte Mikroglia und eingewanderte Makrophagen ähnliche Epitope. Zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert ein Teil der GFP-markierten Blutzellen ein Mikroglia-typisches Muster an Oberflächenantigenen.

- Der zeitliche Verlauf der Mikrogliaaktivierung nach zerebraler Ischämie soll morphologisch und in Bezug auf die Expression immunologisch relevanter Epitope charakterisiert werden. Es soll ein Zusammenhang mit der Einwanderung peripherer Leukozyten in das Infarktgebiet hergestellt werden. Dabei soll insbesondere auch die Verwendung unterschiedlicher Knockout-Modelle (s. unten) erfolgen.

Hypothesen: 1. Die Aktivierung von Mikroglia tritt früher nach zerebraler Ischämie ein als die Rekrutierung von Leukozyten. 2. Die Aktivierung von Mikroglia ist in LIF-Knockout-Mäusen ebenso beeinträchtigt wie die Einwanderung von Leukozyten. In iNOS- und MT-I/-II-Knockout-Mäusen sind hingegen beide Mechanismen unbeeinträchtigt.

- Durch Transplantation GFP-markierter Knochenmarkszellen aus Knockout-Tieren in Wildtypmäuse (und vice versa) sollen gleichsam 'konditionale' Knockouts geschaffen werden, d.h. Tiere, bei denen je nach Zeitpunkt entweder nur Zellen des ZNS oder nur periphere Blutzellen das relevante Gen exprimieren. Nach Induktion einer zerebralen Ischämie soll der Beitrag des betreffenden Gens zum Gewebsschaden in Abhängigkeit vom exprimierenden Zelltyp definiert werden.

Hypothesen: 1. Wird iNOS in peripheren Blutzellen vor der Ischämie ausgeschaltet, verringert sich das Infarktvolumen. Wird iNOS in Mikroglia vor der Ischämie ausgeschaltet, ändert sich die Infarktgröße nicht. 2. Ausschaltung von MT-I/-II im ZNS reduziert die Infarktgröße. Defizienz von MT-I/-II in peripheren Blutzellen hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße.

- In CNTF-Knockout-Mäusen soll eine fokale zerebrale Ischämie induziert werden und der Infarkt anschliessend charakterisiert werden. Ferner soll eine Ischämie in CNTF-Knockouts erfolgen, die mit

Knochenmark rekonstituiert wurden, das CNTF produziert. Es soll getestet werden, ob hämatogene Zellen den trophischen Faktor (CNTF) in das Infarktgebiet schleusen können.

Hypothesen: Die Infarkte in CNTF-Knockouts sind grösser als bei Wildtyp-Mäusen. Nach Knochenmarkstransplantation von CNTF-produzierendem Knochenmark in CNTF-Knockouts kann der neuronale Schaden reduziert werden.

3.5.2 Methoden

Alle im Folgenden Beschriebenen Methoden und Ansätze sind im Labor der Experimentellen Neurologie etabliert.

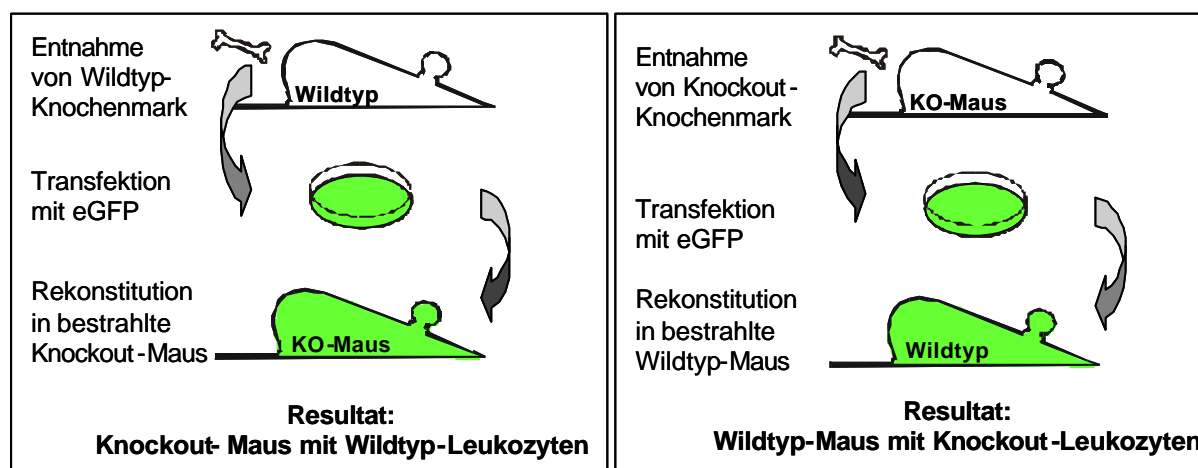
Eine Tierversuchsgenehmigung zur Durchführung der Untersuchungen liegt vor (G0103/98). Ein Folgeantrag wird gestellt. Die für die geplanten Experimente erforderliche Laborsicherheitsstufe 1 lt. GenTG ist gegeben (VE1/541-96; Projektleiter nach GenTG: Dr.med. A. Meisel).

Tiermodelle

Als Wildtypkontrollen für die iNOS-defizienten Mäuse (MacMicking et al., 1995) dient der (C57BL/6 x SV129)xC57BL/6 Stamm. Den MT-I/-II-Knockout-Mäusen (129S7/SvEvBrd-Mt1tm1Bri Mt2tm1Bri, Masters et al., 1994) dienen 129S3/SvImJ Mäuse als Wildtypkontrollen. Die CNTF-Knockouts sind auf gemischtem 129/SV × C57BL/6 Hintergrund entstanden (Masu et al., 1993). Es werden littermate-Kontrollen eingesetzt. Die LIF-Knockout-Mäuse (Stewart et al., 1992) haben einen reinen C57BL/6 Hintergrund.

Das prinzipielle Vorgehen zur Erzeugung von ‚gewebespezifischen‘ Knockout-Mausstämmen mit Hilfe der Chimärentechnologie ist in Abb. 2 dargestellt.

Abb.2: Prinzip der Herstellung von Knochenmarkschimären



Retroviraler Gentransfer

Der Gentransfer erfolgt nach einer modifizierten Methode von Persons et al. (1997). Aus den langen Röhrenknochen von 5-Fluoruracil-behandelten adulten Wildtyp- bzw. Knockout-Mäusen wird Knochenmark gewonnen. Die Knochenmarkszellen werden dissoziiert und für 48 Stunden in Kulturmedium mit IL-3, IL-6 und SCF kultiviert. Anschliessend werden die Zellen auf einer Verpackungszelllinie (GP + E86, ekotrop) kultiviert, die einen retroviralen Vektor auf der Basis des murinen Stammzellvirus mit der genetischen Information für GFP sezerniert. Der Erfolg des Gentransfers kann mittels hämatopoietischer Kolonieansätze kontrolliert werden. Dabei werden die Knochenmarkszellen aus der Kokultur gewonnen und in Methylzellulose mit hämatopoetischen Zytokinen kultiviert. Nach wenigen Tagen können die klonalen Kolonien fluorezenzmikroskopisch auf GFP-Expression untersucht werden.

Herstellung des CNTF-Vektors

Eine CNTF cDNA mit Signalsequenz zur Sekretion liegt kloniert vor (Prof. Sendtner, Würzburg). Die CNTF cDNA wird in unseren retroviralen Vektor an die Stelle des GFP umklont. Die Transduktion von Knochenmarkszellen erfolgt wie bisher über die GP + E86 Verpackungszelllinie.

Knochenmarkstransplantation

Die genetisch modifizierten Knochenmarkszellen werden in Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und anschliessend in letal bestrahlte ($2 \times 5,5$ Gy; Kollaboration Prof. Stuschke, Klinik für Strahlentherapie, Charité) Wildtyp- bzw. Knockout-Mäuse injiziert. In der Regel wird mindestens das Knochenmark einer Donor-Maus benötigt, um das Blutbild in einer bestrahlten Empfänger-Maus zu rekonstituieren. Die Bestrahlungsdosis entspricht der üblicherweise für die Herstellung von murinen Knochenmarkschimären verwendeten Dosis und führt nach eigenen Untersuchungen zu keiner signifikanten Extravasation von Plasmaprotein (Evans blue) im ZNS. Während eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke durch die Bestrahlung nicht ausgeschlossen werden kann, deuten jüngste Ergebnissen auf eine bestrahlungsunabhängige Einwanderung und Differenzierung hämatogener Zellen im ZNS (Mezey et al., 2000). Nach der Transplantation werden die Tiere in ventilierten Filterkäfigen gehalten.

Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)

Peripher-venöses Blut der Knochenmarkschimären wird mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen Mac-1, Gr-1, B220, CD4 und CD8 inkubiert. Anschliessend werden die Zellen mit einem Becton Dickson FACS-Gerät nach GFP-Fluoreszenz und PE-Signal sortiert. Tote Zellen werden durch Propidiumjodid-Einlagerung ausgeschlossen. Die Methodik erlaubt eine qualitative und quantitative Aussage zur GFP-Expression in allen Leukozytenpopulationen.

Aus dem Gehirn der Chimären kann vor oder nach Ischämie eine Analyse der GFP-exprimierenden Zellen erfolgen. Dazu wird eine Gewebspräparation in Anlehnung an die Methodik von Ford et al. (1995) durchgeführt. Das Gehirn wird mechanisch dissoziiert und mit DNase und Kollagenase behandelt. Die Mikroglia- und Leukozyten-Populationen werden anschliessend aus einem Percoll-Gradienten isoliert. Es folgt eine Markierung mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen b7.1, b7.2, CD45, MHC II und die FACS-Analyse wie oben. Die Untersuchungen werden von PD Dr. H. Neumann (MPI Neurobiologie, München) durchgeführt. In ersten Voruntersuchungen konnte eine niedrige Expression von MHC II und CD45 in GFP-positiven Mikroglia gefunden werden.

Ischämiemodell

In Wildtyp-Mäusen, Knockout-Mäusen bzw. den unterschiedlichen Knochenmarkschimären wird eine transiente fokale zerebrale Ischämie durch Okklusion der A. cerebri media (MCAO) von 45 Minuten Dauer induziert (Endres et al., 1998). Unter Halothan-Anästhesie wird den Mäusen bei Kontrolle des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF) mittels Laser Doppler-Flussmessung ein monofiler Faden (7-0, an der Spitze 150µm Siliconbeschichtung) über die A.carotis interna bis zum Abgang der A.cerebri media vorgeschoben, sodass er diese okkludiert. Der rCBF über dem parietalen ipsilateralen Cortex fällt dabei auf ca. 10 % ab. Die Tiere erwachen nach wenigen Minuten aus der Narkose und werden zur Entfernung des Fadens (Reperfusion) 60 Minuten nach Okklusion kurz reanästhesiert. Die Narkosezeiten liegen bei unter 10 min für die Okklusion und unter 5 min für das Ziehen des Fadens. Durch die Laser Doppler-Kontrolle des rCBF im Strombahngebiet der A.cerebri media lassen sich sehr reproduzierte Infarkte erzeugen, welche das ipsilaterale Striatum und den parietalen Kortex betreffen.

Histologie und Immunhistochemie

Die Tiere werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der MCAO geopfert und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) transkardial perfundiert. Die Gehirne werden gefroren und am Kryotom geschnitten (Schnittdicke 20 µm). Die Quantifizierung der Infarkt volumina und des neuronalen Schadens erfolgt nach Vanadium-Acidic-Fuchsin-Färbung (Victorov et al., 2000) unter Korrektur des Hirnödems. Zur Selektion repräsentativer Schnitte für die Immunhistochemie werden Hämatoxylin/Eosin-Färbungen angefertigt. Die ausgewählten Schnitte werden dann über Nacht mit einem primären Antikörper (anti: GFAP, F4/80, MHC I, MHC II, NeuN, Gr-1, LIF, CNTF, MT-I/-II, iNOS) inkubiert und die Bindung am Folgetag mit Texas Red-markierten sekundären Antikörpern visualisiert. In definierten Arealen erfolgt eine Identifikation und Quantifikation der eingewanderten Zellen sowie ein Vergleich mit der lokalen Gewebsreaktion.

Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss) wird die Verteilung der GFP-positiven Zellen in den Gehirnen der unterschiedlichen Tiermodelle vor und nach Ischämie untersucht. Eine in situ-Charakterisierung der GFP-exprimierenden Zellen ist durch immunhistochemische Doppelmarkierung möglich (Priller et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Ergänzend wird die Laser konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Leica, Projekt Z2) zur exakten zellulären Analyse der Fluoreszenzsignale benutzt.

3.5.3 Arbeitsprogramm

Studie I: Charakterisierung der Reaktion von ortständigen und einwandernden Zellen nach zerebraler Ischämie in Wildtyp-GFP-Knochenmarkschimären (wt^{GFP}® wt)

Da im Projekt Knockout-Tiere verwendet werden sollen, die auf unterschiedlichem genetischen Hintergrund entstanden sind (s. Methoden/Tiermodelle), ist eine Charakterisierung der Infarkte in diesen Stämmen erforderlich. Es handelt sich um: C57BL/6, 129S3/SvImJ und (C57BL/6 x SV129)xC57BL/6. Durch Transplantation des jeweiligen GFP-markierten Knochenmarks werden Chimären generiert, in denen 4 Wochen nach Transplantation (siehe Eigene Vorarbeiten/Fokale zerebrale Ischämie) eine 45-minütige fokale zerebrale Ischämie induziert wird. Die kontralaterale Hemisphäre dient als Kontrolle. Nach 1 und 5 Tagen werden die Tiere transkardial mit PFA (n=10 pro Gruppe) oder nur mit PBS (n=5 pro Gruppe) perfundiert. Es erfolgt eine Bestimmung der Infarktgrößen. Die Gehirne der PFA-perfundierten Tiere werden histologisch und immunhistochemisch untersucht. Parallel dazu werden die PBS-perfundierten Gehirne für die FACS-Analyse präpariert. Es besteht eine Zusammenarbeit mit PD Dr. H. Neumann (MPI Neurobiologie, München).

Gesamtzahl der Tiere: 90 + 90 Donoren (siehe Methoden/Knochenmarkstransplantation)

Ziele der Studie: 1. Differenzierung der spatiotemporalen Reaktion von Mikroglia und GFP-markierten Leukozyten im ischämischen Gehirn der unterschiedlichen Mausstämme. 2. Immunologische Charakterisierung der ortständigen Zellen und der eingewanderten GFP-positiven Leukozyten im Zeitverlauf nach zerebraler Ischämie. 3. Bestimmung der zu erwartenden Infarktgrößen nach 45-minütiger MCAO in Wildtyp-GFP-Knochenmarkschimären unterschiedlichen genetischen Hintergrundes.

Studie II: Zerebrale Ischämie in iNOS-, LIF- und MT-I/-II-Knockout-GFP-Knochenmarkschimären (-/-^{GFP}® -/-)

Die Knochenmarkszellen von iNOS-, LIF- und MT-I/-II-defizienten Mäusen werden durch retroviralen Gentransfer mit GFP markiert. Es erfolgt eine Transplantation des genetisch markierten Knochenmarks in die entsprechenden Knockout-Empfängertiere. Nach der Rekonstitution werden die verschiedenen Knockout-GFP-Knochenmarkschimären einer 45-minütigen fokalen zerebralen Ischämie unterzogen. Die kontralaterale Hemisphäre dient als Kontrolle. Die Tiere werden nach 1 und 5 Tagen transkardial mit PFA (n=10 pro Gruppe) perfundiert. Anschliessend werden histologische und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, und die Infarktgrößen gemessen.

Gesamtzahl der Tiere: 60 + 60 Donoren

Ziele der Studie: 1. Charakterisierung der Infarktgrößen und der zellulären Reaktion auf Ischämie in den unterschiedlichen Knockout-Mäusen. 2. Differenzierung der spatiotemporalen Reaktion von Mikroglia und GFP-markierten Leukozyten bei zerebraler Ischämie in Knockout-GFP-Knochenmarkschimären. 3. Bestimmung der zu erwartenden Infarktgrößen nach 45-minütiger MCAO in Knockout-GFP-Knochenmarkschimären.

Studie III: Kreuztransplantation von GFP-markierten Knochenmarkszellen (wt^{GFP}® -/- und -/-^{GFP}® wt)

Knochenmark aus Wildtyp-Mäusen wird retroviral mit GFP transduziert und in iNOS-, LIF- und MT-I/-II-defiziente Mäuse transplantiert. Umgekehrt wird Knochenmark aus iNOS-, LIF- und MT-I/-II-Knockout-Mäusen mit GFP markiert und in Wildtyp-Mäuse transplantiert. Nach der Rekonstitution erhalten Wildtyp-Mäuse, die mit GFP-markiertem Knochenmark aus iNOS-, LIF- und MT-I/-II-defizienten Mäusen transplantiert wurden, eine 45-minütige MCAO. Analog wird eine fokale zerebrale Ischämie von 45 Minuten Dauer in iNOS-, LIF- und MT-I/-II-defizienten Mäusen, die GFP-markiertes

Knochenmark aus Wildtyp-Mäusen erhalten hatten, induziert. Die Tiere werden nach 1 und 5 Tagen transkardial mit PFA (n=10 pro Gruppe) perfundiert. Die PFA-perfundierten Gehirne werden histologisch und immunhistochemisch untersucht, die Infarktgrößen werden bestimmt. Die kontralaterale Hemisphäre dient als Kontrolle.

Gesamtzahl der Tiere: 120 + 120 Donoren

Ziele der Studie: 1. Bestimmung des Einflusses von iNOS-, LIF- und MT-I/-II-Defizienz in peripheren Blutzellen auf die Migrationsleistung und das Differenzierungspotential im Wildtyp-ZNS. 2. Bestimmung des Einflusses von iNOS-, LIF- und MT-I/-II-Defizienz im peripheren Leukozyten auf die Grösse des Gewebsschadens nach transientser fokaler zerebraler Ischämie. Ferner Charakterisierung einer möglicherweise veränderten zellulären und immunologischen Reaktion des Gehirns auf Ischämie im Falle einer exklusiven Expression von iNOS-, LIF- und MT-I/-II in ortständigen Zellen des ZNS. 3. Untersuchung der Migrationsleistung und des Differenzierungspotentials peripherer Wildtyp-Blutzellen im ZNS von iNOS-, LIF- und MT-I/-II-defizienten Mäusen. 4. Bestimmung des Einflusses von iNOS-, LIF- und MT-I/-II-Defizienz im ZNS auf die Grösse des Gewebsschadens nach transientser fokaler zerebraler Ischämie. Ferner Charakterisierung einer möglicherweise veränderten zellulären und immunologischen Reaktion des Gehirns auf Ischämie im Falle einer exklusiven Expression von iNOS-, LIF- und MT-I/-II in peripheren Blutzellen.

Zusammenfassend soll die Funktion von Kandidatengenen bei differentieller Expression im ZNS oder in zirkulierenden Blutzellen im Rahmen der zerebralen Ischämie untersucht werden. Indirekt soll so ein Profil erstellt werden, das die Rolle von Mikroglia und einwandernden Leukozyten differenziert.

Studie IV: Hämatogene CNTF-Versorgung bei zerebraler Ischämie

CNTF-Knockout-Mäuse werden mit Knockout-Knochenmark (CNTF^{-/-}→CNTF^{-/-}) oder mit Knockout-Knochenmark, das mit dem CNTF-Vektor transduziert wurde (CNTF^{-/-}^{CNTF}→CNTF^{-/-}), transplantiert. Nach der Rekonstitution wird in den Knochenmarkschimären eine 45-minütige fokale zerebrale induziert und die Chimären nach 1 und 5 Tagen transkardial mit PFA perfundiert (n=10 pro Gruppe). Die PFA-perfundierten Gehirne werden histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die kontralaterale Hemisphäre dient als Kontrolle. Es erfolgt ein Vergleich der Infarktgrößen und des Überlebens von Neuronen in CNTF^{-/-}^{CNTF}→CNTF^{-/-} mit CNTF^{-/-}→CNTF^{-/-} in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Sendtner (Universität Würzburg).

Gesamtzahl der Tiere: 40 + 40 Donoren

Ziel der Studie: Untersuchung des Einflusses einer selektiven Expression von CNTF in peripheren Blutzellen auf die Infarktgrösse und das Überleben von Neuronen nach transientser fokaler zerebraler Ischämie.

Zur Übersicht werden die im Rahmen der vier Studien untersuchten Konditionen nochmals tabellarisch zusammengefasst:

TIERSTAMM	n	Knochenmarks-DONOR	n	CHIMÄRE	ISCHÄMIE	n
C57Bl/6	30	C57BL/6	30	wt ^{GFP} →wt	45min	30
129S3/SvImJ	30	129S3/SvImJ	30	wt ^{GFP} →wt	45min	30
(C57BL/6 x SV129)xC57BL/6	30	(C57BL/6 x SV129)xC57BL/6	30	wt ^{GFP} →wt	45min	30
iNOS ^{-/-}	20	iNOS ^{-/-}	20	-/ ^{GFP} →-/-	45min	20
LIF ^{-/-}	20	LIF ^{-/-}	20	-/ ^{GFP} →-/-	45min	20
MT-I/-II ^{-/-}	20	MT-I/-II ^{-/-}	20	-/ ^{GFP} →-/-	45min	20
iNOS ^{-/-}	20	(C57BL/6 x SV129)xC57BL/6	20	wt ^{GFP} →-/-	45min	20
LIF ^{-/-}	20	C57BL/6	20	wt ^{GFP} →-/-	45min	20
MT-I/-II ^{-/-}	20	129S3/SvImJ	20	wt ^{GFP} →-/-	45min	20

(C57BL/6 x SV129)xC57BL/6	20	iNOS -/-	20	-/- ^{GFP} →wt	45min	20
C57BL/6	20	LIF -/-	20	-/- ^{GFP} →wt	45min	20
129S3/SvImJ	20	MT-I/-II -/-	20	-/- ^{GFP} →wt	45min	20
CNTF -/-	20	CNTF -/-	20	-/-→-/-	45min	20
CNTF -/-	20	CNTF-/-	20	-/- ^{CNTF} →-/-	45min	20

3.5.4 Zeitplan und Risikoabschätzung

Die Studien sind in einem Zeitraum von 3 Jahren durchführbar. Erfahrungen mit der GFP-Markierung hämatopoetischer Zellen, der Knochenmarkstransplantation und den Ischämie-Modellen liegen vor. In tabellarischer Übersicht ergibt sich folgender Zeitplan:

2002	2003	2004
Charakterisierung der Reaktion von ortständigen und einwandernden Zellen nach zerebraler Ischämie in Wildtyp-GFP-Knochenmarkschimären (wt^{GFP}® wt) <i>-Histologie/Histochemie</i> <i>-FACS</i>	Zerebrale Ischämie in iNOS-, LIF- und MT-I/-II-Knockout-GFP-Knochenmarkschimären (-/-^{GFP}® -/-) Kreuztransplantation von GFP-markierten Knochenmarkszellen (wt ^{GFP} →-/- und -/- ^{GFP} →wt) <i>-Histologie/Histochemie</i>	Kreuztransplantation von GFP-markierten Knochenmarkszellen (wt ^{GFP} →-/- und -/- ^{GFP} →wt) Hämatogene CNTF-Versorgung bei zerebraler Ischämie <i>-Histologie/Histochemie</i>

Risikoabschätzung:

Alle Techniken und Methoden (Chimären, Ischämie-Modelle, Histologie und Immunhistochemie etc.) sind etabliert und charakterisiert, es liegt grosse Erfahrung in diesen Techniken bei den Antragstellern vor. Prinzipiell problematisch ist sicherlich die hohe Zahl der durchzuführenden Experimente, dies hat wesentlich mit den aufwendigen Kontrollexperimenten zu tun. Bei Bewilligung der beantragten Personalmittel scheint die Durchführung des Programmes im Antragszeitraum aber wie geplant machbar, durch die Vorerfahrungen mit der Chimärenherstellung und den Ischämieexperimenten (Variabilität, Ausfallraten etc.) gründet sich diese Abschätzung auf eine solide Datenbasis. Die hier vorgeschlagenen Experimente ergeben sich aus der jetzigen Sicht der Vorbefunde und der Literatur. Es ist, wie in der laufenden Antragsperiode ja geschehen, natürlich möglich dass sich bei überraschenden Ergebnissen Abweichungen im Programm ergeben. Diese könnten z.B. dann nötig werden, wenn bei den Kreuztransplantationsexperimenten dramatische Effekte (z.B. im Sinne von Protektion/Destruktion, oder unerwarteten zellulären Reaktionen) auftreten, welche dann genauer charakterisiert würden.

Literatur

- Ford et al., *J Immunol*, 1995, 154, 4309-4321.
 Endres et al., *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998, 18:238-47.
 MacMicking et al., *Cell*, 1995, 81, 641-650.
 Masters et al., *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91, 584-588.
 Masu et al., *Nature*, 1993, 365, 27-32.
 Mezey et al., *Science*, 2000, 290, 1779-1782.
 Persons et al., *Blood*, 1997, 90, 1777-1786.
 Stewart et al., *Nature*, 1992, 359, 76-79.
 Victorov et al., *Brain Res Brain Res Protoc*, 2000, 5, 135-139.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Das Teilprojekt fügt sich inhaltlich gut in den Bereich A (Zerebrale Ischämie/Hypoxie) ein. Es besteht eine Kollaboration mit Dr. U. Lindauer, die GFP-Mäuse zur Untersuchung der aktiven Blutflussregulation in ZNS-Kapillaren benötigt. Ferner soll mit PD Dr. T. Grune durch Verwendung von Knochenmarkschimären die Expression von Ferritin in Mikroglia und einwandernden Makrophagen nach zerebralen Ischämie untersucht werden. Mit Dr. J. Dreier besteht schon seit längerem eine enge Zusammenarbeit. Dabei werden die im Rahmen dieses Projektes etablierten immunhistochemischen Techniken zur Untersuchung der Gewebsreaktion auf Cortical Spreading Depression/Ischemia verwandt. Mit Dr. I. Bechmann und Prof. Dr. Nitsch (Bereich B: Inflammation) besteht eine Kollaboration, deren Ziel die Quantifizierung und Charakterisierung des Austausches perivaskulärer Zellen mit Knochenmarkszellen ist. Dabei haben sich GFP-Knochenmarkschimären bereits als sehr nützlich erwiesen. Eine Kollaboration mit Dr. J. Braun und Prof. Dr. Weber ist für die Mausmodelle der bakteriellen Meningitis und Herpes-Enzephalitis vorgesehen. Dabei können GFP-Knochenmarkschimären wertvolle Hinweise auf die Rolle einwandernder Leukozyten liefern. Mit dem Projektbereich B (Neurodegeneration und Tumoren) haben sich bereits gemeinsame Fragestellungen ergeben. So wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Kettenmann elektrophysiologische Untersuchungen an Hirnschnitten nach Ischämie vorgenommen. Diese könnten nun an GFP-Knochenmarkschimären durchgeführt werden. Ferner wurde die Technik der Knochenmarkstransplantation auf transgene Tiere, die GFP unter der Kontrolle des GFAP-Promoters exprimieren (Dr. F. Kirchoff, vormals MDC, jetzt ENI Göttingen), erweitert. Schliesslich besteht eine Zusammenarbeit mit Dr. F. van Landeghem und Prof. A. v. Deimling, die die Expression des Glutamattransportes in Mikroglia und einwandernden Makrophagen nach ZNS-Trauma und Entzündung untersuchen.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

PK	Bevilligung 2001			2002			2003			2004		
	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM
	Ila/2-O	1	42000	Ila/2-O	1	42000	Ila/2-O	1	42000	Ila/2-O	1	42000
				Vb-O	1	67200	Vb-O	1	67200	Vb-O	1	67200
	zus.:		42000	zus.:		109200	zus.:		109200	zus.:		109200
SV				Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	
				522	29800	522	29800	522	29800	522	29800	
I				Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.		
				-		-		-		-		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1. Dirnagl, Ulrich, Prof. Dr. med.	Experimentelle Neurologie	Neurologische Klinik	5	1998	C4
	2. Priller, Josef, Dr. med.	Neurologie	Neurologische Klinik	20	1998	IIa-O
	3. Klett, Francisco Fernandez (Arzt)	Experimentelle Neurologie	Neurologische Klinik	10	2000	Mitglied des GRK
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	-	-	-	-	-	
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1. N.N. (Doktorand)	Experimentelle Neurologie	Neurologische Klinik	20		IIa/2-O
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	1. N.N.X (MTA)	Experimentelle Neurologie	Neurologische Klinik	40		Vb-O

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

Ulrich Dirnagl, Prof. Dr. med.

Supervision der Arbeiten, Projektkonzept, Durchführung bildgebender Untersuchungen in vitro und in vivo, Einarbeitung von Mitarbeitern an den Ischämie-Modellen und am konfokalen Mikroskop, Koordinierung der Zusammenarbeit mit den anderen SFB-Projekten und den auswärtigen Institutionen. Herr Dirnagl steht dem Projekt 5 Stunden pro Woche zur Verfügung.

Josef Priller, Dr. med.

Planung und Supervision der Arbeiten, Projektkonzept, Durchführung von gentechnischen und zellbiologischen Arbeiten, Immunhistochemie, Zusammenarbeit mit den anderen SFB-Projekten und den auswärtigen Institutionen. Herr Priller befindet sich in seiner Facharztausbildung und ist neben seiner Tätigkeit für das Projekt auch noch klinisch tätig. Auch ist er Betreuer der M.Huntington – Sprechstunde der Klinik. Herr Priller war seit Projektbeginn 1998 Mitarbeiter des Projektes auf der durch die DFG-finanzierten Stelle halben Wissenschaftlerstelle, seine halbzeitliche klinische Tätigkeit wurde von der Neurologischen Klinik finanziert. Dies hat sehr gut funktioniert und trug zur klinischen Einbindung von SFB-Projekten bei. Herr Priller soll aufgrund seiner im Laufe der Antragsphase stark gewachsenen grossen methodischen und inhaltlichen Beitrages zu dem Projekt nun auch als Antragsteller firmieren. Selbstkritisch muss angemerkt werden, dass dieses sehr aufwendige Projekt in der derzeit laufenden Antragsperiode von uns in den Personalmitteln mit der BAT IIa/2 Stelle unterbeantragt war. Als Reaktion hierauf wurden vom Antragsteller daher aus Stiftungsmitteln seit dem Jahr 2000 noch eine Gastwissenschaftlerin (Dr. Tanya Zenina) hinzufinanziert. Diese Mittel stehen aber ab Mitte 2001 nicht mehr zur Verfügung, auch muss Frau Dr. Zenina im März 2001 nach Moskau zurückkehren.

Francisco Fernandez - Klett

Herr Klett ist seit dem 01.05.2000 Mitglied des Graduiertenkollegs 238 und arbeitet unterstützend bei den Tierexperimenten (Transplantation, Tierzucht, Perfusion) mit. Herr Fernandez – Klett ist aber hauptsächlich in einem Projekt tätig, in dem es in Brain Slice Experimenten um aktive Regulation von kapillären Durchmessern im Gehirn geht (mittels Dual Photon Confocal Mikroskopie, siehe auch Z2).

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

Es handelt sich um ein methodisch sehr aufwendiges Projekt, das insbesondere in folgenden Kerngebieten kompetente Mitarbeit und Expertise erfordert:

- Chimärenherstellung inkl. Knochenmarkstransplantation
- Zellkultur (KM-Stammzellen, inkl. Transfektion)
- Klassische Histologie sowie Immunhistochemie
- Tierhaltung/Pflege
- Mikrochirurgie, in vivo Schlaganfallmodell Maus

Das Projekt ist zudem sehr stark in Kooperationen innerhalb des SFB sowie mit auswärtigen Gruppen eingebunden, sodass über den Eigenbedarf des Projektes hinaus anderen Projekten substantiell zugearbeitet werden muss.

N.N., naturwissenschaftlicher Doktorand (IIa/2-O)

Beantragt wird ein naturwissenschaftliche(r) Doktorand(in), der/die

- die Knochenmarksstammzellen isoliert und transduziert,
- die Knochenmarkstransplantation durchführt,
- bei den gentechnischen Arbeiten assistiert und
- die Infakte histologisch untersucht.
- die in vivo Schlaganfallexperimente durchführt

Diese verantwortungsvollen und anspruchsvollen Tätigkeiten erfordern einen Wissenschaftler, u.a. wegen der in vivo Experimente (Behörl. Genehmigung!) möglichst aus dem Gebiet der Biologie (Hauptfach Zoologie).

N.N., Medizinisch-technische Assistentin/ Medizinisch-technischer Assistent (Vb-O)

Beantragt wird eine medizinisch-technische Assistentin/ ein medizinisch-technischer Assistent, die/der

- die Zelllinien versorgt und bei der Kultivierung und Transfektion der Knochenmarksstammzellen behilflich ist,
- den Gesundheitszustand der Knochenmarkschimären und der Spendertiere überwacht,
- die Gewebsaufarbeitung der Tiere übernimmt
- bei der Tierhaltung/Zucht sowie Genotypisierung assistiert

Die Besetzung dieser Stellen ist von grosser Bedeutung für das Projekt. Durch die umfangreichen Kollaborationen mit anderen Teilprojekten des SFB und mit auswärtigen Forschungsinstitutionen muss die Herstellung der Knochenmarkschimären in weitaus grösserem Umfang als bisher sichergestellt sein. Die Verwendung von 'knockout'-Tieren erfordert darüber hinaus zusätzliche Kontrollgruppen. Die Hauptantragsteller sind durch andere wissenschaftliche Projekte oder durch klinische Tätigkeit soweit gebunden, dass sie nur begrenzt an dem Projekt mitarbeiten können. Deshalb besteht Bedarf für die beantragte Ergänzungsausstattung. Die Experimentelle Neurologie unterhält eine eigene Tierhaltung, in der für die teilweise immunkompromitierten Tiere sehr aufwendige Einzelkäfighaltung in sog. IVC-Regalen durchgeführt wird. Diese aufwendige Haltung, zusammen mit der Zucht und Genotypisierung (Kontrollen) der knock-out Stämme, macht hier technische Assistenz für das Gelingen des Projektes absolut notwendig.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	16000	16000	16000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausstattung	28800	28800	28800

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Kosten für:

*Versuchstiere***Anschaffung** Knockout-Mäuse

MT-I/-II -/- breeder (+Transport/Zoll, Jackson Labs) 1000 DM

(iNOS -/-, CNTF -/-, LIF -/- vorhanden oder durch Kollaboration kostenlos)

Haltung (Breeding) pro Stamm 30 Tiere x 4 x 52 Wochen x 0.8 DM 4992 DM / p.J.

Studie I

Anschaffung 60 C57, 120 SV 3840 DM

Haltung (90 x 5 Wochen) x 0.8 DM 360 DM

Studie II

Haltung (60 x 5 Wochen) x 0.8 DM 240 DM

Studie III

Anschaffung 40 C57, 80 SV 2560 DM

Haltung (120 x 5 Wochen) x 0.8 DM 480 DM

Studie IV

Haltung (40 x 5 Wochen) x 0.8 DM 160 DM

Haltung gesamt 16216 DM

Anschaffung gesamt 7400 DM

Umlage pro Jahr (=Tierkosten pro Jahr, abgerundet): 7800 DM

Verbrauchsmaterial (pro Jahr)Zytokine (rIL-3 449 DM/10µg, rIL-6 595 DM/25µg, rSCF 3200 DM/100 µg)
mit 20% Rabatt bei jährlichem Bedarf von etwa 150µg IL-6, 75µg IL-3 und
150µg SCF 12000 DM

Zellkultur: Pipetten, Kulturflaschen, Medien, Seren etc. 5000 DM

Tierexperimente: Narkotika, mikrochirurg. Fäden zur Mediaokklusion,
Klebstoffe, Kleinmaterial, Nahtmaterial, etc. 2000 DM

Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe, sonstige Chemikalien 2000 DM

Gesamt 28800 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 der endothelialen NO Synthase bei zerebraler Gefäßreaktivität: Beeinflussung der Enzymaktivität mittels HMG-CoA Reduktase-Inhibition und Einfluß auf die Infarktvolumenentwicklung bei fokaler zerebraler Ischämie

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung: Neurologie

3.1.3 Leiter/in:

Dr. Lindauer Ute, geb. 15.12.1964

Neurologische Klinik der Charité
Abteilung für Experimentelle Neurologie
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin

Telefon: 030 / 2802-4685

Telefax: 030 / 2802-4695

E-Mail: ute.lindauer@charite.de

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

ja, befristet bis 31.05.2004 mit Möglichkeit der Verlängerung

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

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

- Untersuchungen am Menschen nein
 - klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie nein
 - Tierversuche ja
- (Ratte, Maus: Genehmigung der Behörde: AZ G 0119 / 97 T 0032 / 99 T 0031 / 99)
- gentechnologische Untersuchungen ja
- Verwendung von knockout-Mäusen:
Gentechnische Anlage S1: AZ 541 / 96,
Anzeige vom 05.10.1999 für eNOS (-/-)

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-Jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
2. Hj 1998	19,8	7,5	-	27,3
1999	39,6	15	-	54,6
2000	39,6	15	-	54,6
2001	39,6	15	-	54,6
Zwischen-Summe	138,6	52,5	-	191,1
2002	67,2	20,7	-	87,9
2003	67,2	20,7	-	87,9
2004	67,2	20,7	-	87,9

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Zerebrale Gefäße verfügen über einen physiologischen, durch das Bioradikal Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) vermittelten vasodilatatorischen Tonus, der zu signifikantem Anteil über einen basalen cGMP-Spiegel in der glatten Gefäßmuskelzelle vermittelt wird. Unsere bisherigen Untersuchungen zeigen, daß dieser basale NO / cGMP Spiegel im Gewebe funktionell hochrelevant ist. So reguliert im Rahmen der neurovaskulären Kopplung im zerebralen Kortex das Bioradikal NO über die Produktion von cGMP die Bereitschaft der Gefäße zur Vasodilatation - als sogenannte 'Modulatorfunktion' des NO / cGMP Systems charakterisiert - es stellt selbst aber nicht den eigentlichen Mediator der Dilatation dar. Aus unseren Untersuchungen der laufenden Antragsperiode konnten wir ableiten, daß in erster Linie die Typ I NO Synthase (neuronale NOS) aus perivaskulären Nervenendigungen für den basalen NO / cGMP Spiegel und damit für eine optimale Funktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskelzelle von Bedeutung ist. Das Endothel selbst und die darin primär vorkommende Typ III Isoform der NOS (endotheliale NOS) ist hierbei von untergeordneter Bedeutung. Dieser Befund ist v.a. deshalb erstaunlich, da die morphologische Nachbarschaft von Endothelzelle und glatter Gefäßmuskelzelle einen gegenteiligen Befund vermuten ließ.

Aus der Literatur ist bekannt, daß das unter Normalbedingungen zugunsten der neuronalen Isoform gewichtete Verhältnis zwischen nNOS und eNOS nicht statisch ist, sondern unter pathophysiologischen Bedingungen dynamisch verändert werden kann, um eine möglichst unveränderte Reaktivität NO abhängiger vasodilatatorischer Stimuli aufrecht zu erhalten.

Die im Rahmen des vorliegenden Antrags formulierten Untersuchungen sollen klären, inwieweit überhaupt eine Bedeutung der eNOS und des vom Endothel produzierten NO für die zerebrale Gefäßreaktivität vorliegt. Darüberhinaus wollen wir klären, ob eine Störung der eNOS Funktion für die zerebrale Gefäßreaktivität von pathophysiologischer Relevanz ist. Ergebnisse aus den geplanten Untersuchungen würden erheblich zu unserem Verständnis der Rolle der eNOS bei zerebrovaskulärer Reaktivität allgemein und bei der neurovaskulären Kopplung im Speziellen beitragen.

Weiterhin soll geklärt werden, ob unter der pathophysiologischen Situation der arteriellen Hypertension eine Erhöhung der eNOS Aktivität über einen therapeutischen Ansatz (mittels HMG-CoA Reduktase Inhibition durch Statin-Applikation) zu einer Verbesserung der gestörten Vasoreaktivität NOS abhängiger Stimuli und zu Protektion bei fokaler zerebraler Ischämie führt.

3.3 Stand der Forschung

Der regionale Blutfluß des Gehirns ist unter physiologischen Bedingungen eng gekoppelt an die neuronale Aktivität. Unter einer Vielzahl von pathophysiologischen Bedingungen kommt es allerdings 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.

Zerebrale Gefäße verfügen über einen physiologischen, Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) vermittelten vasodilatatorischen Tonus, der zu signifikantem Anteil über einen basalen cGMP-Spiegel in der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt wird.

Bisherige Untersuchungen aus der zurückliegenden Antragsperiode (Lindauer et al., 1996; Lindauer et al., 1999) zeigen, daß dieser basale NO Spiegel im Gewebe funktionell von Bedeutung ist: So ist für eine Reihe von vasodilatatorischen Stimuli (z.B. Hyperkapnie, funktionelle somatosensorische Stimulation im zerebralen Kortex) das Vorhandensein des basalen NO / cGMP Spiegels im Gewebe wichtige Voraussetzung für eine physiologische Reaktion der Gefäße (Modulator-Funktion). Der basale NO Spiegel wird primär durch die Aktivität der neuronalen Isoform (nNOS) der konstitutiven NO Synthase (cNOS) in perivaskulären Neuronen bereitgestellt.

Andere vasoaktive Stimuli dagegen (Acetylcholin, Bradykinin, funktionelle Stimulation des Parallelfasensystems im Zerebellum) bedienen sich des NO Systems im Sinne einer echten Mediatorfunktion durch Erhöhung der Aktivität der NO Synthase (Kelm et al., 1988; Akgoeren et al., 1996; Iadecola and Zhang, 1996).

Eine Übersicht der im Gehirn exprimierten NOS Isoformen und deren Lokalisation in den wichtigsten Zelltypen des Gehirns ist in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 1: NOS Isoformen

Isoform	Zelltyp	Ca ²⁺ Calmodulin abhängig	NO Produktion
<u>Konstitutiv exprimiert:</u> <u>cNOS</u> Typ I: neuronale NOS, nNOS Typ III: endotheliale NOS, eNOS	Neuron Astrozyt, Endothelzelle Endothelzelle Neuron, Astrozyt	+	kurzzeitig in pM
<u>Induzierbar: iNOS</u> Typ II: induzierbare NOS, iNOS	Makrophage, Mikroglia Endothelzelle, Astrozyt, Neuron, glatte Gefäß- muskulatur	-	langdauernd in nM

3.3.1 Bedeutung der eNOS-Aktivität für die zerebrovaskuläre Reaktivität

Untersuchungen zur cNOS Aktivität im Gehirn von eNOS und nNOS knockout (eNOS(-/-) bzw. nNOS(-/-)) Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten, daß ca 90 % der gesamten cNOS Aktivität der neuronalen Isoform des Enzyms zuzuordnen ist, während lediglich 10 % der gesamten cNOS Aktivität endotheliale NOS darstellt. Unter ischämischen Bedingungen wird aber innerhalb der ersten halben Stunde nach Ischämiebeginn die gleiche Menge an NO in eNOS(-/-) und nNOS(-/-) Mäusen im Gehirn produziert (Wei et al., 1999). Im Gegensatz zu der deutlich niedrigeren Aktivität der eNOS unter physiologischen Bedingungen scheint unter pathophysiologischen Bedingungen der eNOS eine zur nNOS vergleichbare Bedeutung in der Modulation des NO Spiegels zuzukommen.

Die Vasodilatoren Acetylcholin und Bradykinin sind auf ein intaktes Gefäßendothel angewiesen, und die Gefäßdilataion auf diese Substanzen wird primär durch eNOS Aktivität vermittelt (Watanabe et al., 1988; Kelm et al., 1988; Elhousseiny and Hamel, 2000). Neuere Befunde weisen jedoch darauf hin, daß auch in zerebrovaskulären Endothelzellen funktionell aktive nNOS lokalisiert ist (Benyó et al., 2000). Untersuchungen an eNOS(-/-) Mäusen zeigen, daß unter eNOS Mangel die Vasodilatation auf Acetylcholin durch die neuronale Isoform vermittelt wird (Meng et al., 1998).

Das unter Normalbedingungen zugunsten der neuronalen Isoform gewichtete Verhältnis zwischen nNOS und eNOS ist somit nicht statisch, sondern kann unter pathophysiologischen Bedingungen dynamisch verändert werden, um eine möglichst unveränderte Reaktivität NO abhängiger vasodilatatorischer Stimuli aufrecht zu erhalten.

3.3.2 Veränderung der eNOS Aktivität durch chronische Statin-Behandlung

Chronische Applikation von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase Inhibitoren, den sogenannten Statinen, führt zu einer Erhöhung des zerebralen Blutflusses um 15 bis 30 % (Yamada et al. 2000, ; Endres et al., 1998) unter Ruhebedingungen und zu einer länger andauernden und verstärkten Vasodilatation auf L-Arginin-Infusion, dem Substrat der cNOS. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Vasodilatation auf intravenös verabreichtes L-Arginin in erster Linie durch eNOS vermittelt wird (Reutens et al., 1997), da L-Arginin die Blut-Hirn-Schranke nicht penetriert (Oldendorf, 1971), und experimentelle Zerstörung des Endothels zu einer signifikanten Abschwächung der L-Arginin vermittelten Dilatation führt (Rosenblum et al., 1990).

Die Vasodilatationsverstärkung nach HMG-CoA Reduktase Inhibition ist auf eine Erhöhung der Aktivität und Expression der eNOS in zerebralen Gefäßen zurückzuführen, während die Aktivität der nNOS unbeeinflusst bleibt (Endres et al., 1998; Laufs et al., 1998). Die fehlende Wirkung chronischer HMG-CoA Reduktase Inhibition bei eNOS (-/-) Mäusen ist ein weiterer Beweis für die spezifische Wirkung der Statine auf die eNOS (Endres et al., 1998). Nach dem Absetzen chronischer Statin-Behandlung kommt es zu einer kurzzeitigen deutlichen Verringerung der eNOS Aktivität und Expression weit unter das Ausgangsniveau, bevor nach einigen Tagen die ursprüngliche Aktivität wieder hergestellt ist (Laufs et al., 2000a).

Inwieweit die Reaktivität zerebraler Gefäße nach chronischer Statin Applikation auf eNOS abhängige Stimuli verändert ist, ist bisher noch nicht systematisch untersucht worden.

Eine signifikante Protektion bei Schlaganfall durch HMG-CoA Reduktase Inhibition ist sowohl im Tierexperiment (Laufs et al., 2000b; Khurana et al., 2000; Endres et al., 1998) als auch in klinischen Studien gezeigt (Crouse et al., 1998). Deshalb erscheint eine systematische Untersuchung der zerebrovaskulären Reaktivität unter eNOS aktivierten Bedingungen für ein besseres Verständnis der vaskulären Wirkung der Statine im Vergleich zu Cholesterin-senkenden und Plättchenaktivierungs-verniedrigenden Eigenschaften von Bedeutung.

Auch ist bisher nicht untersucht, ob eine signifikante Erhöhung der eNOS Aktivität, wie sie nach Statingabe erfolgt, einen Einfluß auf normalerweise spezifisch nNOS abhängige Reaktionen ausübt. Das bereits oben beschriebene dynamische Verhältnis zwischen nNOS und eNOS und die sich daraus ergebende unterschiedliche Beteiligung der NOS Isoformen bei zerebrovaskulärer Reaktivität legt die Hypothese nahe, daß unter erhöhter eNOS Aktivität diese auch vermehrt eine Rolle bei nNOS abhängigen Vasodilatoren spielen könnte.

3.3.3 cNOS abhängige Vasoreaktivität sowie Einfluß der Statin-Behandlung im Tiermodell der Hypertension

Während es bei normotensiven Ratten-Stämmen im Tierexperiment nach HMG-CoA Reduktase Inhibition unter chronischer Statinbehandlung zu keiner Veränderung des systemischen arteriellen Blutdruckes kommt, zeigen spontan hypertensive Tiere eine signifikante Erniedrigung hin zu physiologischen Blutdruckwerten (Yamada et al., 2000; Regrigny et al., 2000). Auch hypertensive Patienten profitieren von der blutdrucksenkenden Wirkung unter Statin-Behandlung (Borghgi et al., 2000; Glorioso et al., 1999). Dieser Befund deutet darauf hin, daß pharmakologische eNOS Hochregulation an gesunden Individuen unter physiologischen Bedingungen einen nur geringen Einfluß auf vaskuläre Reaktivität hat, unter pathophysiologischen Bedingungen aber signifikante Wirkung zeigt.

Im Tierexperiment zeigen spontan hypertensive Ratten (SHR, SHRSP) eine im Vergleich zum normotensiven Stamm verminderte Reaktivität extrazerebraler (Kimoto-Kinoshita et al., 2000; Konishi and Su, 1983; Luscher and Vanhoutte, 1986; Luscher et al., 1987) sowie zerebraler (Kimoto-Kinoshita et al., 2000; Sobey et al., 1999) Arterien. Auch zeigen Ratten des SHR-SP Stammes bereits vor dem Auftreten spontaner Hirninfarkte diffuse vaskuläre Prozesse, die in einer globalen Dekompensation des zerebralen Blutflusses münden (Mies et al., 1999). Eine mögliche Ursache für die verminderte vaskuläre Reaktivität und Blutflußdekompensation dürfte in einer verminderten Aktivität und Expression der eNOS

in den hypertensiven Rattenstämmen zu sehen sein (Kimoto-Kinoshita et al., 2000). Nicht endothelabhängige Reaktionen wie die Dilatation auf NO Donoren erscheint unverändert (Sobey et al., 1999), während es für die zerebrovaskuläre Reaktivität auf Hypercapnie gegensätzliche Befunde gibt: So berichten einige Autoren, daß diese normalerweise nNOS abhängige Reaktion unverändert ist (Takahashi et al., 1996; Heinert et al., 1998; Sobey et al., 1999), während es aber Hinweise auf eine Abschwächung der Hyperkapnieantwort älterer SHR Tiere im Vergleich zu jungen SHR Tieren gibt (Tamaki et al., 1995) bzw. von reduzierter CO₂ Reaktivität in pialen und größeren kortikalen Arterien bei SHR Tieren im Vergleich zu normotensiven Tieren berichtet wird (Yoshida et al., 1987). Die untere Grenze der Autoregulation ist bei hypertensiven Tieren in Richtung höherer Werte des systemischen Blutdrucks verschoben (Fujishima and Omae, 1976).

Eine Therapie, die zu einer Steigerung der Aktivität und Expression der eNOS führt, dürfte gerade bei hypertensiven Individuen zu verbesserter vaskulärer Reaktivität führen. Vereinzelt sind hier Befunde aus der Literatur bekannt. So wurde eine Verminderung der Konstriktion und eine verbesserte Dilatation auf endothelabhängige Stimuli zerebraler Arterien nach Statinbehandlung gezeigt (Alvarez et al., 1999; Regrigny et al., 2000). Weitere systematische Untersuchungen zur eNOS Aktivität und Expression in SHR im Vergleich zu normotensiven Tieren und deren Veränderung unter Statin-Gabe sowie deren Auswirkung auf zerebrovaskuläre Reaktivität wären allerdings für eine Einordnung der Rolle der eNOS von Bedeutung.

Auch ist bisher nicht gezeigt, ob eine chronische Statin-Behandlung auch in hypertensiven Tieren zu einer Verbesserung des Outcomes nach Schlaganfall führt, wie es für normotensive Mäuse sehr eindrucksvoll gezeigt wurde (Endres et al., 1998).

Eine mäßige Absenkung des Blutdrucks nach Auslösen eines experimentellen Schlaganfalls in der Ratte durch Hydralazin in einer Größenordnung, wie sie bei Statin-Gabe erreicht wird, führt zu keiner positiven Wirkung auf das Schlaganfallvolumen (Harms et al., 2000). Inwieweit eine Aktivitätssteigerung der eNOS bei hypertensiven Tieren einen zu normotensiven Tieren vergleichbaren therapeutischen Effekt auf das Schlaganfallvolumen zeigt, ist bisher nicht untersucht.

Literatur:

- Akgoeren N, Dalgaard P, Lauritzen M (1996) Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis. *Brain Res* 710:204-214
- Alvarez dS, Perez-Guerrero C, Herrera MD, Marhuenda E (1999) Effects of chronic treatment with simvastatin on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 17:769-776
- Benyó Z, Lacza Z, Hortobágyi T, Görlach C, Wahl M (2000) Functional importance of neuronal nitric oxide synthase in the endothelium of rat basilar arteries. *Brain Res* 877:79-84
- Borghgi C, Prandin MG, Costa FV, Bacchelli S, Degli ED, Ambrosioni E (2000) Use of statins and blood pressure control in treated hypertensive patients with hypercholesterolemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:549-555
- Crouse JR, Byington RP, Furberg CD (1998) HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. *Atherosclerosis* 138:11-24
- Elhousseiny A, Hamel E (2000) Muscarinic --but not nicotinic --acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:298-305
- *Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8880-8885
- Fujishima M, Omae T (1976) Lower limit of cerebral autoregulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Experientia* 32:1019-1021
- Glorioso N, Troffa C, Filigheddu F, Dettori F, Soro A, Parpaglia PP, Collatina S, Pahor M (1999) Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension* 34:1281-1286
- *Harms H, Wiegand F, Megow D, Prass K, Einhaupl KM, Dirnagl U (2000) Acute treatment of hypertension increases infarct sizes in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport* 11:355-359

- Heinert G, Casadei B, Paterson DJ (1998) Hypercapnic cerebral blood flow in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 16:1491-1498
- Iadecola C, Zhang F (1996) Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol* 271:R990-1001
- Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J (1988) Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154:236-244
- Khurana VG, Smith LA, Weiler DA, Springett MJ, Parisi JE, Meyer FB, Marsh WR, O'Brien T, Katusic ZS (2000) Adenovirus-mediated gene transfer to human cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1360-1371
- Kimoto-Kinoshita S, Nishida S, Tomura TT (2000) Decrease of endothelial nitric oxide synthase in stroke-prone spontaneously hypertensive rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 288:103-106
- Konishi M, Su C (1983) Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 5:881-886
- *Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, Bohm M (2000) Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 102:3104-3110
- *Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31:2442-2449
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129-1135
- *Lindauer U, Megow D, Schultze J, Weber JR, Dirnagl U (1996) Nitric oxide synthase inhibition does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 216:207-210
- *Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U (1999): Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol* 277: H799-H811.
- Luscher TF, Vanhoutte PM (1986) Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8:344-348
- Luscher TF, Vanhoutte PM, Raji L (1987) Antihypertensive treatment normalizes decreased endothelium-dependent relaxations in rats with salt-induced hypertension. *Hypertension* 9:III193-III197
- Meng W, Ayata C, Waeber C, Huang PL, Moskowitz MA (1998) Neuronal NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice. *Am J Physiol* 274:H411-H415.
- Mies G, Hermann D, Ganten U, Hossmann KA (1999) Hemodynamics and metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats before manifestation of brain infarcts. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1238-1246.
- Oldendorf WH (1971) Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* 221:1629-1639
- Regigny O, Atkinson J, Capdeville-Atkinson C, Liminana P, Chillon JM (2000) Effect of Lovastatin on Cerebral Circulation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 35:1105-1110
- Reutens DC, McHugh MD, Toussaint PJ, Evans AC, Gjedde A, Meyer E, Stewart DJ (1997) L-arginine infusion increases basal but not activated cerebral blood flow in humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:309-315
- Rosenblum WI, Nishimura H, Nelson GH (1990) Endothelium-dependent L-Arg- and L-NMMA-sensitive mechanisms regulate tone of brain microvessels. *Am J Physiol* 259:H1396-H1401
- Sobey CG, Moffatt JD, Cocks TM, Kontos HA (1999) Evidence for Selective Effects of Chronic Hypertension on Cerebral Artery Vasodilatation to Protease-Activated Receptor-2 Activation. *Stroke* 30:1933-1941
- Takahashi H, Kirsch JR, Okada T, Traystman RJ (1996) Intensity of halothane- and hypercapnia-induced cerebral hyperemia is strain-dependent in rats. *Anesth Analg* 83:359-365
- Tamaki K, Nakai M, Yokota T, Ogata J (1995) Effects of aging and chronic hypertension on cerebral blood flow and cerebrovascular CO₂ reactivity in the rat. *Gerontology* 41:11-17
- Watanabe M, Rosenblum WI, Nelson GH (1988) In vivo effect of methylene blue on endothelium-dependent and endothelium-independent dilations of brain microvessels in mice. *Circ Res* 62:86-90

- Wei G, Dawson VL, Zweier JL (1999) Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1455:23-34
- *Yamada M, Huang Z, Dalkara T, Endres M, Laufs U, Waeber C, Huang PL, Liao JK, Moskowitz MA (2000) Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:709-717
- Yoshida F, Fujishima M, Sadoshima S, Ishituka T, Ogata J (1987) Carbon dioxide reactivity of cerebral cortical and pial arteries in spontaneously hypertensive and normotensive rats--a morphometric study. *Brain Res* 412:1-5

* Arbeiten von Mitarbeitern der Abteilung Experimentelle Neurologie mit Relevanz zum vorliegenden Antrag

3.4 Eigene Vorarbeiten

Die Ergebnisse aus der laufenden Antragsphase sind im Arbeitsbericht ausführlich dargestellt.

3.4.1 Rolle von NO bei der Kalium-vermittelten Dilatation zerebraler Arterien

Wir konnten zeigen, daß Inward-Rectifier-Kalium-Kanäle (KIR) an der glatten Gefäßmuskelzelle durch Erhöhung der extraluminale K⁺-Konzentration auf Werte, die bei neuronaler Aktivierung gemessen werden, aktiviert werden und im Wesentlichen für die Vasodilatation verantwortlich gemacht werden können. Unsere Untersuchungen stützen daher die Hypothese, daß KIR bei der neurovaskulären Kopplung eine wichtige Rolle spielen. Funktionelle oder strukturelle Defekte von Inward-rectifier-Kalium-Kanälen könnten daher die Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und regionaler Blutflußerhöhung stören. Darüberhinaus zeigten unsere Untersuchungen, daß KIR-Kanäle auch noch bei hohen extrazellulären K⁺-Konzentrationen aktiviert werden und den überwiegend vasokonstriktiven Effekt hoher Kalium-Konzentrationen abschwächen.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß die Vasodilatation auf Kalium ab einer Konzentration von 40mM durch das NO / cGMP System modulatorisch beeinflusst wird.

Somit könnte Kalium, bei neuronaler Aktivität freigesetzt und bis 40 mM als Vasodilatator wirksam, eine echte Mediatorfunktion bei der neurovaskulären Kopplung innehaben, deren Vasodilatation über KIR vermittelt und durch NO moduliert wird (Manuskript in Vorbereitung).

3.4.2 Rolle von NO bei der Dilatation zerebraler Arterien auf extraluminale Azidose

Wie aus unseren Untersuchungen ersichtlich, führt NOS Inhibition im in vitro Modell der isolierten Zerebralarterie neben einer Abnahme des Ruhedurchmessers zu einer signifikanten Verringerung der Dilatation auf extraluminale Azidose. Die durch unspezifische wie auch spezifisch neuronale NOS Inhibition verursachte Abschwächung der Gefäßantwort auf Azidose wird durch Wiederherstellung des basalen NO / cGMP Spiegels unter fortdauernder Enzymblockade vollständig restituiert, nicht aber nach Zugabe der NO unabhängigen Dilatatoren Papaverin und Nimodipin. Mit diesen Befunden konnten wir die in vivo im Tierexperiment beschriebene permissive Rolle von NO bei der Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation (Lindauer et al., 1999) bestätigen. Diese modulatorische Rolle des NO ist somit auch unter in vitro Bedingungen losgelöst vom Parenchym gegeben. Das Endothel selbst spielt bei der Azidose-vermittelten Gefäßdilatation keine Rolle, wie unsere Untersuchungen an Arterien mit funktionell geschädigtem Endothel gezeigt haben. Mittels NADPH-Diaphorase Färbung der Gefäße und aufgrund der Ergebnisse aus Denervierungsexperimenten konnten wir ferner zeigen, daß die neuronale NOS, verantwortlich für den basalen NO Spiegel in der isolierten mittleren Zerebralarterie, in perivaskulären Nervendigungen in the Adventitia der Gefäße lokalisiert ist (Lindauer et al., 2001). Die modulatorische Wirkung des NO wird über die Bereitstellung eines basalen cGMP Spiegels in der glatten Gefäßmuskelzelle vermittelt.

Die Dilatation auf Azidose ist hauptsächlich auf eine sich ergänzende Aktivierung von ATP-abhängigen wie auch Ca²⁺-abhängigen Kalium-Kanälen zurückzuführen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, daß die im zerebralen Kortex unter physiologischen Bedingungen vorhandene basale Konzentration des Bioradikal's NO für den vasodilatatorischen Ruhetonus zerebraler Gefäße verantwortlich ist. Dieser basale NO Spiegel wirkt primär über eine basale Aktivität der löslichen Guanylatzyklase, die die Bereitstellung eines basalen cGMP Spiegels in der glatten Gefäßmuskelzelle vermittelt. Die neuronale Isoform der NOS, lokalisiert in perivaskulären Nervenendigungen extra- wie intrazerebralen Ursprungs ist verantwortlich für den basalen NO Spiegel im Gewebe, das Endothel spielt hierfür keine Rolle. Die vaskuläre Reaktivität auf eine Reihe von vasodilatatorischen Stimuli (funktionelle Aktivierung und systemische Hyperkapnie in vivo sowie extraluminale Azidose in vitro) wird im Sinne einer Modulation durch diese basalen NO / cGMP Konzentrationen permissiv beeinflusst.

3.4.3 Veränderung der Gefäßreaktivität nach Cortical Spreading Depression (CSD)

Es ist allgemein bekannt, daß nach CSD der regionale zerebrale Blutfluß unter Ruhebedingungen signifikant um ca. 15 % reduziert ist. Die Gefäßreaktivität auf Hyperkapnie ist während der ersten Stunde nach CSD deutlich abgeschwächt. Unsere Untersuchungen zeigten nun, daß Applikation von NO und cGMP sowie dem NO unabhängigen Vasodilatator Papaverin nach CSD zu physiologischem Blutflußanstieg führt. Es liegt somit keine generelle Vasoparalyse nach CSD vor. Wird der Ruhefluß nach CSD durch topische Applikation eines NO Donors oder des zellgängigen cGMP-Analogs 8-Bromo-cGMP auf sein Ausgangsniveau vor CSD angehoben, wird die Gefäßreaktivität auf Hyperkapnie vollständig restituiert. Nach Zugabe des NO unabhängigen Vasodilatators Papaverine allerdings unterbleibt diese Restitution. Kontinuierliche intravenöse Infusion des NOS Substrats L-Arginin bereits vor der CSD beschleunigt die Erholung des Ruheflusses sowie der Gefäßreaktivität auf Hyperkapnie, kann aber die Oligämie wie auch die Reduktion der Blutflußantwort auf Hyperkapnie direkt nach der CSD nicht verhindern.

Die Ergebnisse unserer Studien zeigten darnach, das eine Veränderung des essentiellen basalen NO / cGMP Spiegels unter pathophysiologischen Bedingungen für die neurovaskuläre Entkoppelung nach fokaler zerebraler Ischämie oder Cortical Spreading Depression (CSD) verantwortlich gemacht werden muß. Im Tierexperiment ist nach CSD die Blutflußantwort auf Hyperkapnie wie auch auf funktionelle Stimulation über Stunden signifikant reduziert. Aber auch der Ruhefluß nimmt in einer Größenordnung ab, wie es nach NOS Inhibition gezeigt wurde. Die Aktivität der cNOS ist allerdings nach CSD unverändert, sodaß wir von einer Verminderung des cGMP Spiegels selbst als Ursache der gestörten zerebrovaskulären Reaktivität nach CSD ausgehen (Matsuda et al., 2001). Weiterführenden Untersuchungen werden uns helfen, die Ursache für die Verminderung des cGMP Spiegels aufzuklären.

3.4.4 NO - abhängige Vasodilatation zerebraler Gefäße hypertensiver Ratten

Die arterielle Hypertension ist der wichtigste Risikofaktor beim Schlaganfall. Ein Verständnis der Veränderungen zerebrovaskulärer Reaktivitäten bei essentieller Hypertension ist daher von großer Bedeutung. Präparate der Arteria cerebri media aus kongenen hypertensiven Ratten ohne Schlaganfallprädisposition (gezüchtet und zur Verfügung gestellt durch Herrn Dr. Norbert Hübner, Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Ganten, MDC Berlin Buch) zeigen im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe (WKY-Stamm) keine Veränderung der Vasodilatation auf Erhöhung der extraluminale Kaliumkonzentration auf 20 mM bzw. auf extraluminale Azidose, die Endothel-vermittelte Vasodilatation auf Acetylcholin ist allerdings signifikant reduziert. Die unter unspezifischer NOS Blockade in der Gruppe der kongenen Tiere auftretende Vasokonstriktion unterscheidet sich nicht von der normotensiven Kontrollgruppe. Dieser Befund deutet auf einen gleichermaßen vorhandenen basalen NO Spiegel bei den hypertensiven Tieren hin. Nach unspezifischer NOS Blockade ist in der Kontrollgruppe der WKY Tiere, wie bereits für Ratten des Wistar-Stammes gezeigt, die Vasodilatation auf extraluminale Azidose deutlich abgeschwächt, die aus kongenen Tiere entnommen Arterien weisen allerdings einen abweichenden Befund auf: Hier führt die NOS Blockade zwar auch zu einer deutlichen Vasokonstriktion, die Vasodilatation auf extraluminale Azidose schein allerdings nur leicht abgeschwächt zu sein.

Zusammenfassend weisen unsere Untersuchungen an Zerebralarterien aus hypertensiven Tieren auf eine signifikant veränderte Gefäßreaktivität hin. Die endothelabhängige Vasodilatation ist deutlich vermindert, und physiologischerweise durch NO modulierte Reaktionen zeigen eine signifikant geringere

Beeinflussung durch den basal vorhandenen NO Spiegel. Die Ursache hierfür könnte in einem veränderten Gleichgewicht zwischen eNOS und nNOS begründet sein, deren Aufklärung Teil des vorliegenden Antrags darstellt.

3.4.5 Zusammenfassung

Zerebrale Gefäße verfügen über einen physiologischen, NO vermittelten vasodilatatorischen Tonus, der zu signifikantem Anteil über einen basalen cGMP-Spiegel in der glatten Gefäßmuskulatur verursacht wird. Unsere bisherigen Untersuchungen zeigen, daß dieser basale NO Spiegel im Gewebe funktionell von Bedeutung ist und primär durch die basale Aktivität neuronale NO Synthase perivaskulärer Neuronen bereitgestellt wird. So reguliert im Rahmen der neurovaskulären Kopplung im zerebralen Kortex das Bioradikal NO über die Produktion von cGMP die Bereitschaft der Gefäße zur Vasodilatation - die sogenannte 'Modulatorfunktion' des NO / cGMP Systems - es stellt selbst aber nicht den eigentlichen Mediator der Dilatation dar (Lindauer et al., 1999; Lindauer et al., 2001).

Literatur:

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug zum SFB (1998, 1999, 2000)

- Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U (1998): Perivascular nerves contribute to cortical spreading depression-associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* 274: H1979-H1987.
- Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1998): Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 978-990.
- Eder C, Klee R, Heinemann U (1998): Involvement of stretch-activated Cl⁻ channels in ramification of murine microglia. *J Neurosci* 18:7127-37.
- Klee R, Heinemann U, Eder C (1998): Changes in proton currents in murine microglia induced by cytoskeletal disruptive agents. *Neurosci Lett*. 247:191-4.
- Klee R, Heinemann U, Eder C (1999): Voltage-gated proton currents in microglia of distinct morphology and functional state. *Neuroscience* 91:1415-24.
- Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U (1999): Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol* 277: H799-H811.
- Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhüpl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000): Products of hemolysis in the subarachnoid space induce cortical spreading ischaemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage ? *J Neurosurg* 93: 658-666.
- Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2000) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol London* (in press).
- Lindauer U, Roysl G, Leithner C, Kuehl M, Gold L, Gethmann J, Kohl M, Villringer A, Dirnagl U (2001): No Evidence for Early Decrease in Blood Oxygenation in Rat Whisker Cortex in Response to Functional Activation. *NeuroImage* (in press)
- Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U (2001) The cerebrovascular response to elevated potassium – role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett* (in press)

Manuskripte in review:

- Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, Vogt J, Dreier JP, Dirnagl U (2001): Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arteriolar pH reactivity. *Am J Physiol* (in revision).
- Matsuda H, Scheckenbach K, Hirabayashi H, Dreier JP, Dirnagl U, Lindauer U (2001): Impaired cerebrovascular reactivity after cortical spreading depression in rats: role of nitric oxide. *J Cereb Blood Flow Metab* (in revision).

Übersichtsartikel und Buchbeiträge:

Dirnagl U, Lindauer U (1998): Microcirculatory disturbances in cerebral ischemia. In: Cerebrovascular disease: Pathophysiology, diagnosis, and management, ed: Ginsberg MD and Bogouslavsky J, Blackwell Science, Cambridge, p.343-357.

Dirnagl U, Obrig H, von Pannwitz W, Kohl M, Kerskens C, Döge C, Lindauer U, Wolf T, Villringer A (2000): Cerebral blood flow, hemoglobin oxygenation, and water diffusion changes during stroke: fingerprinting with near-infrared spectroscopy and MRI. In: Ischemic blood flow in the brain, ed: Fukuuchi Y, Tomita M, Koto A, Springer-Verlag, Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York, p.232-240

Lindauer U, Dirnagl U (2000): Metabolic and neural control of cerebral cortex blood flow in hypoxia and ischaemia. J Physiol London 523:S76.

Lindauer U, Dirnagl U (2000): Synaptic activity and regional blood flow: Physiology and metabolism. In: Pain Imaging, Progress in Pain Research and Management, Vol. 19, Chapter 2, ed.: Casey KL and Bushnell CM, IASP Press, Seattle, WA, USA, p. 32-45.

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)**3.5.1 Ziele**

Aus unseren Untersuchungen der laufenden Antragsperiode konnten wir herausarbeiten, daß in erster Linie die Typ I NO Synthase (nNOS) aus perivaskulären Nervenendigungen für den basalen NO / cGMP Spiegel und damit für eine optimale Funktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskelzelle von Bedeutung ist. Das Endothel selbst und die darin primär vorkommende endotheliale Isoform der NOS (Typ III, eNOS) ist hierbei von untergeordneter Bedeutung. Dieser Befund ist v.a. deshalb erstaunlich, da die morphologische Nachbarschaft von Endothelzelle und glatter Gefäßmuskelzelle einen gegenteiligen Befund vermuten ließ.

Die nun geplanten Untersuchungen sollen klären, inwieweit überhaupt eine Bedeutung der eNOS und des vom Endothel produzierten NO für die zerebrale Gefäßreaktivität vorliegt und ob eine Störung der eNOS Funktion im Rahmen der Gefäßreaktivität pathophysiologische Relevanz inne hat.

Folgende Hypothesen sollen nun im Rahmen des vorgeschlagenen Projektes auf ihre Gültigkeit hin überprüft werden:

1. Chronische Blockade der HMG-CoA Reduktase durch Statin-Behandlung führt zu signifikanter Erhöhung der Aktivität und Expression der eNOS im Gehirn der Ratte. Diese Expressions- und Aktivitätserhöhung führt zu verstärkter Dilatation zerebraler Arterien auf endothelabhängige Stimuli.

2. Die untergeordnete Rolle der eNOS bei einer Reihe von NO abhängigen vasodilatatorischen Stimuli ist auf den geringen Anteil der eNOS Aktivität an der Gesamtaktivität der cNOS unter physiologischen Bedingungen zurückzuführen. Die Lokalisation der eNOS im Endothel im Gegensatz zur perivaskulären Lokalisation der nNOS spielt dabei keine Rolle. Daher führt Erhöhung der eNOS Aktivität und Expression durch chronische Gabe von Statinen zu einer Beteiligung der eNOS an unter Normalbedingungen eNOS-unabhängigen / rein nNOS abhängigen vasodilatatorischen Stimuli im Gehirn. Therapeutische Erhöhung der eNOS Aktivität über Statin-Applikation könnte daher zu einer Verbesserung der unter pathophysiologischen Bedingungen (z.B. nach CSD) gestörten Vasoreaktivität nNOS abhängiger Stimuli führen.

3. Beendigung der Statin-Behandlung führt, wie im Experiment an der Maus gezeigt, zu kurzzeitig signifikant reduzierten Aktivitäts- und Expressionsdaten der eNOS. Wir wollen daher folgende Hypothesen überprüfen: Signifikante Reduktion der eNOS Aktivität- und Expression nach Absetzen der Statin-Behandlung führt zu stark verminderter vaskulärer Reaktivität auf endothelabhängige Stimuli. Unter physiologischen Bedingungen spezifisch nNOS abhängige Stimuli erfolgen hingegen wieder unverändert, da nach Absetzen der Statine und Verminderung der eNOS Aktivität die Bereitstellung des basalen NO Spiegels wieder alleinig über die nNOS erfolgt.

4. Spontan hypertensive Ratten zeigen eine reduzierte eNOS Aktivität, die durch chronische Blockade der HMG-CoA Reduktase durch Gabe von Statinen signifikant erhöht werden kann. Dies führt zu verbesserter zerebrovaskulärer Reaktivität.

5. Chronische Gabe von Statinen führt bei hypertensiven Ratten im Gegensatz zu reiner Blutdruck-Therapie zu signifikanter Verbesserung des klinischen Bildes nach experimentell ausgelöstem Schlaganfall und geht mit einer Reduktion des Schlaganfallvolumens einher.

3.5.2 Methoden

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 seitdem im Labor der experimentellen Neurologie in Verwendung (Lindauer, 1996).

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 das intraluminale und das extraluminale Kompartiment voneinander getrennt manipuliert werden kann.

Nach Dekapitation von zuvor mit Halothan anästhesierten 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 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 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.

Modell der fokalen zerebralen Ischämie der Ratte

Männliche Ratten (ca. 250g) werden mit Isofluran in Lachgas / Sauerstoff anästhesiert und die Schwanzarterie zur systemischen Blutdruckmessung und Überwachung der arteriellen Blutgase kanüliert. Die Körpertemperatur wird mittels einer rektal eingeführten Sonde gemessen und über ein Heizkissen im physiologischen Bereich konstant gehalten. Das fokale Ischämiemodell nach Brint et al. (Brint et al., 1988) wird wie folgt durchgeführt: Die rechte und linke A. carotis communis wird freigelegt und für die Ischämiedauer von 90 Minuten vorübergehend verschlossen. Die rechte A. cerebri media wird über ein ca 2mm großes Bohrloch (Zugang subtemporal) freigelegt, die Dura mater über dem Gefäß eingeritzt und ein über einen Mikromanipulator gesteuertes, 80 µm langes Stahlhäkchen direkt oberhalb der unteren Kortikalvene unter die Arterie geschoben. Durch vorsichtiges Anheben des Häkchens wird die Arterie für die Dauer von 90 Minuten verschlossen. Die Reperfusion erfolgt durch Entfernung des Häkchens und Öffnen der Carotiden. Dieses Modell führt zu reproduzierbaren neokortikalen Infarkten und ist seit Jahren im Labor der Experimentellen Neurologie etabliert (z.B. Harms et al., 2000; Lyons et al., 2000; Wiegand et al., 1999).

Das Ausmaß der fokalen Ischämie wird über Erfassen des klinischen Defizits sowie über quantitative Infarkt volumenanalyse beurteilt. Hierzu werden die Tiere 24 Stunden, 3 und 7 Tage nach Beginn der zerebralen Ischämie klinisch untersucht und das beobachtete Defizit in 4 Grade eingeteilt (die Tiere werden am Schwanz angehoben: Grad 0: kein Defizit zu beobachten; Grad 1: Flexion der Vorderpfote; Grad 2: Flexion der Vorderpfote und verringerter Widerstand bei seitlichem Druck; Grad 3: wie Grad 2 dazu kreisende Fortbewegung). Sieben Tage nach Beginn der zerebralen Ischämie werden die Tiere anästhesiert und dekapitiert. Das Gehirn wird rasch entnommen und in 2-Methylbutan bei -30°C tiefgefroren. Serielle Koronarschnitte (40 µm dick) werden im Abstand von 400 µm hergestellt, getrocknet und mit Vanadium-Säure-Fuchsin (Victorov et al., 2000) gefärbt. Mithilfe eines Bildverarbeitungsprogramms werden die Infarktgebiete an 30 – 35 Schnitten ausgemessen und die Volumina berechnet.

Laser-Doppler-Blutflußmessung in vivo

Zum Erfassen der Hyperkapnieantworten und Blutflußantworten auf cortical spreading depression (CSD) zur Untersuchung der Gefäßreaktivität in vivo werden männliche Ratten durch intraperitoneale Thiopental-Injektion anästhesiert, tracheotomiert, künstlich beatmet und die A. und V. femoralis kanüliert. Der parietale Schädelknochen wird freigelegt und ein geschlossenes kranielles Fenster implantiert (Dura mater entfernt zur topischen Applikation von Substanzen, Superfusion mit künstlichem Liquor). Zur Auslösung der CSD mittels Nadelstich wird eine weitere kleine Kraniotomie rostral des kranialen Fensters durchgeführt. Der regionale zerebrale Blutfluß wird mittels Laser-Doppler Methode gemessen (Dirnagl et al., 1989) und digital aufgezeichnet. Hyperkapnie wird durch Zufuhr von 5%igem CO₂ -Mischgas in die Einatemluft erzeugt und das Ausmaß der Hyperkapnie über Messung der arteriellen Blutgase kontrolliert.

HMG-CoA Reduktase Inhibition:

Atorvastatin der Firma BMS / Gödecke in einer Dosis von 1 mg bzw. 10 mg / kg / d bzw. gleiches Volumen des Vehikels werden über einen Zeitraum von 14 Tagen subcutan appliziert. Die Auswahl des Atorvastatins aus der Substanzklasse der Statine begründet sich auf dessen synthetischer Herstellung und der Eigenschaft, die Blut-Hirn-Schranke nicht penetrieren zu können (Furberg, 1999). Somit können direkte parenchymale Effekte des Statins in unseren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Lediglich in der frühen Phase der fokalen Ischämie, in der die Blut-Hirn-Schranke kurzzeitig gestört ist, ist mit einem Eintritt des Statins ins Parenchym zu rechnen.

NOS Aktivitätsmessung:

Bestimmung der cNOS Aktivität in Zerebralarterien, Aorta und zerebralem Kortex (eNOS und nNOS nicht unterscheidbar): Gewebeproben von Zerebralarterien, Aorta und zerebralem Kortex werden nach Dekapitation der Ratten rasch entnommen und gefroren. Die katalytische Aktivität der Ca²⁺-abhängigen NOS der entnommenen Probe wird im Citrullin-Konversionsassay radioaktiv durch Bestimmung der Menge an produziertem [¹⁴C]Citrullin aus [¹⁴C]Arginin erfasst (Huang et al., 1995). Im Rahmen der Untersuchungen zur Wirkung des Atorvastatins auf die Aktivität und Expression der eNOS besteht enge Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Endres, Neurologische Klinik der Charité, Berlin (steht als Berater dem Projekt ständig zur Verfügung) sowie mit Dr. Ulrich Laufs, Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg. Die Messung der NOS Aktivität wird im Labor von Dr. Laufs durchgeführt.

NOS Expressionsmessung mittels Real-Time reverser Transkriptions-PCR und Western Blot-Methode:

Bestimmung der Expression von nNOS und eNOS in Zerebralarterien, Aorta und zerebralem Kortex auf mRNA-Ebene: Gewebeproben von Zerebralarterien, Aorta und zerebralem Kortex werden nach Dekapitation der Ratten rasch entnommen. Sofort anschließend wird die Gesamt-RNA isoliert und die reverse Transkription gemäß Standard-Technik durchgeführt (Freyer et al. 1999). Die Quantifikation erfolgt mittels Real-Time-PCR unter Verwendung des Light-Cyclers und des FastStart-Kits der Firma Roche Molecular Biochemicals (Meuer et al., 2001). Primer-Paare für eNOS, nNOS und GAPDH (interner Standard für RNA-Präparation und cDNA-Synthese) werden entsprechend Endres et al. (1998) verwendet. Die Akkumulation der PCR-Amplifikate wird on-line gemessen, so daß eine präzise Quantifizierung während der exponentiellen Phase der Amplifikation möglich ist. Veränderungen der eNOS und nNOS mRNA Expression werden im Verhältnis zur Expression des „housekeeping genes“ GAPDH gemessen, wobei die GAPDH-Expression als konstant vorausgesetzt werden darf.

Bestimmung der Expression der endothelialen NOS auf Proteinebene wird mittels Western Blot Analyse aus Geweben der Aorta und Zerebralarterie bestimmt: Immunoblot-Methode unter Verwendung eines murinen monoklonalen Antikörpers gegen eNOS, Detektion mittels sekundärem Antikörper in Verbindung mit einem Chemilumineszenz-Verstärkungs-Kits.

Verfügbarkeit der Methoden und Techniken:

Alle genannten Modelle und Techniken sind im Labor der Experimentellen Neurologie etabliert bzw. werden in Kooperation mit Dr. Matthias Endres (Neurologische Klinik der Charité, Berlin) sowie mit Dr.

Ulrich Laufs (Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg) im Labor von Dr. Laufs durchgeführt (NOS Aktivitätsmessung).

Literatur:

- Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, 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 RM, Eichler MY, Swafford MW, Johnson TD, Suresh MS, Childres WF (1996) Stimulation of α_2 adrenoceptors dilates the rat middle cerebral artery. *Anesthesiology* 85:82-90
- Bryan RM, Steenberg ML, Eichler MY, Johnson TD, Swafford MW, Suresh MS (1995) Permissive role of NO in α_2 -adrenoreceptor-mediated dilations in rat cerebral arteries. *Am J Physiol* 269:H1171-H1174
- Carlberg M (1994) Assay of neuronal nitric oxide synthase by HPLC determination of citrulline. *J Neurosci Meth* 52:165-167
- Dacey RG, Duling BR (1982) A study of rat intracerebral arterioles: methods, morphology, and reactivity. *Am J Physiol* 243:H598-H606
- *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
- Duling BR, Rivers RJ (1986) Isolation, cannulation, and perfusion of microvessels. In: *Microcirculatory Technology* (Baker CH, Nastuk WL, eds), Orlando, Florida: Academic Press, INC., pp 265-280
- *Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8880-8885
- Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, Weih M, Angstwurm K, Docke W, Meisel A, Schumann RR, Schonfelder G, Dirnagl U, Weber JR (1999) Cerebral endothelial cells release TNF- α after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 163: 4308-4314.
- Furberg CD (1999) Natural statins and stroke risk. *Circulation* 99:185-188.
- *Harms H, Wiegand F, Megow D, Prass K, Einhaupl KM, Dirnagl U (2000) Acute treatment of hypertension increases infarct sizes in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport* 11:355-359
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-242
- *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, Megow D, Schultze J, Weber JR, Dirnagl U (1996) Nitric oxide synthase inhibition does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 216:207-210
- *Lyons SA, Pastor A, Ohlemeyer C, Kann O, Wiegand F, Prass K, Knapp F, Kettenmann H, Dirnagl U (2000) Distinct physiologic properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1537-1549
- Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (Eds) (2001) *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- *Victorov IV, Prass K, Dirnagl U (2000) Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res Protoc* 5:135-139
- *Wiegand F, Liao W, Busch C, Castell S, Knapp F, Lindauer U, Megow D, Meisel A, Redetzky A, Ruscher K, Trendelenburg G, Victorov I, Riepe M, Diener HC, Dirnagl U (1999) Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1229-1237

* Arbeiten von Mitarbeitern der Abteilung Experimentelle Neurologie

3.5.3 Arbeitsprogramm

Studie 1:

Untersuchungen zur Klärung der Hypothesen 1 und 2: Nachweis der eNOS Hochregulation unter Statin-Behandlung und Auswirkung auf endothelabhängige und endothelunabhängige Vasoreaktivität

Tierart und -stamm: Ratten, Wistar (Charles River Deutschland)

Behandlung der Tiere über 14 Tage mit 1 bzw. 10 mg / kg / d Atorvastatin s.c. bzw. Vehikel

- cNOS Aktivitätsmessung (n=3)
- eNOS / nNOS mRNA Bestimmung (n=3)
- eNOS Protein Bestimmung (n=3)
- jeweils aus Aorta, Arteria cerebri media und zerebralem Kortex:
- Atorvastatin-Gruppe niedrige Dosierung (n=9), Atorvastatin-Gruppe hohe Dosierung (n=9), Vehikel-Kontrollgruppe (n=9).
- Anhand der Ergebnisse zur eNOS Aktivität und Expression erfolgt die Auswahl der Atorvastatin-Dosis für alle weiteren Untersuchungen. Voraussichtlich wird mit der hohen Dosierung verfahren. Dies ist deshalb zu erwarten, da Tierspezies geringer Größe einen im Vergleich zum Menschen signifikant höheren metabolischen Grundumsatz aufweisen.

Behandlung der Tiere über 14 Tage mit 10 mg / kg / d Atorvastatin s.c. bzw. Vehikel

- Untersuchungen zur Reaktivität der isolierten Arteria cerebri media: Azidosereaktivität, Kalium-Reaktivität, Autoregulation und endothelabhängige Reaktivität; Atorvastatin-Gruppe (n=15), Vehikel-Kontrollgruppe (n=15).
- Untersuchungen zur Reaktivität zerebraler Zirkulation in vivo (Laser-Doppler Blutflußmessung): Reaktivität auf systemische Hyperkapnie und Acetylcholin (topische Applikation), Reaktivität auf CSD; Atorvastatin-Gruppe (n=5), Vehikel-Kontrollgruppe (n=5).

Behandlung der Tiere über 14 Tage mit 10 mg / kg / d Atorvastatin s.c., an den letzten 3 Tagen zusätzlich AP-CAV mit 1 mg / kg / d i.p. zur spezifischen eNOS Inhibition (caveolin-1 scaffolding domain, spezifischer eNOS Inhibitor (Bucci et al., 2000)):

- Untersuchung der Reaktivität der isolierten Arteria cerebri media (n=5) unter spezifischer eNOS Inhibition nach Statin-Hochregulation. Parallel zu den eNOS-Inhibitor-Experimenten an der Ratte sind Untersuchungen der zerebralen Gefäßreaktivität an isolierten Zerebralarterien von eNOS(-/-) Mäusen nach Statin-Behandlung geplant, um die spezifische, eNOS vermittelte Wirkung der Statin-Behandlung von eNOS unabhängigen Wirkungen abgrenzen zu können. Der Stamm der eNOS (-/-) ist bereits in der Tierhaltung der Experimentellen Neurologie verfügbar. Hierzu werden ausgewählte, nach Statin-Behandlung an der Ratte veränderte Gefäßreaktivitäten an Statin-behandelten eNOS (-/-) Mäusen überprüft (voraussichtlicher Tierbedarf: n=9 eNOS (-/-) nach Statin-Behandlung sowie n=9 eNOS (+/+) (Wildtyp) nach Statin-Behandlung).

Gesamt sind in dieser Studie n=72 Versuche an Wistar Ratten geplant. Zusätzlich sind n=18 Versuche an eNOS (-/-) und eNOS (+/+) Mäusen geplant. Bei einer durchschnittlichen Ausfallsrate von 10 % ergibt sich in dieser Studie ein Bedarf an Ratten von n=80 und an Mäusen von n=20.

Studie 2:

Untersuchungen zur Klärung der Hypothese 3: Veränderung der eNOS Aktivität nach Absetzen der Statin-Behandlung

Tierart und -stamm: Ratten, Wistar (Charles River Deutschland)

Behandlung der Tiere über 14 Tage mit 10 mg / kg / d Atorvastatin s.c. bzw. Vehikel, danach Absetzen bis Tag 4

- cNOS Aktivitätsmessung (n=3)
- eNOS / nNOS mRNA Bestimmung (n=3)
- eNOS Protein Bestimmung (n=3)
- aus Aorta, Arteria cerebri media und zerebralem Kortex;
- Tag 2 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (erwartete niedrigste eNOS Aktivität) (n=9), Tag 4 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (eNOS Aktivität wieder auf Ausgangsniveau zurückgekehrt), (n=9).
- Als Vehikelkontrolle dienen die Messungen der Studie 1.

- Untersuchungen zur Reaktivität der isolierten Arteria cerebri media: Azidosereaktivität, Kalium-Reaktivität, Autoregulation und endothelabhängige Reaktivität; Tag 2 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (erwartete niedrigste eNOS Aktivität) (n=15), Tag 4 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (eNOS Aktivität wieder auf Ausgangsniveau zurückgekehrt) (n=15).
Als Vehikelkontrolle dienen die Untersuchungen der Studie 1.
- Untersuchungen zur Reaktivität zerebraler Zirkulation in vivo (Laser-Doppler Blutflußmessung): Reaktivität auf systemische Hyperkapnie und Acetylcholin (topische Applikation), Reaktivität auf CSD; Tag 2 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (erwartete niedrigste eNOS Aktivität) (n=5) Tag 4 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (eNOS Aktivität wieder auf Ausgangsniveau zurückgekehrt) (n=5).
Als Vehikelkontrolle dienen die Untersuchungen der Studie 1.

Gesamt sind in dieser Studie n=58 Versuche an Wistar Ratten geplant, bei einer durchschnittlichen Ausfallsrate von 10 % ergibt sich ein Bedarf an Tieren in dieser Studie von n=65.

Studie 3:

Untersuchungen zur Klärung der Hypothese 4: Bei spontan hypertensiven Tieren findet sich eine Reduktion der eNOS Aktivität mit reduzierter Gefäßreaktivität, nach Statin-Behandlung erfolgt auch hier eNOS Hochregulation, die mit verbesserter zerebrovaskulärer Reaktivität einhergeht.

Tierart und -stamm: Ratten, SHR-SP sowie WKY (Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, MDC, Berlin-Buch, Dr. Ganten bzw. über Kooperation mit TP A8 Prof. Unger, Dr. Blume, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité)

Behandlung der Tiere über 14 Tage mit 10 mg / kg / d Atorvastatin s.c. bzw. Vehikel

- eNOS Aktivitätsmessung (n=3)
eNOS / nNOS mRNA Bestimmung (n=3)
aus Aorta, Arteria cerebri media und zerebralem Kortex;
SHR-SP Atorvastatin-Gruppe (n=6), Vehikel-Kontrollgruppe (n=6)
WKY Atorvastatin-Gruppe (n=6), Vehikel-Kontrollgruppe (n=6)
Auf die Bestimmung der eNOS auf Proteinebene wird verzichtet.
- Untersuchungen zur Reaktivität der isolierten Arteria cerebri media: Azidosereaktivität, Kalium-Reaktivität, Autoregulation und endothelabhängige Reaktivität; SHR-SP Atorvastatin-Gruppe (n=15), Vehikel-Kontrollgruppe (n=15)
WKY-0 Atorvastatin-Gruppe (n=15), Vehikel-Kontrollgruppe (n=15).
- Untersuchungen zur Reaktivität zerebraler Zirkulation in vivo (Laser-Doppler Blutflußmessung): Reaktivität auf systemische Hyperkapnie, Acetylcholin (topische Applikation) und CSD; SHR-SP Atorvastatin-Gruppe (n=5), Vehikel-Kontrollgruppe (n=5)
WKY Atorvastatin-Gruppe (n=5), Vehikel-Kontrollgruppe (n=5).
- Untersuchungen zur Reaktivität der isolierten Arteria cerebri media nach Absetzen der Statin-Behandlung: Azidosereaktivität, Autoregulation und endothelabhängige Reaktivität; Tag 2 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (erwartete niedrigste eNOS Aktivität): SHR-SP Atorvastatin-Gruppe (n=15), WKY Atorvastatin-Gruppe (n=15).
Als Vehikelkontrolle dienen die Untersuchungen der Studie 14-Tage Vehikel-Behandlung.
- Untersuchungen zur Reaktivität zerebraler Zirkulation in vivo (Laser-Doppler Blutflußmessung) nach Absetzen der Statin-Behandlung: Tag 2 nach Beendigung der Atorvastatin-Behandlung (erwartete niedrigste eNOS Aktivität): Reaktivität auf systemische Hyperkapnie, Acetylcholin (topische Applikation) und CSD; SHR-SP Atorvastatin-Gruppe (n=5), WKY Atorvastatin-Gruppe (n=5).
Als Vehikelkontrolle dienen die Untersuchungen der Studie 14-Tage Vehikel-Behandlung.

Gesamt sind in dieser Studie n=72 Versuche an SHR-SP Ratten und n=72 Versuche an WKY Ratten geplant, bei einer durchschnittlichen Ausfallsrate von 10 % ergibt sich ein Bedarf an Tieren in dieser Studie von n=80 des Stammes SHR-SP und n=80 des Stammes WKY.

Studie 4:

Untersuchungen zur Klärung der Hypothese 5: Unter Statin-Behandlung kommt es zu einer Verminderung des klinischen Defizits nach fokaler zerebraler Ischämie und zu einer Reduktion des Schlaganfallvolumens bei spontan hypertensiven Tieren.

Tierart und -stamm: Ratten, SHR-SP (Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, MDC, Berlin-Buch, Dr. Ganten bzw. über Kooperation mit TP A8 Prof. Unger, Dr. Blume, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité)

Behandlung der Tiere über 21 Tage mit 10 mg / kg / d Atorvastatin s.c. bzw. Vehikel

- Experimentelle fokale zerebrale Ischämie (Häkchenmodell) an Tag 14 nach Statin-Behandlungsbeginn, Untersuchung des klinischen Defizits an Tag 1, 3 und 7 nach Schlaganfall sowie Infarktvolumenbestimmung an Tag 7 nach Auslösen der fokalen Ischämie (=Tag 21 der Statin-Behandlung)
SHR-SP Atorvastatin-Gruppe (n=10), Vehikel-Kontrollgruppe (n=10).
- Experimentelle fokale zerebrale Ischämie (Häkchenmodell) an Tag 14 nach Statin-Behandlungsbeginn, Messen des regionalen zerebralen Blutflusses mittels Laser-Doppler Blutflußmessung vor, während und bis zu 4 Stunden nach Beginn der fokalen Ischämie in Narkose (Akutversuche), dabei Klärung, ob Statin-Behandlung zu einer Verbesserung der zerebralen Perfusion während der Ischämie und in der frühen Reperfusionphase führt;
SHR-SP Atorvastatin-Gruppe (n=8), Vehikel-Kontrollgruppe (n=8).

Gesamt sind in dieser Studie n=36 Versuche an SHR-SP Ratten geplant, bei einer durchschnittlichen Ausfallsrate von 10 % ergibt sich ein Bedarf an Tieren in dieser Studie von n=40 des Stammes SHR-SP.

Literatur:

Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6:1362-1367

3.5.4 Zeitplan

Alle beschriebenen Modelle und Methoden sind im Labor der experimentellen Neurologie etabliert bzw. werden durch die Kooperation mit Dr. Ulrich Laufs, Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg bereitgestellt. Ein sofortiger Beginn der Untersuchungen ist somit gewährleistet.

Die Studien 1 und 2 werden parallel durchgeführt, ein Zeitraum von 1 bis 1,5 Jahren ist geplant. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen an Wistar-Ratten erfolgt das genaue Design der Untersuchungen an SHR-SP Tieren im Vergleich zum normotensiven Referenzstamm WKY aus Studie 3 und 4. Diese Studien werden schwerpunktmässig in der zweiten Hälfte der Antragsphase durchgeführt.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Das vorliegende Projekt steht auch weiterhin, wie bereits in der laufenden Antragsphase gezeigt, in engem methodischen und inhaltlichen Zusammenhang zum Projekt A1 Dreier / Einhäupl. Während sich das Projekt A1 zunächst allgemein mit den Mediatoren der Blutflußantwort auf CSD befaßt hat, steht seit der laufenden Antragsphase das Phänomen der sogenannten "spreading ischaemia", das 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), im Zentrum der Untersuchungen. So wird z.B. zur Zeit in enger inhaltlicher Zusammenarbeit im Modell der isolierten Zerebral-Arterie untersucht, inwieweit eine pharmakologische Inhibition der Na⁺-K⁺-ATP-ase unter NOS Blockade zu einer Verstärkung der Vasokonstriktion während erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration führt. Diese Befunde sind von großer Bedeutung für das bessere Verständnis und die sichere mechanistische Abtrennung parenchymaler von rein vaskulären Aspekten bei der in vivo ablaufenden "spreading ischaemia".

Verbindung zum neu beantragten Projekt: Auch im Rahmen des verzögerten Vasospasmus nach SAB dürfte sich eine eNOS Hochregulation mit nachfolgender Verbesserung der zerebrovaskulären Reaktivität unter Statin-Behandlung therapeutisch sinnvoll auswirken. Daneben werden aber auch grundlegende Mechanismen zur Frage der Rolle der eNOS im Rahmen der zerebrovaskulären Reaktivität in

vorliegendem Projekt untersucht, die auch zu einem besseren Verständnis der Vorgänge während und nach "spreading ischaemia" führen dürften. Durch die Gleichartigkeit der zu untersuchenden Mediatoren und Modulatoren ergeben sich hierdurch weiterhin interessante Anknüpfungspunkte.

Enge inhaltliche Kooperation besteht auch im Rahmen der neurovaskulären Kopplung mit dem Projekt A5 Dirnagl bezüglich der Rolle perivaskulärer, GFP exprimierender Zellen in Knochenmarkschimären und in transgenen Mäusen, die β -actin-gekoppelt GFP exprimieren. Hierbei steht die Frage nach einer aktiven Regulation im Bereich des Kapillarbetts selbst im Zentrum unseres Interesses. Perizyten, die perivaskulär angesiedelt in engem Kontakt zu kortikalen Kapillaren stehen und über glatten Gefäßmuskelzellen vergleichbare kontraktile Elemente verfügen, könnten dabei eine wesentliche Rolle spielen. Im Rahmen dieser gemeinsamen Untersuchungen versuchen wir, vaskuläre Antworten auf Vasodilatoren und Konstriktoren auf der Ebene von Arteriolen und Kapillaren darzustellen und dabei gleichzeitig eine aktive Beteiligung der Perizyten nachzuweisen. Diese Experimente werden an vitalen Hirnschnitten der Maus unter Einsatz konventioneller Laser Scanning Mikroskopie und des Zweiphotonen Laser Scanning Mikroskops durchgeführt. Die hohe Eindringtiefe bei deutlich reduzierter Schadensentwicklung durch die Nutzung der Zweiphotonen-Technologie ist für diese Untersuchungen von herausragendem Vorteil.

Im Rahmen der pathophysiologischen Fragestellungen zur vaskulären Reaktion unter bakterieller Meningitis im bisherigen Projekt B6 Weber sind ebenfalls inhaltliche Gemeinsamkeiten sowohl unter Beachtung der Hyperämie als auch der verzögerten Ischämien während und nach bakterieller Meningitis zu sehen.

Weiterhin ist eine Zusammenarbeit mit dem in der Gruppe A neu integrierten Projekt A8 von Herrn Prof. Unger und Frau Dr. Blume (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité) zu erwarten, das sich schwerpunktmäßig mit den über AT1- und AT2-Rezeptoren vermittelten Wirkungen von Angiotensin II beim ischämischen Insult des Gehirns beschäftigt. Genetisch hypertensive Ratten verfügen über ein hochreguliertes Renin-Angiotensin-System, welches auch den zerebralen Blutfluß und die zerebrovaskuläre Reaktivität während eines Schlaganfallgeschehens beeinflusst (Nishimura Y et al., 2000, Stroke31:2478-86), da Angiotensin-Rezeptoren auch auf zerebralen Gefäßen exprimiert werden. Inwieweit diese Beeinflussung aber rein vaskulären oder auch parenchymalen Ursprungs ist, ist bisher nicht geklärt. Hierbei kann der Einsatz unseres isolierten Arterienmodells wichtige Hinweise liefern. Darüberhinaus besteht nach Umzug des Labors von Herrn Prof. Unger und Frau Dr. Blume auch die Möglichkeit, Ratten des Stammes SHR-SP und WKY aus deren Tierhaltung zu beziehen, was aufgrund der größeren räumlichen Nähe im Vergleich zum Bezug der Tiere vom MDC Berlin-Buch von großem Vorteil ist.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
	IIa/2	1	39600	Vb	1	67200	Vb	1	67200	Vb	1	67200
	zus.:	1	39600	zus.:	1	67200	zus.:	1	67200	zus.:	1	67200
SV			Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		
			522	20700	522	20700	522	20700	522	20700		
I			Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.					
			-		-		-					

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1. Lindauer Ute Dr. med. vet. 2. Endres Matthias Dr. med. 3. Megow Dirk Dr. rer. nat.	1. Experimentelle Neurologie 2. Neurologie 3. Experimentelle Neurologie	1. Abteilung Experimentelle Neurologie der Neurologischen Klinik 2. Neurologische Klinik 3. Abteilung Experimentelle Neurologie der Neurologischen Klinik	1. 15 Std / Woche 2. B 3. 3 Std / Woche	1. 1998 2. ab 2002 3. ab 2002	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	4. Muselmann Claudia (MTA)		4. Abteilung Experimentelle Neurologie der Neurologischen Klinik	4. 5 Std / Woche	4. ab 2002	
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	-	-	-	-	-	-
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	1. Foddis Marco (MTA)		1. Abteilung Experimentelle Neurologie der Neurologischen Klinik	1. 40 Std / Woche	1. ab 2002	1. Vb

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit X gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

1. Ute Lindauer, Dr.med.vet., Projektleiterin:

Frau Lindauer ist als Projektleiterin verantwortlich für die Planung und Leitung aller Arbeiten tätig, daneben führt sie selbst Experimente durch. Die technische und inhaltliche Betreuung der / des MTA sowie von Medizinstudenten zur Durchführung einer Dissertation stellt einen weiteren Aufgabenbereich dar. Im Rahmen dieses Projektes wird besonders Wert gelegt auf die experimentelle und wissenschaftliche Ausbildung von Medizinstudenten als Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses. Frau Lindauer steht für 15 Wochenstunden dem Projekt als Leiterin zur Verfügung. Weiterhin steht sie dem Projekt sowie allen weiteren Projekten des SFB, die die Tierhaltung der Experimentellen Neurologie nutzen, durch ihre Funktion als Leiterin der Tierhaltung mit 5 Wochenstunden zur Verfügung. Frau Lindauer ist darüberhinaus mit der organisatorischen und inhaltlichen Leitung der AG Neurovaskuläre Kopplung der Abtlg Experimentelle Neurologie und der Durchführung von Seminaren und Vorlesungen zur Pathophysiologie im Fach Neurologie betraut und in weitere Projekte eingebunden (Klinische Forschergruppe Prof. Villringer, Projekt 1B).

2. Matthias Endres, Dr.med., Berater:

Herr Endres wird neben seiner klinischen Tätigkeit und neben eigener wissenschaftlicher Arbeit dem Projekt als ständiger Berater zur Verfügung stehen. Herr Endres hat in Kooperation mit Herrn Dr. Ulrich Laufs (Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg) einen wesentlichen Anteil an der Erforschung der Wirkung der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren auf die NOS inne und wird mit seiner langjährigen experimentellen Erfahrung wichtigen inhaltlichen Beitrag zum Projekt leisten. Herr Endres befindet sich kurz vor dem Abschluß seiner Facharztausbildung und strebt die Habilitation für das Fach Experimentelle Neurologie / Neurologie an.

3. Dirk Megow, Dr. rer. nat., Mitarbeiter:

Herr Megow ist der Leiter der AG Biochemie der Abtlg Experimentelle Neurologie und mit allen biochemischen sowie einer Vielzahl von molekularbiologischen Techniken vertraut. Er wird im Rahmen der geplanten biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen (NOS PCR und Westernblotting) im Projekt mitarbeiten.

4. Claudia Muselmann, MTA:

Frau Muselmann ist eine erfahrene MTA und ist mit allen benötigten Techniken der Molekularbiologie und Biochemie des vorliegenden Antrags gründlich vertraut. Frau Muselmann wird mit begrenztem Zeitaufwand dem Projekt durch eigene Arbeit und durch technische Einarbeitung von Medizinstudenten im Rahmen der Dissertation zur Verfügung stehen.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

1. Marco Foddis, MTA:

Herr Foddis ist seit Februar 2000 in der Abtlg Experimentelle Neurologie im Rahmen eines anderen Drittmittelprojektes als MTA tätig, das zum 30.11.2001 beendet sein wird. Danach ist die Übernahme von Herrn Foddis in vorliegendes Projekt geplant.

Die Durchführung der Experimente im vorliegenden Projekt erfordert die kontinuierliche Mitarbeit einer/s medizinisch-technischen Assistentin/en. Die Zahl der geplanten Versuche in den einzelnen Studien sowie die Dauer der Einzelversuche, die einen vollen Arbeitstag beanspruchen, machen eine Vollzeitstelle notwendig. Da es sich um anspruchsvolle in vitro- Experimente sowie um verantwortungsvolle Experimente am narkotisierten Tier mit vorausgehender und nachfolgender Behandlung der Tiere handelt, können diese nur von einer / einem erfahrenen MTA durchgeführt werden. Deshalb wird die Eingruppierung in BAT Vb als zwingend notwendig angesehen. Die technische Anleitung und Betreuung von Studenten der Medizin, die im Rahmen des Projektes ihre Dissertation vornehmen werden, ist durch eine / einen erfahrene/n MTA gewährleistet, die inhaltliche und wissenschaftliche Betreuung wird von der Projektleiterin vorgenommen.

Herr Foddis hat sich als überdurchschnittlich engagiert und zuverlässig erwiesen. Aufgrund seiner Eigenständigkeit, seines manuellen Geschicks und aufgrund seines überdurchschnittlichen

physiologischen Grundwissens und seiner Fähigkeit, sein Wissen auch anderen zu vermitteln, ist er für die Tätigkeiten in vorliegendem Projekt optimal geeignet.

Mit Wegfall der elektrophysiologischen Ausrichtung des Projektes (zuvor Projekt A6 gemeinsam mit Dr. Rolf Klee) wird eine wissenschaftliche Ausbildung der Mitarbeiterin / des Mitarbeiters nicht mehr als notwendig angesehen. Die gründliche Bearbeitung der große Anzahl der Einzelexperimente ist mit der Hälfte der regulären Wochenstundenzahl aber nicht zu gewährleisten. Deshalb wird die Finanzierung eines nichtwissenschaftlichen Mitarbeiters als Vollzeitstelle beantragt.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	6000	6000	6000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	20700	20700	20700

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Kostenart 522 jeweils für Haushaltsjahr 2002, 2003 und 2004 identisch anzusetzen

- | | | |
|--|----|------|
| 1. Versuchstiere: Kosten gesamt: DM 16175,50 in 3 Jahren | DM | 5400 |
| für das gesamte Projekt sind geplant: | | |
| <u>Wistar-Ratten</u> n=145, Preis pro Tier 200 g KGW DM 30.- (Lieferant: Charles River Deutschland, inkl. MWSt, Transport, Transportkäfig) = DM 4350.-, dazu Haltung der Tiere für 2,5 Wochen in der abteilungseigenen Tierhaltung, Preis pro Tier und Woche DM 2,20 = DM 797,50; gesamt DM 5147,50 | | |
| <u>SHR-SP bzw. WKY-Ratten</u> n=200, Preis pro Tier 3 Wo alt DM 30.- (Lieferant: Dr. Ganten, MDC Berlin) = DM 6000.-, dazu Aufzucht 8 Wochen bis KGW 200g und Haltung der Tiere während des Experiments für 2,5 Wochen bzw. 3,5 Wochen in der abteilungseigenen Tierhaltung, Preis pro Tier und Woche DM 2,20 = DM 4708.-; gesamt DM 10708.- | | |
| <u>Mäuse eNOS (-/-), (+/+)</u> n=20, eigene Zucht, Aufzuchtskosten pro Tier 14.- DM = DM 280.-, dazu Haltung der Tiere für 2,5 Wochen im Experiment in der Abteilungseigenen Tierhaltung, Preis pro Tier und Woche DM 0,80 = DM 40.-; gesamt DM 320.- | | |
| 2. Chemikalien für MOPS-Puffer, Schlauchmaterial, Vasoaktive Chemikalien | | 5000 |
| Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien zur Durchführung des Modells der isolierten Arterie | | |
| 3. Chemikalien für NOS PCR und Proteinbestimmung | | 4000 |
| Hierbei handelt es sich um teure Verbrauchsmaterialien zur Durchführung oben genannter molekularbiologischer und biochemischer Nachweismethoden | | |
| 4. Injektionsnarkotika, Nahtmaterialien, Knochenwachs, Paladur, | | 4000 |

Verbrauchsmaterialien zur Blutgasanalyse für die geplanten Experimente in vivo	
5. Sondergase zur Inhalationsnarkose und zur Begasung des künstlichen Liquors für die geplanten Experimente in vivo	1300
6. Laser Doppler Flow-Sonde	1000
Es werden für die Blutflußmessung in den geplanten Experimenten in vivo für den gesamten Zeitraum von 3 Jahren voraussichtlich 2 Sonden àDM 1500.- (gesamt DM 3000.-) benötigt, da auch bei sorgfältiger Behandlung die Lebensdauer begrenzt ist.	
Summe Verbrauchsmittel pro Jahr:	20700

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

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A7

3.1.1 Thema:

Rolle der Microglia im Eisenstoffwechsel des Gehirns - Schädigung Eisen bindender Proteine bei hypoxischer und radikalischer Belastung

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neurobiologie
Biochemie und Molekularbiologie

3.1.3 Leiter:

PD Dr. Tilman Grune, 15.10.1962
Neurowissenschaftliches Forschungszentrum
Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation
Medizinische Fakultät (Charité)
Humboldt-Universität zu Berlin
Schumannstr. 20/21
10098 Berlin
Telefon: (030) 2802 3120
FAX: (030) 2802 3190
E-mail: tilman.grune@charite.de

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

ja, befristet bis zum 30. 09. 2003

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

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

- Untersuchungen am Menschen nein
 - klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie nein
 - Tierversuche ja
- Genehmigung bei der Behörde:
Reg 0213/00
Tiergattung: Nager (Ratte)
- gentechnologische Untersuchungen ja
- Genehmigung bei der Behörde:
VE 12-540/96 (Änderung: 14.11.2000)

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
bis 1998	19,8	14,0 + 17,8	-	51,6
1999	40,8	22,0	-	62,8
2000	42,0	22,0	-	64,0
2001	42,0	14,6	-	56,6
Zwischen-summe	144,6	90,4	-	235,0
2002	77,0	24,0 + 5,0	52,9	158,9
2003	77,0	24,0	-	101,0
2004	77,0	24,0	-	101,0

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Das Gehirn ist ein Organ mit hohem Eisenbedarf und -gehalt. Die neuronalen und nichtneuronalen Zellen des Gehirns verfügen einerseits aufgrund der Notwendigkeit von Eisen für die normale Stoffwechselfunktion des Gehirns und andererseits wegen der Toxizität freien Eisens über einen Proteinapparat, der die Zellen mit ausreichend Eisen versorgt und die Toxizität weitestgehend eindämmt. Die Freisetzung von Eisen und die Umverteilung zwischen den verschiedenen Eisenpools ist in der Pathophysiologie hypoxischer Zustände beschrieben.

Eine zentrale Rolle in der Regulation des Gesamteisenstoffwechsels des Gehirns spielt die Microglia, die wesentlich an der Aufnahme und Speicherung extrazellulären Eisens beteiligt ist. Um die Funktion der Aufnahme und der Speicherung von freierwirdendem Eisen zu erfüllen, wird in diesen Zellen der Transferrinrezeptor und das Ferritin reguliert. Es ist nicht völlig geklärt, wie eine Induktion beider Proteine erfolgt. Die Regulation beider Proteine auf Translationsebene (durch die IRP-1 und IRP-2 Moleküle) ist normalerweise gegenläufig. In microglialen Zellen wird der Transferrinrezeptor und Ferritin oft parallel reguliert. Die Mechanismen dieser gleichläufigen Regulation sind unklar und sollen im beantragten Projekt untersucht werden.

In der vorherigen Antragsperiode konnte gezeigt werden, dass Ferritin während oxidativer Schädigung Eisen freisetzt und anschliessend durch das Proteasom abgebaut wird. Es konnte gezeigt werden, dass intakte Microglia in der Lage ist, Ferritin bei oxidativem Stress zu induzieren. In einer Reihe von Pathologien unterliegt die Microglia aber als gewebeständige Zellpopulation ebenfalls einer Schädigung. So ist bei Hypoxie und Reoxygenierung eine energetische und oxidative Beeinflussung des microglialen Stoffwechsels zu erwarten. So soll in diesem Projekt die Eisen bindende Kapazität der Microglia bei Hypoxie und Reoxygenierung untersucht werden. Dabei werden vor allem das Ferritin und der Transferrin-Rezeptor untersucht, die für die Eisenspeicherung und Eisenaufnahme verantwortlich sind. Ob diese Regulation über IRP-1, IRP-2 oder auf mRNA-Ebene erfolgt bzw. auf einer Kombination dieser Mechanismen beruht, soll im weiteren geklärt werden.

Im letzten Teil des Projektes soll überprüft werden, in wie weit die Microglia die Funktion der Eisenregulation auch im hypoxischen Gewebeverband einnimmt. Dazu werden in Kooperation mit anderen Gruppen des SFB Versuche in Gewebeschnitten und im Ganztier durchgeführt.

Somit werden Ferritin und der Transferrinrezeptor auf Funktions-, Protein- und RNA-Ebene untersucht. Durch die hypoxische Belastung soll überprüft werden, in wie weit die Microglia in der Lage ist, unter pathologischen Bedingungen die Eisenhomöostase aufrecht zu erhalten.

3.3 Stand der Forschung

Grundlegende und neue Erkenntnisse über die Regulation des Eisenstoffwechsels

Das Gehirn benötigt eine ständige Zufuhr von Eisen, aber Eisen ist in seiner freien Form toxisch. Aus diesem Grunde hat sich im Laufe der Evolution ein Apparat herausgebildet, der Eisen in bioverfügbarem Zustand hält, jedoch die Toxizität dieses Elements weitgehend einschränkt.

Der wesentliche intrazelluläre Eisenspeicher ist das Ferritin. Die Aufnahme von Eisen in die Zelle erfolgt hauptsächlich über Transferrin-Bindung und den Transferrin-Rezeptor (TfR). Eine zentrale Rolle in der intrazellulären Regulation der Proteine des Eisenstoffwechsels spielen die IRPs (iron regulatory proteins) IRP-1 und IRP-2. Bei Eisenmangel sind diese in der Lage, an ein "iron-responsive element" (IRE) einiger mRNAs zu binden und die Translation zu inhibieren bzw. zu verstärken.

IRP-1 ist ein relativ stabiles Protein, über dessen Abbau nichts bekannt ist. Es ist scheinbar nicht essentiell, da Zelllinien ohne IRP-1 existieren [Schalinske et al., 1997]. IRP-1 kann auch durch NO aktiviert werden. Oxidativer Stress dagegen scheint eine Oxidation der cytosolischen Aconitase/IRP-1 hervorzurufen, die zu keinem funktionierenden Enzym führt [Cairo und Pietrangelo, 2000], sondern Formen erzeugt, die durch das Proteasom abgebaut werden [Grune et al., 1998]. Dies konnte von uns in der vergangenen Antragsperiode gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu scheint das IRP-2 anders und unabhängig reguliert zu sein [Cairo und Pietrangelo, 2000]. Die Stabilität des IRP-2 wird im wesentlichen über das Proteasom-Ubiquitin-System reguliert; damit ist seine Halbwertszeit begrenzt [Iwai et al., 1998; Cairo und Pietrangelo, 2000]. Somit scheint die Präsenz des IRP-2 entscheidend für seine Bindung an das IRE zu sein. Für das IRP-2 wurde ebenfalls eine Fe-katalysierte Oxidierbarkeit nachgewiesen [Iwai et al., 1998].

Neben diesen Translationsregulationsmöglichkeiten gibt es scheinbar noch eine Regulation auf mRNA-Ebene über die noch wenig bekannt ist.

Oxidativer Stress und Regulation des Eisenstoffwechsels in Makrophagen und Microglia

Wie das Eisen regulierende System der Makrophagen auf oxidativen Stress, eine Zellaktivierung bzw. auf eine Eisenbelastung unter hypoxischen Bedingungen reagiert, ist bislang wenig geklärt.

IRP-1 und IRP-2 werden unterschiedlich reguliert [Schalinske et al., 1997; Pantopoulos et al., 1995] und binden verschiedene IREs mit unterschiedlicher Affinität [Menotti et al. 1998; Cairo und Pietrangelo, 2000]. Im Kontrast zu anderen Zelltypen erzeugen erhöhte Eisenkonzentrationen in Makrophagen einen Anstieg der TfR-mRNA und des TfR-Proteins. Der Mechanismus hierfür ist ungeklärt, obwohl es Hinweise auf eine Regulation auf Translationsebene gibt.

Die Aktivierung von Makrophagen scheint von einer Aktivierung von IRP-1 und einer Inaktivierung von IRP-2 begleitet zu sein [Ponka und Lok, 1999]. Dies geht einher mit einer Down-Regulation des TfR. Unterschiedliche Gruppen verweisen hier aber auf verschiedene Ergebnisse. Nicht unwesentlich scheinen die Effekte des gebildeten NO und der evtl. exprimierten Hämoxygenase-1 [Carraway et al., 1998].

Aufgrund der hohen Konzentration des Katalysators Eisen in der Mikroumgebung Eisen bindender Proteine sind diese besonders radikalischen Angriffen ausgesetzt. Es ist bekannt, dass im *in vitro* System isolierte Proteine, die durch verschiedene Oxidantien modifiziert wurden, bevorzugt durch Proteasen hydrolysiert werden [Grune et al., 1997]. Die Gruppe von Davies fand eine strenge Abhängigkeit der proteolytischen Suszeptibilität von der Oberflächenhydrophobizität des Substrates [Giulivi et al., 1994; Pacifici et al., 1993]. Wie in der vergangenen Antragsperiode gezeigt, entfaltet eine moderate oxidative Belastung das Substratprotein teilweise [Lasch et al., 2001] und gibt somit ein Signal für die spezifische Erkennung und den Abbau durch das 20S-Proteasom [Giulivi et al., 1994; Pacifici et al., 1993, Lasch et al. 2001]. Die Oxidation von Ferritin führt zu einem Verlust von Eisen [Rudeck et al., 2000]. Dass dieses nicht mehr funktionsfähige Ferritin durch das 20S-Proteasom erkannt und abgebaut wird, konnte von uns in der vergangenen Antragsperiode gezeigt werden [Rudeck et al., 2000, Reinheckel et al., 1998]. Ähnliches konnten wir für die Aconitase demonstrieren [Grune et al., 1998]

In weiteren von uns durchgeführten Untersuchungen konnten wir zeigen, 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, 1998]. Durch Einsatz der Antisense-Technik konnte gezeigt werden, dass das Proteasom am Abbau oxidiert 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. Diese Untersuchungen wurden im Laufe der letzten Antragsperiode an microglialen Zellen wiederholt und bestätigt [Mehlhase et al., 2001a, Gieche et al. 2001]. Der intrazelluläre Turnover von Ferritin ist nach oxidativem Stress in microglialen Zellen dramatisch gesteigert, wobei nur ein geringfügige Veränderung der Ferritinkonzentration zu beobachten ist. Das heißt, dass die unter den Bedingungen des oxidativen Stresses stattfindende Ferritin-Neusynthese zum großen Teil zur Wiederherstellung eines intakten Ferritin-Pools verwendet wird [Mehlhase et al., 2001b].

Ischämie und Hypoxie: Eisenstoffwechsel und seine Regulation

Hypoxie und Reoxygenierung gehen mit oxidativem Stress und Zellschädigung einher [Lyons und Kettenmann, 1998; Si et al., 1997; Spranger et al., 1998]. Ein Teil dieser oxidativen Belastung scheint auf die Xanthinoxidasereaktion zurückzuführen sein [Banati et al., 1994]. Die Radikalbildung wird aber durch die microgliale Aktivierung verstärkt [Mabuchi et al., 2000; Phillips et al., 2000]. Ein wesentlicher Faktor, der die Eisenumverteilung und die Eisenfreisetzung beeinflusst, ist die katalytische Zersetzung von Häm. Diese erfolgt vor allem durch die induzierbare Hämoxxygenase-1 [Koistinaho et al.; 1996; Matz et al., 1996]. Das freiwerdende Eisen muß schnell von der Microglia aufgenommen werden, um eine oxidative Belastungen auszuschließen. Dazu muß auf funktionelle Reserven zurückgegriffen werden oder der TfR und Ferritin-Proteingehalt erhöht werden. Über die Veränderung von TfR, Ferritin, IRP-1 und IRP-2 in Makrophagen bei und nach Hypoxie gibt es unterschiedliche Befunde [Hanson und Leibold, 1998; Hanson et al., 1999; Toth et al., 1999; Tacchini et al., 1999]. Es kann davon ausgegangen werden, dass es bei der Regulation von IRP-1 und IRP-2 zelltypenabhängige Unterschiede gibt. Neben der klassischen Regulation von IRP-1 und IRP-2 gibt es eine Redoxsensitivität der IRE-IRP-Wechselwirkung [Olivera et al., 1999; Bouton et al., 1997]. Über die Regulation des Eisenstoffwechsels unter analogen Bedingungen in der Microglia ist nichts bekannt.

Zum anderen scheint es ebenfalls zusätzliche Mechanismen zu geben, die die Induktion von Ferritin bei Ischämie bzw. hämorrhagischen Insulten bewirken [Koeppen et al., 1995a,b; Kondo et al., 1995; Matz et al. 1996]. Es scheint erwiesen, dass die translationelle Regulation durch eine transkriptionelle ergänzt wird, bei der die Transkriptionsfaktoren AP-1 [Camhi et al., 1998] und NF- κ B [Tsukamoto et al., 1999] entscheidend beteiligt sind. Um der Akkumulation von löslichem Eisen [Oubidar et al., 1994] in verschiedenen pathologischen Situationen vorzubeugen, besitzt die Microglia wahrscheinlich ebenfalls einen TfR-unabhängigen Weg der Eisenaufnahme [Jeffries et al., 1996] und eine IRE/IRP unabhängigen Weg der TfR-Synthese [Leiter et al., 1999].

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

Literatur

- Banati, R.B., P. Schubert, G. Rothe, J. Gehrman, K. Rudolfi, G. Valet, G.W. Kreutzberg (1994) *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 14, 145-149.
- Bouton, C., H. Hirling, J.-C. Drapier (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 19969-19975.
- Cairo, G., A. Pietrangelo (2000) *Biochem. J.* 352, 241-250.
- Camhi, S.L., J. Alam, G.W. Wiegand, B.Y. Chin, A.M.K. Choi (1998) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18, 226-234.
- Carraway, M.S., A.J. Ghio, J.L. Taylor, C.A. Piantadosi (1999) *Am. j. Physiol* 275, L583-L592.
- Gieche, J., J. Mehlhase, A. Licht, T. Zacke, N. Sitte, T. Grune (2001) eingereicht.
- Giulivi, C., Pacifici, R.E. und Davies, K.J.A. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 329-341
- 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.
- Grune, T., T. Reinheckel, K.J.A. Davies (1997) *FASEB J.* 11, 526-534.
- Grune, T., I.E. Blasig, N. Sitte, B. Roloff, R. Haselhoff, K.J.A. Davies (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10857-10862.
- Hanson, E.S., E.A. Leibold (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 7588-7593.
- Hanson, E.S., L.M. Foot, E.A. Leibold (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 5047-5052.
- Iwai, K., S.K. Drake, N.B. Wehr, A.M. Weissman, T. LaVaute, N. Minato, R.D. Klausner, R.L. Levine, T.A. Rouault (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4924-4928.
- Jefferies, W.A., M.R. Food, R. Gabathuler, S. Rothenberger, T. Yamada, O. Yasuhara, P.L. McGeer (1996) *Brain Res.* 712, 122-126.
- Koeppen, A.H. (1995a) *J. Neurol. Sci.* 134 (Suppl.), 1-9.
- Koeppen, A.H., A.C. Dickson, J. A. Mc Evoy (1995b) *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 Cerebr. Blood Flow Metab.* 15, 216-226.
- Lasch, P., T. Petras, O. Ullrich, J. Backmann, D. Naumann, T. Grune (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9492-9502.

- Leiter, L.M., H.S. Thatte, C. Okafor, P.W. Marks, D.E. Golan, K.R. Bridges (1999) *J. Cell. Physiol.* 180, 334-344.
- Lyons, S.A., H. Kettenmann (1998) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 521-530.
- Mabuchi, T., K. Kitagawa, T. Ohtsuki, K. Kuwabara, Y. Yagita, T. Yanagihara, M. Hori, M. Matsumoto (2000) *Stroke* 31, 1735-1743.
- Matz, P., C. Turner, P.R. Weinstein, S.M. Massa, S.S. Panther, F.R. Sharp (1996) *Brain Res.* 713, 211-222.
- Mehlhase, J., J. Gieche, O. Ullrich, N. Sitte, T. Grune (2001) *IUBMB Life* in press.
- Mehlhase, J., J. Gieche, A. Licht, A. Stolzing, G. Sandig, T. Grune (2001b) in preparation.
- Menotti, E., B.R. Henderson, L.C. Kühn (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 1821-1824.
- Olivera, L., C. Bouton, J.-C. Drapier (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 516-521.
- Oubidar, M., M. Boquillon, C. Marie, L. Schreiber, J. Bralet (1994) *Free Rad. Biol. Med.* 16, 861-867.
- Pacifici, R.E., Kono, Y. und Davies, K.J.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 15405-15411
- Pantopulos, K., N.K. Gray, M.W. Hentze (1995) *RNA* 1, 155-163.
- Ponka, P., C.N. Lok (1999) *Internatl. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1111-1137.
- Phillips, J.B., A.J. Williams, J. Adams, P.J. Elliott, F.C. Tortella (2000) *Stroke* 31, 1686-1693.
- Reinheckel, T., N. Sitte, O. Ullrich, U. Kuckelkorn, K.J.A. Davies, T. Grune (1998) *Biochem. J.* 335, 637-642.
- Rudeck, M., T. Volk, N. Sitte, T. Grune (2000) *IUBMB Life* 49: 451-456.
- Schalinske, K.L., K.P. Blemings, D.W. Steffen, O.S. Chen, R.S. Eisenstein (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10681-10686.
- Si, Q.-S., Y. Nakamura, K. Kataoka (1997) *Glia* 21, 413-418.
- Spranger, M., I. Kipianova, S. Krempien, S. Schwab (1998) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 670-674.
- Tacchini, L., L. Bianchi, A. Bernelli-Zazzera, G. Cairo (1999) *J. Biol.* 274, 24142-24146.
- Toth, I., L. Yaun, J.T. Rogers, H. Boyce, K.R. Bridges (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4467-4473.
- Tsukamoto, H., M. Lin, M. Ohata, C. Giulivi, S.W. French, G. Brittenham (1999) *Am. J. Physiol.* 277, G1240-G1250.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit ihrem Bestehen mit der radikalischen Schädigung von Zellen und Organen. Wir haben viele Untersuchungen zu oxidativen Stress unter hypoxischer und ischämischer Belastung in Leber, Herz, Niere und Darm [1-5] sowie in Zellkulturen [6-8] durchgeführt.

In Untersuchungen zur Proteinoxidation und zum oxidativen Stress konnten wir die Bedeutung der Proteolyse als sekundäres antioxidatives Schutzsystem in sich teilenden Zellen gezeigt werden [9-11]. Es konnte demonstriert werden, dass verschiedene Zelllinien über die Fähigkeit der Steigerung der Proteolyserate nach oxidativem Stress verfügen [9-11]. Besonderen Wert haben wir bei 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 [9-10]. In weiterführenden Untersuchungen konnte die Rolle der isolierten 20S-Protease beim Abbau von oxidierten Proteinen eindeutig belegt werden. Neuere Arbeiten führten zu grundlegenden Erkenntnissen über die Auffaltung von Proteinen durch Oxidation [12] und die Konsequenzen in ihrer Proteaseresistenz [12-14]. Im weiteren konnte durch eine Reihe von Untersuchungen gezeigt werden, dass das Proteasom aggregierte oxidierte Proteine nicht erkennt [9-14]. Darüber hinaus konnte sogar eine Hemmung des Proteasoms durch Proteinaggregate nachgewiesen werden [14]. Die Rolle von Stickstoffzentrierten Oxidantien als Trigger für einen verstärkten proteolytischen Abbau wurde ebenfalls demonstriert [11, 15].

Eine Sonderstellung in der Oxidierbarkeit scheinen Eisen bindende Proteine einzunehmen, wie in der letzten Antragsperiode untersucht. Diese scheinen, durch Oxidation besonders stark geschädigt und besonders effektiv durch das Proteasom erkannt und abgebaut, zu werden [11, 16-18]. Insbesondere das Ferritin scheint durch die hohen Eisenmengen besonders leicht oxidierbar und proteolytisch abbaubar zu sein [18].

Neben den in vitro-Ansätzen zur Erkennung und zum Abbau oxidierter Proteine wurden Ansätze in lebenden Zellen verfolgt. So wurden Fragestellungen zur Proteinoxidation in Neuronen nach Hypoxie [19], zum Abbau oxidierter Proteine während der zellulären Seneszenz [13, 14, 20-22] und zur Regulation der Proteolyse unter radikalischer Belastung [16, 23, 24] bearbeitet. Bei dem letztgenannten Forschungskomplex geht es vor allem um die Abschätzung des Anteils an ATP-abhängiger und ATP-unabhängiger Proteolyse

sowie den Anteil des 26S- und des 20S-Proteasoms [16, 23, 25]. Bei diesen Untersuchungen konnte ein weiterer Regulationsmechanismus des Proteasoms bei oxidativem Stress entdeckt werden: die PARP-Aktivierung des Proteasoms [24]. Diese PARP-Aktivierung konnte ebenfalls bei Aktivierung der Microglia nachgewiesen werden [26]. Es kommt auch in microglialen Zellen bei oxidativem Stress zu einer Inaktivierung des 26S-Proteasoms [23, 27].

Der Turnover einiger spezieller Proteine wird ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Dazu gehört, neben dem Ferritin, der Turnover des oxidativ inaktivierten Cytochrom P-450 (hier insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung des Proteins bei der alkoholinduzierten Leberschädigung), von Proteinakkumulationen während der Alzheimerschen Erkrankung (im Mittelpunkt des Interesses steht das tau-Protein) und von extrazellulären oxidierten Proteinen (diese Klasse von oxidierten Proteinen wurde bis jetzt noch nicht ausführlich untersucht).

In der letzten Antragsperiode konnte gezeigt werden, dass der Ferritin-Turnover in microglialen Zellen nach oxidativem Stress selektiv gesteigert ist [28]. Die Funktionalität des Eisen bindenden Apparates während microglialer Aktivierung wird zur Zeit noch untersucht.

Auswahl eigener Arbeiten:

1. **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.
2. **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.
3. 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.
4. **Grune, T.**, W. Siems, J. Kowalewski, H. Esterbauer: Postischemic accumulation of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine. *Life Sciences* 55 (1994) 693-699.
5. Siems, W., J. Kowalewski, H. David, **T. Grune** and M. Bimmler: Discrepancy between biochemical normalization and morphological recovery of small intestinal mucosa after short time ischemia in presence of the xanthine oxidase inhibitor oxypurinol. *Cell. & Molec. Biol.* 37 (1991) 213-226.
6. **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.
7. 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.
8. Mertsch, K., **T. Grune**, W. Siems, A. Ladhoff, N. Saupe, I. Blasig: Hypoxia and Reoxygenation of brain endothelial cells in vitro: A comparison of biochemical and morphological response. *Cell. Molec. Biol.* 41 (1995) 243-253.
9. **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.
10. **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.
11. **Grune, T.**, I.E. Blasig, N. Sitte, E. Roloff, R. Haseloff, K.J.A. Davies: Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10857-10862.
12. Lasch, P., T. Petras, O. Ullrich, J. Backmann, D. Naumann, **T. Grune**: Hydrogen peroxide induced structural alterations of RNase A. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9492-9502.
13. Sitte, N., K. Merker, T. von Zglinicki, **T. Grune**: Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 701-708.
14. Sitte, N., M. Huber, **T. Grune**, A. Ladhoff, W.-D. Doecke, T. von Zglinicki, K.J.A. Davies: Proteasome inhibition by lipofuscin during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J.* 14 (2000) 1490-1498.
15. **Grune, T.**, L.-O. Klotz, J. Gieche, M. Rudeck, H. Sies: Protein oxidation and proteolysis by the non-radical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* (2001) im Druck.
16. Reinheckel, T., N. Sitte, O. Ullrich, U. Kuckelkorn, K.J.A. Davies, **T. Grune**: Comparative resistance of the 20 S and 26 S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J.* 335 (1998) 637-642.

17. Mehlhase, J., J. Gieche, O. Ullrich, N. Sitte, **T. Grune** :LPS-induced protein oxidation and proteolysis in BV-2 microglial cells. IUBMB Life (2001) im Druck.
18. Rudeck, M., T. Volk, N. Sitte, **T. Grune**: Ferritin oxidation in vitro: Implication of iron release and degradation by the 20S proteasome. IUBMB Life 49 (2000) 451-456.
19. Weih, M., M. Schmidt, J. Gieche, C. Harms, U. Dirnagl, **T. Grune**: Proteolysis of oxidized short-lived proteins after oxygen-glucose deprivation in rat cortical neurons is mediated by the proteasome. J. Cereb. Blood Flow Metab. (2001) in Revision.
20. Sitte, N., K. Merker, T. von Zglinicki, **T. Grune**, K.J.A. Davies: Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ-fibroblasts: Part I - Effects of proliferative senescence FASEB J. 14 (2000) 2495-2502.
21. Sitte, N., K. Merker, T. von Zglinicki, K.J.A. Davies, **T. Grune**: Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ-fibroblasts: Part II - Aging of non-dividing cells. FASEB J. 14 (2000) 2503-2510.
22. Merker, K., N. Sitte, **T. Grune**: Hydrogen peroxide mediated protein oxidation in young and old human MRC-5 fibroblasts. Arch. Biochem. Biophys. 375 (2000) 50-54.
23. Zacke, T., A. Licht, **T. Grune**: Regulation of proteasomal degradation in microglial cells during oxidative stress. (2001) in Vorbereitung.
24. Ullrich, O., T. Reinheckel, N. Sitte, R. Hass, **T. Grune**, K.J.A. Davies: Poly-ADP-Ribose-Polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 6223-6228.
25. Reinheckel, T., O. Ullrich, N. Sitte, **T. Grune**: Differential impairment of 20S- and 26S-proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. Arch. Biochem. Biophys. 377 (2000) 65-68.
26. Ullrich, O., I. Bechmann, A. Diestel, M. Homberg, **T. Grune**, R. Hass, R. Nitsch: Turnover of oxidatively-damaged nuclear proteins in BV-2 microglial cells is linked to its activation state by poly-ADP-ribose-polymerase. FASEB J. (2001) im Druck.
27. Stolzing, A., J. Mehlhase, **T. Grune**: Degradation of extracellular oxidized proteins by microglial cells. (2001) eingereicht.
28. Mehlhase, J., J. Gieche, A. Licht, A. Stolzing, G. Sandig, **T. Grune**: Oxidative stress -induced turnover of ferritin in microglial cells. (2001b) in Vorbereitung.

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1 Ziele

Die Untersuchungen im folgenden Bewilligungszeitraum sollen sich an den Erkenntnissen der vorhergehenden Antragsperiode anschließen, die gezeigt hat, dass Ferritin oxidativ leicht geschädigt wird, es Eisen verliert und vom Proteasom abgebaut wird, sowie dass Microglia in der Lage ist bei oxidativem Stress Ferritin zu induzieren. Ziel der Bearbeitung soll es sein, weitere Aufschlüsse über die Mechanismen der Regulation des Eisenstoffwechsels durch die Microglia unter Normoxie und Hypoxie zu erhalten. Dabei stehen die Aufnahme und die Effekte von freiem Eisen, Transferrin gebundenem Eisen und Häm-Eisen sowie die Regulation Eisen bindender Proteine vor, während und nach Hypoxie im Mittelpunkt des Interesses, da dies wesentliche pathogenetische Faktoren der oxidativen Belastung des reoxygenierten Gehirns sein können.

Folgende Hypothesen sollen untersucht werden:

1. Aktivierte Microglia hat eine erhöhte Fähigkeit zur Eisenaufnahme und -speicherung durch eine Erhöhung des Ferritin- und TfR-Gehaltes.
2. Der Anstieg des Ferritin- und TfR-Gehaltes erfolgt über Regulation auf Translationsebene durch IRP-1 und IRP-2.
3. Microglia ist nach hypoxischer Belastung in der Lage schnell die Eisenaufnahme zu steigern. Dies gilt sowohl für Transferrin gebundenes Eisen als auch für niedrigmolekulares Eisen.
4. Der posthypoxisch verstärkte Eisenaufnahme liegt ein translationell regulierter Anstieg des Ferritin und TfR zu Grunde.
5. Microgliale Zellen sind im Gewebeverband für die Beseitigung des extrazellulären Eisens verantwortlich. Dies wird durch verstärkte Ferritin- und TfR-Expression gewährleistet.

3.5.2 Methoden

Biologische Modelle

Die grundlegenden biochemischen Untersuchungen sollen in primärer Microglia durchgeführt werden. Dazu werden primäre Zellen aus dem Hirn neugeborener Ratten präpariert.

Neugeborene Ratten vom Tag 0 bis Tag 3 werden dekapitiert, anschließend die Kopfhaut abpräpariert und die Kalottenschuppen auseinander gezogen bis das Gehirn freiliegt. Das entnommene Gehirn wird von der Hirnhaut befreit und mittels einer Pipette zerkleinert. Nach Zentrifugation werden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Platten in Medium mit 10 % FKS und 1% Penicillin/Streptomycin gezogen. Die Versuche werden zwischen dem 9. und 12. Tag durchgeführt.

Für einige ausgewählte Untersuchungen muß evtl. auf permanente Zelllinien, wie BV-2 oder RAW264.7 zurückgegriffen werden. Dies ist insbesondere der Fall, wenn große Zellmengen erforderlich sind, um ausreichend Untersuchungsmaterial zu erhalten.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppen Ullrich und Nitsch wird die Untersuchung der Ferritin-Induktion in "slice"-Kulturen angestrebt. Dazu werden "slice"-Kulturen hypoxisch oder radikalisch belastet und die Ferritin-Induktion immunhistochemisch untersucht. Es wird eine Kolo-kalisation mit glialen Markerproteinen durchgeführt.

Die Untersuchungspalette soll durch Studien am Ganztier ergänzt werden. Hier ist eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Priller/Dirnagl angestrebt. Wobei durch immunhistochemische Verfahren die Ferritin-Induktion und die Zugehörigkeit zur Microglia überprüft werden kann. Durch Verwendung der vorhandenen Erfahrungen auf dem Gebiet der Ischämie und Anwendung der GFP-transgenen Maus können Rückschlüsse über die zeitliche Abfolge des pathophysiologischen Geschehens gezogen werden.

Belastung der Zellen

Verschiedene Eisen- oder radikalische Belastungen bzw. Aktivierungsmechanismen werden auf ihren Effekt auf den Eisenstoffwechsel untersucht. Es sollen freies Eisen und Transferrin in unterschiedlichen Eisenbeladungen und Häm zum Einsatz kommen. Zu den in unserer Arbeitsgruppe bereits verwendeten Reagenzien gehören unter anderem H₂O₂, der Superoxid-Generator Menadion, NO, Xanthinoxidase/Xanthin. 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).

Zur Aktivierung microglialer Zellen sollen die bereits verwendeten Substanzen: LPS, PMA, TNF- α und γ -Interferon zum Einsatz kommen (Mehlhase et al., 2001 im Druck). Es ist daran gedacht, dieses Spektrum durch weitere Faktoren zu erweitern (GMCSF, MCSF - Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppe Heinemann). Neben den zum Einsatz kommenden aktivierenden Agenzien ist an den parallelen Einsatz von radikalangenden Substanzen (PBN, DMPO, α -Tocopherol) gedacht, um Unterschiede zwischen Signaltransduktionskaskaden und Wirkungen des oxidativen Bursts zu unterscheiden (Mehlhase et al., 2001 im Druck).

Hypoxie

Die hypoxische Belastung wird durch in einer Hypoxiekammer durchgeführt. Die Belastung erfolgt in Abwesenheit von Glukose. Dem Medium werden unterschiedliche Substanzen zugesetzt. Dazu gehören. [⁵⁹Fe]Cl₃, Hemmstoffe, Antioxidantien usw.

Untersuchungen zur Eisen-Aufnahme

Aufnahme von Transferrin-gebundenem Eisen. [⁵⁹Fe]Cl₃ wird mit Natriumcitrat versetzt und inkubiert. Das entstehende [⁵⁹Fe]-Citrat wird mit apo-Tf inkubiert. Anschließend wird eine Trennung des [⁵⁹Fe]-Citrats vom [⁵⁹Fe]-Tf durch Ultrafiltration erreicht. Dem so gewaschene [⁵⁹Fe]-Tf wird Zellkulturmedium hinzugegeben und die Aufnahme über verschiedenen Zeiträume verfolgt.

Aufnahme von Häm-Eisen. In das Zellkulturmedium wird Häm oder Hämin in verschiedenen Konzentrationen gegeben und die Expression von Hämoxidase-1, Ferritin und TfR verfolgt. Falls es möglich ist, ⁵⁹Fe markiertes Häm, zu beschaffen kann dies ebenfalls eingesetzt werden und der Verbleib des Eisens getestet werden (Synthese radioaktiven Häms kann evtl. bei Radioporphyrins, Leeds erfolgen).

Aufnahme von freiem Eisen. [⁵⁹Fe]Cl₃ wird in das Zellkulturmedium gegeben. Anschließend werden die Zellen nach verschiedenen Zeitintervallen geerntet, die Zellen durch Zentrifugation und Ultrafiltration fraktioniert und getestet, wieviel ⁵⁹Fe in der hochmolekularen Zellfraktion enthalten ist. Um die Einlagerung in Ferritin zu testen, wird eine Immunpräzipitation des Ferritin durchgeführt.

Bestimmung Eisen bindender Proteine

Folgende Eisen bindende Proteine sollen in die Untersuchungen mit einbezogen werden: Ferritin, IBP-1, IBP-2, Transferrin und Transferrinrezeptor. Diese sollen hinsichtlich der folgenden Parameter untersucht werden:

Untersuchung des Proteingehaltes. Der Proteingehalt soll hauptsächlich mit Hilfe von Antikörpern untersucht werden. Dabei ist sowohl an Immunoblots als auch 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 [³⁵S]-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 der Proteine gemessen werden. Dies geschieht ebenfalls durch [³⁵S]-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 die mRNA dieser Proteine sind bereits angewendet. Es wird angestrebt durch Kooperation im Rahmen des SFB on-line PCR-Analysen für die entsprechenden RNA aufzubauen.

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 IRP-1 und IRP-2 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. Ein Forschungsaufenthalt für J. Mehlhase ist im Labor von Kostas Pantopoulos (Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Canada) geplant. Dort können die erforderlichen Methoden erlernt werden.

Die Aufnahmekapazität von Eisen in microgliale Zellen soll durch [⁵⁹Fe]-Aufnahmetests wie bereits beschrieben, gemessen werden.

Konstruktion von Reporterplasmiden und Transfektion

Plasmidkonstruktion. Als Plasmid wird der Vektor pCMS-EGFP benutzt. Die entsprechenden IREs werden vor oder hinter der codierenden Sequenz des Reportergens EGFP in den Vektor kloniert (Menotti et al., J. Biol. Chem. 1998). Die entsprechenden Oligonukleotide werden synthetisiert. Die Ligation des Inserts wird durch T4 DNA Ligase (BioLabs) durchgeführt. Kompetente E. coli Zellen (Genotyp TOP10F') werden transfiziert und der Vektor isoliert und die Sequenz überprüft. Als Kontrollen werden der Vektor und der EGFP exprimierende Vektor verwendet.

Transfektion. Die Transfektion der Plasmide wird entweder mit BV-2 Zellen oder mit primärer Microglia durchgeführt. Unter Verwendung der Lipofectin Methode wird Rotifect (Roth, Berlin) benutzt. Im Falle einer Selektion werden die Zellen mit 100µg/ml Zeocin gezogen.

(Im Labor eines Kooperationspartners - Dr. O. Ullrich - bestehen Erfahrungen mit der Transfektion microglialer BV-2 Zellen. In unserem Labor ist seit einiger Zeit Frau Dr. Grit Sandig tätig, die über große Erfahrung bei der Transfektion verschiedener Zellen verfügt. Sollte es trotz aller Anstrengungen nicht gelingen primäre microgliale Zellen zu transfizieren, kann auf BV-2 Zellen zurückgegriffen werden.)

Messung der proteolytischen Systeme

Bestimmung der Aktivität. Die Aktivität der proteolytischen Enzyme wird im Zellysat aus 10⁶ Zellen bestimmt und entweder auf Zellzahl oder Proteingehalt normiert. Zellen werden für diese Messungen in 1 mM DTT lysiert. Das Lysat wird zentrifugiert und der Überstand zur Messung der Aktivität des Proteasoms verwendet (pH 8; Substrat: suc-LLVY-MCA).

Bestimmung des Proteasengehaltes durch Immunoblots. Die Proteine des wie oben gewonnenen Zelllysates 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.

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 sowohl ein ELISA-Verfahren als auch 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).

3.5.3 Arbeitsprogramm

Hier soll noch einmal darauf verwiesen werden, dass Eisen in diesem Projekt, wie bereits in der vergangenen Antragsperiode - in stoffwechselrelevanten Konzentrationen verwendet werden soll. Damit gilt Eisen hier als mögliches regulierendes Agens und nicht als Oxidationsmittel, um Zellen radikalisch zu schädigen. Wesentliches Projektziel ist es, die Bedeutung der Microglia in der Regulation des Eisenstoffwechsels unter hypoxischen Stressbedingungen zu untersuchen.

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

1. Eisenaufnahme microglialer Zellen in unterschiedlichen Aktivierungsstadien und Regulation der Eisen bindenden Proteine (Ziele 1 und 2)

Die Hypothese, ob aktivierte Microglia eine erhöhte Fähigkeit zur Eisenaufnahme und Eisenspeicherung durch eine Erhöhung des Ferritin- und TfR-Gehaltes hat, wird im ersten Teil der Untersuchungen überprüft. Es sollen an die Untersuchungen aus der ersten Antragsperiode angeknüpft werden und die bereits etablierten Methoden der Aktivierung microglialer Zellen angewendet werden. Die Eisenaufnahme der aktivierten Zellen wird im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen untersucht. Es ist außerordentlich interessant, unterschiedliche Stimulierungsarten miteinander zu vergleichen. Hierzu gehören wie bereits erwähnt: LPS, PMA, TNF- α und γ -Interferon. Hier ist eine Zusammenarbeit mit der Gruppe Eder/Heinemann geplant. Unter diesen Bedingungen sollen die Veränderungen der Konzentration und der Menge des Ferritins und des Transferrin-Rezeptors, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene gemessen werden. Zusätzlich sollen Untersuchungen Aufschluß über Veränderungen des Ferritin-Turnovers geben. Dabei kann auf die etablierten Methoden aus der vergangenen Antragsperiode zurückgegriffen werden. Besondere Berücksichtigung findet hierbei die chemische Form, in der das Eisen vorliegt. Da nicht zu erwarten ist, dass in pathologisch relevanten Zuständen (Zelluntergang, Neurodegeneration, ischämischer Zelltod) alles Eisen Transferrin gebunden vorliegt, wird sowohl hämgebundenes Eisen, als auch freies Eisen mit untersucht.

Weiterhin wurde postuliert, dass der Anstieg des Ferritin und des TfR über Regulation auf Translationsebene durch IRP-1 und IRP-2 erfolgt. Somit wird die Aktivierung beider Proteine getestet. Da bekannt ist, dass IRP-1 und IRP-2 auf unterschiedliche IREs reagieren, soll mittels eines transfizierten Reportergens mit verschiedenen UTR die Aktivierung von IRP-1 und IRP-2 untersucht werden. In wie weit das Proteasom an der Regulation der Menge aktiven IRP-2 beteiligt ist, kann dann in diesem Modell mit dem Einsatz von Proteasom-Hemmstoffen untersucht werden. Durch den Einsatz von Radikalfängern und Hemmstoffen soll die Rolle des oxidativen Stresses, bzw. von NO-Radikalen bei der Aktivierung der Eisenaufnahme, überprüft werden.

2. Einfluss von Hypoxie auf die Eisenaufnahme und den Eisenhaushalt der Microglia (Ziele 3 und 4)

Bei der Beantwortung der Hypothese nach der hypoxischen und posthypoxischen Eisenaufnahmekapazität der Microglia werden diese Zellen für unterschiedliche Zeiten hypoxisch belastet und die Aufnahme von Transferrin gebundenem Eisen als auch von Häm und freiem Eisen untersucht. Während der Hypoxie soll die funktionelle Reserve der Eisenaufnahme und der Eisenspeicherkapazität bestimmt werden. Hierzu wird, wie oben beschrieben, die Eisenaufnahme zu den entsprechenden Zeitpunkten gemessen. An dieser Stelle wird ebenfalls getestet, in wie weit microgliale Zellen Eisen verlieren können und ob es zu Veränderungen innerhalb der einzelnen Eisenpools kommt. Durch

Zentrifugation, Ultrafiltration und Ferritin-Immunopräzipitation kann abgeschätzt werden, in welchem Eisenpool es in verschiedenen Phasen der Hypoxie zu Veränderungen kommt.

Es wird vermutet, dass der posthypoxisch verstärkten Eisenaufnahme ein translationell regulierter Anstieg des Ferritin und TfR zu Grunde liegt. Dies wird durch Messung des Zeitverlaufs der Neubildung Eisen bindender Proteine überprüft. Dafür werden, ähnlich der Experimente zur Schädigung durch oxidativen Stress in der letzten Antragsperiode, sowohl Immunoblots durchgeführt als auch endogene Proteine mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und nach Immunopräzipitation analysiert. So werden Aufschlüsse über den Umsatz Eisen bindender Proteine gewonnen. Insbesondere ist interessant, ob Ferritin in der hypoxischen Phase und/oder in der frühen Reoxygenierungsphase verstärkt synthetisiert (und auch abgebaut) wird. Eine Analyse der mRNA mittels RT-PCR läßt Rückschlüsse auf veränderte mRNA-Gehalte zu. Mit Hilfe verschiedener Hemmstoffe und den bereits oben erwähnten Reporterplasmiden wird getestet, in wie weit in den einzelnen Abschnitten der Hypoxie das IRP-1 oder IRP-2 bzw. die mRNA-Seite der Regulation des Ferritins und des TfR beteiligt ist. Die Rolle von Oxidantien bei der Regulation in der posthypoxischen Phase wird durch unterschiedliche antioxidativ wirkende Substanzen abgeklärt. Bei Abschluß dieser Arbeiten soll ein komplexes Bild über die Regulation Eisen bindender Proteine in isolierter Microglia während Hypoxie vorliegen.

3. Untersuchungen zur Rolle der Microglia im Zellverband (Ziel 5)

Die Überprüfung der Rolle microglialer Zellen für die Beseitigung des extrazellulären Eisens im Gewebeverband wird in zwei prinzipiellen Ansätzen untersucht: zum einen in "slice" Kulturen. und zum anderen im Tier. Dieses Herangehen ist interessant, da im Gewebeverband die Microglia mit Faktoren, bzw. Resten toter astroglialer und neuronaler Zellen, konfrontiert wird. Somit können Unterschiede zwischen Untersuchungen in der Zellkultur und im *in vivo* System herausgearbeitet werden.

Die Untersuchung in "slice"-Kulturen soll in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Ullrich und Nitsch erfolgen. Es ist geplant diese Techniken im eigenen Labor zu etablieren. In hypoxisch gestressten Präparaten wird immunhistochemisch Ferritin und TfR nachgewiesen und durch Colokalisation mit bekannten Markerproteinen wird die Induktion bestimmten Zelltypen zugeordnet.

Ein weiterer Ansatz soll mit der Arbeitsgruppe Priller/Dirnagl verfolgt werden, wo im etablierten Modell der Ischämie die eingewanderten Makrophagen sowie die residierenden microglialen Zellen auf eine Ferritin Induktion überprüft werden sollen. In beiden Arbeitsgruppen sind die entsprechenden Methoden etabliert, so dass hier keine Verzögerungen zu erwarten sind.

Von diesem Projektabschnitt wird erwartet, in wie weit microgliale Zellen im hypoxischen und posthypoxischen Gewebeverband in Lage sind, den Eisenhaushalt zu regulieren.

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 zur Eisenaufnahme der Microglia und die Anpassung des Hypoxie-Modells auf die microglialen Zellkulturen sollen im ersten Jahr der Laufzeit des Projektes im wesentlichen abgeschlossen sein. Parallel dazu soll mit den Untersuchungen zur Transfektion des Reporterplasmides begonnen werden. Konstruktion des Plasmides, das Austesten der Transfektionsbedingungen und die entsprechenden Funktionstests sowie erste Untersuchungen zur Hypoxie werden in etwa das zweite Beantragungsjahr umfassen. Die Studien zur Rolle des IRP-1 und des IRP-2 bei der Regulation des Ferritins und des TfR werden im Anschluß daran durchgeführt. In dieser Phase der Projektbearbeitung soll mit der Etablierung der "slice"-Kulturen im Labor begonnenen werden. Im weiteren, also im verbleibenden Teil des letzten Jahres der Projektbearbeitung, sollen die Untersuchungen zum Verhalten des Eisenstoffwechsels der Microglia im Gewebeverband durchgeführt werden. Es wird erwartet, dass man mit ausgewählten Parametern ein erstes Bild über die pathophysiologischen Zusammenhänge erhält.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Das vorliegende Projekt ist seit 3 Jahren im SFB und steht in engem Zusammenhang mit einer Reihe von Projekten, die im vorliegenden Antragszeitraum weiter ausgebaut werden soll. Mit der Arbeitsgruppen Ullrich und Nitsch existiert bereits eine mehrjährige Zusammenarbeit zur radikalischen Schädigung von Zellen und zur Proteinoxidation u.a. in microglialen Zellen. Es entstanden hierbei mehrere Publikationen bzw. Arbeiten die zur Publikation eingereicht sind. Es ist davon auszugehen, dass Eisen bei einer Reihe

von pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. bei der "Spreading Depression", in Form des Oxyhämoglobins, (Dreier/Einhäupl) und ebenfalls in den von der Arbeitsgruppe Heinemann untersuchten Schadenskaskaden eine mehr oder weniger zentrale Rolle spielt. Es ergeben sich ebenfalls Anknüpfungspunkte an Untersuchungen der Arbeitsgruppe Unger/Blume am Modell der Hypoxie.

Weiterhin kommt es zu Kooperationen mit den Arbeitsgruppen Priller/Dirnagl, Heinemann/Eder, Ullrich und Nitsch hinsichtlich der zu nutzenden biologischen Modelle. Es ist vorgesehen, die dort im SFB bereits etablierten Methoden der "slice"-Kulturen zu nutzen und Experimente zum Eisenstoffwechsel an diesem Objekt durchzuführen. Ein Ausbau der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Priller/Dirnagl (Manuskript zur Publikation eingereicht) auf Untersuchungen zur Ischämie an der GFP-transgenen Maus ist geplant.

Es ist wahrscheinlich, dass sich im Laufe der Bearbeitung des Projektes weitere Kooperationen mit anderen Gruppen des SFB, insbesondere auf methodischem Gebiet ergeben. Zur Zeit werden in einem Projekt mit Dr. W. Müller Untersuchungen zur Rolle von oxidativem Stress und Eisen bei der Schädigung von Zellen im akuten Hirnschnitt mit Hilfe des 2-Photonen-konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopes durchgeführt.

Eine Kooperation besteht mit der Arbeitsgruppe Kloetzel (Institut für Biochemie an der Charité), die 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 Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
	IIa/2	1	42000,- DM	IIa/2	1	42000,- DM	IIa/2	1	42000,- DM	IIa/2	1	42000,- DM
				Vb/2	1	35000,- DM	Vb/2	1	35000,- DM	Vb/2	1	35000,- DM
	zus.:	1	42000,- DM	zus.:	2	77000,- DM	zus.:	2	77000,- DM	zus.:	2	77000,- DM
SV			Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		
			SV	24000,- DM +5000,- DM	SV	24000,- DM	SV	24000,- DM	SV	24000,- DM		
I			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			
			52900,- DM			-			-			

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Grune, Tilman PD Dr.	Biochemie	Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation	15 h/Woche	-	C1-O
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	Jakstadt, Manuela	MTA	Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation	10 h/Woche	-	IVb
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Jana Mehlhase	Dipl. Biologin (voraussichtlich ab Mai 01)	Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation	40 h/Woche	-	IIa-O/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	N.N.(x)	MTA	Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation	20 h/Woche	-	Vb/2

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

1. Grune, Tilman, PD Dr.: Als Leiter der Forschungsabteilung der Klinik für Physikalische Medizin und Rehabilitation im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum 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.

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.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

1. Jana Mehlhase, (BAT IIA/2 Stelle für Jana Mehlhase, zur Zeit Studentin der Fachrichtung Biologie, Diplom-Biologieabschluß voraussichtlich Mai 2001, danach Beschäftigung im Forschungslabor.)

Die Doktorandin soll die Verfahren zur Messung der Eisenaufnahme und des Turnovers der Eisen bindenden Proteine durchführen. Frau Mehlhase hat bereits während ihrer Diplomarbeit Fragen zu Turnover von Ferritin bearbeitet. Sie beherrscht alle grundlegenden biochemischen Techniken, die für die Bearbeitung dieses Projektes notwendig sind. Im weiteren entfallen die Arbeiten zur Konstruktion des Plasmides, seiner Vervielfältigung und der Transfektion in ihr Aufgabengebiet. Die Durchführung weiterer biochemischer Grundanalysen sowie die Betreuung und Durchführung der Arbeiten zur Untersuchung microglialer Zellen im Gewebeverband ist ebenfalls Teil der Aufgabe der Doktorandin.

2. N.N. (BAT Vb/2)

Da die in diesem Projekt geplanten Arbeiten einen großen Zeitaufwand für die Bereitstellung des Zellmaterials erfordern, ist geplant, diese Arbeiten von einer halbtags zu beschäftigenden MTA ausführen zu lassen. Da die Doktorandin mit der Durchführung der biochemischen und molekularbiologischen Experimente beschäftigt ist, ist es wünschenswert, sie von den Zellpräparationen zu befreien. Dies ist besonders wichtig, da die biochemische Experimente einen großen Zeitaufwand erfordern und dafür größere Mengen an Zellmaterial benötigen. Im weiteren Verlauf soll die MTA ebenfalls in die Herstellung von Schnittkulturen eingeführt werden und diese Technik im Labor unter Anleitung etablieren. Eine zusätzliche MTA hilft außerdem, die Struktur der Forschungsabteilung zu festigen, da zur Zeit technische Hilfskräfte fehlen.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	15000,- DM	15000,- DM	15000,- DM

fortgesetzt

Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als <u>Ergänzungsausstattung</u> beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	24000,- DM +5000,- DM	24000,- DM	24000,- DM
--	--------------------------	------------	------------

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

(einmalig)

Multikanalpipette

1000,- DM

Eine Multikanalpipette ist für das serienmäßige Bestücken von Mikrotiterplatten bei großen Probenmengen erforderlich. Zur Zeit steht nur eine solche Pipette zur Verfügung. Der Einsatz der hier beantragten soll im Isotopenlabor erfolgen, so dass die Eisenaufnahmestudien mit großer Probenzahl schnell durchgeführt werden können.

Phosphor-Imager-Screen

je 2000,- DM (Anzahl: 2)

Einen zentralen Punkt in den Untersuchungen spielen die radioaktiven Markierungen von Ferritin. Die Auswertung der Immunpräzipitate des Ferritins erfolgt über Elektrophoresen. Im weiteren hat sich gezeigt, dass es wesentlich günstiger ist, die Daten über ein Phosphor-Imaging -System (Firma Amersham, vorhanden in Arbeitsgruppe Dirnagl) auszuwerten, als über autoradiographische Verfahren. Um das bereits vorhandene Gerät anwenden zu können, benötigt die Arbeitsgruppe eigene Screens, die eine optimale Nutzung gewährleisten.

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

(pro Jahr)

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

	Beantragt für das Haushaltsjahr		
	2002	2003	2004
Summe:	52900,- DM	-	-

(Alle Preisangaben in DM einschl. MwSt., Transportkosten etc.)**Begründung zur Ergänzungsausstattung der Investitionen für 2002**

Hypoxiekammer

Antragssumme: 52 900,- DM

Diese Hypoxiekammer wird benötigt, um die Untersuchungen zur Beantwortung der Fragestellungen der Ziele 35 durchzuführen. Da die Experimente so geplant sind, dass Hypoxien in radioaktiv markierten Zellen durchgeführt werden, bzw. die radioaktive Markierung während der Hypoxie erfolgen muß, ist eine Hypoxiekammer im Bereich eines Isotopenlabors notwendig. Voruntersuchungen ergaben, dass bei Versuchen zur radioaktiven Markierung des Ferritins mit anschließender Immunpräzipitation mit dem 50-100fachen der Freigrenze gearbeitet werden muß, um ein ausreichendes Signal zu gewährleisten. Diese Versuche sind außerhalb eines Radionuklidlabors undenkbar. In der Arbeitsgruppe Dirnagl steht eine Hypoxiekammer zur Verfügung, die jedoch ausschließlich nicht-radioaktiv verwendet wird. Eine Umwandlung dieses Laborbereiches in ein Radionuklidlabor ist aus räumlichen Gründen unmöglich. Durch den hohen Nutzungsgrad der bei Prof. Dirnagl vorhandenen Hypoxiekammer durch verschiedene

Mitarbeiter und Studenten ist eine Umsetzung (auch zeitweise) unmöglich. Andererseits ist eine Hypoxiekammer im Radionuklidlabor des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums gut für andere Arbeitsgruppen nutzbar (Dirnagl, Ullrich, Unger/Blume). Das Radionuklidlabor des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums ist sowohl räumlich als auch personell zur Zeit nicht voll ausgelastet.

Aus dem SFB ist die Arbeitsgruppe Unger/Blume ebenfalls daran interessiert, eine Hypoxiekammer zu nutzen. Auch bei diesem Teilprojekt läßt sich durch die Anwendung von Radioaktivität das methodische Spektrum erweitern.

Die Durchführung einer Hypoxie mit nicht professionellen Hypoxiekammern ist außerordentlich problematisch, da kein konstanter Sauerstoffpartialdruck im unteren ppm-Bereich erreicht werden kann. Übergasungshypoxien sind aus Gründen der Kontamination der Umgebung und der Raumluft mit Radioaktivität ebenfalls nicht wünschenswert.

Somit ist die beantragte Hypoxiekammer im Bereich eines Radionuklidlabors für das beantragte Teilprojekt die beste Möglichkeit, die notwendigen Hypoxien zu erzeugen.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt A8

3.1.1 Thema:

Lokalisation, Regulation und Signalwege von Angiotensin II AT2-Rezeptoren nach fokaler Ischämie im Rattenhirn.

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Pharmakologie

3.1.3 Leiter/in:

- a) Unger, Thomas, Prof. Dr. med, geb. am 26.10.1950
 b) Blume, Annegret, Dr. rer. nat., geb. am 21.8.1962

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
 Universitätsklinikum Charité
 Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin
 Dorotheenstraße 94
 10117 Berlin

Telefon: 030-450 525-001

Telefax: 030-450 525-901

E-Mail: thomas.unger@charite.de

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

- a) nein b) ja, befristet bis zum 30.4.2004

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
2002	84.000	40.000	-	124.000
2003	84.000	40.000	-	124.000
2004	84.000	29.000	-	113.000

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Das Peptidhormon Angiotensin II (Ang II) wirkt nicht nur auf periphere Organe, sondern über Bindung an seinen AT1-Rezeptor auch als Neurotransmitter/Neuromodulator im Gehirn, insbesondere bei der zentralen Regulation von Blutdruck und Volumenhomeostase. Neben dem AT1-Rezeptor ist im Gehirn ein weiterer Angiotensin-Rezeptor-Subtyp, der AT2-Rezeptor, in distinkten Arealen nachweisbar. Dieser Rezeptor wird peripher und zentral nach Verletzungen bzw. im Verlauf pathophysiologischer Prozesse verstärkt exprimiert. So ist nach Axotomie oder Quetschung des Ischias-Nerven die AT2-Rezeptor mRNA im proximalen und distalen Nervenstumpf drastisch erhöht; eine Behandlung mit Ang II beschleunigt über eine Stimulation von AT2-Rezeptoren die funktionelle Regeneration des Nerven. Ang II induziert über Bindung an seinen AT2-Rezeptor das Aussprossen von Neuriten in PC12W-Zellen in Kultur; an Retina-Explantaten bewirkt das Peptidhormon eine AT2-Rezeptor-vermittelte Aussprossung von Nervenfasern. Auch am gequetschten Optikus-Nerven fördert Ang II über den AT2-Rezeptor die Regeneration.

Neuere Befunde zeigen, daß AT1- und AT2-Rezeptoren eine Rolle nach Schlaganfall im Gehirn spielen. Neurone im Randgebiet des Infarktes, der Penumbra, können sich unter günstigen Bedingungen regenerieren und sind deshalb Ziel therapeutischer Intervention. Wir haben nachgewiesen, daß die Blockade zentraler AT1-Rezeptoren den Umfang neurologischer Ausfälle nach fokaler Ischämie im Rattenhirn verringert; gleichzeitig kommt es auch zu einer Verminderung der Schlaganfall-induzierten Expression von c-Fos/c-Jun im Bereich des Cortex und Hippocampus. Für die positiven Effekte der AT1-Rezeptor-Blockade sind intakte AT2-Rezeptoren im Gehirn nötig.

Bisher ist über die zellulären Mechanismen der protektiven/regenerativen Wirkungen des AT2-Rezeptors im Gehirn nichts bekannt. Nicht untersucht ist bisher auch die Frage, welche Zellpopulationen dabei eine Rolle spielen. Die o.g. Befunde am Ischias-Nerven (erhöhte AT2-Rezeptor-Expression im distalen Nervenstumpf) legen nahe, daß die positiven Effekte der AT2-Rezeptor-Stimulation auf die Regeneration durch nicht-neuronale Zellen vermittelt werden. Bekannt ist, daß neben Neuronen auch Astroglia und Makrophagen beide Subtypen des AT-Rezeptors sowie den Angiotensin-Vorläufer Angiotensinogen exprimieren, während entsprechende Daten zu Oligodendrocyten und Mikroglia noch fehlen. Ein Schwerpunkt des Projektes soll daher auf einer Charakterisierung von Zelltypen liegen, die an den AT-Rezeptor-vermittelten Effekten in vivo nach Schlaganfall teilhaben. Weiterhin sollen Astrocyten als eine der wahrscheinlich beteiligten Zellpopulationen mit dem AT2-Rezeptor transfiziert werden (Simulation der Rezeptor-Hochregulation nach Ischämie) und die Signaltransduktionskaskaden, die durch Stimulation mit Ang II in diesen Zellen aktiviert werden, näher untersucht und mit denen nicht-transfizierter Zellen verglichen werden. In Astrocyten/Neuronen-Kokultur soll nach möglichen Mediatoren gesucht werden, die durch Stimulation astrozytärer AT2-Rezeptor freigesetzt werden, sowie der Einfluß dieser Mediatoren auf Neurone evaluiert werden.

Falls die in vivo-Untersuchungen ergeben, daß AT-Rezeptoren in Mikroglia nach Ischämie hochreguliert werden, sollen sich analog zu den Untersuchungen an Astrocyten Experimente zu Mediatoren anschließen, die durch AT2-Rezeptor-Stimulation in Mikroglia freigesetzt werden.

3.3 Stand der Forschung

3.3.1 Das Gehirn-Renin-Angiotensin-System (RAS)

Angiotensin II (Ang II) ist klassischerweise als Hormon bekannt, welches Blutdruck und Wasserhaushalt des Körpers reguliert. Das Oktapeptid hat neben seinen Wirkungen auf periphere Organe auch zentralnervöse Effekte (Unger et al. 1988; Culman et al. 1995; Blume et al. 1999) Seit einiger Zeit ist bekannt, daß Angiotensin II durch ein lokales Gehirn-Renin-Angiotensin-System, dessen verschiedene Komponenten in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen werden konnten, direkt an seinem Angriffsort im Gehirn gebildet werden kann (Yang et al. 1992; Erdmann et al. 1996). Beide Subtypen des Angiotensin-Rezeptors, AT1 und AT2, werden im Gehirn exprimiert. Dabei gibt es Gehirnregionen, in denen bevorzugt ein Rezeptorsubtyp vorkommt, aber auch Regionen, die beide Rezeptoren aufweisen (Obermüller et al. 1992; Lenkei et al. 1992). Eine Vielzahl neuerer Befunde weist darauf hin, daß die beiden Angiotensin-Rezeptoren divergente physiologische Aufgaben haben. Während der AT1-Rezeptor

für die klassischen zentralen kreislauf- und osmoregulatorischen Funktionen von Ang II verantwortlich ist, beginnt sich für AT₂-Rezeptoren eine völlig andere Rolle abzuzeichnen:

Im adulten Gewebe ist der AT₂-Rezeptor häufig supprimiert, wird aber nach Gewebsverletzung wie z.B. nach Myokardinfarkt, Nerven-Läsion oder Hautverletzung heraufreguliert. Unter diesen Bedingungen müssen Zellen, ähnlich wie in der Embryonalentwicklung, sowohl proliferieren als auch differenzieren. Eine AT₂-Rezeptor-vermittelte Proliferationshemmung konnte in Endothelzellen und Zellen neuronalen Ursprungs (PC12W) *in vitro* sowie in der Mikrovaskulatur und der Neointima beschrieben werden. Weiterhin weisen mehrere Studien in Zellen neuronalen Ursprungs auf eine differenzierungsfördernde/regenerative Wirkung des AT₂-Rezeptors hin. Untersuchungen an PC12W-Zellen ergaben Hinweise, daß Ang II über seinen AT₂-Rezeptor die Neuritenelongation fördert. Am Modell des Ischiasnerven konnten wir zeigen, daß eine Nervenquetschung in einer zeitabhängigen Hochregulation der AT₂-Rezeptor mRNA in den proximalen und distalen Nervensegmenten resultierte, die mit einer erfolgreichen Regeneration der Nervenfasern korrelierte (Gallinat et al., 1998). Diese Ergebnisse legen nahe, daß der AT₂-Rezeptor in neuroregenerativen Prozessen des N. ischiadicus und von Hinterwurzelganglien involviert ist. Funktionelle Studien am Ischiasnerven haben dies inzwischen bestätigt (Reinecke et al., 2000). In einem weiteren Projekt zur neuronalen Regeneration im zentralen Nervensystem wurden vergleichbare Experimente am N. opticus durchgeführt. Nach computergestützter Auswertung der axonalen Elongation zeigte sich, daß ANG II als neurotropher Faktor wirkt und durch den AT₂-Rezeptor vermittelt die Regeneration des Nervus opticus *in vivo* fördert (Lucius et al., 1998). Diese Arbeit zeigte erstmals, daß ANG II über den AT₂-Rezeptor *in vivo* an einer funktionellen neuronalen Regeneration auch im zentralen Nervensystem beteiligt ist (siehe auch eigene Vorarbeiten). Es gibt Befunde, die auf eine Interaktion zwischen AT₁- und AT₂-Rezeptoren im Gehirn bzw. in Neuronen in Kultur hindeuten. Untersuchungen an wachen Ratten zeigten, daß die durch Stimulation zentraler AT₁-Rezeptoren induzierte Vasopressin-Freisetzung und Trinkantwort durch Vorbehandlung mit einem AT₂-Rezeptor-Antagonisten verstärkt wurde. Dies würde bedeuten, daß zentrale AT₁-Rezeptoren unter inhibitorischer Kontrolle durch AT₂-Rezeptoren stehen (Höhle et al., 1995a, 1995b).

3.3.2 Angiotensin und Schlaganfall

Einen interessanten neuen Aspekt eröffnen Untersuchungen, die zeigen, daß Ang II unter Beteiligung seiner beiden Rezeptorsubtypen im Gehirn, AT₁ und AT₂, eine Rolle bei pathophysiologischen Veränderungen spielt, die nach einem Schlaganfall im Gehirn ablaufen. Dabei scheinen die beiden Rezeptoren miteinander zu interagieren.

Bei einem Schlaganfall kommt es durch den entstehenden Sauerstoffmangel zu einer Schädigung des betroffenen Gebietes. Dabei sterben die Neurone im Kerngebiet des Infarktes ab, während Neurone im Randgebiet des Infarktes, der sogenannten Penumbra, sehr viel länger überleben und sich teilweise sogar regenerieren können. Die Penumbra ist deshalb Ziel therapeutischer Intervention. Da das Gehirn eine nur geringe Ischämietoleranz hat, führt der Zusammenbruch der Sauerstoff- und Glukoseversorgung zu einer Reihe von morphologischen und biochemischen Veränderungen (Yang et al 1992; Pulsinelli 1992; Hossmann et al. 1995; Dirnagl et al. 1999).

Zu den Prozessen, die durch eine Ischämie ausgelöst werden, gehört auch die Expression von ITF wie c-Fos oder c-Jun. Untersuchungen zeigen, daß c-Jun das Absterben von Neuronen vermitteln kann (Herdegen et al. 1997). So weisen Neurone, denen der Nervenwachstumsfaktor NGF entzogen wurde, stark erhöhte Expressionsraten von c-Fos und c-Jun auf; eine Behandlung mit spezifischen Antisense-Oligomeren gegen die mRNA dieser Transkriptionsfaktoren oder mit spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine erhöht die Überlebensrate der neuronalen Zellen und schützt sie vor Apoptose (Schlingensiepen et al. 1993). Im ischämischen Gehirngewebe scheint die Expression von c-Jun und c-Fos direkt mit der Verletzbarkeit des entsprechenden neuronalen Gewebes assoziiert zu sein; hypoxische Neurone weisen nämlich ein zeitlich und örtlich differenziertes Muster der Expression dieser Proteine auf, das parallel zum ischämischen Zelltod verläuft (Dragunow et al. 1994).

Es gibt verschiedene, teilweise kontroverse Befunde, daß Ang II und seine beiden Rezeptoren eine Rolle bei pathophysiologischen Prozessen nach Schlaganfall spielen. So erhöhte eine intravenöse Behandlung mit dem Peptid die Überlebensrate von Wüstenspringmäusen, deren Gehirn durch unilaterale Ligatur der Arteria carotis die Sauerstoffversorgung entzogen war (Fernandez et al 1986). Andererseits konnte in Untersuchungen an spontan hypertensiven Ratten (SHR) sowie an Salz-belasteten Dahl-Ratten gezeigt werden, daß eine systemische Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten oder Hemmern des Angiotensin-Konversionsenzymes (ACE) den neurologischen Status nach Ischämie verbesserte, die

Schlaganfallinzidenz allgemein senkte und das Infarktvolumen nach Ischämie verkleinerte (Stier et al. 1993; von Lutterotti et al. 1992). Es lag nahe, anzunehmen, daß diese positiven Effekte auf eine Senkung des Blutdruckes bei den Ratten zurückzuführen waren. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, daß ACE-Hemmer den Metabolismus des ischämischen Gehirns bei SHR verbesserten (Sadoshima et al. 1993) und in normotensiven Ratten ebenfalls das Ausmaß neurologischer Ausfälle nach Ischämie verringerten (Werner et al. 1991). Wir konnten zeigen, daß eine mehrtägige intracerebroventrikuläre Vorbehandlung mit den AT1-Rezeptor-Antagonisten Irbesartan und Losartan das Ausmaß der neurologischen Ausfälle nach Gehirnschämie verringerte. Obwohl eine alleinige Vorbehandlung mit dem AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123177 keine Auswirkung auf den neurologischen Status nach Schlaganfall zeigte, vermochte der AT2-Rezeptor-Antagonist die günstige Auswirkung der AT1-Rezeptor-Blockade auf das Ausmaß der neurologischen Ausfälle nach fokaler Ischämie aufzuheben (siehe eigene Vorarbeiten). Es ist nicht bekannt, auf welche Mechanismen die beschriebenen protektiven Effekte beruhen. Interessant ist aber in diesem Zusammenhang, daß nach globaler Ischämie die Expression der AT2-Rezeptor- mRNA im Cortex und Hippocampus deutlich erhöht ist (Makino et al. 1996).

3.3.3 Beteiligte Zelltypen

Das ZNS besteht aus unterschiedlichen Zelltypen; diese umfassen neben Neuronen, Mikroglia und makroglialen Zellen, die sich in die beiden Hauptgruppen Astrocyten und Oligodendrocyten unterteilen lassen, auch Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Zusätzlich kommt es nach Verletzungen neben dem kontinuierlichen turnover auch zu einer verstärkten Einwanderung von Makrophagen an die Stelle des Insults. Unklar ist bisher, welche Zelltypen an den oben beschriebenen Effekten beteiligt sein könnten. Ang II und Komponenten des RAS sind in Neuronen, Astroglia und auch in Makrophagen nachgewiesen worden. Nach Gehirnverletzung nimmt die Zahl der Astrocyten im Bereich der Verletzung zu; gleichzeitig werden Astrocyten in tieferen Schichten reaktiv, ohne sich zu teilen. Es ist mehrfach gezeigt worden, daß Astrocyten den Angiotensin II-Vorläufer Angiotensinogen synthetisieren, und nach Verletzung wird die Angiotensinogen-Genexpression hochreguliert. Die Immunreaktivität für Ang II ist unter diesen Bedingungen ebenfalls erhöht (Lippoldt et al. 1994). Diese Befunde lassen vermuten, daß Astrocyten auch der Zelltyp sind, der die oben beschriebenen positiven Effekte nach Schlaganfall vermittelt, oder doch entscheidend daran beteiligt ist. Während Neurone sowohl den AT1- als auch den AT2-Rezeptor exprimieren, scheinen Astrocyten unter Normalbedingungen in erster Linie den AT1-Rezeptor zu exprimieren (Sumners et al. 1991). Auf humanen Astrocyten ist auch der AT2-Rezeptor nachgewiesen worden; über diesen Rezeptor wird eine Ang II-induzierte Freisetzung von PGI₂ und teilweise auch von PGE₂ vermittelt (Jaiswal et al. 1991). Nicht bekannt ist, ob der AT2-Rezeptor auf Astrocyten nach Verletzung ähnlich wie in anderen Geweben hochreguliert wird. Die Expression von AT1-Rezeptoren auf Astrocyten wird z.B. durch Wachstumshormon (GH, growth hormone) reguliert (Wyse und Sernia 1997). Die Stimulation von AT1-Rezeptoren in Astroglia in Kultur führt zur Aktivierung von Phospholipase C mit nachfolgender Phosphoinositol-Hydrolyse und Erhöhung intrazellulären Calciums, welches seinerseits Proteinkinase C aktiviert (Sumners et al. 1991; Wang et al. 1996; Sumners et al. 1994). Außerdem induziert eine Stimulation mit Ang II in kultivierten Astroglia auch die Expression von c-Fos (Raizada et al. 1993). Ang II stimuliert in Gliazellen die Freisetzung von Prostaglandinen und dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, ein Molekül, das eng verwandt mit der Protease Nexin-1 (PN-1) ist (Jaiswal et al. 1991; Olson et al. 1991; Gloor et al. 1986). Protease Nexin-1 ist ein Serin-Protease-Inhibitor, der die Neuriten-Aussprossung stimuliert und in Schwann-Zellen durch Ang II reguliert wird; dabei scheinen beide AT-Rezeptoren eine Rolle zu spielen (Bleuel et al. 1995). In Astrocyten wird PN-1 nach Ischämie vermehrt gebildet.

Eine andere wichtige Zellgruppe bilden Makrophagen und Makrophagen-ähnliche Mikroglia. Mikroglia stammen aus dem myelomonozytären System, machen 12% der Zellen im ZNS aus und sind die primären Zellen der Immunantwort im Gehirn. Nach Schlaganfall wandern Mikroglia zum geschädigten Gewebe, proliferieren und gehen in einen aktivierten Zustand über, in welchem sie eine Vielzahl von Mediatoren wie inflammatorische Zytokine, Chemokine und MHC Antigene produzieren und phagozytisch werden. Es ist bisher nicht bekannt, ob Mikroglia Angiotensin-Rezeptoren exprimieren. Gezeigt worden ist allerdings, daß Makrophagen Komponenten des RAS und insbesondere auch Angiotensin-Rezeptoren beider Subtypen exprimieren (Okamura et al. 1999) und daß bei Entzündungen peripherer Organe (z.B. Nephritis) Ang II und AT-Rezeptoren auf Makrophagen beteiligt sind (Suzuki et al. 1998). Da Makrophagen zwar in begrenztem Umfang im Gehirn vorhanden sind, in großer Zahl aber erst nach

Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke in ischämische nekrotische Gehirngebiete einwandern, ist es unwahrscheinlich, daß sie bei den pro-regenerativen Effekten einer chronischen AT₁-Rezeptor-Blockade in der Penumbra eine Rolle spielen. Möglich erscheint dagegen, daß Mikroglia, die im aktivierten Zustand viele Makrophagen-Eigenschaften haben, an den beobachteten Effekten beteiligt sein könnten.

Literatur

- Bleuel A, de Gasparo M, Whitebread S, Püttner I, Monard D (1995) Regulation of protease nexin-1 expression in cultured Schwann cells is mediated by angiotensin II receptors. *J Neurosci* 15, 750-761.
- Blume A, Herdegen Th, Unger Th (1999) Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J Mol Med* 77, 339-357.
- Culman J, Höhle S, Qadri F, Edling O, Blume A, Lebrun C, Unger Th (1995). Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis. *Clin Exp Hypertens* 17, 281-293.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391-397.
- Dragunow M, Beilharz E, Sirimanne E, Lawlor P, Williams C, Bravo R, Gluckman P (1994) Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic-ischemic injury to the young rat brain. *Mol Brain Res* 25, 19-33.
- Erdmann B, Fuxe K, Ganten D (1996) Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebral cortex. *Hypertension* 28, 813-824.
- Fernandez LA, Spencer DD, Kaczmar TJ (1986) Angiotensin II decreases mortality rate in gerbils with unilateral carotid ligation. *Stroke* 17, 82-85.
- Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger Th, Herdegen Th (1998) Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT₂- and AT₁ receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Mol Brain Res* 57, 111-122.
- Gloor S, Odink K, Geuther J, Nick H, Monard D (1986) A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell* 47, 687-93.
- Herdegen T, Skene P, Bähr M (1997) The c-Jun transcription factor – bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *TINS* 20, 227-231.
- Höhle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J, Unger Th (1995a) Angiotensin AT₁ receptor-mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT₂ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 275, 277-282.
- Höhle S, Blume A, Lebrun C, Culman J, Unger Th (1995b) Angiotensin receptors in the brain. *Pharmacol Toxicol* 77, 306-315.
- Hossmann K-A, Mies G, Paschen W, Csiba L, Bodsch W, Rapin JR, Le Poncin-Laffite M, Takahashi K (1985) Multiparametric imaging of blood flow and metabolism after middle cerebral artery occlusion in cats. *J Cereb Blood Flow Metabol* 5, 97-107.
- Jaiswal N, Tallant EA, Diz DI, Khosla MC, Ferrario CM (1991) Subtype 2 angiotensin receptors mediate prostaglandin synthesis in human astrocytes. *Hypertension* 17, 1115-1120.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C (1997) Expression of angiotensin type-1 (AT₁) and type-2 (AT₂) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 18, 383-439.
- Lippoldt A, Bunnemann B, Ueki A, Rosen L, Cintra A, Hasselrot U, Metzger R, Hilgenfeld U, Brosnihan B, Ganten D, Fuxe K (1994) On the plasticity of the cerebellar renin-angiotensin-system: localization of components and effects of mechanical perturbation. *Brain Res* 668, 1444-159
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen Th, Sievers J, Unger Th (1998) The angiotensin AT₂-receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188, 661-670.
- Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Fujiwara M, Furukawa T (1996) Transient upregulation of the AT₂ receptor mRNA level after global ischemia in the rat. *Neuropeptides* 30, 596-601.
- Obermüller N, Unger Th, Culman J, Gohlke P, de Gasparo M, Bottari S (1991) Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei. *Neurosci Lett* 132, 11-15.
- Olson JA, Shiverick KT, Ogilvie S, Bui WC, Raizada MK (1991) Angiotensin II induces secretion of plasminogen activator inhibitor 1 and a tissue metalloprotease inhibitor-related protein from rat brain astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1928-1932.

- Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennessy PA, Higaki J, Ogihara T (1999) Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens* 17, 537-545.
- Pulsinelli W (1992) Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet* 339, 533-536
- Raizada MK, Rydzewski B, Lu D, Summers C (1993) Angiotensin II type 1 receptor-mediated stimulation of c-fos gene expression in astroglial cultures. *Am J Physiol* 265, C1046-C1049.
- Reinecke K, Lucius R, Herdegen T, Unger Th (2000) Angiotensin increases the rate of functional regeneration in the rat sciatic nerve. Abstract. *Hypertension* 36, 658.
- Sadoshima S, Fujii F, Ooboshi H, Ibayashi S, Fujishima M (1993) Angiotensin converting enzyme inhibitors attenuate ischemic brain metabolism in hypertensive rats. *Stroke* 24, 1561-1567.
- Schlingensiepen KH, Schlingensiepen R, Kunst M, Klinger I, Gerdes W, Seifert W, Brysh W (1993) Opposite functions of Jun-B and c-Jun in growth regulation and neuronal differentiation. *Dev Genetics* 14, 305-312.
- Stier CT Jr, Adler LA, Levine S, Chander PN (1993) Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens (Suppl.)* 11, S37-S42.
- Summers C, Tang W, Zelezna B, Raizada MK (1991) Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal transduction mechanisms in neurons and astroglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7567-7571.
- Summers C, Tang W, Paulding W, Raizada MK (1994) Peptide receptors in astroglia: focus on angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *Glia* 11, 110-116.
- Suzuki Y, Shirato I, Okumura K, Ravetch JV, Takai T, Tomino Y, Ra C (1998) Distinct contribution of Fc receptors and angiotensin II-dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.* 54, 1166-1174.
- Unger Th, Badoer E, Ganten D, Lang E, Rettig R (1988) Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation* 77 (suppl 1), 1-40.
- Von Lutterotti N, Camargo MJ, Campbell WG Jr, Mueller FB, Timmermans PB, Sealey JE, Laragh JH (1992) Angiotensin II receptor antagonist delays renal damage and stroke in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 10, 949-957.
- Wang D, Martens JR, Posner P, Summers C, Gelband CH (1996) Angiotensin II regulation of calcium in astroglia cultured from rat hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 67, 996-1004.
- Wyse B, Sernia C (1997) Growth hormone regulates AT1a angiotensin receptors in astrocytes. *Endocrinology* 138, 4176-4180.
- Yang GY, Chen SF, Kinouchi H, Chan PH, Weinstein PR (1992) Edema, cation content, and ATPase activity after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23, 1331-1336.
- Yang G, Gray TS, Sigmond CD, Cassell MD (1999) The angiotensin gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. *Brain Res* 817, 123-131.

3.4 Eigene Vorarbeiten

3.4.1 Signaltransduktion des AT2-Rezeptors

Studien zur Signaltransduktion des AT2-Rezeptors, die seit mehreren Jahren in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt werden, beschäftigten sich schwerpunktmäßig mit der Beteiligung von MAP-Kinasen sowie Stickstoffmonoxid (NO) an AT2-Rezeptor-vermittelten Differenzierungs- und Regenerationsprozessen einerseits sowie mit der Rolle von Ceramiden bei der AT2-Rezeptor-induzierten Apoptose in PC12W-Zellen andererseits. So konnten wir an PC12W-Zellen zeigen, daß der AT2-Rezeptor die Aktivität der MAP Kinase ERK1/2 abhängig von der Gesamtheit der die Zelle treffenden Signale moduliert: unter Bedingungen, die das Neuritenwachstum bei diesen Zellen fördern, erhöhte eine Stimulation des AT2-Rezeptors allein die ERK-Aktivität, während eine NGF-vermittelte ERK-Stimulation durch Kostimulation mit Ang II über den AT2-Rezeptor verringert wurde (Stroth et al. 2000). Weitere Untersuchungen wurden an Aorten von spontan hypertensiven Ratten (SHR-SP) durchgeführt, denen Ang II infundiert wurde. Ang II erhöhte über eine Stimulation des AT2-Rezeptors den sekundären Botenstoff cGMP in der Aorta; diese Erhöhung war nicht durch die Erhöhung des Blutdruckes induziert, sondern wurde durch Aktivierung von Bradykinin B2-Rezeptoren vermittelt, welche ihrerseits die NO-Synthase aktivierten und damit zu einer NO Produktion führten (Gohlke et al. 1998). AT2-Rezeptor-aktivierte Signaltransduktionswege spielen andererseits eine Rolle bei der Apoptose: eine Stimulation von PC12W-Zellen mit Ang II unter Kulturbedingungen, die Apoptose ermöglichen, rief eine

AT2-Rezeptor-vermittelte Erhöhung der Ceramid-Spiegel hervor, die ultimativ in programmiertem Zelltod endet (Gallinat et al. 1999).

Studien zum Einfluß von AT-Rezeptoren auf Komponenten der extrazellulären Matrix in vaskulären Zellen sowie auf Zytoskelett-Proteine (Neurofilament M, Microtubuli-assoziiertes Protein) in PC12W-Zellen ergaben Hinweise auf eine mögliche Funktion von ANG II als neurotropher Faktor bei der Regeneration peripherer Nerven (Gallinat et al. 1997; Stroth et al. 1998; Fischer et al. eingereicht).

3.4.2 AT-Rezeptoren und Regeneration peripherer Nerven

In Einklang mit der Hypothese, daß Ang II positiv auf die Nervenregeneration einwirkt, konnten wir zeigen, daß die mRNA-Expression beider AT-Rezeptoren nach Axotomie des N. ischiadicus bei adulten Ratten zeitabhängig in proximalen und distalen Nervenstümpfen erhöht ist: das Maximum der AT2-Rezeptor mRNA-Expression lag im proximalen Nervenstumpf bei 3 Tagen nach Axotomie, im distalen Stumpf bei 14 Tagen. Auch eine Quetschung des Ischiasnerven resultierte in einer dramatischen Erhöhung der AT2-Rezeptor mRNA; die Stimulation der AT2-Rezeptor mRNA-Expression in den Nervensegmenten verlief zeitlich parallel zur Regeneration der Nervenfasern (Gallinat et al. 1998) Diese Ergebnisse lieferten weitere Hinweise darauf, daß der AT2-Rezeptor die neuronale Regeneration fördern kann. Neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit der funktionellen Regeneration des N. ischiadicus in vivo. Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine chronische lokale Applikation von ANG II die funktionelle Wiederherstellung nach Quetschung des Ischiasnerven fördert. Auch diese Effekte erwiesen sich als AT2-Rezeptor-vermittelt (Reinecke et al., 2000).

3.4.3 AT2-Rezeptor und Regeneration zentraler Nerven

Weiterführende Untersuchungen zur neuronalen Regeneration im zentralen Nervensystem wurden an Retina-Explantaten sowie in vivo am N. opticus durchgeführt. Ang II induzierte an postnatalen (postnataler Tag 11) Retina-Explantaten über eine Stimulation des AT2-Rezeptors das Neuritenwachstum. Um festzustellen ob Ang II die axonale Regeneration auch in vivo stimuliert, wurden Versuche mit einem Crush-Modell des Sehnerven durchgeführt. Nach Ang II-Behandlung zeigte sich eine erhöhte Anzahl GAP-43 (Wachstums-assoziiertes Protein-43)-positiver Fasern, und die regenerierenden Fasern kreuzten die Läsionsstelle. Die computergestützte Auswertung der axonalen Elongation ergab, daß Ang II in vivo als neurotropher Faktor das Aussprossen von Nervenfasern nach Verletzung fördert; diese Effekte des Peptids sind AT2-Rezeptor-vermittelt. Damit war erstmals in vivo ein Beweis erbracht, daß ANG II über den AT2-Rezeptor an einer neuronalen Regeneration auch im zentralen Nervensystem beteiligt ist (Lucius et al. 1998).

3.4.4 AT1 Rezeptor-vermittelte Expression induzierbarer Transkriptionsfaktoren

Ang II erhöht über eine Stimulation zentraler AT1-Rezeptoren auch die Expression von induzierbaren Transkriptionsfaktoren (ITF) wie z. B. c-Fos oder c-Jun (Lebrun et al. 1995). Diese ITF-Expression ist auf distinkte Gehirnregionen begrenzt, welche an der Regulation der Volumenhomeostase und der Osmoregulation durch Ang II beteiligt sind. Die Ang II-induzierte ITF-Expression ist auch zeitlich hochdifferenziert und in genetisch hypertensiven Ratten, die ein hochreguliertes RAS im Gehirn aufweisen, signifikant höher als in normotensiven Kontrolltieren (Blume et al. 1997; 1998). Zur Zeit untersuchen wir die Signaltransduktionswege, die den AT1-Rezeptor mit der Expression von c-Fos und c-Jun verbinden.

3.4.5 Einfluß von AT-Rezeptoren auf die Pathophysiologie nach Schlaganfall

Grundlage unseres Projektvorschlages sind neben den oben erwähnten Arbeiten Untersuchungen zur Rolle von AT-Rezeptoren bei der Pathophysiologie nach Schlaganfall: an einem Rattenmodell der fokalen Ischämie mit Reperfusion konnten wir zeigen, daß eine chronische Blockade von zentralen AT1-Rezeptoren den neurologischen Status nach Schlaganfall signifikant verbessert; für diesen positiven Effekt der AT1-Rezeptor-Inhibition war das Vorhandensein intakter AT2-Rezeptoren im Gehirn notwendig. Außerdem wurde durch eine Blockade des AT1-Rezeptors die Ischämie-induzierte Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun in Cortex und Hippocampus deutlich verringert; auch hier zeigte eine alleinige Blockade des AT2-Rezeptors keinen Effekt, durch gleichzeitige Blockade von AT2-Rezeptoren wurden jedoch die Effekte der AT1-Rezeptor-Blockade rückgängig gemacht (Dai et al 1999; Culman et al. eingereicht). Bisher ist nicht klar, ob die Apoptose-fördernden oder die pro-regenerativen Effekte des AT2-Rezeptors für die beobachteten Wirkungen verantwortlich sind.

Verzeichnis der themenbezogenen eigenen Publikationen aus den letzten Jahren

- Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Paul M, Metzger R, Unger Th (1995) The Angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95, 651-657.
- Lebrun C, Blume A, Herdegen Th, Seifert K, Bravo R, Unger Th (1995) Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: Expression of Fos, Jun and Krox proteins. *Neuroscience* 65, 93-99.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger Th (1996) The angiotensin II AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 122, 59-67.
- Blume A, Lebrun C, Herdegen Th, Linz W, Bravo R, Möllenhoff E, Unger Th (1997) Angiotensin II induces an increased expression of inducible transcription factors in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29, 592-598.
- Gallinat S, Csikós T, Meffert S, Herdegen Th, Stoll M, Unger Th (1997) The angiotensin AT₂ receptor down-regulates neurofilament M in PC12W cells. *Neurosci Lett* 227, 29-32.
- Steckelings UM, Bottari SP, Stoll M, Wagner J, Unger Th (1998) Repression of c-fos and c-jun gene expression is not part of AT₂ receptor-coupled signal transduction. *J Mol Med* 76, 202-207.
- Blume A, Seifert K, Lebrun CJ, Möllenhoff E, Gass P, Bravo R, Unger Th, Herdegen Th. (1998) Differential time course of angiotensin-induced AP-1 and Krox proteins in the rat lamina terminalis and hypothalamus. *Neurosci Lett* 241, 87-90.
- Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger Th (1998) Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: Role of the AT₂ receptor. *Mol Brain Res* 53, 187-195.
- Gohlke P, Pees C, Unger Th (1998) Angiotensin AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31, 349-355.
- Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger Th, Herdegen Th (1998) Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT₂- and AT₁ receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Mol Brain Res* 57, 111-122.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen Th, Sievers J, Unger Th (1998) The angiotensin AT₂-receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188, 661-670.
- Gallinat S, Busche S, Schütze S, Krönke M, Unger Th (1999) AT₂-receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett* 443, 75-79.
- Blume A, Herdegen Th, Unger Th (1999) Angiotensin peptides and inducible transcription factors. *J Mol Med* 77, 339-357.
- Dai W-J, Funk A, Herdegen Th, Unger Th, Culman J (1999) Blockade of central angiotensin AT₁ receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke* 30, 2391-2399.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger Th (2000) The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52 (3), 415-472.
- Stroth U, Blume A, Mielke K, Unger Th (2000) Angiotensin AT₂-receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Mol Brain Res* 78, 175-180.
- Blume A, Kaschina E, Unger T. (2001) Angiotensin II type 2 receptors: signalling and pathophysiological role. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 239-246.
- Fischer JW, Stoll M, Hahn AWA, Unger Th (2001) Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in endothelial cells in vitro. Eingereicht bei *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*.
- Culman J, Dai W, Gohlke P, Blume A, Unger Th (2001) Inhibition of central angiotensin AT₂ receptors prevents the beneficial effects of AT₁ receptor blockade on neurological outcome after focal brain ischemia in the rat. Eingereicht bei *Neuropharmacology*.

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1 Ziele

Unsere Studien zur AT₂-mRNA-Expression sowie zur Regeneration nach Quetschung des N. ischiadicus zeigten, daß Ang II über den AT₂-Rezeptor auf Prozesse sowohl distal als auch proximal zur Läsion einwirkt. Diese Befunde lassen vermuten, daß nicht nur neuronale Zellen, sondern auch Gliazellen an den

AT2-Rezeptor-vermittelten positiven Einflüssen auf die Regeneration beteiligt sind. Geplant sind daher folgende Untersuchungen:

1. Intakte AT2-Rezeptoren sind für die positiven Effekte einer Blockade zentraler AT1-Rezeptoren auf den neurologischen Status nach Schlaganfall notwendig. Kolokalisations-Untersuchungen mit Markern für verschiedene Zelltypen des ZNS sollen Aufschluß darüber geben, auf welchen Zellpopulationen AT-Rezeptoren im intakten Gehirn exprimiert werden. In einem zweiten Versuchsansatz soll dann untersucht werden, auf welchen Zellen diese Rezeptoren nach Schlaganfall lokalisiert sind, ob insbesondere AT2-Rezeptoren unter diesen pathologischen Bedingungen im Bereich der Penumbra reguliert werden und ob eine chronische Vorbehandlung mit AT-Rezeptor-Antagonisten die Rezeptor-Zahl und/oder Lokalisation beeinflusst.
2. AT2-Rezeptoren werden nach Schlaganfall hochreguliert und scheinen an pathophysiologischen Vorgängen nach Ischämie beteiligt zu sein. Vieles spricht dafür, daß Astrocyten eine wesentliche Rolle in diesem Zusammenhang spielen. Daher ist geplant, Astrocyten in Kultur zu nehmen und mit dem AT2-Rezeptor zu transfizieren. Dabei dienen transfizierte Astrocyten mit einer hohen AT2-Rezeptor-Expression in einem ersten Schritt als mögliches pathophysiologisches Modell der Situation nach Schlaganfall. An diesem Modell sollen Signaltransduktionsmechanismen (insbesondere Kinasen/Phosphatasen) und Interaktionen der beiden AT-Rezeptoren untersucht werden. Weiterhin ist geplant, die transfizierten Astrocyten für Untersuchungen in Kokultur mit Neuronen zu verwenden, um festzustellen, ob eine Stimulation von AT2-Rezeptoren in Astrocyten unter Kulturbedingungen Mediatoren freisetzt, die Neurone beeinflussen können.
3. Mikroglia im Gehirn sind eine weitere Zellpopulation, die möglicherweise an den beschriebenen Effekten beteiligt ist. Bis jetzt ist (anders als bei Astrocyten) nicht untersucht, ob Angiotensin oder seine Rezeptoren von Mikroglia exprimiert oder reguliert werden. Für Makrophagen konnte jedoch eine Expression von AT-Rezeptoren gezeigt werden. Da Mikroglia-Zellen sowohl von ihrer Funktion und Physiologie her Makrophagen-ähnlich sind, soll festgestellt werden, ob Mikroglia AT-Rezeptoren exprimieren und ob diese möglicherweise unter pathologischen Bedingungen reguliert sind (siehe auch Punkt 1). Diese Untersuchungen sollen an primären Mikroglia aus postnatalen Ratten (P2) durchgeführt werden. Falls eine Expression von Rezeptoren nachgewiesen werden kann, sollen sich Untersuchungen zur Signaltransduktion und Untersuchungen von Faktoren, die möglicherweise als Antwort auf eine AT-Rezeptor-Stimulation sezerniert werden, anschließen. Dies schließt auch eine Transfektion von Mikroglia mit dem AT2-Rezeptor analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit Astroglia ein, falls sich ergibt, daß AT2-Rezeptoren auf diesen Zellen in Ruhe kaum ausgeprägt sind, aber unter Ischämie-Bedingungen hochreguliert werden.

3.5.2 Methoden und Arbeitsprogramm

Modell der fokalen Gehirnschämie mit Reperfusion

In unseren Studien wird ein Modell einer distalen, unilateralen Okklusion der mittleren zerebralen Arterie (MCA) mit Reperfusion verwendet (Koizumi et al., 1986). Dieses Modell hat klinische Relevanz, da bei Schlaganfällen eine Reperfusion oft spontan, z.B. durch eine Auflösung des Embolus oder eine klinische Intervention auftritt. Die Okklusion der MCA ist für mindestens 25 % aller ischämischen Schäden beim Menschen verantwortlich, manche Studien berichten sogar, daß mehr als 80 % aller zerebralen Infarkte durch eine Verletzung oder Okklusion der MCA verursacht seien (McAuley, 1995). Von den am häufigsten benutzten Methoden der experimentellen Okklusion der MCA ohne Kraniektomie bei Nagern verursacht die vorgesehene Methode die wenigsten Komplikationen und bringt die konsistentesten Ergebnisse (Laing et al., 1993).

Die Versuche werden an männlichen Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld) durchgeführt. In tiefer Narkose wird entlang der Mittellinie ein Schnitt am Hals durchgeführt und die rechte A. carotis communis freipräpariert. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops wird die A. carotis externa ligiert und die A. carotis interna bis zum Canalis caroticus in der Schädelbasis frei präpariert. Danach wird die A. carotis communis ligiert. Oberhalb der Ligatur wird ein Faden in die A. carotis communis eingeführt und in die Richtung A. carotis interna und MCA geschoben, bis er auf Widerstand trifft. Nach 90 min wird der Faden aus der MCA gezogen und die Ligatur der A. carotis communis entfernt. Für die Okklusion wird

ein spezieller Faden verwendet (4/0, Monofilament, ETHILON[®], ETHICON GmbH, KG Heidelberg). Der Faden wird mit Silikon so überzogen (Provil[®], Bayer AG), daß der Durchmesser des Fadenendes 0,25 mm beträgt. Bei scheinoperierten Tieren wird kein Faden in die A. carotis communis eingeführt. Eine gleichbleibende Körpertemperatur von 37°C während des Eingriffes wird durch Lagern der Tiere auf einer Heizmatte sichergestellt. Die Perfusion in den zerebralen Cortex jeder Hemisphäre im Versorgungsgebiet der mittleren zerebralen Arterie wird mittels Laser-Doppler-Messung bestimmt; einsetzend vor Beginn der Ischämie bis ca. 40 Minuten nach Reperfusion; in die Versuche gehen nur Tiere ein, bei denen die Restperfusion während der ersten 30 Minuten nach Okklusion des Gefäßes bei unter 20 % liegt. Nach Beendigung des Versuches wird, soweit im Rahmen des Versuchablaufs möglich, das Infarktvolume bestimmt (Färbung mit Kresylviolett). Wo zeitlich möglich, wird außerdem das Ausmaß der neurologischen Ausfälle 24 Stunden nach der Induktion der Gehirnschämie untersucht. Die neurologischen Ausfälle werden gemäß der Skala von Garcia et al. (1995) bestimmt. Diese Untersuchungen bestehen aus der Quantifizierung einer ganzen Reihe von Parametern wie der Spontanaktivität der Tiere, der Symmetrie der Bewegungen aller vier Pfoten, dem Vorderpfoten-Ausstrecken (Forepaw Outstretching), dem Klettern an einem Stahlgitter und der Reaktion auf propriozeptive Stimulation. Die Bestimmung dieser zusätzlichen Parameter ist sinnvoll, da häufig die Größe des Schlaganfalles nicht mit dem Grad neurologischer Ausfälle korreliert ist. Die beschriebenen Methoden sind in unserem Tierlabor etabliert (Dai et al. 1999).

3.5.2.1 Zelluläre Lokalisation und Regulation von AT-Rezeptoren in der Penumbra nach Schlaganfall

Um die Mechanismen der positiven AT-Rezeptor-Effekte nach Ischämie genauer untersuchen zu können, ist es notwendig, die beteiligten Zelltypen im ZNS in situ zu charakterisieren. Dazu sollen immunhistochemische Untersuchungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen den AT1-Rezeptor oder den AT2-Rezeptor an Gehirnschnitten durchgeführt werden. Durch Verwendung von spezifischen Markern für Neurone (NSE, MAP-2, Neurofilament L), Astroglia (GFAP, Vimentin), Oligodendrocyten (CNP, CA II, MBP) und Mikroglia (OX42, Ki-M6, ED-1, Iba-1) in Kombination mit den spezifischen AT-Rezeptor-Antikörpern soll eine zelluläre Auflösung des Expressionsmusters ermöglicht werden. Für die Immunhistochemie wird ein System der Firma Vectastain (ABC-Kit, enthält biotinylierten sekundären Antikörper zur Signalverstärkung sowie Avidin-gekoppelte Peroxidase) sowie Diaminobenzidin bzw farbige Substrate der Firma Vectastain als Chromogene verwendet. Alternativ werden Fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper und konfokale Lasermikroskopie benutzt (Verwendung des SFB-eigenen Multiphotonen Konfokalen Laser Scanning Mikroskopes). Die Untersuchungen sollen sowohl an unbehandelten Tieren als auch an Tieren mit Ischämie (siehe Ischämie-Modell) durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit, die AT-Rezeptor-Verteilung im Gehirn zu studieren, ist die In situ-Hybridisierung an Gehirnschnitten; diese Methode erlaubt eine bessere Quantifizierung des Signals als die Immunhistochemie. Dazu werden koronare Schnitte mit radioaktiv markierten komplementären Proben gegen die AT1- bzw. AT2-Rezeptor-mRNA inkubiert. Die Proben werden durch in vitro-Transkription von Plasmid-kodierten Rezeptor-Sequenzen (Zusammenarbeit mit M. Bader, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) unter Verwendung von ³²P-rCTP radioaktiv markiert. Die Auswertung erfolgt durch Exposition auf Autoradiographie-Film. Diese Techniken sind in unserem Labor etabliert und werden routinemäßig angewendet. Vorerst ist geplant, die Rezeptorexpression zu den Zeitpunkten 3 h, 24 h, 3 Tage und 7 Tage nach Ischämie genauer zu untersuchen (Makino et al. 1996).

Um die Regulation der AT-Rezeptoren nach Ischämie sowie den Einfluß einer chronischen Behandlung mit Rezeptorantagonisten zu studieren, soll wieder das Modell der Ischämie mit Reperfusion verwendet werden. Im Rahmen der geplanten Versuche werden normotensive Ratten an fünf aufeinander folgenden Tagen über osmotische Pumpen (Alzet, Modell No. 2002; Perfusionsgeschwindigkeit 0,5 l/h) intrazerebroventrikulär mit spezifischen Rezeptorantagonisten gegen den AT1- oder den AT2-Rezeptor behandelt. Die Dosis (2 nmol/h für Losartan; 1 nmol/h für PD123 319) ist dabei so gewählt, daß selektiv zentrale, nicht aber periphere AT-Rezeptoren inhibiert werden. Am sechsten Tag erfahren die Tiere für 90 min eine fokale zerebrale Ischämie, gefolgt von einer Reperusionsphase. Die Untersuchung der Rezeptorregulation erfolgt mit den oben beschriebenen Methoden; vorerst ist geplant, die Expression zu den Zeitpunkten 3 h, und 24 h nach Ischämie zu untersuchen (Makino et al. 1996). Zusätzlich soll zur genaueren Quantifizierung der Regulation die Technik der Ligandenbindung mit Iod-markierten Ang II-Analoga ([¹²⁵I-Sar1-Ile8]-Angiotensin II) verwendet werden. Dazu werden koronare Gehirnschnitte (10 m) auf Objektträger aufgebracht und mit ¹²⁵I-markiertem Sarilesin (ein Ligand für beide AT-Rezeptor-

Subtypen) inkubiert. Der Grad unspezifischer Bindung wird über Koinkubation mit einem Überschuß nicht-radioaktiven Angiotensins bestimmt, der Beitrag der beiden Rezeptor-Subtypen zur Gesamtbindung durch Koinkubation mit dem AT2-Rezeptorantagonisten PD 123 319 (für die Bestimmung der AT1-Rezeptoren) bzw. mit dem AT1-Rezeptorantagonisten Losartan (für die Bestimmung der AT2-Rezeptoren). Die Auswertung erfolgt über das Auflegen von Autoradiographiefilmen oder über direkte Exposition auf einer Photoemulsion.

3.5.2.2 Untersuchung der AT2-Rezeptor-Signaltransduktion und der Interaktion mit AT1-Rezeptoren an transfizierten Astrocyten

AT2-Rezeptoren werden unter pathophysiologischen Bedingungen verstärkt exprimiert. Folgende, in 3.2 und 3.3 ausführlicher erläuterte experimentelle Befunde haben zu der Hypothese geführt, daß Astrocyten der Zelltyp im ZNS sind, der wahrscheinlich den AT2-Rezeptor unter Normalbedingungen kaum (unter der Nachweisgrenze) exprimiert, in dem aber durch pathophysiologische Prozesse, wie sie z.B. nach Ischämie stattfinden, die AT2-Rezeptor-Expression hochreguliert wird:

1. nach Ischias-Nerven-Transektion ist die AT2-Rezeptor-Expression auch im distalen Nervenstumpf deutlich erhöht; dies bedeutet, daß die Rezeptor-Regulation distal in nicht-neuronalen Zellen stattfindet
2. es gibt bisher weder für Oligodendrocyten, noch für Mikroglia Befunde, die eine Expression von AT1- oder AT2-Rezeptoren beschreiben, wohl aber für Astrocyten
3. die beschriebenen Studien zur AT-Rezeptorexpression in Ratten sind an Primärkulturen von Astrocyten aus dem Hypothalamus durchgeführt worden. Der Hypothalamus ist eine Region mit hoher AT1-Rezeptor-Expression (diese Rezeptoren sind hier entscheidend an der Regulation von Blutdruck und Volumenhomeostase beteiligt), aber generell sehr schwacher AT2-Rezeptor-Expression, deshalb ist es wahrscheinlich, daß die AT2-Rezeptor-Expression hier unter der Nachweisgrenze lag (möglicherweise auch mit verursacht durch die Kulturbedingungen).
4. Untersuchungen an menschlichen Astrocyten haben eine Expression von AT2-Rezeptoren in diesen Zelltyp gezeigt

Primärkulturen sind ein Modellsystem, das der Situation in vivo ähnlicher ist als eine Zelllinie. Es ist bisher auch keine astrocytäre Zelllinie beschrieben worden, die einen oder beide AT-Rezeptoren exprimiert. Weiterhin ist es schwierig, direkte Studien zur Signaltransduktion in situ oder ex vivo durchzuführen, da man bei Untersuchungen einer Gehirnregion z.B. mit molekularbiologischen Methoden wie Western Blot oder Kinase-Assays immer Protein aus allen Zelltypen im Gewebeextrakt hat. Um die Auswirkungen einer AT2-Rezeptor-Stimulation bzw. -Hochregulation auf die Signaltransduktion von Astroglia untersuchen zu können, soll deshalb in einem ersten Schritt ein in vitro-Modell verwendet werden, welches das Erarbeiten grundlegender Mechanismen ermöglicht, die dann wieder auf die Situation in vivo übertragen werden können. Etwaige unter Kulturbedingungen auftretende Artefakte können durch die Überprüfung der gewonnenen Erkenntnisse im Tierversuch eliminiert werden. Dazu werden kortikale Astroglia in Kultur genommen und mit dem AT2-Rezeptor transfiziert. Zur Isolation von Astroglia werden die zerebralen Cortices von neugeborenen Ratten (<3 Tage) präpariert, von den Meningen befreit, die Zellen durch mehrfache Passage durch Nadeln abnehmender Größe vereinzelt und in Kultur genommen. Zwischen dem achten und zwölften Tag werden die Kulturen geschüttelt, um Makrophagen und Vorläufer-Zellen, die auf dem Astrocyten-Monolayer sitzen, zu entfernen. Nach einigen Tagen in Serum-freiem, Cytosin-Arabinosid-enthaltendem Medium sind die Zellen frei von kontaminierenden Vorläufer-Zellen; gelegentlich auftretende Mikroglia-ähnliche Zellen werden durch Behandlung mit L-Leucin-Methylester eliminiert. Vor Versuchsbeginn werden die Zellen noch einige Tage in Cytosin-Arabinosid-freiem Medium gehalten. Der AT2-Rezeptor ist im Rahmen eines anderen Projektes mittels PCR aus Gewebe kloniert und durch Sequenzierung auf Vollständigkeit überprüft worden (pCR 2.1-TOPO Klonierungs-System der Firma Invitrogen). Das klonierte Insert wird in einen Vektor umklontiert, mit dem eukaryontische Zellen transfiziert werden können (pEGFP-C3 und pDsRed-C1, Firma Clontech). Durch Verwendung einer neuartigen Methode (biolistische Technologie der Firma Biorad) soll eine effiziente Transfektion der primären Zellen sichergestellt werden. An den transfizierten Astroglia, die sowohl den AT1-Rezeptor (endogen), als auch den transfizierten AT2-Rezeptor in genügend hoher Anzahl exprimieren (Überprüfung durch Rezeptorbindungsstudien), sollen Signaltransduktionsmechanismen untersucht werden. Die gleichzeitige Expression beider Rezeptoren auf

den Astrocyten stellt kein Problem hinsichtlich der Interpretation der Daten da, da es eine Vielzahl sehr spezifischer Rezeptor-Antagonisten für beide Subtypen gibt. Zellen, die eine hohe AT₂-Rezeptor-Expressionrate aufweisen, dienen als Modell für eine unter pathophysiologischen Bedingungen hochregulierte Rezeptorpopulation. Zellen, die mit dem Wildtyp-Plasmid transfiziert wurden, sowie nicht-transfizierte Zellen mit endogener bzw. niedriger AT₂-Rezeptor-Expression unter Normalbedingungen dienen als Kontrollen. Unsere vorläufige Arbeitshypothese lautet, daß der AT₂-Rezeptor über eine Stimulation der MAP-Kinase ERK1/2 Mediatoren freisetzt, welche das Neuritenwachstum beeinflussen. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen zur Signaltransduktion liegt auf MAP-Kinasen, da sowohl ERK als auch JNK durch AT-Rezeptoren reguliert werden und da an PC12W-Zellen gezeigt wurde, daß ERK1/2 an der neuronalen Elongation beteiligt ist. An Hypothalamusneuronen in Kultur wurde außerdem gezeigt, daß die Interaktion zwischen AT-Rezeptoren auf der Ebene der MAP-Kinasen stattfindet. Die Kinase-Aktivität soll in einem Enzymassay unter Verwendung von Basischem Myelin-Protein (MBP) für ERK1/2 bzw. GST-c-jun für JNK als Substrat für Phosphorylierung untersucht werden. Die Zellen werden dazu in An- bzw. Abwesenheit der spezifischen Rezeptorantagonisten (Losartan für den AT₁-Rezeptor; PD 123 319 für den AT₂-Rezeptor) mit Ang II stimuliert, geerntet und das native Protein isoliert. Der Proteinextrakt wird mit Protein A-Sepharose-Partikeln gereinigt und die Kinase im Extrakt durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern konzentriert. Die Substratreaktion wird mit ³²P-γ-ATP als Phosphatgruppendonator durchgeführt und die Reaktionsprodukte auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt nach Exposition auf einer Membran mittels Phosphoimager. Mit dem AT₂-Agonisten CGP42112 steht ein weiteres Werkzeug für diese Untersuchungen zur Verfügung. Kinase-Assays sind in unserem Labor etabliert. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studien sollen weitere Signaltransduktionskomponenten (z.B. Komponenten des RAS/MEK/ERK-Weges) untersucht werden; gegebenenfalls werden die Studien auf andere Signaltransduktionsmechanismen (z.B. Aktivierung von Phosphatasen) ausgedehnt.

Der zweite Teil der Hypothese (die Aktivierung des AT₂-Rezeptors in Astrocyten führt zur Freisetzung von Mediatoren aus diesen Zellen, die das Neuritenwachstum beeinflussen) soll untersucht werden, indem kortikale Neurone und kortikale Astrocyten zuerst getrennt präpariert und in Kultur genommen werden. Durch Aussäen von Astrocyten auf Deckgläschen mit Wachsfüßchen, die dann auf den Neuronenrasen gesetzt werden, kann unter kontrollierten Bedingungen in einer Kokultur untersucht werden, welche Auswirkung eine Stimulation von astrocytären AT₂-Rezeptoren auf die neuronale Elongation hat. Dabei sollen sowohl morphologische Parameter (die Elongation selbst) als auch die Freisetzung neurotropher Faktoren (z.B. NGF; aus dem Kulturüberstand Ang II-stimulierter transfizierter Astrocyten mittels Western blot) sowie die Expression von neuronalen Zytoskelettproteinen (z.B. Neurofilament M, Mikrotubuli-assoziiertes Protein mittels Western blot) bestimmt werden.

3.5.2.3 AT-Rezeptor-Expression auf Mikroglia

Es ist bisher nicht untersucht worden, ob Mikroglia AT-Rezeptoren exprimieren; für Makrophagen ist dies hingegen gezeigt worden. Da AT-Rezeptoren auf Makrophagen auch eine Rolle bei pathophysiologischen Veränderungen z.B. in der Niere spielen, liegt es nahe zu überprüfen, ob Mikroglia, die viele Makrophagen-Eigenschaften haben, ebenfalls AT-Rezeptoren exprimieren und ob diese eine Rolle bei den entzündlichen Prozessen spielen, die nach Ischämie im Bereich des geschädigten Gewebes ablaufen. Zusätzlich zu den unter 3.5.2.1 beschriebenen Kolokalisations-Experimenten soll daher an isolierten postnatalen Ratten-Mikroglia mittels Bindungsstudien und/oder Northern blot/RT-PCR untersucht werden, ob AT-Rezeptor-Proteine oder AT-Rezeptor-mRNA von diesen Zellen exprimiert werden. Falls AT-Rezeptoren nachgewiesen werden können, sollen dann analog zu den unter 3.5.2.2 beschriebenen Versuchen mit Astrocyten Studien zur Signaltransduktion bzw. zur Freisetzung von Mediatoren (z.B. inflammatorische Substanzen) durchgeführt werden. Zur Gewinnung von Mikrogliazellen werden Primärkulturen aus postnatalen (P2) Rattengehirnen angelegt. Nach 10 Tagen in Kultur werden die frei flottierenden Mikrogliazellen abgesaugt, der Überstand gesammelt, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die Reinheit der Kultur wird mittels spezifischer Antikörper gegen mikrogliale Proteine (Ki-M6, ED-1, Iba-1) überprüft. Primäre Mikroglia-Zellen in Kultur werden durch die Isolierung bzw. Kultivierung in einen aktivierten Zustand überführt. Um sie wieder in einen ramifizierten, inaktiven Phänotyp zu überführen und damit der physiologischen Situation nahe zu kommen, werden die Zellen in Astrocyten-konditioniertem Medium kultiviert. Der ramifizierte Phänotyp kommt dem Ruhezustand in vivo nahe (keine meßbare Produktion von NO, IL-6; Phänotyp). Auch im

Fall der Mikroglia-Zellen müssen jedoch in der Zellkultur erarbeitete Ergebnisse wieder unter in vivo-Bedingungen verifiziert werden.

Literatur:

Dai W-J, Funk A, Herdegen Th, Unger Th, Culman J (1999) Blockade of central angiotensin AT₁ receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. Stroke 30, 2391-2399.

Garcia JH, Wagner S, Liu KF & Hu XJ (1995). Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. Stroke 26, 627-635.

Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986) Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn J Stroke 8, 1-8.

Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW (1993) Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? Stroke 24, 294-298.

Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Fujiwara M, Furukawa T (1996) Transient upregulation of the AT₂ receptor mRNA level after global ischemia in the rat. Neuropeptides 30, 596-601.

McAuley MA (1995) Rodent models of focal ischemia. Cerebrovasc Brain Met Rev 7, 153-180.

3.5.3. Zeitplan

Unsere Arbeitsgruppe, zur Zeit Teil des Pharmakologischen Instituts der Universität Kiel, wird im Laufe des Jahres 2001 nach Berlin transferiert. Sämtliche tierexperimentellen Arbeiten, Immunhistochemie, In situ-Hybridisierung, Rezeptorklonierung, Northern blot, Western blot, RT-PCR, Zellkultur-Systeme und die Kinase-Assays sind im Labor in Kiel etabliert und können ohne Probleme nach Berlin übernommen werden. Mit den entsprechenden Versuchen kann deshalb unmittelbar begonnen werden.

Die Studien zur zellulären Lokalisation und Regulation von AT-Rezeptoren nach fokaler Ischämie sollen im Verlauf von zwei Jahren abgeschlossen werden. Parallel dazu läuft die Identifikation von AT-Rezeptoren auf Mikroglia, für die je nach Ergebnislage zwei bis drei Jahre geplant sind. Die Untersuchungen zur Signaltransduktion und Interaktion von AT-Rezeptoren an AT₂-Rezeptor-transfizierten primären Astroglia sind für einen Zeitraum von drei Jahren angesetzt; dabei ist der genaue zeitliche Rahmen für die Etablierung transfizierter Astrocyten nicht genau bestimmbar (siehe auch Begründung des Personalbedarfs).

	2002	2003	2004
Zelluläre Lokalisation von AT-Rezeptoren	→		
Regulation von AT-Rezeptoren nach Ischämie		→	
Identifikation von AT-Rezeptoren auf Mikroglia und Signaltransduktion	→	→	→
Transfektion von Astroglia	→		
Untersuchungen zur Signaltransduktion in transfizierten Astroglia		→	→

3.5.4 Tierversuche

Bei den geplanten Tierversuchen (Tierspezies: Ratte) werden die Bestimmungen der derzeit gültigen Fassung des Tierschutzgesetzes beachtet. Ein Antrag auf Erteilung einer Tierversuchsgenehmigung ist beim Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit des Landes Berlin eingereicht.

3.5.5 Gentechnologische Experimente

Die geplanten Arbeiten werden der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet und werden in einer gentechnologischen Anlage des Instituts für Pharmakologie der Sicherheitsstufe 1 ordnungsgemäß durchgeführt werden.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Aus den Fragestellungen ergeben sich Zusammenarbeiten mit folgenden Antragstellern:

A1 (Dreier/Einhäupl): In Zusammenarbeit mit Herrn Dreier soll untersucht werden, ob eine möglicherweise durch Angiotensin AT1-Rezeptor-Blockade verminderte Sekretion von Endothelin-1 an positiven Effekten einer AT1-Rezeptor-Inhibition nach Schlaganfall beteiligt ist.

A5 (Priller/Dirnagl): In Zusammenarbeit mit dem Projekt A5 soll untersucht werden, ob Makrophagen, die nach Ischämie ins verletzte Gehirngebiet einwandern, den AT2-Rezeptor exprimieren bzw. unter den Bedingungen im Ischämiebereich hochregulieren. Dazu sollen Knochenmarkschimären in einem Stadium verwendet werden, in dem ohne Ischämie GFP-markierte Makrophagen in der Peripherie, nicht aber im ZNS nachweisbar sind. Nach Induktion einer fokalen Ischämie soll mittels spezifischer Antikörper gegen den AT2-Rezeptor sowie Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern unter Verwendung des vom SFB angeschafften Multiphotonen-konfokalen Laser-scanning-Mikroskopes die Kollokalisierung von Rezeptor und Marker studiert werden.

A6 (Lindauer): Eine Zusammenarbeit mit dem Projekt A6 soll einerseits bezüglich der Tierhaltung stattfinden (Übernahme der von uns gezüchteten SHR-SP und WKY-Ratten). Außerdem soll in Kooperation mit Frau Lindauer überprüft werden, ob spontan hypertensive Ratten mit ihren hochregulierten Angiotensin-Rezeptoren eine Angiotensin-Rezeptor-beeinflusste veränderte zerebrovaskuläre Reaktivität haben und ob diese vaskulären oder parenchymalen Ursprungs ist.

A7 (Grune): Eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Grune ist auf dem Gebiet der Mikroglia-Primärkultur geplant, weil diese Gruppe über Erfahrung in diesem Bereich verfügt. Herr Grune beantragt außerdem eine Hypoxiekammer für Zellkulturen, die von uns für entsprechende Versuche mit benutzt werden soll.

B9 (Hanisch): Eine Zusammenarbeit mit dieser Arbeitsgruppe ist auf dem Gebiet der MAP-Kinase-Signaltransduktion geplant. Herr Hanisch verfügt außerdem auch über Erfahrung auf dem Gebiet des JAK/STAT-Signalweges. Diese Signalkaskade kann durch Angiotensin AT1-Rezeptoren aktiviert werden und soll eventuell später in die Untersuchungen über eine Interaktion von AT1- und AT2-Rezeptoren in Astrozyten/Neuronen/Mikroglia einbezogen werden.

3.6.1 Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern

Die In situ-Untersuchungen zur AT-Rezeptorexpression nach Ischämie werden in Zusammenarbeit mit PD Dr. M. Bader, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin-Buch durchgeführt. Die immunhistochemische Analyse der Rezeptorverteilung erfolgt in Kooperation mit Prof. Dr. H. Imboden, Zoologisches Institut der Universität Bern, Schweiz. Die Transfektion von Astrozyten erfolgt in Kooperation mit Prof. Dr. Thomas Herdegen und Dr. Kirsten Mielke, Pharmakologisches Institut der Universität Kiel.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
	-	-	-	BAT IIa/2	2	42.000 42.000	BAT IIa/2	2	42.000 42.000	BAT IIa/2	2	42.000 42.000
	zus.:			zus.:		84.000	zus.:		84.000	zus.:		84.000
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	
				522	40.000	522	40.000	522	29.000			
I				Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.					

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Unger, Th., Prof. Dr. med. Blume, A., Dr. rer. nat.	Pharmakologie	Institut für Pharmakologie und Toxikologie	5 B 15	neu neu	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	x1. N.N. x2. N.N.		Institut für Pharmakologie und Toxikologie		neu neu	BAT IIa/2 BAT IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	-					

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

3.7.1.1.1 Prof. Dr. Th. Unger, G.A.

Leiter der Arbeitsgruppe. Beratende Funktion bei Versuchsplanung und Erstellung von Publikationen. Der Antragsteller wird mit 5 Stunden/Woche für die Planung des Projektes und Diskussion zur Verfügung stehen.

3.7.1.1.2 Dr. Annegret Blume, G.A.

Frau Blume wird wöchentlich mit 15 Stunden aus der Grundausrüstung zur Verfügung stehen. Sie übernimmt die Planung und Koordination der Forschungsarbeiten. Frau Dr. Blume wird außerdem Ihre umfangreichen molekularbiologischen und zellbiologischen Kenntnisse zur Klonierung des AT2-Rezeptors sowie zur Transfektion des Rezeptors in Astroglia und zur Durchführung von Kinase-Assays einbringen. Außerdem wird sie Publikationen erstellen.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

3.7.1.3.1 N.N, BAT IIa/2, E.A

Ein neu einzustellender Doktorand (rer. nat.) soll die Arbeiten zur Lokalisation und Regulation von AT-Rezeptoren nach fokaler Ischämie durchführen. Das Modell der fokalen Ischämie ist anspruchsvoll und verlangt beträchtliche methodische Kenntnisse sowie die Fähigkeit zum selbstständigen Arbeiten. Da die Reproduzierbarkeit der Ischämie wie auch die Überlebensrate der Tiere nach Eingriff sehr stark von der manuellen Geschicklichkeit des Experimentators abhängt und eine längere Übungsphase verlangt, ist eine Vollzeitkraft zur Durchführung der Versuche notwendig. Die Erfahrung hat außerdem gezeigt, daß die komplexen Versuche vom Aufbau und theoretischen Hintergrund her nur von einem Wissenschaftler mit entsprechenden Vorkenntnissen überblickt werden können. Auch die verschiedenen Techniken (Immunhistochemie, In situ-Hybridisierung, Liganden-Bindungs-Studien), die zum Nachweis und zur Quantifizierung der Rezeptoren eingesetzt und auch miteinander kombiniert werden sollen, müssen so beherrscht werden, daß auch evtl. auftretende Probleme selbstständig gelöst werden können

3.7.1.3.2 N.N, BAT IIa/2 , E.A.

Ein weiterer neu einzustellender Doktorand (rer. nat.) soll die Transfektion von primären Astrocyten sowie die Untersuchungen zur Signaltransduktion durchführen. Dieses Projekt ist umfangreich und verlangt ebenso wie die fokale Ischämie beträchtliche methodische Kenntnisse sowie die Fähigkeit zum selbstständigen Arbeiten. Insbesondere die ausreichend effiziente Transfektion der Astrocyten mit den Rezeptorplasmiden ist eine neue Technik, die etabliert und beherrscht werden muß; dies ist nicht trivial, da sich Mammalierzellen allgemein schlecht transfizieren lassen. Es ist außerdem wünschenswert, daß die Präparation und Kultur der Zellen in den Händen einer Person liegen, um auch in Kulturen unterschiedlicher Herkunft (unterschiedlicher Tiere/Präparationen) möglichst ähnliche Versuchsbedingungen zu erreichen. Technisch anspruchsvolle Untersuchungen zur Signaltransduktion verlangen Selbstständigkeit und wissenschaftlichen Überblick.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	15.000	15.000	15.000

fortgesetzt

Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	40.000	40.000	29.000
--	--------	--------	--------

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Kostenart: 522

für 2002-2004 (Angabe pro Jahr)

	DM	2002	2003	2004
Materialien für In situ-Hybridisierung (Oligomere, Enzyme, Nensorb-Säulen, Chemikalien Filme, Kassetten)	DM	3000	3000	3000
Materialien für Immunhistochemie, Kinase-Assays, Western blot (Antikörper, Substrate, Chemikalien)		4000	4000	6000
Radioliganden für Ligandenbindungsassay, Kinase-Assays, In-situ- Hybridisierung (³² P-ATP, ¹²⁵ I-Sarilesin, ³⁵ S-ATP, ³² P-rCTP)		5000	5000	5000
Zellkulturmaterialien (Medien, Zusätze, Antibiotika, Plastikmaterial)		3000	3000	5000
Reagenzien für Molekularbiologie (Restriktionsenzyme, Polymerasen,		3000	3000	5000
200 Osmotische Minipumpen (Alzet) a 60,-DM		12.000	12 000	
200 Ratten a 50,-DM		10.000	10.000	5000
Summe		40.000	40.000	29.000

Für die ersten beiden Jahre der Förderperiode sind umfangreiche Tierexperimente geplant. Da Tierhaltung und die osmotischen Pumpen für das Projekt essentiell sind, andererseits aber auch den größten Posten bei den Verbrauchsmitteln ausmachen, kommt für die Jahre 2002 und 2003 eine höhere Summe zustande.

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

entfällt

PROJEKTBEREICH B
„Entzündung“
(Projektbereichsleiter: Prof Dr.R.Nitsch)

- B 6** Gliaktivierung - Ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis
Weber/Braun
- B 9** Signale und Signalprozesse glialer Aktivierung: Thrombin als zellulärer Stimulus
Hanisch
- B11** Die Beteiligung von autoantigenspezifischen T-Zellen bei Protektion und Reorganisation des entorhinal-hippocampalen Systems
(war C1) Nitsch
- B12** Die Rolle von oligodendroglialen Chemokinrezeptoren bei der Myelinisierung und Demyelinisierung – funktionelle in vitro-in vivo Korrelationen
Brück/Stangel
- B13** Mechanismen des Immunprivilegs: Die Rolle von Gliazellen
Bechmann/Gimsa
- B14** Expression und funktionelle Bedeutung des TRAIL-Systems für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose
Zipp
- B15** Untersuchungen zur Kommunikation zwischen Neural- und Immunzellen mittels akuter und chronischer intracerebroventrikulärer Applikation pro und anti-inflammatorischer Zytokine im Tierversuch
(war C5) Woiciechowsky, Volk

Zusammenfassende Darstellung des Projektbereichs B

Im Zuge der weitergehenden neuroimmunologischen Ausrichtungen des SFB 507 ist es gelungen, einen eigenen Projektbereich B als eng vernetztes Schwerpunktthema „Entzündung“ zu definieren. Hierbei arbeiten die Arbeitsgruppen von Frauke Zipp, Wolfgang Brück, Jörg Weber, Uwe Hanisch, Ingo Bechmann, Robert Nitsch und Christian Woiciechowsky eng zusammen. Die den Projekten zugrundeliegenden neurologischen Erkrankungen sind die Multiple Sklerose (Zipp, Brück/Stangel), die bakterielle Meningitis (Weber/Braun, Hanisch) sowie das Neurotrauma (Bechmann/Gimsa, Nitsch, Woiciechowsky). Es werden sowohl destruktive als auch protektive Aspekte der Entzündung des Zentralen Nervensystems bearbeitet. Dabei liegt in den jeweiligen Projekten ein unterschiedlicher Schwerpunkt auf der Frage nach der Bedeutung von apoptoseinduzierenden Faktoren bei der Multiplen Sklerose (Zipp), der Bestimmung der Bedeutung von Chemokinrezeptoren auf Oligodendrozyten bei Myelinisierung und Demyelinisierungsprozessen im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse (Brück/Stangel), Untersuchungen der Beteiligung nicht-neuronaler Zellen bei Schadenskaskaden der Meningitis (Projekt Weber/Braun), der Analyse der Beiträge von Serumproteasen zu Schadenskaskaden im ZNS (Projekt Hanisch), den Möglichkeiten des Zentralen Nervensystems, durch spezifische Gliazellfunktionen das Immunprivileg zu unterhalten (Bechmann/Gimsa), der Analyse der Funktionen von autoantigenspezifischen T-Zellen bei Protektions- und Reorganisationsvorgängen (Nitsch), sowie schließlich der Untersuchung der Auswirkungen zentralnervöser Schädigung auf die periphere Immunregulation (Woiciechowsky/Volk). Durch die Vereinigung dieser verschiedener Ansätze, die die

Rolle von Gliazellen und ihrer Kommunikation mit dem spezifischen Immunsystem zum Gegenstand haben und hierbei sowohl destruktive als auch protektive Mechanismen bearbeiten, wird der Tatsache Rechnung getragen, daß neuroinflammatorische Geschehen sowohl in der Pathogenese, als auch bei der Reparatur nach Schädigung im Zentralen Nervensystem eine spezifische Rolle zukommt.

Das Projekt Zipp stellt sich die Frage, welche Rolle dem TRAIL-System bei der Multiplen Sklerose zukommt. Es ist aufgrund der spezifischen Lokalisation von Ligand und seinen Rezeptoren zu vermuten, daß es bei zentralen T-Zell Effekten eine wichtige Rolle spielt. Es werden Methoden der humanen T-Zellkultivierung, Funktionsanalysen am humanen Hirnschnitt und Lokalisationstechniken eingesetzt. Hierbei besteht eine enge Kooperation mit den Projekten Bechmann/Gimsa und Nitsch sowie Woiciechowsky. Zur Untersuchung autoptischen sowie bioptischen Materials wird mit dem Projekt Brück/Stangel zusammengearbeitet. Das Projekt Brück/Stangel beschäftigt sich mit der Rolle von spezifischen Chemokinrezeptoren bei De- und Remyelinisierung. Hierbei zeigen erste Befunde eine funktionelle Bedeutung dieser Rezeptoren für Oligodendrozyten. Sowohl in Kultursystemen als auch an Patientenmaterial werden immunzytochemische und in situ Hybridisierungsstudien durchgeführt. Es besteht in der Fragestellung eine Zusammenarbeit mit dem Projekt Zipp sowie methodisch mit den Projekten Bechmann/Gimsa und Nitsch. Im Projekt Weber/Braun wird die besondere Rolle der Blut-Hirn-Schranke bei der Invasion von Erregern und Leukozyten in Zellkultursystemen und im Meningitis-Mausmodell untersucht. Die Bedeutung dieser Veränderungen für die Entwicklung möglicher Therapieansätze soll herausgearbeitet werden. Der Ansatz ist inhaltlich mit Fragen, die in den Projekten Hanisch und Bechmann/Gimsa bearbeitet werden, verknüpft und es besteht eine enge Kooperation mit Projekten aus dem A-Bereich (Dirnagl/Priller, Dreier/Einhäupl). Im Projekt Hanisch geht es um die Frage, inwieweit Thrombin bei Störungen der Blut-Hirn-Schranken Funktion sowohl proteolytisch als auch nicht-proteolytisch Effekte auslösen und dabei als Mikroglia-Aktivator und -Modulator fungieren kann. Die Arbeiten sind eng verknüpft mit dem Projekt Weber/Braun. Das Projekt Bechmann/Gimsa stellt die Frage, unter welchen Bedingungen das Immunprivileg des Gehirns zusammenbricht. Besonders wird die Rolle der Auswirkung von mikroglialer Reaktion und T-Zellfunktion bearbeitet. Hier besteht eine inhaltliche Anknüpfung an das Projekt Weber/Braun, methodisch an die Projekte Brück/Stangel sowie Nitsch. Das Projekt Nitsch geht der Frage nach, unter welchen Bedingungen und über welche Mechanismen T-Zellen nach axonaler Schädigung protektive und reparative Funktionen übernehmen. Hierfür werden Zellassaysysteme eingesetzt. Es bestehen inhaltliche Verknüpfungen zum Projekt Brück/Stangel sowie methodisch zu den Projekten Zipp und Bechmann/Gimsa. Die Auswirkungen eines Neurotraumas auf die periphere Immunregulation werden im Projekt Woiciechowsky/Volk untersucht. Dabei wird ein in vivo Modell eingesetzt, bei dem Zytokininjektionen in das Gehirn durchgeführt werden. Es besteht inhaltlich eine Anbindung an das Projekt Bechmann/Gimsa und methodisch an das Projekt Zipp.

Bei diesem neu integrierten Bereich „Entzündung“ handelt es sich demnach um die Reaktion des SFB 507 auf die Entwicklungen auf dem Gebiet der Interaktion zwischen Glia/Immunzellen und Nervenzellen, die für ein besseres Verständnis neuroimmunologischer und neuroinflammatorischer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung ist. Es wird also hier ein pathophysiologisches Prinzip in den Mittelpunkt des Projektbereiches gestellt, welches verschiedene neurologische Erkrankungen miteinander verbindet. Die Vernetzung der Projekte läßt erwarten, daß das für das Verständnis pathophysiologischer Prozesse innerhalb der jeweiligen Projekte erarbeitete Wissen für die anderen Projekte nutzbar gemacht und in direkte experimentelle Strategien, wohl zumeist in Kooperation, umgesetzt wird.

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
1995	18.1	26.4		44.5
1996	38.3	20		58.3
1997	38.3	20		58.3
1998	29.1	25		54.1
1999	42	30		72
2000	42	30		72
2001	42	30		72
Zwischen-summe	147	105		252
2002	42	60.5		102.5
2003	42	41.3		83.3
2004	42	41.3		83.3

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Die Prognose der bakteriellen Meningitis sowie der neuronale Schaden sind entscheidend vom Ausmaß der Schädigung der Blut-Hirnschranke (BHS) abhängig. Die Mortalität der häufigsten Form der Meningitis, hervorgerufen durch *Streptococcus pneumoniae*, ist mit 20–30 % unerwartet hoch. Wesentliche Schritte in der Pathophysiologie dieser tödlichen Infektionskrankheit sind nicht geklärt. Wir haben in der bisherigen Förderperiode zeigen können, dass zerebrale Endothelzellen, die mit Pneumokokkenzellwänden (PCW) stimuliert werden, in der Lage sind TNF- α zu produzieren und über autokrine Regulationsmechanismen die ICAM-1 Hochregulation und teilweise die iNOS abhängige NO Freisetzung zu steuern. Zudem konnten wir erstmals die Rolle der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) als relevante Kinase im Signalweg aktiviert durch PCW in Astrozyten zeigen. Diese entzündliche Aktivierung der Blut-Hirnschranke ermöglicht die Migration von Pneumokokken und führt im weiteren Verlauf zum Einstrom von Leukozyten.

Ziele dieses Antrages werden es sein, a) molekulare Mechanismen, die zur Öffnung der BHS bzw. b) zur Zerstörung von Zellen der BHS führen, zu identifizieren und entsprechende protektive Strategien zu entwickeln.

3.3 Stand der Forschung

Die durch *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufene Meningitis ist die schwerste Form der bakteriellen Hirnhautentzündung. Mit der Einführung der Haemophilus Typ b Impfung und dem signifikanten Rückgang dieser Erkrankung ist nunmehr die Pneumokokkenmeningitis sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter die häufigste Form der bakteriellen Meningitis. Trotz effektiver bakterizider Antibiotika ist die Mortalität 20-30 % (Schuchat et al., 1997). Mehr als die Hälfte der Überlebenden leidet an permanenten neurologischen und neuropsychologischen Ausfällen (Bohr et al., 1984). Der Gegensatz zwischen effektiver bakterizider Behandlung und der schlechten Prognose der Erkrankung kann teilweise dadurch erklärt werden, dass β -Lactam Antibiotika, die typische Therapie bei Meningitis, Zellwandkomponenten freisetzen, die die gleiche oder größere inflammatorische Aktivität haben als lebendige Bakterien. Pneumokokkenzellwände kann man als grampositives Äquivalent zum Endotoxin betrachten. Auch ihre Konzentration im Liquor korreliert mit der Prognose der Erkrankung (Schneider et al., 1999). Neben der inflammatorisch wirkenden Zellwand (Tuomanen et al., 1985) hat der Pneumokokkus als Bakterium einen hochaktiven Stoffwechsel (AlonsoDeVelasco et al., 1995). Pneumolysin und durch fehlende bakterielle Katalase in großen Mengen produziertes H₂O₂ sind proinflammatorisch und zytotoxisch wirksam (Braun et. al., 1999a).

Die Aktivierung und der sodann folgende Zusammenbruch der BHS sind von zentraler Bedeutung in der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis und durch folgende Schritte gekennzeichnet.

- Die entzündliche Aktivierung der Blut-Hirnschranke ist die Voraussetzung für die Invasion von Pneumokokken und führt im weiteren Verlauf zur Induktion der Leukozyten-Endothelinteraktion, gefolgt vom Leukozytenübertritt.
- Leukozyten abhängige und unabhängige Faktoren wie z.B. bakterielle Toxine induzieren die Öffnung der BHS und die Zerstörung von Endothelzellen.
- Bakterien akkumulieren im Liquor vor allem im Ventrikelsystem und im Subarachnoidalraum und tragen mit den eingewanderten Leukozyten zum neuronalen Schaden bei.
- Reparaturmechanismen tragen möglicherweise zur funktionellen Wiederherstellung der BHS bei.

Insbesondere die molekularen Mechanismen des ersten Schrittes sowie die leukozytenunabhängigen Mechanismen des zweiten Schrittes sind unverstanden und sollen zentrales Thema der hier vorgeschlagenen Untersuchungen sein.

Eine wesentliche neue Beobachtung war, dass Pneumokokkenzellwände (PCW) in der Lage sind, schon in geringen Konzentrationen (Äquivalent von 10^3 CFU) TNF- α in mikrovaskulären Endothelzellen (BMEC) zu exprimieren und freizusetzen (Freyer et al., 1999). Diese inflammatorische Aktivierung ist die Voraussetzung für die Invasion von Pneumokokken in BMEC durch Transzytose. Ca. 20 % der Pneumokokken überwinden durch diesen PAF-Rezeptor abhängigen Mechanismus konfluierende zerebrale Endothelzellen ohne mit "tight junctions" zu interferieren (Ring et al., 1998). Untersuchungen der zu Grunde liegenden "signaling pathways" zeigten erstmals, dass Pneumokokkenzellwände zur Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wie der extrazellulär signalregulierten Proteinkinase 1 (erk-1) und 2 sowie von p38 führen. Diese Aktivierung ist zumindest teilweise CD 14 abhängig (Schumann et al., 1998). Die MAP Kinasen, erk-1 und erk-2, beeinflussen wesentliche "tight junction" Funktionen (Kevil et al., 2000) und könnten somit der molekulare Schlüssel für die leukozytenunabhängige passagere Öffnung der BHS durch bakterielle Glykopeptide sein (Spellerberg et al., 1995). Die MAPK Regulation der "tight junctions" kann durch H_2O_2 , einem wesentlichen Stoffwechselprodukt von Pneumokokken (Spellerberg et al., 1996), und durch den "vascular endothelial growth factor" (VEGF), einen potentiellen Reparaturfaktor der BHS, induziert werden (Wang et al., 2000). H_2O_2 führt zu einer Abnahme des transendothelialen Widerstandes und zu einer Verminderung von Occludin, einem wesentlichen "tight junction" Protein. Der selektive erk-1/2 Inhibitor PD-98059 verhindert diese Veränderungen (Kevil et al., 2000).

Die Rolle der leukozytären Mechanismen und deren Induktoren sind in den letzten Jahren durch verschiedene Arbeitsgruppen und unsere eigene zunehmend aufgeklärt worden, wobei die Exekutoren der Leukozytenschädigung nur partiell bekannt sind. Als solche sind bislang Matrixmetalloproteinasen (Kieseier et al., 1999) und TNF- α (Bitsch et al., 1997) identifiziert worden.

Bei der Pneumokokkenmeningitis wurde bei Patienten und in experimentellen Modellen im Hippokampus neuronale Apoptose beobachtet (Nau et al., 1999). Diese Apoptose ist experimentell zum einen durch Inhibition der Leukozyteninvasion, zum anderen auch durch die intrazisternale Verabreichung von zVAD-fmk, einem Breitspektrum Caspase Hemmer, um 50% vermindert (Braun et al., 1999). Dies hat zur Hypothese geführt, dass zum einen die entzündliche Antwort des Körpers, aber möglicherweise auch direkte bakterielle Faktoren an dieser Schädigung beteiligt sein könnten. In der Tat sind Pneumokokken in der Lage, in verschiedenen Zellkultursystemen Apoptose zu induzieren. Dabei werden die Caspasen 1-10 nicht aktiviert und zudem ist zVAD-fmk wirkungslos. Dies deutet auf einen neuen Mechanismus des vorwiegend durch das porenbildende bakterielle Toxin Pneumolysin und durch von Pneumokokken freigesetztes H_2O_2 , induzierten Zelltodes hin (Braun et al., 2001). Ob auch eine Rezeptor vermittelte Kaskade dabei eine Rolle spielen könnte, ist unklar. Ob Apoptose als Mechanismus der BHS Schädigung von Bedeutung sein könnte, ist bisher nicht untersucht, allerdings gibt es dafür erste experimentelle Hinweise (s.u.).

Das Verständnis der molekularen Mechanismen der Schädigung der BHS könnte zum einen die Entwicklung protektiver Strategien bei entzündlichen ZNS Erkrankungen zur Folge haben. Auf der anderen Seite könnten diese Mechanismen auch zur gezielten Öffnung der BHS z.B. zum Transport von neuroprotektiven Medikamenten über diese ansonsten äußerst dichte Barriere genutzt werden.

Literatur:

- AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* 1995; 59:591-603.
- Bitsch A, Trostdorf F, Bruck W, Schmidt H, Fischer FR, Nau R. Central nervous system TNF alpha-mRNA expression during rabbit experimental pneumococcal meningitis. *Neurosci Lett* 1997; 237:105-108.
- Bohr V, Paulson OB, Rasmussen N. Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* 1984; 41:1045-1049.
- Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 1999; 5:298-302.
- Braun JS, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL. Pneumolysin, a protein toxin of Streptococcus Pneumoniae, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun* 1999a, 67: 3750-6
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 2001; in revision
- Freyer, D., Manz, R., Ziegenhorn, A., Weih, M., Angstwurm, K., Döcke W.D., Meisel, A., Schumann, R. R., Schönfelder, G., Dirnagl, U., and Weber, J. R. Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of Streptococcus pneumoniae and upregulate iNOS and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol.* 1999; 163:4308-4314
- Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS. H₂O₂-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279 (1):C21 –30
- Kieseier BC, Paul R, Koedel U, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis. *Brain* 1999; 122:1579-1587.
- Nau R, Soto A, Brück W. Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58:265-274.
- Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 1998; 102:347-360.
- Schneider O, Michel U, Zysk G, Dubuis O, Nau R. Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations. *Neurology* 1999; 53:1584-1587.
- Schuchat A, Robinson K, Wenger JD Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* 1997; 337:970-976.
- Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Göbel U, Weber JR. Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p 38 in astrocytes. *Glia* 1998; 22:295-305.
- Spellerberg B, Cundell DR, Sandros J, et al. Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol* 1996; 19:803-813.
- Spellerberg B, Prasad S, Cabellos C, Burroughs M, Cahill P, Tuomanen E. Penetration of the blood-brain barrier: enhancement of drug delivery and imaging by bacterial glycopeptides. *J Exp Med* 1995; 182:1037-1043.
- Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 1985; 151:859-868.
- Wang W, Dentler WL, Borchardt RT. VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Jan ;280 (1):H434 -40 280

3.4 Eigene Vorarbeiten

Ein Teil unserer Vorarbeiten wurde bereits unter 3.3 Stand der Forschung dargestellt. Wir haben uns in den voran gegangenen Förderperioden ausführlich mit den entzündlichen Veränderungen bei bakterieller Meningitis in der Frühphase der Erkrankung beschäftigt. Schwerpunkte waren anfänglich zum einen Mechanismen, zum anderen Interventionsmöglichkeiten vorwiegend der Leukozyten-Endothelinteraktion und deren Auswirkungen auf die von uns im Tiermodell gemessenen Parameter (regionaler zerebraler Blutfluss, rCBF; intrakranieller Druck, ICP; Hirnödeme und Leukozytenzahl im Liquor; Weber et al., 1997, Angstwurm et al., 2000). TNF- α gilt als Schlüsselzytokin in der Schadenskaskade und wird auch in

relevanten Konzentrationen im Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis nachgewiesen. Überraschenderweise induziert TNF- α nur geringe entzündliche Veränderungen. Unter klinischen Gesichtspunkten konnten wir allerdings einen wichtigen kostimulatorischen Effekt im Rattenmodell zeigen (Angstwurm et al., 1998). Wir sind auch der Frage des Effekts der Hypothermie nachgegangen und konnten einen sehr überzeugenden Effekt milder Hypothermie in der Frühphase der bakteriellen Meningitis zeigen. Neben einer signifikanten Reduktion des rCBF und ICP Anstieges konnten wir auch eine Inhibition der Leukozyteninvasion beobachten (Angstwurm et al., 2000).

Verhinderung der Leukozyteninvasion in den Subarachnoidalraum ist eine der effektivsten Interventionen in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis und ist sowohl in der Frühphase als auch in der späteren Phase sinnvoll und vermindert zudem auch den apoptotischen Schaden in Hippokampusneuronen (Braun et al., 1999). Unverstanden sind allerdings die Exekutoren der leukozytären Toxizität. Wir konnten zeigen, dass die Inhibition von Leukozyteneinstrom mit CD 18 Antikörpern zu einer dem selektiven iNOS Inhibitor Aminoguanidin vergleichbaren Verminderung von rCBF und ICP führt, obwohl die Zahl der Leukozyten im Liquor unverändert bzw. in iNOS defizienten Mäusen vermehrt ist. Damit ist es gelungen, erstmals einen funktionell relevanten leukozytären Faktor bei experimenteller Meningitis zu identifizieren (Publikation in Vorbereitung).

Wie bereits oben dargestellt, haben wir uns ausführlich mit Signaltransduktion sowie der Induktion von Botenstoffen durch PCW beschäftigt. Die Arbeiten sind teilweise in einer intensiven Kooperation innerhalb des SFBs mit der Arbeitsgruppe PD Dr. Hanisch (B 2) entstanden. Neben der elektrophysiologischen Charakterisierung des Effektes von PCW auf Mikrogliazellen (Draheim et al., 1999) konnten wir Interventionen in der Signalkaskade mit MAPK Inhibitoren wie AG 126 zeigen (Prinz et al., 1999). Die mögliche Inhibition von ICP und rCBF Anstieg sowie eine Reduktion von Leukozytenzahl im Liquor durch AG 126 ist bei Vorbehandlung der Tiere in der Frühphase der Erkrankung möglich (Publikation in Vorbereitung).

Ein wesentlicher Schritt im Verständnis der Pathophysiologie der BHS Aktivierung war die erstmalige Beobachtung, dass BMECs in der Lage sind über TNF- α die Expression von ICAM-1 sowie dem für die Vasodilatation und damit für die Migration von Leukozyten wichtigen NO durch autokrine Mechanismen zu steuern (Freyer et al., 1999). Auf die Aufdeckung des p38 und MAPK Pathways wurde bereits mehrfach hingewiesen (Schumann et al., 1998, Hanisch et al. 2001).

In einer intensiven Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Hörtnagl konnten wir zum einen die teilweise von uns etablierten Zellkultursysteme nutzen, sowie die notwendige Expertise zur Zelltodquantifizierung und Differenzierung erwerben (Harms et al., 2000, Harms et al., 2001). Wir konnten Herrn Dr. Braun nach seiner Rückkehr aus dem Labor von E. Tuomanen (Memphis, USA) als Mitarbeiter gewinnen und widmen uns in anderen Projekten der Aufklärung des neuronalen Unterganges im Hippokampus (Braun et al., 1999). Wir untersuchten neuronotoxische Wirkungen bakterieller Toxine in vivo und in vitro, wobei wir hier Mechanismen und mögliche Unterschiede zwischen Neuronen im Kortex und im Hippokampus bearbeiten (Braun et al., 2001).

In der letzten Antragsphase haben wir auch Experimente, die sich mit der möglichen proinflammatorischen Rolle von Neuropeptiden beschäftigen, fortgeführt. Neben der Durchtrennung des N. nasociliaris, die zur Depletion von Neuropeptiden führt, haben wir den Effekt von 5HT₁ Agonisten auf rCBF, ICP und Leukozyteneinstrom untersucht. Wir konnten zeigen, dass die 5HT_{1B/D} Rezeptoren wesentlich beteiligt sind, und dass die Induktion der Meningitis tatsächlich zur Depletion von CGRP in perivaskulären C-Fasern führt, die durch 5HT₁ Agonisten verhindert werden kann. Es ist uns auch gelungen, die klinische Relevanz zu belegen, da im Liquor von Patienten mit bakterieller ein signifikanter Spiegel von CGRP im Liquor gefunden werden konnte (Manuskript eingereicht, Hoffmann et al., 2001)

Wir versuchen auch vermehrt, klinische Fragestellungen mit Bezug zu Daten aus der Grundlagenforschung zu erheben, wie die Rolle von Procalcitonin, einem wahrscheinlich von Endothelzellen produzierten Entzündungsmarker bei Patienten mit bakterieller Meningitis (Hoffmann et al., 2001).

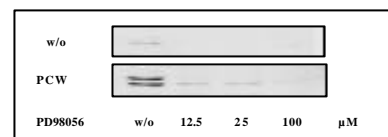
3.4.1 Publikationen

(Antragsteller unterstrichen, SFB-Projektmitarbeiter/Kooperationspartner fett gedruckt, geförderte Arbeiten während der laufenden Projektperiode mit *)

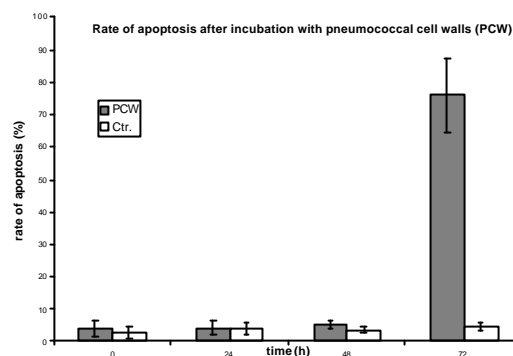
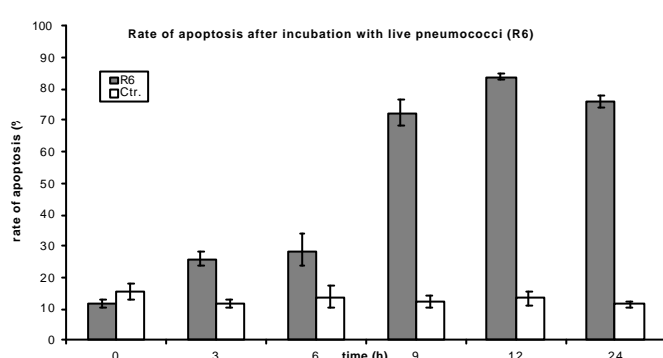
- ***Angstwurm K**, Reuss S, Arnold G, **Dirnagl U**, Schumann RR, Weber JR. Induced hypothermia in experimental pneumococcal meningitis *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20:834-838
- ***Angstwurm K**, **Freyer D**, **Dirnagl U**, **Hanisch UK**, Schumann RR, **Einhäupl KM**, Weber JR. Tumour necrosis factor- α induces only minor inflammatory changes in the CNS, but augments bacterial meningitis. *Neuroscience* 1998; 86:627-34
- Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 1999; 5:298-302.
- *Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 2001; in revision
- *Draheim HJ, Prinz M, Weber JR, Weiser T, **Kettenmann H**, **Hanisch UK**. Induction of K⁺ channels in mouse microglia: Cells require responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* 1999; 89:1379-90
- ***Freyer D**, Manz R, Ziegenhorn A, Weih M, **Angstwurm K**, Döcke WD, Meisel A, Schumann RR, Schönfelder G, **Dirnagl U**, Weber JR. Cerebral endothelial cells release TNF- α after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate iNOS and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 1999; 163:4308-4314
- ***Hanisch UK**, Prinz M, Häusler KG, Kann O, **Kettenmann H**, Weber JR (2001) Protein tyrosine kinase inhibition by AG126 prevents massive microglial cytokine release and attenuates the inflammatory response in a model of pneumococcal meningitis. *Eur J Immunol* in press
- *Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, **Freyer D**, Weih M, **Dirnagl U**, Weber JR, Hoertnagel H. Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures *FASEB* 2000; 14:1812-24
- *Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, **Freyer D**, Kapinya K, Herwig U, Megow D, **Dirnagl U**, Weber JR, Hörtnagl H. Differential mechanisms of neuroprotection by 17 β -estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J Neuroscience* 2001; in press
- Hoffmann O, **Dirnagl U**, Weber JR. The Trigeminovascular System in bacterial meningitis *Microsc Res Techniq* 2001, in press
- *Hoffmann O, Reuter U, Masuhr F, Holtkamp M, Kassim N, Weber JR. Low sensitivity of serum procalcitonin in bacterial meningitis of adults. *Scan J Infect Dis* 2001; in press
- *Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, **Kettenmann H**, Weber JR, **Hanisch UK**. Microglial activation by components of Gram-positive and-negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 8:1078-89
- *Reuter U, Weber JR, Arnold G, Wolf T, **Dreier J**, **Lindauer U**, and **Dirnagl U**. Locally triggered release of neurotransmitters from perivascular nerves contributes to cortical spreading depression associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* 1998; 274:H1979-H1987
- *Schumann RR, Pfeil D, **Freyer D**, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB and Weber JR. Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2 and p38 in astrocytes. *Glia* 1998;22:295-305
- Weber JR, **Angstwurm K**, Rosenkranz T, **Lindauer U**, **Freyer D**, Bürger W, Busch C, **Einhäupl KM**, and **Dirnagl U**. Heparin inhibits leukocyte rolling in pial vessels and attenuates inflammatory changes in a rat model of experimental bacterial meningitis meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:1221-1229

3.4.2 Vorläufige Ergebnisse die antragsrelevant sind:

Ziel A (siehe 3.5.1): Wir konnten in BMEC (Ratte) zeigen, dass es zu einer Aktivierung der erk1/erk2 Kinasen nach Stimulation mit PCW kommt. Diese Aktivierung kann mit MEK1 Inhibitor PD-9856 dosisabhängig inhibiert werden.



Ziel B (siehe 3.5.1): Frühe und späte Induktion der Apoptose (Ethidiumbromid/Acridinorangein Färbung, 3 unabhängige Experimente) BMEC einmal ausgelöst durch lebende *S. pneumoniae* R6 (10^6 CFU) mit einem Maximum bereits nach 12h und einmal induziert durch PCW (Äquivalent von 10^7 CFU/ml) wobei bei der Verwendung der stoffwechselfähigen Zellwände die Apoptose erst nach 72h auftritt



3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1. Ziele

Ziel A: Identifikation der molekularen Mechanismen, die zur entzündlichen Aktivierung der BHS führen, und Entwicklung protektiver Interventionen.

Folgende Hypothesen liegen diesem Ziel zu Grunde:

- Pneumokokken induzieren durch H_2O_2 , Pneumolysin und andere Mediatoren eine Signalkaskade in Endothelzellen/Astrozyten, die zur MAP Kinasen-Aktivierung und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt.
- Pneumokokkenzellwände induzieren ein rezeptorvermitteltes Signaling in Endothelzellen.
- Die Aktivierung dieser Kinasen führt zur Niederregulation entscheidender "tight junction" Funktionen und damit zur von Leukozyten unabhängigen Veränderung der BHS.

Ziel B: Aufklärung der Mechanismen, die zu Apoptose von zerebralen Endothelzellen führen, und Entwicklung möglicher protektiver Interventionsstrategien.

Folgende Hypothesen liegen diesem Ziel zu Grunde:

- Apoptose von Endothelzellen ist ein relevanter Mechanismus der BHS Schädigung bei bakterieller Meningitis
- Pneumokokken induzieren durch ihre Stoffwechselprodukte einen raschen, möglicherweise von der Aktivierung bekannter Caspasen unabhängigen Zelltod in Endothelzellen.
- Pneumokokkenzellwände führen durch einem Rezeptor/Signal vermittelten Weg, zum späten Zelltod.

3.5.2 Methoden

Zellkultur: Die notwendigen Zellkultursysteme stehen unserer Arbeitsgruppe seit Jahren zur Verfügung. (siehe 3.4.1. Schumann et al., 1998, Freyer et al., 1999). Die Zellkultursysteme sollen durch eine humane Zelllinie (HBMEC, Dr. K. Kim, Baltimore, ML USA) ergänzt werden. Grundsätzlich streben wir an, die

entscheidenden Experimente in primären Zellkulturen und einzelne Experimente in Zelllinien durchzuführen. Dies hat zwei relevante Gründe. Es kann dadurch das immer wieder diskutierte Problem der Kontamination der BMEC Kulturen durch hochaktive Mikrogliazellen entkräftet werden. Die Palette der Interventionen, z.B. durch Antikörper (Ak), etc. ist im humanen System vielfach möglich, im Ratten oder Maussystem oft problematisch, da entweder die entsprechenden Strukturen nicht bekannt sind, bzw. keine Ak zur Verfügung stehen. Um die Messung transendothelialer Widerstände (TER) vornehmen zu können (Endothel Tissue Resistance Measurement Chambers, WPI, Berlin) werden wir ein Doppelkammersystem mit konfluierenden Endothelzelllayern auf einer Membran verwenden. Erste Erfahrungen mit diesem System bestehen bereits. Sollten die erreichten Widerstände zu niedrig sein um Unterschiede zu erfassen, planen wir mit Astrozytenmedium diesen anzuheben. Funktionell sollen diese Messungen noch durch die Bestimmung eines Albuminquotienten ergänzt werden.

Signaltransduktion: Methoden zur Erfassung der MAP Kinasen Aktivierung und p38 Aktivierung sind im Labor etabliert. Die erk1/erk2 Kinasen werden mittels Western blot erfasst, wobei diese mit einem pan-Ak dargestellt werden. Der aktive Zustand wird mit einem spezifischen "phosphorylation site"-Ak nachgewiesen (Biosource Europe, Belgien; siehe auch Abb. 3.4.2 Ziel A). Die tatsächliche Phosphorylierung erfassen wir durch die spezifische Fähigkeit von erk1/erk2, den Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP an des myelinbasierte Protein zu katalysieren (Biotrak MAPK Assay, Schumann et al., 1998; Kooperation mit Hanisch). Ergänzt werden sie durch die Messung einer Palette pro- und antiinflammatorischer Zytokine etc., wobei PCR, ELISA (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) sowie der Nachweis von biologisch aktiven TNF- α geführt werden (Prinz et al. 1999, Freyer et al. 1999;).

"Tight junction" Proteine: Wir haben einen Western blot zum zum Nachweis von ZO-1 (anti-ZO-1 Ak, Zymed San Francisco, USA) und Occludin (anti-occludin Ak, Zymed) etabliert. Die Ergebnisse der Western blot Analysen werden densitometrisch quantifiziert. Geplant ist auch die Etablierung von PCR Messungen für Occludin, ZO-1 (Yi et al., 2000). Optional in Abhängigkeit der Ergebnisse könnten auch noch die Messung von ZO-2 sowie Claudinen etabliert werden. In der Zellkultur können beide Proteine mit Immunfluoreszenz Doppelfärbungen und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie nachgewiesen und semiquantitativ erfasst werden.

Multiphoton Laser Scanning Mikroskop: Der Einsatz dieser Technik erlaubt uns "tight junction" Proteine in Endothelzelllayern mit Immunfluoreszenz zu färben und dabei den "light/dye" Schaden und die damit verbundene zusätzliche Aktivierung des Zellkultursystemes zu vermindern. Zudem ist eine dreidimensionale Darstellung und Quantifizierung von ZO-1 und Occludin möglich. Durch den Einsatz unterschiedlicher Immunfluoreszenzmarker können beide Proteine und ein Endothelzellmarker gleichzeitig dargestellt werden.

Apoptose: Entsprechende Nachweisverfahren der Apoptose sind im Labor etabliert (Schumann et al., 1998a, Braun et al., 1999, Braun et al., 2001, Harms et al., 2000) Standardmäßig werden Färbungen mit Ethidiumbromid und Acridinorange (Sigma, Deisenhofen) und TUNEL Färbungen (Kit, Boehringer Mannheim) und Annexin-V-FITC Propidium Färbungen (Coulter, Miami, FL, USA) durchgeführt. Ergänzt werden diese durch Nachweis der DNA Fragmentation durch Laddering und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (Kooperation mit Bechmann), Western blot Analysen von CD 95 Ligand und Rezeptor (Kooperation mit Zipp). Fluorometrische Analyse der Caspasenaktivität der Caspasen 1-10, normalerweise 1, 3, 8, 9 (Caspasensubstrate Calbiochem, San Diego, CA, USA) mit dem Mikroplatten Reader.

Tiermodelle: Wir planen auch den Nachweis von Apoptose in Endothelzellen der Blutliquorschranke bzw. der BHS in vivo. Zur Verfügung stehen experimentelle Modelle der Meningitis in Maus und Ratte, bei entsprechenden Fragestellungen auch im Kaninchen. In der Maus wird die Meningitis entweder durch lumbale Injektion von 10^4 CFU *S. pneumoniae* D39 oder einem Äquivalent von 10^7 CFU PCW induziert. Die Punktion der Zisterne am Ende des Versuches erlaubt die Gewinnung von ca. 10 μ l Liquor zur Zellzählung oder gepoolt aus 3 Proben die Zytokinmessung. Danach Perfusionsfixierung und histologische Bearbeitung mit H&E und TUNEL Färbung. Die Darstellung der Meningen ist in "whole mount" Präparationen geplant, wobei wir dabei die Technik von McMenamin et al., 1999 verwenden wollen. Dabei wird eine ca. 3x4 mm große Fläche der Pia mater nach Ablösung der Dura abgezogen und auf einem Objektträger montiert.

Pneumokokken und Pneumokokkenzellwände: *S. pneumoniae* D39 Kapseltyp 2 und R6 dem unbekapselten Derivat (Rockefeller University, New York, NY, USA) sind gut charakterisierte Pneumokokken, die von verschiedenen Laboren weltweit eingesetzt werden. Wir verwenden zusätzlich eine Pneumolysin-negative Mutante *plnA*⁻ (Dr. D. Briles, University of Alabama, Birmingham, AL, USA), die Pyruvat Oxidase

Mutante *spxB*⁻ (defizient in der H₂O₂ Produktion), eine choline binding protein A Mutante *cbpA*⁻ mit einen Adhäsionsdefekt (Dr. E.I. Tuomanen, Memphis, TN, USA) und die von uns hergestellte *plnA*⁻/*spxB* Doppelmutante (Braun et al., 2001).

Neben den lebenden Bakterien verwenden wir eine standardisierte Zellwandpräparation, die aus den unbekapselten R6 hergestellt wird (Tuomanen et al., 1985, Weber et al., 1995). Die chemische Zusammensetzung dieser Präparation ist bekannt (Höltje und Tomasz, 1975) In einer anderen Präparation wird in einem definierten Medium Cholin gegen Ethanolamin ausgetauscht, sodass diese Zellwände cholinfrei sind (Qualitätskontrolle mit Western blot, TEPC 15 Ak).

Literatur:

- Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 1999; 5:298-302.
- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 2001; in revision
- Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, Weih M, Angstwurm K, Döcke WD, Meisel A, Schumann RR, Schönfelder G, Dirnagl U, Weber JR. Cerebral endothelial cells release TNF- α after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate iNOS and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 1999; 163:4308-4314
- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Freyer D, Weih M, Dirnagl U, Weber JR, Hoertnagel H. Melatonin is protective in necrotic but not in caspase-dependent, free radical-independent apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures *FASEB* 2000; 14:1812-24
- Holtje JV, Tomasz A. Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of *Pneumococcus*. *J Biol Chem* 1975; 250:6072-6
- McMenamin PG. Distribution and phenotype of dendritic cells and resistant tissue macrophages in the duramater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol* 2000; 405:553-62
- Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK. Microglial activation by components of Gram-positive and-negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 8:1078-89
- Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB and Weber JR. Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2 and p38 in astrocytes. *Glia* 1998; 22:295-305
- Schumann RR, Belka C, Reuter D, Lamping N, Kirschning CJ, Weber JR, Pfeil D. Lipopolysaccharide activates caspase-1 in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* 1998a; 91: 577-84
- Weber JR, Angstwurm K, Bürger W, Einhäupl KM and Dirnagl U. Anti ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 1995; 63:63-68
- Yi X, Wang Y, Yu FS. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 13:4093-100

3.5.3 Arbeitsprogramm

Ziel A: Identifikation der molekularen Mechanismen, die zur entzündlichen Aktivierung der BHS führen und Entwicklung möglicher Interventionen.

- Inkubation von BMEC mit lebenden *S. pneumoniae* D39 Kapseltyp 2 und R6 (10⁵-10⁸ CFU), dem unbekapselten Derivat, der Pneumolysin-negativen mutante *plnA*⁻, der Pyruvat Oxidase Mutante *spxB*⁻ (defizient in der H₂O₂ Produktion), die *plnA*⁻/*spxB* Doppelmutante, eine choline binding protein A Mutante *cbpA*⁻ mit einen Adhäsionsdefekt. Zusätzlich soll Katalase verwendet werden, um bei den H₂O₂ defizienten Typen auch die Host Antwort zu blocken und damit zu differenzieren. Behandlung mit PD-98056 MEK Inhibitor oder PD-98059. Messung der MAP Kinasen Aktivierung und Messung von TNF- α , IL-1 β und IL-6 (PCR bzw. ELISA, TNF Bioassay).
- Inkubation von BMEC mit PCW (Äquivalent von 10⁶-10⁹ CFU), PCW in denen Cholin die Bindungsstelle für den PAF-Rezeptor durch Ethanolamin ersetzt wird. Behandlung mit anti-PAFr-, anti-TEPC-15 (anti-Phosphorylcholine) Aks oder freiem Cholin, Toll like Rezeptor anti-(TLR)2-, anti-

- TLR4-, CD14 Ak, Katalase, PD-98056 MEK Inhibitor oder PD-98059. Messung der MAP Kinasen Aktivierung und Messung von TNF- α , IL-1 β und IL-6 (PCR bzw. ELISA, TNF Bioassay)
- Inkubation von BMEC mit lebenden *S. pneumoniae* R6 Messung und PCW, Quantifizierung von ZO-1 Occludin und Claudin sowie funktionell der TER und des Albuminübertritts. Verwendung der entsprechenden Mutanten in Abhängigkeit der Vorergebnisse z.B der Pyruvat Oxidase Mutante *spxB*⁻ oder die *plnA*⁻/*spxB* Doppelmutante und R6 Wildtype. Verwendung der entsprechenden Ak in Abhängigkeit der Vorergebnisse z.B. anti-TLR2 oder anti-PAFr. Behandlung mit PD-98056 MEK Inhibitor oder PD-98059
 - Prüfung von relevanten Einzelbefunden im Tierversuch z. B. TLR2 knockout Maus (Dr. K. Kirschning, München, Dr. R. Schumann, Berlin) bzw. einzelne Pneumokokken Mutanten (jeweils D39 bzw. D39 Hintergrund). Behandlung mit PD-98056 MEK Inhibitor. H&E Färbung, Leukozytenzahl, Schrankenstörungsmessung mit Evansblue (n=10 /Gruppe).

Ziel B: Aufklärung der Mechanismen, die zur Apoptose von BMECs führen und Entwicklung möglicher Interventionsstrategien.

- Inkubation von BMEC mit lebenden *S. pneumoniae* D39 Kapseltyp 2 oder R6, zu unterschiedlichen Zeitpunkten 3, 6, 9, 12 h, der Pneumolysin-negativen Mutante *plnA*⁻, *spxB*⁻, *plnA*⁻/*spxB*⁻, *cbpA*⁻, zum Zeitpunkt der maximalen Apoptose. Behandlung mit dem Breitspektrum Caspase Inhibitor z-VAD-fmk. Apoptosenachweis mit Ethidiumbromid/Acridinorange- und TUNEL Färbungen, Messung der Caspasen 1, 3, 8 und 9. Bestätigung der Apoptose durch andere bereits dargelegte Methoden inklusive EM.
- Inkubation von BMEC mit PCW, zu unterschiedlichen Zeitpunkten 12, 24, 48, 72 h, zum Zeitpunkt der maximalen Apoptose. Verwendung von cholinfreien (Ethanolamin) Zellwänden und Behandlung mit anti-PAFr-, anti-TLR2-, anti-TLR4-, anti-CD14 Ak, und mit dem Breitspektrum Caspase Inhibitor z-VAD-fmk. Apoptosenachweis mit Ethidiumbromid/Acridinorange- und TUNEL Färbungen, Messung der Caspasen 1, 3, 8 und 9. Bestätigung der Apoptose durch andere bereits dargelegte Methoden inklusive EM. Inkubation von BMEC mit PCW, Nachweis von FAS Ligand und FAS Rezeptor (Western blot). Messung der Caspase 8 Aktivität. Behandlung mit blockieren FASr Ak bzw. Homolog.
- Nachweis von Apoptose in Hirngefäßen und pialen Gefäßen (Arteriolen, Venolen) und gezielte Suche im Plexus Choroideus (Epithel) Prüfung von Interventionen auf Grund von den erhobenen Vorergebnissen zum TLR2 knockout Maus (Dr. K. Kirschning, München, Dr. R. Schumann, Berlin) bzw. Effekt der intrathekalen z-VAD-fmk Behandlung auf die Schrankenstörung.
- Nachweis der Apoptose im Endothel meningealer Gefäßen sowie im Parenchym in Gehirnen von Patienten die an bakterieller Meningitis verstorben sind. Der Nachweis soll in HE Färbungen zunächst nach morphologischen Kriterien erfolgen und durch TUNEL Färbung besser spezifiziert werden. Zudem wollen wir auch im Epithel des Plexus Choroideus gezielt danach suchen. Diese Untersuchungen werden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Brück durchgeführt. Eine entsprechende Anzahl von Gehirnen steht uns zur Verfügung.

Tierversuchsgenehmigungen für die geplanten Untersuchungen liegen vor (G0154/00, G 0167/00)

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Das Projekt ist im Bereich "Entzündung" des SFB angesiedelt und dort eng mit den Projekten Hanisch (B9); Brück/Stangel (B12), Bechmann/Gimsa (B13); Zipp (B14) und Woiciechowsky/Volk vernetzt. Mit der Arbeitsgruppe Hanisch haben wir in der laufenden Antragsperiode Signalwege, die durch PCW induziert werden untersucht (siehe 3.4.1). In Hinkunft soll die Kooperation fortgeführt werden, wobei ein reger Methodenaustausch bzw. Überprüfen von Signalwegen im Tiermodell geplant ist. Zusammen mit der Arbeitsgruppe Brück besteht eine längere Kooperation im Bereich histologischer Techniken und der Auswertung der histologischen Schnitte. Wir planen, wie unter 3.5.3 Ziel B angeführt, den Nachweis von Apoptose in Endothelzellen in Gehirnen von Patienten, die an Pneumokokkenmeningitis verstorben sind. Herr Brück kann dabei auf vorhandene Schnitte von Sektionen zurückgreifen. Mit Bechmann/Gimsa soll die Rolle derIDO als T-Zellproliferationshemmer im Mausmodell der Meningitis untersucht werden. Zudem werden die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in BMEC nach Stimulation mit Pneumokokken durchgeführt. Mit Frau Zipp besteht eine Zusammenarbeit vorwiegend im Bereich von

Apoptosemechanismen und deren Nachweismethoden (CD95, TRAIL, etc.). Mit der Arbeitsgruppe Woiciechowsky/Volk wird momentan im Tierversuch der Frage nachgegangen, ob durch intracerebroventrikuläre Applikation von PCW als krankheitsrelevanten Zustand periphere immunologische Effekte induziert werden können. Mit dem Institut von Herrn Volk kooperieren wir seit Jahren methodisch und nützen z.B. den Durchflußzytometer (siehe 3.4.1). Darüber hinaus bestehen in der Weiterentwicklung tierexperimenteller Ansätze und physiologischer Techniken mit den Gruppen Dreier/Einhäupl (A1), Lindauer (A6) sowie der Nutzung des Multiphoton Laser Scanning Mikroskopes mit Dirnagl/Priller (A5) teils jahrelange intensive Kooperationen innerhalb der experimentellen Neurologie.

Außerhalb des SFBs bestehen Kooperationen mit Herrn PD Dr. Schumann, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Charité, Berlin, Dr. Rudel, MPI für Infektionsbiologie (bakteriell induzierte Apoptose), Berlin, Prof. Nau in Göttingen (Methoden/Materialaustausch), Dr. Novak, Wien (Bakterien knock outs, Typisierung etc.) und Prof. E. Tuomanen, Memphis, (Bakterien knock outs, Zellwandpräparation, Tiermodelle).

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
		IIa/2	1	42	IIa/2	1	42	IIa/2	1	42		
	zus.:			zus.:			zus.:			zus.:		
SV												
			Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		
			522	41.3			41.3				41.3	
			515	19.2								
			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			
			106.5			87.3			87.3			
I												
			106.5			87.3			87.3			

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾ (einschl. Hilfskräfte)	Weber Jörg, Prof. Dr. Oberarzt Braun Johann, Dr. Hoffmann Olaf, Dr.	Neurologie Neurologie Neurologie	Neurologische Klinik Neurologische Klinik Neurologische Klinik	10 10 40	1995 2002 2002	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter ^{1) 2)} (einschl. Hilfskräfte)	Dagand Emilie, Dipl.- Ing.	Neurologie	Neurologische Klinik	40		BAT II/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

3.7.1.1 Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

1. Weber, Jörg R. Prof. Dr. med.: Herr W. kann sich neben seinen klinischen Verpflichtungen als Oberarzt der Klinik dem Projekt etwa 10 Stunden/Woche widmen. Herr W. beherrscht alle im Projekt vorgeschlagenen Präparationen und Techniken und wird vorwiegend für die Planung der in diesem Antrag vorgeschlagenen Experimente zuständig sein. Die Bearbeitung und Interpretation der erhobenen Daten sowie das Verfassen von Publikationen bzw. die Anleitung der Mitarbeiter dazu, sowie die Betreuung der Doktorarbeiten sind seine Hauptaufgaben.

2. Braun Johann S. Dr. med.: Herr B. ist Mit Antragsteller und beherrscht die wesentlichen in diesem Antrag notwendigen Techniken. Er wird neben seiner klinischen Tätigkeit ca. 50 % seiner Arbeitszeit sich dem Antrag widmen. Geplant ist, dass er mit Herrn Hoffmann im Tausch die klinische Funktionen wahrnimmt. Damit ist sichergestellt, dass sowohl Herr Braun als auch Herr Hoffmann für mindestens 18 Monate kontinuierlich im Antragszeitraum forschen können, aber auch die nötige klinische Anbindung haben.

3 "Gerok" Stelle einrichtet auf Empfehlung der DFG (BAT IIa):

Hoffmann Olaf Dr. med.: Herr H. ist ein junger, engagierter Wissenschaftler, der nun seit einem Jahr in unserer Arbeitsgruppe arbeitet. Er beherrscht alle im Antrag vorgeschlagenen in vivo Techniken und soll sich vor allem dem in vivo Experimenten widmen. Er wird momentan auch in die in vitro Techniken eingearbeitet. Es ist davon auszugehen, dass Herr H. zum Förderungsbeginn alle notwendigen Techniken beherrscht. Herr H. würde 50 % seiner Arbeitszeit dem Projekt widmen und Tauschpartner von Herrn B. sein. Damit wäre wie bereits oben angeführt sichergestellt, dass beide längere Zeit kontinuierlich wissenschaftlich arbeiten könnten (siehe oben). Herr H. hat bereits 8 Originalarbeiten in internationalen Journalen veröffentlicht, 2 sind dabei aus diesem Projekt hervorgegangen, 3 weitere sind in Vorbereitung.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung entfällt

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1. Dagand Emilie, Dipl. Ing. (BAT IIa/2): Frau D. ist Diplomingenieurin für Gen- und Biotechnologie und beherrscht sowohl von ihrer theoretischen Ausbildung als von ihrer praktischen Erfahrung die im Antrag angeführten Techniken. Ihre Expertise in der Entwicklung von PCRs, Southern blotting etc. sowie ihre Erfahrungen im Proteinnachweis und der Quantifizierung würden unserem Projekt zusätzliche methodische Innovation bringen. Zudem gehören zu ihren Aufgabenbereich die arbeitsintensive Präparation primärer Zellkultursysteme sowie die Überwachung, Charakterisierung und Qualitätskontrolle. Des Weiteren ist die Durchführung der Versuche im Doppelkammersysteme und Messung der TER, die PCR Untersuchungen und Western blots ein Schwerpunkt der Arbeit. Ihre Erfahrungen mit mikrobiologischen Techniken wären auch bei der verantwortungsvollen Betreuung der Pneumokokken Zucht und der Charakterisierung von PCW von Vorteil. Frau D. hat auch an Sequenzierungsprojekten teilgenommen und als Koautor in renommierten Journalen publiziert. Es ist geplant, dass Frau Dagand die erhobenen Daten als Doktorarbeit zum Dr. rer. medic. zusammenfasst.

"Gerok" Stelle einrichtet auf Empfehlung der DFG (BAT IIa) siehe bitte oben.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als <u>Grundausrüstung</u> voraussichtlich zur Verfügung:	12	12	12

Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als <u>Ergänzungsausrüstung</u> beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausrüstung</u>	41.3	41.3	41.3
---	------	------	------

(Alle Angaben in DM)

Geräte im Einzelwert von bis DM 20.000,- brutto ohne Fahrzeuge

Nikon E 200 Eclipse Fluoreszenz Mikroskopie Arbeitsplatz. Ein Großteil der geplanten Versuche muß im S2/L2 Bereich unseres Labor stattfinden. Das S2/L2 Labor ist nicht mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgestattet. Zur Durchführung der geplanten Versuche und insbesondere um die notwendigen Sicherheitsstandards einzuhalten ist diese Gerät von größter Bedeutung.

Summe der Kleingeräte:	DM 19.200
	DM 19.200

Begründung zur Ergänzungsausrüstung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

- | | |
|---|----------|
| 1. Zellkulturmedien, Chemikalien, FKS etc.
Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für die Herstellung, Erhaltung bzw. Durchführung von Experimenten in der Zellkultur notwendig sind. | DM 6.000 |
| 2. Gefäße für die Zellkultur (Multiwellplatten, Doppelkammereinsätze mit Filtern etc.).
Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für Zellkulturexperimente unerlässlich sind. | 5.000 |
| 3. Chemikalien für die Medienherstellung zur Züchtung von Bakterien, (Aminosäuren, Ethanolamin etc. Agarplatten,
Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für die Züchtung von Bakterien, Knock out Bakterien und derPräparation definierter Zellwände unerlässlich sind. | 2.000 |
| 4. Chemikalien etc. für PCR
Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für die geplanten PCRs notwendig sind. | 4.000 |
| 5. Chemikalien, Gele für Western blots
Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für die der geplanten Blots notwendig sind. | 2.500 |
| 6. Antikörper
Begründung: Hierbei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien, die für die geplanten Western blots notwendig sind. | 5.000 |
| 7. ELISA kits (TNF, IL-1 etc.)
Begründung: Hierbei handelt es sich um Kits die effizient und in anerkannter Qualität eine Messung von Zytokinen etc. ermöglichen und die notwendig sind für die geplanten Experimente sind | 4.500 |
| 7. TUNEL kits, Färbungen, EM Materialien | 5.000 |

Begründung: Neben der morphologischen Beurteilung sind diese Spezialfärbungen absolut notwendig, um mit mehreren Methoden den Zelltod in den geplanten Untersuchungen zu spezifizieren. 3.200

8. Versuchstiere/Tierhaltung (ca. 80 Mäuse a DM 40)

Begründung: Die Versuchstiere müssen bei Charles River gekauft werden bzw. von unseren Kooperationspartnern bezogen werden. Neben den Tierkosten fallen Transportkosten sowie Kosten der Tierhaltung, Typisierung und Qualitätskontrolle an. 1.500

9. Narkosemittel, Perfusionsmaterialien, Präparationsmittel für die Tierversuche

Begründung: Diese zusätzlichen Verbrauchsmaterialien sind für die erfolgreiche Durchführung der Tierversuche notwendig. 1.500

10. Versuchstiere für die Zellkultur (ca. 150 Ratten 30g a 10 DM)

Begründung: Diese Tiere sind die Grundlage unserer Zellkultursystem und damit unerlässlich

insgesamt **DM 41.300**

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

entfällt

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B9

3.1.1 Thema:

Thrombin als Stimulus und Modulator mikroglialer Aktivierung

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neurobiologie, Biochemie

3.1.3 Leiter/in:

PD Dr.rer.nat.habil. Hanisch, Uwe-Karsten, 06.05.1961

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Zelluläre Neurowissenschaften

Robert-Rössle-Straße 10

13092 Berlin-Buch

Telefon: (030) 9406-3260

Telefax: (030) 9406-3819

E-Mail: uhanisch@mdc-berlin.de

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

Ja, befristet bis zum 31.07.2002

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

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
1998 (2.Hj.)	30,6	12,5	0	43,1
1999	63,6	25	0	88,6
2000	64,8	25	0	89,8
2001	67,2	25	0	92,2
Zwischen-summe	226,2	87,5	0	313,7
2002	67,2	25	0	92,2
2003	67,2	25	0	92,2
2004	67,2	25	0	92,2

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Für Thrombin, bekannt als eine Serinprotease der Blutgerinnungskaskade, wurden in letzter Zeit auch einige zelluläre Wirkungen beschrieben. Diese werden über einen ungewöhnlichen Mechanismus ausgelöst. Limitierte Proteolyse spezifischer Protease-aktivierter Rezeptoren (PAR) legt dabei einen neuen N-Terminus frei, der die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als intramolekularer Ligand autostimuliert. Kürzlich haben wir für Thrombin eine potentielle Rolle als Mikroglia-Aktivator vorgestellt. Während Thrombin bestimmte mikrogliale Reaktionen über Proteolyse vermittelt, werden andere in Abwesenheit enzymatischer Aktivität beobachtet. Über vermutlich alternative Rezeptorrekrutierung stimuliert Thrombin dosisabhängig die Induktion von Zyto- und Chemokinen, hemmt aber die durch einen zweiten Stimulus evozierte Freisetzung. Mehrere Befunde lassen dafür separate Mechanismen erkennen. Außerdem kann durch Thrombin-Modifizierung der induktive vom inhibitorischen Effekt abgekoppelt werden. Wir vermuten daher, dass Thrombin zusätzliche zelluläre Aktivität als ‚Ligand‘ besitzt. Da bei Störungen der Blut-Hirn-Schranken-Funktion oder bei ZNS-Verletzungen Serumkomponenten in das umliegende Gewebe einfluten, könnte Thrombin neben einer Spaltung löslicher Substrate und einer proteolytischen PAR-Aktivierung auch über nicht-proteolytische Effekte an Folgeprozessen pathologischer Ereignisse teilnehmen. Tatsächlich wurden für Serumproteasen auch neuronale Effekte beschrieben und eine Beteiligung an Hirngewebeschädigungen gezeigt. Im vorliegenden Projekt sollen potentielle Funktionen des Thrombins als Mikroglia-Aktivator und –Modulator untersucht werden. Einflüsse auf Mikroglia-Funktionen und einbezogene Signalwege stellen einen Schwerpunkt der Untersuchungen dar. Ziel ist auch die Aufdeckung der Mechanismen, die anscheinend einerseits über PAR-Aktivierung, andererseits über nicht-enzymatische Stimulationen ablaufen könnten. Die Arbeiten orientieren sich damit am Beispiel des Thrombins auf die bislang wenig berücksichtigten Beiträge von Serumproteasen zu Schadenskaskaden des ZNS.

3.3 Stand der Forschung

Signale der mikroglialen Aktivierung

Mikrogliale Aktivierung wird in nahezu allen neuropathologischen Szenarien registriert (Banati et al., 1993; Streit, 1994; Kreutzberg, 1996; Schwaiger et al., 1998; Raivich et al., 1999; Streit et al., 2000). Sie ist durch morphologische Veränderungen, erhöhte Motilität, chemotaktische Bewegung, Expression von Ionenkanälen und Oberflächenantigenen sowie durch Synthese und Freisetzung einer Vielzahl löslicher Produkte charakterisiert und kann zur Entfaltung phagozytotischer und toxischer Eigenschaften der Mikroglia führen. Grundsätzlich ist dieser Prozess zunächst eine protektive und restorative Reaktion auf Störungen der Gewebemöostase. Massive oder chronische Mikroglia-Aktivierung steht aber im Verdacht, an sekundären Schadenskaskaden beteiligt zu sein. Diese können direkt mit mikroglialen Eigenschaften in Verbindung stehen, aber auch Interaktionen mit anderen neuronalen Zellen, wie Astrozyten, und eingewanderten Immunzellen einschließen. Welche Konsequenzen aus der

Transformation der Mikroglia hervorgehen, hängt vermutlich einerseits von der Stärke, Dauer und Art der primären Stimulation ab, wird aber zu einem vermutlich ebenso bedeutenden Anteil vom Aktivierungskontext und weiteren modulierenden Faktoren bestimmt (Hanisch, 2001a).

Mikroglia-Aktiveringung kann durch verschiedenste Faktoren ausgelöst werden (Raivich et al., 1996; Graeber et al., 1998; Streit et al., 2000; Streit, 2000; Hanisch, 2001a). Bei Schädigungen des ZNS-Gewebes mögen ionale Veränderungen ($[K^+]$), massiv freigesetzte (Ko)Transmitter (z.B. ATP) oder Störungen einer konstitutiven Neuron-Mikroglia-Kommunikation kritische Signale darstellen, die Aktivierungsmechanismen auslösen und über einen mehr protektiven oder neurotoxischen Nettoeffekt der mikroglialen Reaktionen entscheiden (Harrison et al., 1998; Streit et al., 2000). Vermutlich werden aber auch noch andere Substanzen gebildet, freigesetzt oder in ihrer Struktur bzw. Verfügbarkeit verändert, die Gefährdung oder Schädigung anzeigen und eine Rekrutierung der Mikroglia steuern. Ihre (bio)chemische Natur und ihren mikroglialen Rezeptoren sind weitgehend unbekannt. Denkbar wäre, dass Serumfaktoren eine Signalwirkung entfalten, wenn Beeinträchtigungen des Blutgefäßsystems ihren Übertritt in den Extrazellulärraum des ZNS erlauben.

Beteiligung von Serinproteasen an Schadensmechanismen des ZNS

Normalerweise ist der Stoffaustausch zwischen Blutkreislauf und Hirngewebe streng kontrolliert. Die Blut-Hirn-Schranke ist dabei eine selektive Barriere des zerebralen Gefäßsystems, die u.a. die Aufrechterhaltung eines ZNS-spezifischen ionalen und biochemischen Milieus und den geregelten Übertritt von Nährstoffen und Metaboliten garantiert. Störungen ihrer funktionellen Integrität oder Gefäßverletzungen führen jedoch zu einem mehr oder weniger ungehinderten Einfluten von Serumkomponenten, die normalerweise einem Ausschluss unterliegen. Einige dieser Komponenten mögen zu Veränderungen oder sogar Störungen zellulärer Funktionen führen, wenn gliale und neuronale Zellpopulationen über entsprechende signalgekoppelte Rezeptoren verfügen (Merrill und Benveniste, 1996; Raber et al., 1998; Vitkovic et al., 2000). Als Beispiel werden neuromodulatorische Zytokine und Komplementproteine angeführt (Hanisch und Quirion, 1995; Besedovsky und del Rey A., 1996; Nataf et al., 1999; Hanisch, 2001b). Andere Serumfaktoren können infektiösen Agenzien assistieren, über mehr indirekte Mechanismen mit ZNS-Funktionen interferieren oder im Extremfall die Vitalität neuraler Zellen einschränken (Schumann et al., 1990; Prinz et al., 1999).

In letzter Zeit wurde Serinproteasen und ihrer komplexen Beteiligung an hirnschädigenden Prozessen Aufmerksamkeit geschenkt (für eine Übersicht siehe Turgeon und Houenou, 1997; Gingrich und Traynelis, 2000). Dabei wird davon ausgegangen, dass Serumproteasen wie Thrombin, *tissue plasminogen activator* oder Plasmin bei unterschiedlichsten Pathologien Zugang zu Zellen und extrazellulären Substraten des ZNS erhalten. Solch eine Situation kann nach traumatischen Ereignissen oder in Folge einer Ischämie, Infektion oder inflammatorischer Prozesse eintreten. Daraus könnten multiple Konsequenzen für gliale und neuronale Zellen sowie für lösliche und Matrixproteine erwachsen. Tatsächlich zeigen *in vitro*- und *in vivo*-Studien sowie klinische Befunde einen signifikanten Beitrag solcher Serinproteasen und ihrer verschiedenen Substrate an (Gingrich und Traynelis, 2000).

Zelluläre Wirkungen des Thrombins

Thrombin ist eine multifunktionelle Serinprotease (Grand et al., 1996; Coughlin, 2000). Thrombin wird selbst aus seiner inaktiven Vorstufe (Zymogen) Prothrombin freigesetzt und katalysiert anschließend die Überführung von Fibrinogen in Fibrin. Diese Rolle als wichtige Komponente der Blutgerinnungskaskade ist intensiv untersucht. Neben seiner proteolytischen Aktivität für das lösliche Fibrinogen wurden aber auch verschiedene zelluläre Wirkungen beobachtet (Grand et al., 1996; Coughlin, 2000; Cocks und Moffatt, 2000). Thrombin kann Blutplättchen aktivieren und induziert proliferative, chemotaktische und adhäsive Effekte in Granulozyten, Monozyten bzw. Gefäßmuskelzellen (Coughlin, 2000; Cocks und Moffatt, 2000). Der Mechanismus, wie eine Protease direkt zelluläre Reaktionen auslösen könnte, blieb allerdings längere Zeit verborgen. Mit der Identifizierung der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) wurde nicht nur ein bislang völlig unbekanntes Rezeptoraktivierungsprinzip entdeckt, sondern für den Koagulationsfaktor Thrombin die zelluläre Seite seines Wirkspektrums molekular verständlich (Cocks et al., 1999; Coughlin, 2000; Chow et al., 2000; Cocks und Moffatt, 2000).

Thrombin bindet dabei an der Extrazellulärdomäne des PAR-Moleküls und spaltet ein N-terminales Peptid ab. Der freigesetzte neue N-Terminus stellt dann den intramolekulen Ligand, der den Rezeptor durch Bindung an eine signalauslösende Domäne aktiviert. Synthetische Peptide entsprechender Ligand-Sequenz haben Agonisteneigenschaft. PAR-Kopplung an G-Proteine, Phospholipase C, Rho,

Adenylylcyclase und verschiedene Proteinkinasen löst nachfolgend verschiedenste zelluläre Reaktionen, wie zytoskelettale, metabolische und sekretorische Veränderungen aus (Coughlin, 2000; Cocks und Moffatt, 2000). Durch Proteolyse kann ein Thrombin-Molekül damit rasch mehrere PAR-Moleküle aktivieren, die über Phosphorylierung und Internalisation schnell deaktiviert werden. Bisher wurden drei proteolytisch aktivierbare Thrombin-Rezeptoren kloniert, PAR1, PAR3 und PAR4. Der ebenfalls zur Familie gehörige PAR2 wird nicht durch Thrombin sondern durch Trypsin aktiviert (Xu et al., 1998; Andersen et al., 1999).

Thrombin und Thrombin-Rezeptoren im ZNS

Drei Molekülgruppen geben Hinweis auf die Existenz eines Thrombin/Thrombin-Rezeptor-systems im ZNS. mRNA für Prothrombin, die inaktive Thrombin-Vorstufe, wurde im Hirngewebe verschiedener Entwicklungsphasen nachgewiesen (Dihanich et al., 1991; Turgeon und Houenou, 1997). Im ausgereiften Hirngewebe werden sowohl mRNA, als auch Protein in verschiedenen Regionen lokalisiert (Turgeon und Houenou, 1997). Bei Bedarf könnte somit schnell lokal Thrombin gebildet werden. Auch wurden eine ZNS-Expression von PARs, hauptsächlich PAR1, mit vermutlich neuronaler und astrozytärer Lokalisation (Niclou et al., 1994; Weinstein et al., 1995; Festoff et al., 1996; Suidan et al., 1996; Weinstein et al., 1998; Ubl und Reiser, 2000; Ubl et al., 2000) und proteolytisch bzw. PAR-vermittelte Effekte für Astrozyten und neuronale Zellen beschrieben (Gurwitz und Cunningham, 1990; Suidan et al., 1992; Grabham und Cunningham, 1995; Ubl und Reiser, 1997; Suidan et al., 1997; Turgeon und Houenou, 1997). Außerdem wird Nexin-1 (PN-1), ein natürlicher Thrombin-Inhibitor (Serpine), im ZNS-Gewebe gefunden.

Es ist noch weitgehend unklar, welche Funktionen Thrombin im ZNS hat. Eine Beteiligung während der Synaptogenese bzw. Synapseneliminierung wurde in Betracht gezogen. PAR-Expression legt nahe, dass astrozytäre und neuronale Zellen auch im adulten Gewebe auf Thrombin reagieren können (Festoff et al., 1996; Turgeon und Houenou, 1997). Eine Beteiligung an Schadensmechanismen unterschiedlichster Ursache ist wahrscheinlich (Akiyama et al., 1992; Cunningham et al., 1993; Vaughan et al., 1994; Davis-Salinas et al., 1994; Donovan et al., 1997; Turgeon und Houenou, 1997). Schätzungen auf der Grundlage zirkulierenden Prothrombins und der nach Schädigungen in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Gewebe nachweisbaren Thrombin-Aktivität ergeben ausreichende Spiegel für PAR-Aktivierung. Erhöhte Spiegel scheinen mitunter sogar über Tage in Nähe zerebrovaskulärer Läsionen zu persistieren (Gingrich und Traynelis, 2000). Neurotoxizität kann experimentell mit Thrombin ausgelöst werden und PAR1-Stimulierung steigert NMDA-Rezeptor-Aktivität. Für ein neurotoxisches Potential sprechen auch Befunde zum protektiven Effekt von Proteaseinhibitoren, wie Nexin-1 (Turgeon und Houenou, 1997; Gingrich und Traynelis, 2000). Endogenes Nexin-1 konzentriert sich auch vorrangig in Blutgefäßnähe. Es ist vorstellbar, dass durch diesen antagonistischen Mechanismus bei Gewebeerletzungen eindringendes Thrombin sofort inaktiviert und Konsequenzen endogener Prothrombin-Konversion kontrolliert werden. Andererseits scheint Thrombin auch neuroprotektive Effekte zu haben (Vaughan et al., 1995; Donovan und Cunningham, 1998), wobei das Überwiegen der jeweiligen Wirkung auf die Zellvitalität von der Dosis und Dauer der Thrombin-Einwirkung abhängen könnten.

Mikroglia als Ziel zellulärer Thrombin-Wirkungen

Kürzlich wurde von uns sowie zeitgleich durch eine weitere Arbeitsgruppe eine Rolle des Thrombins als mikroglialer Aktivator vorgestellt (Möller et al., 2000; Ryu et al., 2000). Thrombin-Behandlung kultivierter Mikroglia führt zur Auslösung zytosolischer Signale und veranlasst die Zellen zur Proliferation und NO-Synthese (siehe Abschnitt 3.4).

Wie wir inzwischen intensiver untersucht haben, kann Thrombin auch als Stimulus und Modulator mikroglialer Zytokin-Freisetzungen agieren. Überraschenderweise werden diese Wirkungen jedoch nicht durch Blockade der proteolytischen Aktivität aufgehoben. Das gab uns Anlass zu der Vermutung, dass einige zelluläre Effekte über nicht-proteolytische Signalgenerierung und damit auch nicht über PAR-Spaltung verlaufen. Als Hypothese wird daher formuliert, dass Thrombin unter bestimmten pathologischen Situationen, die mit einer erhöhten Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität assoziiert sind, innerhalb des ZNS-Parenchyms nicht nur lösliche Substrate umsetzt und PARs auf ZNS-Zellen aktiviert, sondern zusätzlich als Ligand näher zu bestimmender Oberflächenmoleküle Reaktionen

auslöst. Die Charakterisierung dieser multiplen, insbesondere jedoch der ‚nicht-klassischen‘ Rezeptoraktivierungen und ihrer zellulären Konsequenzen ist Ziel des Projektes.

Literatur

- Akiyama H, Ikeda K, Kondo H, McGeer PL (1992) Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 146: 152-154.
- Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW (1999) Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11189-11193.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-118.
- Besedovsky HO, del Rey A. (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17: 64-102.
- Chow JM, Moffatt JD, Cocks TM (2000) Effect of protease-activated receptor (PAR)-1, -2 and -4-activating peptides, thrombin and trypsin in rat isolated airways. *Br J Pharmacol* 131: 1584-1591.
- Cocks TM, Fong B, Chow JM, Anderson GP, Frauman AG, Goldie RG, Henry PJ, Carr MJ, Hamilton JR, Moffatt JD (1999) A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature* 398: 156-160.
- Cocks TM, Moffatt JD (2000) Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 21: 103-108.
- Coughlin SR (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407: 258-264.
- Cunningham DD, Pulliam L, Vaughan PJ (1993) Protease nexin-1 and thrombin: injury-related processes in the brain. *Thromb Haemost* 70: 168-171.
- Davis-Salinas J, Saporito-Irwin SM, Donovan FM, Cunningham DD, Van Nostrand WE (1994) Thrombin receptor activation induces secretion and nonamyloidogenic processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269: 22623-22627.
- Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D (1991) Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 6: 575-581.
- Donovan FM, Cunningham DD (1998) Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem* 273: 12746-12752.
- Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD (1997) Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 17: 5316-5326.
- Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA (1996) Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin Thromb Hemost* 22: 267-271.
- Gingrich MB, Traynelis SF (2000) Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci* 23: 399-407.
- Grabham P, Cunningham DD (1995) Thrombin receptor activation stimulates astrocyte proliferation and reversal of stellation by distinct pathways: involvement of tyrosine phosphorylation. *J Neurochem* 64: 583-591.
- Graeber MB, Lopez-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S (1998) The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813: 241-253.
- Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW (1996) Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 313 (Pt 2): 353-368.
- Gurwitz D, Cunningham DD (1990) Neurite outgrowth activity of protease nexin-1 on neuroblastoma cells requires thrombin inhibition. *J Cell Physiol* 142: 155-162.
- Hanisch UK (2001b) Effects of interleukin-2 and interferons on the nervous system. In: *Psychoneuroimmunology* (Ader R, Felten DL, Cohen N, eds), pp 585-631. San Diego: Academic Press.
- Hanisch UK (2001a) Microglia as a source and target of cytokine activities in the brain. In: *Microglia in the degenerating and regenerating CNS* (Streit WJ, ed), New York: Springer-Verlag.
- Hanisch UK, Quirion R (1995) Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine. *Brain Res Rev* 21: 246-284.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (1998) Role for neuronally derived

- fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10896-10901.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318.
- Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19: 331-338.
- Möller T, Hanisch UK, Ransom BR (2000) Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 75.
- Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR (1999) Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci* 22: 397-402.
- Niclou S, Suidan HS, Brown-Luedi M, Monard D (1994) Expression of the thrombin receptor mRNA in rat brain. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 40: 421-428.
- Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK (1999) Microglial activation by components of Gram-positive and -negative bacteria: Distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 1078-1089.
- Raber J, Sorg O, Horn TF, Yu N, Koob GF, Campbell IL, Bloom FE (1998) Inflammatory cytokines: putative regulators of neuronal and neuro- endocrine function. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 320-326.
- Raivich G, Bluethmann H, Kreutzberg GW (1996) Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio J Med* 45: 239-247.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30: 77-105.
- Ryu J, Pyo H, Jou I, Joe E (2000) Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B [In Process Citation]. *J Biol Chem* 275: 29955-29959.
- Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249: 1429-1431.
- Schwaiger FW, Hager G, Raivich G, Kreutzberg GW (1998) Cellular activation in neuroregeneration. *Prog Brain Res* 117: 197-210.
- Streit WJ (1994) The role of microglia in regeneration. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* S69-S70.
- Streit WJ (2000) Microglial response to brain injury: a brief synopsis. *Toxicol Pathol* 28: 28-30.
- Streit WJ, Walter SA, Pennel NA (2000) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581.
- Suidan HS, Niclou SP, Monard D (1996) The thrombin receptor in the nervous system. *Semin Thromb Hemost* 22: 125-133.
- Suidan HS, Nobes CD, Hall A, Monard D (1997) Astrocyte spreading in response to thrombin and lysophosphatidic acid is dependent on the Rho GTPase. *Glia* 21: 244-252.
- Suidan HS, Stone SR, Hemmings BA, Monard D (1992) Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron* 8: 363-375.
- Turgeon VL, Houenou LJ (1997) The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 25: 85-95.
- Ubl JJ, Reiser G (1997) Characteristics of thrombin-induced calcium signals in rat astrocytes. *Glia* 21: 361-369.
- Ubl JJ, Reiser G (2000) A novel proteolytic mechanism for termination of the Ca²⁺ signalling evoked by proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) in rat astrocytes [In Process Citation]. *Adv Exp Med Biol* 477: 323-329.
- Ubl JJ, Sergeeva M, Reiser G (2000) Desensitisation of protease-activated receptor-1 (PAR-1) in rat astrocytes: evidence for a novel mechanism for terminating Ca²⁺ signalling evoked by the tethered ligand. *J Physiol* 525 Pt 2: 319-330.
- Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD (1995) Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci* 15: 5389-5401.
- Vaughan PJ, Su J, Cotman CW, Cunningham DD (1994) Protease nexin-1, a potent thrombin inhibitor, is reduced around cerebral blood vessels in Alzheimer's disease. *Brain Res* 668: 160-170.
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C (2000) "Inflammatory" cytokines: Neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74: 457-471.

- Weinstein JR, Gold SJ, Cunningham DD, Gall CM (1995) Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci* 15: 2906-2919.
- Weinstein JR, Lau AL, Brass LF, Cunningham DD (1998) Injury-related factors and conditions down-regulate the thrombin receptor (PAR-1) in a human neuronal cell line. *J Neurochem* 71: 1034-1050.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6642-6646.

3.4 Eigene Vorarbeiten

3.4.1. Allgemeine Vorarbeiten

Dieser Abschnitt fasst kurz die Arbeiten und Ergebnisse der vorangegangenen Antragsperiode zusammen, die inhaltlich und methodisch Voraussetzungen für die geplanten Arbeiten der künftigen Projektausrichtung darstellen.

Mikrogliales Aktivierungsverhalten in Modellen bakterieller Konfrontation

Bei ZNS-Infektionen werden virale Hüllproteine und bakterielle Zellwandstrukturen von der Mikroglia als ‚fremd‘ erkannt. Entsprechende Rezeptoren leiten dann die zellulären Reaktionen einer mikroglialen Aktivierung ein. Als Modellstimuli lieferten bakterielle Zellwandkomponenten, wie das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien, grundlegende Einblicke in den Prozess der mikroglialen Aktivierung. Weniger bekannt war, ob und wie diese Zellen auf unterschiedliche bakterielle Stimuli reagieren. Wir haben dazu Konfrontationen der Mikroglia mit gram-positiven *Streptococcus pneumoniae* in Kultur simuliert und die zellulären Reaktionen charakterisiert. ZNS-Infektionen mit *S. pneumoniae* stellen dabei immer noch ein großes klinisches Problem dar, da Mortalität und Morbidität bei Meningitiden trotz Antibiotikaeinsatz seit Jahrzehnten unverändert hoch sind. Ziel der Arbeiten war, Hinweise auf eine evtl. unterschiedliche Reaktion der Mikroglia auf gram-positive und -negative Konfrontationen zu erhalten, die evtl. für den unterschiedlichen klinischen Verlauf bakterieller Infektionen relevant sein könnten.

Tatsächlich können Zellwandpräparationen von *S. pneumoniae* (*pneumococcal cell walls*, PCW) Mikroglia extrem effizient und rasch aktivieren. Ab einer kritischen Extrazellulärkonzentration werden die Zellen u.a. zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen angeregt, wobei einige dieser Faktoren nachweislich neurotoxisches Potential besitzen. Dabei führen schon kurzzeitige PCW-Konfrontationen zu einer massiven und anhaltenden Aktivierung. Trotz vieler Gemeinsamkeiten werden in dieser Stärke, Dynamik und Kinetik mikrogliale Reaktionen nicht beobachtet, wenn LPS gram-negativer Bakterien als Stimulus zum Einsatz kommt. Aus klinischer Sicht könnte damit mikroglialen Reaktionen und Produkten eine wichtige Rolle in der Frühphase bakterieller Meningitiden und für Konsequenzen Antibiotika-vermittelter Lyse von Bakterien zukommen. Andererseits zeigen diese Befunde an, dass sich selbst in Kultur unterschiedliche Stimulationsbedingungen in unterschiedlicher Weise in mikrogliale Reaktionen übersetzen.

Beteiligung von Rezeptoren, Kofaktoren und zytosolischen Signalkaskaden

Neben der Induktion von Zyto- und Chemokinen wurden auch elektrophysiologische und morphologische Veränderungen der Mikroglia nach PCW- und LPS-Kontakt charakterisiert. Dabei wurde die Expression von K⁺-Kanälen des Kv1.3-Typs als charakteristischer Marker mikroglialer Aktivierung auch dazu heran gezogen, die unterschiedliche Beteiligung von Oberflächenrezeptoren und Serumfaktoren an bakteriell auslösbaren Aktivierungsprozessen darzustellen. So wurde für PCW-vermittelte Reaktionen eine Rolle des Rezeptormoleküls CD14 und des assistierenden Kofaktors *LPS binding protein* (LBP) ausgeschlossen, die jedoch für LPS-induzierte Effekte benötigt werden. Auch wurde eine entwicklungsabhängig unterschiedliche Ansprechbarkeit der Mikroglia gegenüber PCW-Kontakt nachgewiesen.

An der intrazellulären Umsetzung bakterieller Zellstimulationen sind teilweise überlappende, teilweise mehr individuelle Proteinphosphorylierungsereignisse beteiligt. Über Phosphorylierungsnachweise und eine extensive Charakterisierung der Auswirkungen von Proteinkinase-

(und Phosphatase)-Hemmungen wurde die Einbeziehung von ERK/MAPK-Kaskaden (und zum Teil des JAK/STAT-Systems) an der Induktion verschiedener mikroglialer Reaktionen untersucht. Danach spielt der MEK1/2→ERK1/2 *pathway* für mikrogliale Aktivierung durch gram-positive PCW eine wichtige Rolle, eine Kinasekaskade, die eher mit zellulären Reaktionen auf Mitogene und Wachstumsfaktoren in Verbindung gebracht wurde.

Die vergleichende Charakterisierung zytosolischer Signalprozesse nach unterschiedlicher mikroglialer Stimulation hatte das praktische Ziel, intrazelluläre Enzymaktivitäten aufzufindig zu machen, die eine möglichst selektive Manipulation mikroglialer Reaktionen erlauben. Als Ergebnis wurde ein Proteintyrosinkinase-Inhibitor ausgewählt, der speziell die überschießende Zytokin-Produktion bei PCW-Konfrontationen reduziert, auf mikrogliale Zellen nicht toxisch wirkt, die biologisch verfügbare TNF α -Menge vermutlich zusätzlich über das TNF α :sTNF-R II-Verhältnis vermindert, andere mikrogliale Aktivierungsparameter nicht beeinflusst und bei (sogar) systemischer Applikation in einem Ratten-Tiermodell der Meningitis tatsächlich positive Effekte vermittelt. Pharmakologische Eingriffe dieser Art könnten für adjuvante Therapien und die Beeinflussung inflammatorischer Prozesse heran gezogen werden. Ein entsprechendes Patent wurde veröffentlicht.

Um die an isolierten Zellkulturen erhaltenen Effekte, charakterisierten Prozesse mikroglialer Aktivierung und deren Beeinflussbarkeit in komplexeren Modellen prüfen zu können, wurden organotypische Kulturmodelle für zunächst Ratten-, inzwischen auch Maus-Gewebe etabliert. Diese Gewebekulturmodelle sollen künftig helfen, das (mikro)gliale Verhalten auch in einem zellulären Kontext zu untersuchen, der einer Situation *in vivo* näher kommt.

Verändertes Calcium-Signalgeschehen in aktivierter Mikroglia

Die Arbeiten zu Mechanismen und Konsequenzen der mikroglialen Aktivierung befassten sich ebenfalls mit Veränderungen des Proteasom-Komplexes und der Rolle des intrazellulären Calciums ($[Ca^{2+}]_i$) bzw. seiner veränderten Spiegel in aktivierter Mikroglia. Dabei scheint die Auslösbarkeit von Calcium-Transienten durch Stimulation mit Calcium-Signal-induzierenden Faktoren, wie Komplementfaktor C5a, in chronisch aktivierter Mikroglia drastisch vermindert, ein Phänomen, dass unabhängig vom aktivierenden Stimulus zu sein scheint und über Blockade intrazellulärer Kinasen aufgehoben werden kann. Ursache verminderter Calcium-Signalfähigkeit scheint ein generell erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel zu sein. Chronisch erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ hat denkbar viele Konsequenzen, einschließlich einer eingeschränkten Zellvitalität. Veränderungen im intrazellulären Milieu (chronisch) aktivierter Mikroglia werden auch in den geplanten Arbeiten berücksichtigt.

Induktion mikroglialer Zyto- und Chemokin-Produktion

Mikroglia stellt eine wichtige endogene Quelle für Zyto- und Chemokine dar. Gleichzeitig exprimieren diese Zellen eine Reihe entsprechender Rezeptoren. Sie können somit auf para- und autokrine Zyto/Chemokin-Signale reagieren und sekundäre Konsequenzen erhöhter Zyto/Chemokin-Spiegel vermitteln. Wir haben in der Vergangenheit u.a. die mikrogliale Expression von Zytokin/Zytokinrezeptor-Systemen charakterisiert, so für das IL-2/IL-15- oder das IL-18-System, und deren Kopplung an zytosolische Kinasen aufgezeigt. In einem systematischen Ansatz wurden nun die durch unterschiedliche Stimulation induzierbaren Zyto- und Chemokin-Profile, Synthesekapazitäten und die Freisetzungsmodulation durch Interferon- γ (IFN γ) für Mikroglia, Astrozyten und zwei Populationen peripherer Makrophagen verglichen. Danach stellt sich aktivierte Mikroglia als die vermutlich wichtigste ZNS-Quelle für Chemokine dar. IFN γ , ein von Lymphozyten sezerniertes Zytokin, könnte dabei einen wesentlichen Einfluss auf die mikroglialen und astrozytären Zyto- und Chemokin-Profile nehmen, wobei IFN γ einzelne Faktoren in unterschiedlicher Weise und dazu auch noch in Abhängigkeit vom produzierenden Zelltyp und seiner Stimulationsart reguliert. Als *feedback*-Signal eingewanderter Immunzellen käme IFN γ damit evtl. auch eine Rolle beim ‚*shaping*‘ des Chemokin-Cocktails zu, der wiederum über die Zusammensetzung zellulärer Infiltrate entscheidet.

Die aus diesen Arbeiten gewonnenen Kenntnisse und methodischen Erfahrungen sind für das vorgesehene Projekt von zweifacher Bedeutung. Einerseits zeigten die Untersuchungen zum Thrombin als Mikroglia-Aktivator, dass diese Serinprotease ein Stimulus für Zyto- und Chemokin-Freisetzungen ist. Damit könnte Thrombin als Sofortsignal Störungen der Blut-Hirn-Schranke und Gewebe- bzw. Gefäßverletzungen ‚anzeigen‘. Es könnte in benachbarter Mikroglia eine Aktivierung restaurativer und protektiver Mechanismen einleiten, einschließlich der Zyto- und Chemokin-Produktion. Andererseits

wird gerade die Induktion dieser Faktoren in Mikroglia über einen ungewöhnlichen Mechanismus ausgelöst und gesteuert. Dieser Mechanismus ist das zentrale Thema des Projektes, wobei die quantifizierbare Freisetzung von Zyto- und Chemokinen einen idealen Meßparameter darstellt.

3.4.2. Spezifische Vorarbeiten

Thrombin ist ein Aktivator der Mikroglia

In Zusammenarbeit mit der University of Washington in Seattle (Dr. Thomas Möller) wurde kürzlich für Thrombin eine potentielle Rolle als Mikroglia-aktivierendes Signal vorgestellt. Dabei wurden für Thrombin funktionelle Rezeptoren auf Mikroglia *in vitro* nachgewiesen. Thrombin-Behandlung führt zur Auslösung einer transienten $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung, vermutlich über Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Das Calcium-Signal konnte durch Hirudin, einen spezifischen Hemmer von Thrombin-PAR-Interaktionen, geblockt werden — zusammen mit der sofortigen Inaktivierung der Signalgenerierbarkeit nach einmaliger Thrombin-Exposition Anzeichen eines proteolytischen Rezeptoraktivierungsmechanismus. Thrombin führte auch zur dosisabhängigen Auslösung mikroglialer Proliferation und NO-Produktion. Diese intrazellulären und zellphysiologischen Effekte ließen erkennen, dass Thrombin vermutlich über PAR-Rekrutierung als ein mikrogliales Stimulationssignal wirken kann.

Bei einer Charakterisierung weiterer mikroglialer Reaktionen auf Thrombin-Kontakt wurden inzwischen jedoch überraschende Hinweise auf einen zusätzlichen *nicht*-proteolytischen Aktivierungsmechanismus erhalten. Dieses Phänomen soll im vorgelegten Projekt auf molekularer und zellulärer Ebene untersucht werden. Ausgangsbasis für die Formulierung der Arbeitshypothesen und Ziele sind Vorarbeiten, deren wichtigste Ergebnisse nachfolgend genannt sind.

Thrombin ist Stimulus und Modulator der mikroglialen Zyto- und Chemokin-Freisetzung

Thrombin führt zu einer dosisabhängigen Freisetzung (*release*) von Zyto- und Chemokinen. Die freigesetzten Mengen sind im Vergleich zu den in etablierten Mikrogliaaktivierungsmodellen erhaltenen Größenordnungen durchaus beachtlich (Abb. 1). Das Release-Profil weist dabei auch spezifische Merkmale auf.

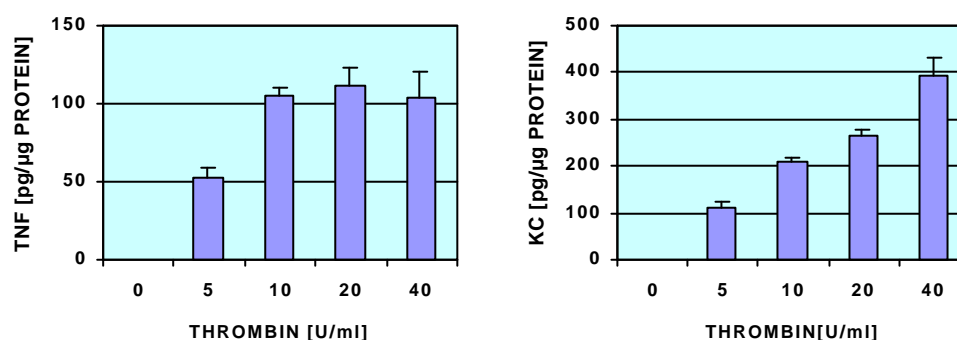


Abb. 1: Thrombin-induzierte Freisetzung von TNF α und KC (GRO α) aus Maus-Mikroglia. Kulturen wurden für 16 h mit verschiedenen Thrombin-Konzentrationen (U/ml) behandelt. Anschließend wurden die freigesetzten Zyto- bzw. Chemokin-Mengen im Überstand mittels ELISA bestimmt. Der Release ist in pg pro μ g Zellprotein angegeben (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=20). Ähnliche Ergebnisse wurden für IL-6, IL-12, MCP-1, MIP-1 α , -1 β , -2, RANTES sowie den löslichen TNF-Rezeptors II (sTNF-R II), jedoch nicht für andere untersuchte Faktoren erhalten.

Im Gegensatz zur induktiven Eigenschaft moduliert Thrombin eine evozierte Zyto/Chemokin-Freisetzung, wie sie durch LPS ausgelöst wird. So führt gleichzeitige Thrombin-Behandlung LPS-stimulierter Mikroglia zu einer dosisabhängig verminderten Freisetzung (Abb. 2).

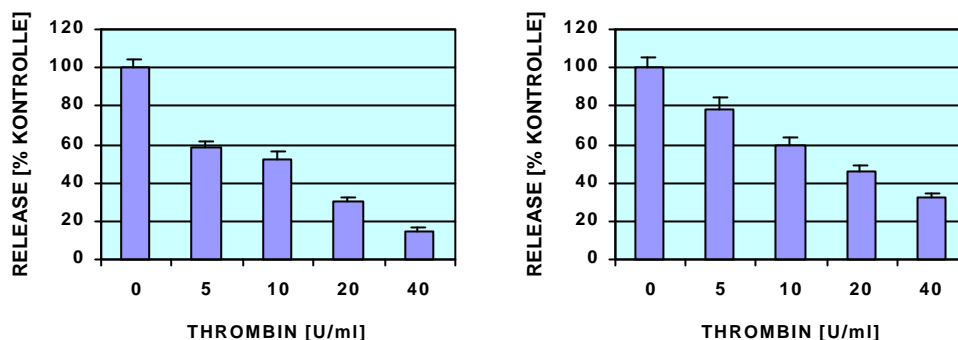


Abb.2: Thrombin-vermittelte Inhibition der LPS-evozierten Freisetzung von TNF α (links) und KC (rechts) aus Mikroglia. Kulturen wurden für 16 h mit LPS (100 ng/ml) in Gegenwart verschiedener Thrombin-Konzentrationen stimuliert. Die freigesetzten Zyto- und Chemokin-Mengen wurden anschließend im Überstand gemessen, der Release pro Zellprotein bestimmt und für die einzelnen Thrombin-Konzentrationen als Prozent der Kontrolle (freigesetzte Mengen in Abwesenheit des Thrombins) ausgedrückt (Angaben als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=20).

Thrombin-Effekte in Abwesenheit enzymatischer Aktivität

Thrombin scheint für die Auslösung der Effekte auf die mikrogliale Zyto- und Chemokin-Freisetzung kein Rezeptorprotein zu spalten. Experimente mit weitgehend selektiven Blockern der Thrombin-Proteaseaktivität stützen diese Vermutung. Inhibitor-vorbehandeltes Thrombin zeigt dabei nahezu unverändert sowohl Induktion, als auch Modulation (Inhibition) der Zyto/Chemokin-Freisetzung. Inzwischen wurde in unabhängigen Ansätzen die nicht-proteolytische Wirkung des Thrombins bestätigt. Dadurch konnte auch die Abspaltung eines sekundär wirksamen Peptids oder die Umsetzung löslicher Substrate ausgegrenzt werden.

Thrombin-Effekte auf die Zyto/Chemokin-Freisetzungen sind dennoch direkter Natur

Die Unabhängigkeit von der Proteaseeigenschaft ist Hinweis auf einen weiteren, grundlegend anderen Mechanismus zellulärer Wirkung. Dennoch scheinen die Release-modulierenden Thrombin-Einflüsse direkt ausgelöst zu werden. Ohne auf die einzelnen Befunde im Detail einzugehen ist es unwahrscheinlich, dass Thrombin im Zusammenwirken mit oder durch Aktivierung von sekundären Faktoren die Zyto- und Chemokin-Freisetzung stimuliert bzw. inhibiert. So werden beide Effekte unter verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet.

Effekte auf die Zyto/Chemokin-Freisetzungen erfordern ein natives Thrombin-Molekül. Induktion und Inhibition des Zyto/Chemokin-Release erfolgen vermutlich ohne Proteolyse. Trotzdem wird Thrombin als ‚intaktes‘ Protein benötigt. Denaturierung führt zum Verlust beider freisetzungsmulierender Eigenschaften (Abb. 3). Dieser Befund ist Hinweis dafür, dass, auch wenn die enzymatische Aktivität *per se* ausgeschaltet ist, das Thrombin-Protein noch weitere zelluläre Wirkungen entwickeln kann, jedoch nur ein immer noch weitgehend korrekt gefaltetes Molekül diese Effekte vermittelt.

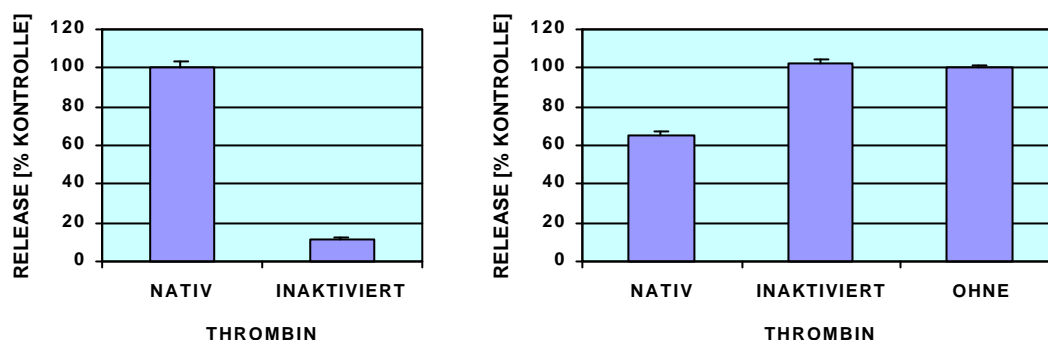


Abb. 3: Verlust der induzierenden (links) und inhibierenden Wirkung (rechts) auf die mikrogliale TNF α -Freisetzung durch Hitzebehandlung des Thrombins. Eine Thrombin-Lösung wurde dazu für 10 min bei 100 °C inkubiert, anschließend mit Kulturmedium auf eine theoretische Endkonzentration von 10 U/ml eingestellt und mikroglialen Kulturen allein (links, für Induktion) oder in Kombination mit 100 ng/ml LPS (rechts, für Inhibition) zugesetzt. Danach wurde die jeweils resultierende TNF α -Produktion gemessen. Zum Vergleich wurde jeweils auch natives Thrombin verwendet. Die maximale LPS-evozierbare TNF α -Produktion wurde in Abwesenheit von Thrombin ermittelt und daran die Inhibitionsfähigkeit des nativen und inaktivierten Thrombins gemessen. Angaben beziehen sich auf Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit n=36.

Effekte auf die Zyto/Chemokin-Freisetzung werden über zwei Mechanismen vermittelt

Die Inhibition der mikroglialen Zyto- und Chemokin-Freisetzung wird schnell initialisiert und erinnert dabei an die *kiss-and-run*-Kinetik PAR-vermittelter Effekte. Im Gegensatz dazu wird für die Induktion die Gegenwart des Thrombins über einen längeren Zeitraum (Stunden) benötigt (Abb. 4). Diese klare Dissoziation läßt (zumindest) zwei separate Mechanismen vermuten, die jedoch beide ohne proteolytische Rezeptoraktivierung auskommen. Weitere Anhaltspunkte für unterschiedliche Mechanismen der Freisetzungsinduktion bzw. -inhibition wurden aus einer selektiven Thrombin-Inaktivierung erhalten. Bei diesen in drei Varianten ausgeführten Studien konnte der induktive vom inhibitorischen Thrombin-Effekt nahezu komplett abgetrennt werden. Die Wirkungstrennung verweist damit auf die Beteiligung unterschiedlicher Molekülanteile am induktiven und modulatorischen (inhibitorischen) Thrombin-Effekt. Daraus wiederum können unterschiedliche Thrombin-Rezeptor-Interaktionen abgeleitet werden.

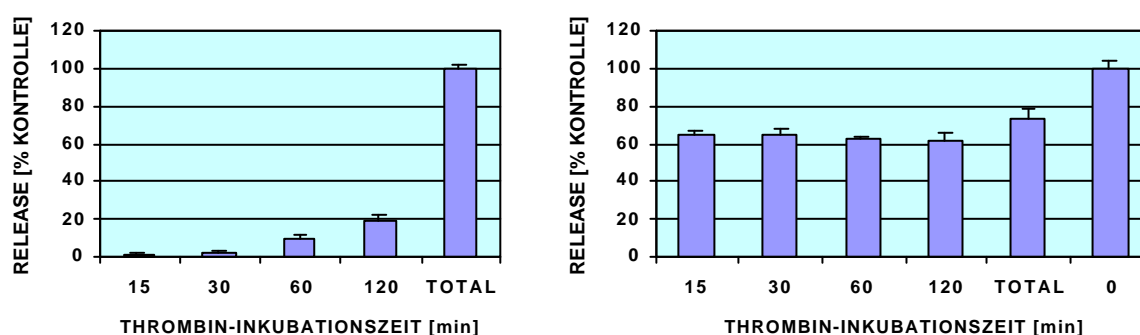


Abb. 4: Zeitabhängigkeit der Thrombin-induzierten KC-Freisetzung (links) bzw. der Thrombin-vermittelten Inhibition der LPS-evozierten KC-Freisetzung aus Mikroglia (rechts). In beiden Fällen wurden Kulturen für verschiedene Zeiten (15 bis 120 min) mit Thrombin (10 U/ml) behandelt, danach das Thrombin wieder entfernt. Nach einer totalen Inkubationszeit von 16 h wurden die freigesetzten KC-Mengen im Überstand bestimmt. Die maximale Release-Induktion wurde mit kontinuierlicher Thrombin-Gegenwart gemessen (*TOTAL*, links). Für die Ermittlung des inhibitorischen Effekts auf die LPS-evozierte Freisetzung (rechts) war LPS (100 ng/ml) als Primärstimulus über die gesamte Zeit anwesend. Die maximale Inhibition wurde in Kulturen bestimmt, denen Thrombin über die gesamte Inkubationszeit zugesetzt war (*TOTAL*, rechts). Als Kontrolle dienten in diesem Fall Zellen, die lediglich mit LPS, also

ohne Thrombin, stimuliert worden waren (0, rechts). Angaben in Mittelwerten aus drei (n=36, links) bzw. zwei Experimenten (n=24, rechts).

Generelle Vorarbeiten zu Proteasen

Es soll erwähnt werden, dass aus früheren Arbeiten zum Trypsin speziellere Kenntnisse für die Charakterisierung von Proteaseeigenschaften vorliegen. Trypsin und Thrombin sind verwandte Serinproteasen. Dabei werden bestimmte PARs (PAR2) auch von Trypsin aktiviert.

Eigene Publikationen aus bzw. zu den Vorarbeiten

Originalarbeiten:

- Angstwurm K, Freyer D, Dirnagl U, Hanisch UK, Schumann R, Einhäupl KM, Weber JR (1998) Tumor necrosis factor α induces only minor inflammatory changes in the CNS, but augments experimental meningitis. *Neuroscience* 86: 627-634.
- Draheim H, Prinz M, Weber JR, Weiser T, Kettenmann H, Hanisch UK (1999) Induction of K⁺ channels in mouse brain microglia: Cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* 89: 1379-1390.
- Hanisch UK, Lyons S, Prinz M, Nolte C, Weber J, Kettenmann H, 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.
- Mertsch K, Hanisch UK, Kettenmann H, Schnitzer J, Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system. *J Comp Neurol* (im Druck).
- Möller T, Hanisch UK, Ransom BR (2000) Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 75: 1539-1547.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke C, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H (2000) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33: 72-86.
- Prinz M, Hanisch UK, Kettenmann H, Kirchhoff F (1998) Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5. *Mol Brain Res* 63: 155-162.
- Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK (1999) Microglial activation by components of Gram-positive and -negative bacteria: Distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 1078-1089.
- Prinz M, Hanisch UK (1999) Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem* 72: 2215-2218.
- Prinz M, Häusler KG, Kettenmann H, Hanisch UK, β -Adrenergic receptor stimulation selectively inhibits IL-12 release in microglia. *Brain Res* (im Druck).
- Stohwasser R, Giesebrecht J, Kraft R, Kettenmann H, Hanisch UK, Kloetzel PM (2000) Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: Induction of immunoproteasomes by interferon- γ and lipopolysaccharide. *Glia* 29: 355-365.

Frühere Arbeiten mit direktem Bezug zum vorgelegten Projekt und seinen Proteaseaspekten:

- Hanisch UK, Könnecke A, Schellenberger V, Jakubke HD (1987) Characterization of the S' subsite specificity of trypsin. *Biocatalysis* 1: 129-136. (jetzt *Biocatal Biotransform*)
- Schellenberger V, Hanisch UK, Könnecke A, Jakubke HD (1987) Attempts of quantifying the S' subsite specificity of serine proteases. In: *Peptides and Proteases: Recent Advances* (Schowen RL, Barth A, eds), *Advances in Biosciences* Vol. 65, Pergamon Oxford, 159-166.

Übersichten/Buchbeiträge:

- Hanisch UK (2001) Effects of interleukin-2 and interferons on the nervous system. In: *Psychoneuroimmunology*, 3^d edition (Ader R, Felten DL & Cohen N, eds), Academic Press, San Diego, 585-631.

Hanisch UK, Microglia as a source and target of cytokine activities in the brain. In: Microglia in the degenerating and regenerating CNS (Streit WJ, ed), Springer Verlag New York (im Druck).

Patent:

Hanisch UK, Prinz M, Weber JR, Kettenmann H, Verwendung von Proteinkinasehemmern, insbesondere in pharmazeutischen Mitteln gegen Meningitis. Deutsches Patent- und Markenamt, München, DE 197 45 485 A1, April 22, 1999.

In Vorbereitung oder eingereicht sind:

Hanisch UK, Prinz M, Angstwurm K, Weber JR, Kettenmann H, The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine release activation by pneumococcal cell walls (in Revision).

Hanisch UK, Prinz M, Weber JR, Kettenmann H, Interleukin-12 production by activated microglia: Comparing the induction potential of bacterial cell wall components (in Vorbereitung).

Häusler KG, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK, Interferon- γ differentially modulates the pattern of evoked cytokine and chemokine production in glial cell types and macrophages (in Vorbereitung).

Kann O, Ohlemeyer C, Schumann RR, Weber JR, Kettenmann H, Hanisch UK, Suppression of C5a-induced calcium signaling in activated microglia (in Vorbereitung).

Nolte C, Freyer D, Prinz M, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK, Pneumococcal cell walls trigger the release of TNF α and nitric oxide from cultured rat microglia by membrane contact rather than uptake (in Vorbereitung).

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1. Ziele

Hauptziel des Projektes ist die Charakterisierung mikroglialer Effekte des Thrombins. Neben den schon vermuteten Wirkungen auf neuronale und astrozytäre Zellen sowie lösliche Substrate würde sich damit für Thrombin über die zentrale Stellung der Mikroglia als Sensor und Effektor pathologischer Ereignisse in verschiedensten Situationen eine weitere Einflussnahme auf das ZNS ergeben. Als unmittelbares Signal einer Blut-Hirn-Schranken-Störung oder Gewebeerletzung könnte die Serinprotease eine aktivierende Wirkung für diese Zellen entfalten. Dabei könnte Thrombin einerseits aus dem Serum in das ZNS-Gewebe übertreten, andererseits aus seiner schon endogen vorliegenden Vorstufe (Zymogen) freigesetzt werden. Im Zusammenspiel mit weiteren Mikroglia-Aktivatoren könnte Thrombin auch zelluläre Reaktionen modulieren.

Dieses Hauptziel wird dabei in folgende Fragestellungen und im Arbeitsprogramm in vorgesehene experimentelle Studien unterteilt:

- Welches Wirkungsspektrum besitzt Thrombin für die Eigenschaften der Mikroglia?
- Wie allgemeingültig sind die darstellbaren mikroglialen Thrombin-Wirkungen?
- Welche Eigenschaften des Thrombins vermitteln welche Effekte?
- Welche PAR-Typen werden von Mikroglia exprimiert?
- Ist Thrombin Protease und Ligand?
- Lassen sich die zellulären Thrombin-Mechanismen weiter auftrennen?
- Wie interferiert Thrombin mit anderen mikroglialen Aktivierungssignalen?
- Welche intrazellulären Konsequenzen hat Thrombin in der Mikroglia?
- Auf welcher Stufe greift Thrombin in die Freisetzungsmodulation ein?

- Ist Thrombin auch im Gewebe nicht-proteolytisch wirksam?

3.5.2. Methoden

Zellen und Gewebe

Arbeiten *in vitro* nutzen die in unserem Labor am MDC routinemäßig hergestellten und standardisierten Mikroglia-Primärkulturen von Mäusen der Entwicklungsstufe P0. Dazu werden die Zellen auf Deckgläsern angesiedelt (50000 Zellen pro Glas) oder in 96-Well-Platten bzw. Petrischalen ausgebracht (10000 Zellen pro well bzw. 3 bis 6 x 10⁶ Zellen pro Schale). Für vergleichende Untersuchungen werden entsprechende Mikroglia-Präparationen der Ratte berücksichtigt.

Wir sind 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 entsprechende Agenzien bedürfen und zugänglich sind.

Als Modellschubstanz zur Aktivierung von Mikroglia in Kultur wird kommerziell erhältliches LPS (*E. coli*) verwendet. Für die ausgewählten Vergleichsstudien zur kontextabhängigen Thrombin-Wirkung werden gereinigte, nichtinfektiöse Zellwand-Präparationen (PCW) von *Streptococcus pneumoniae* (Stamm PnR-527, Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Jörg Weber bzw. Dr. Ralf Schumann, Humboldt-Universität Berlin) bzw. kommerziell erhältliche rekombinante Maus-Zytokine (wie IFN γ) verwendet.

Hirnhomogenate für molekulare Nachweise bzw. entsprechende Gewebeschnitte werden von perfundierten (blutfreien) bzw. perfusionsfixierten Tieren präpariert. Auf die Verwendung mikroglialer Zell-Linien (z.B. BV-2) wird verzichtet. Obwohl der Einsatz von Linien zu wesentlich größeren Zellzahlen führt und damit größere Protein- und mRNA-Mengen für biochemische Arbeiten bereit stellt, haben wir in der Vergangenheit abweichende Eigenschaften solcher Zellen beobachten müssen.

Arbeiten, die gleichzeitig (bestätigend) oder jeweils vorrangig von Kooperationspartnern (z.B. Prof. Dr. Thomas Möller, Seattle) ausgeführt werden, unterliegen einer Normierung der Protokolle. Im Einzelfall wird Material von Kulturüberständen oder Zellaufschlüssen beider Seiten in einem Labor weiter analysiert. In anderen Fällen werden die gleichen Schlüsselexperimente parallel unter Verwendung gleicher Substanzen (Proteine, Primer, Inhibitoren) in den jeweiligen Zellmodellen ausgeführt. Dieses Verfahren hat sich schon bewährt. Dem Kooperationspartner in den USA steht auch im begrenzten Umfang humane Mikroglia zur Verfügung, um dort Schlüsselbefunde zu bestätigen.

Für Arbeiten an organotypischen Kulturen der Retina stehen etablierte Modelle im Labor am MDC zur Verfügung. Nach publizierter Entwicklung eines solchen Modells für die Ratte sind inzwischen die Voraussetzungen für den Einsatz der Maus-Retina geschaffen. Dabei kann das mikrogliale Verhalten morphologisch bzw. die basale und stimulierbare Gewebeproduktion verschiedener Freisetzungserzeugnisse als mehr funktionelle Reaktion über entsprechende Methoden verfolgt werden. Ein Modell zur Hirnschnittkultivierung wird mit Unterstützung des Labors von Prof. Dr. Robert Nitsch (Humboldt-Universität zu Berlin) gerade aufgebaut.

Motilität, Phagozytose und Toxizität

Als mikrogliale Reaktionen auf Stimulation können in unserem Labor am MDC Motilität und phagozytotische Aktivität gemessen werden. Veränderungen im Motilitäts- und Phagozytoseverhalten der Mikroglia wurden dabei in der Vergangenheit über computergestützte Videomikroskopie gemessen bzw. über mikroskopische Endbestimmung nach Inkubation der Zellen mit gefärbten Partikeln ermittelt (Dr. Christiane Nolte). Zur Messung von NO-Freisetzung durch Mikroglia wird routinemäßig die Nitritbestimmung nach Griess eingesetzt. Der Nachweis toxischer Mikroglia-Produkte soll in Überstandstransferexperimenten unter Einsatz neuronaler Zellkulturen vorgenommen werden. Modellkulturen dieser Art stehen im Labor zur Verfügung. Die Auswirkung auf die Zellvitalität wird durch Messung metabolischer Aktivität in WST-1-Tests bzw. über alternative Färbung lebender und abgestorbener Zellen in kommerziellen Testsystemen ermittelt.

Thrombin, Thrombin-Varianten und Modulatoren der Thrombin-Aktivität und -Wirkung

Als Standard kommt kommerziell erhältliches Thrombin zum Einsatz. Präparationen aus Rinder-, Maus-, Ratten- und humanem Plasma sind in verschiedenen Formulierungen erhältlich und stehen vergleichenden Untersuchungen zur Verfügung. Daneben haben wir Zugang zu Thrombin-Varianten mit fehlendem *exo-anion binding site* (γ -Thrombin) bzw. inaktivem katalytischen Zentrum. Außerdem haben wir in den Vorarbeiten durch partielle Inaktivierung ein nicht-proteolytisches Thrombin erhalten, das in den Freisetzungstudien zwar noch das Phänomen ‚Inhibition‘, aber nicht mehr die Induktion zeigt. Biotinyliertes Thrombin, das ebenfalls für verschiedene biochemische und physiologische Experimente zum Einsatz kommen soll, ist in kleinen Mengen kommerziell erhältlich. Vorgesehen ist jedoch, über ein Biotinylierungsagenz ein Thrombin-Derivat selbst herzustellen. Biotinylierungen wurden in der Vergangenheit für Antikörper und andere Proteine ausgeführt. Zunächst muss dabei die biologische Wirksamkeit des Derivats bestätigt werden. Gegebenenfalls müssen die Biotinylierungsbedingungen entsprechend geändert werden. Analog dazu wird ein Fluoreszenz-Derivat hergestellt, das für Bindungs- und Internalisationsexperimente eingesetzt werden soll. Auch für diese Derivatisierung bestehen praktische Erfahrungen. Allgemeine Erfahrungen mit Proteasen und Proteaseaktivitäten liegen aus früheren Arbeiten zum Trypsin, einer Thrombin-verwandten Protease, vor.

Für die Inhibition der Proteaseaktivität des Thrombins stehen spezifische Inhibitoren kommerziell zur Verfügung. Zwei wurden inzwischen schon für unterschiedliche Thrombin-Experimente eingesetzt. Deren Anwendung soll aber systematisch und auf noch nicht untersuchte mikrogliale Konsequenzen ausgeweitet werden. Die Annahme nicht-proteolytischer zellulärer Effekte erfordert, den Ausschluss enzymatischer Aktivität klar nachzuweisen. Andererseits kann aber die Bindung eines Inhibitors Veränderungen im Thrombin-Molekül erzeugen, die sich indirekt auf nicht-proteolytische Effekte auswirken. Aus der Kombination verschiedener Inhibitoren und dem Einsatz nicht-enzymatischer Thrombin-Varianten soll die ‚alternative‘ Wirkung des Thrombins als Invariante hervorgehen. Die Messung der enzymatischen Aktivität des Thrombins wird über ein chromogenes Substrat vorgenommen.

Die Beteiligung von ausgewählten intrazellulären Signalwegen (z.B. von Komponenten der ERK/MAPK-Kaskaden) an der Mikroglia-Aktivierung bzw. Induktion mikroglialer Reaktionen (wie Zyto- und Chemokin-Freisetzung) wird mittels pharmakologischer Intervention charakterisiert. Dafür steht insbesondere eine Palette potenter niedermolekularer und membranpermeabler Inhibitoren zur Verfügung. Ziel ist dabei vorrangig, die Auswirkung einer entsprechenden Blockade vergleichend zu betrachten. Der direkte Nachweis einer Rekrutierung von (z.B.) Kinasen erfolgt über den molekularen Nachweis ihrer Phosphorylierung, wie nachfolgend beschrieben.

Protein- und mRNA-Analysen

Release-Messungen stellen ein wichtiges und quantifizierbares Reportersystem (*readout*) für die zu untersuchenden Thrombin-Effekte dar. Gerade die ungewöhnlichen, nicht-enzymatisch vermittelten Wirkungen wurden für Zyto- und Chemokin-Freisetzungen beobachtet. Zytokin- und Chemokin-Freisetzungen werden routinemäßig in Zellüberstandsprouben bestimmt, die zu definierten Zeitpunkten während oder nach einer Stimulation bzw. Behandlung der Zellen mit Thrombin, LPS, PCW oder Zytokinen entnommen werden. Zytokininduktionen werden außerdem in Lysaten von Mikroglia-Zellen gemessen. Zytokin-Bestimmungen in Zellüberständen und Lysaten werden unter Verwendung von hochsensitiven ELISA-Systemen mit Mauszytokinen als Standard vorgenommen. Für die Bestimmung der hauptsächlich interessierenden Reporterfaktoren (TNF α , IL-6, IL-12, KC bzw. MIP1 α) stehen ELISA-fähige Antikörperpaare und Standards, für zusätzlich zu testende Faktoren kommerzielle Kits zur Verfügung. Gesamtzellproteine werden zur Ermittlung von normierten Release-Aktivitäten über die BCA-Proteinbestimmung gemessen.

Für den Nachweis in Western-Blot-Verfahren (intrazellulär vorliegende Zytokine, wie TNF α , oder Kinasen, wie p42/p44^{MAPK} oder p38) werden diese aus Zell-Lysaten stimulierter oder unstimulierter Kulturen (gegebenenfalls auch aus Überständen, z.B. für Kontrollen) erhaltenen Proteine direkt oder nach Immun- bzw. Kopräzipitation über SDS-PAGE aufgetrennt und über Antikörper-vermittelte Detektion und hochsensitive ECL dargestellt. Diese Techniken finden ebenfalls routinemäßige Anwendung in unseren Labors. Proteinphosphorylierungen können unter Verwendung von Antikörpern gegen PTyr, PSer oder PThr nachgewiesen werden. Vorzugsweise stehen Antikörper zur Verfügung, die auch doppelt phosphorylierte Kinasesequenzen erkennen. Obwohl bei Primärkulturpräparationen nur relativ geringe Zellzahlen und damit Proteinmengen anfallen, wird auf den Einsatz mikroglialer Linien bewusst

verzichtet, da in der Vergangenheit auch deutliche Abweichungen im physiologischen Verhalten beobachtet wurden.

RNA wird über RT-PCR-Techniken nachgewiesen. Neben dem Einsatz von einzelnen Primerpaaren (z.B. für PAR-Nachweise) werden kommerzielle Testsysteme eingesetzt, die multiple Transkripte (z.B. für mehrere Zytokine) gleichzeitig erfassen. Zur Quantifizierung der TNF α -mRNA in den Inhibitionsstudien wird ebenfalls ein kommerzielles System für die Maus-Sequenz verwendet.

Immunzytochemie und Mikroskopie

Die aktivierungsabhängige Expressionen von Zelloberflächenantigenen sowie Darstellungen der Mikroglia selbst werden über immunzytochemische Verfahren bzw. Lektinfärbung nach Fixierung der Zellen vorgenommen. Die benötigten Verfahren sind als Standardtechniken im Labor etabliert. 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 der Komplementrezeptor 3 und das MHC-II-Antigen berücksichtigt. Entsprechende Färbungen erfolgen mit Primärantikörpern, die anschließend mittels fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper visualisiert werden. Für Nachweise bestimmter PAR-Proteine werden zur Zeit schon Antikörper-Präparationen getestet, die über Kooperation erhältlich sind. Außerdem wird über diesen Weg gerade ein erster Antikörper über Peptidantigen entwickelt. Im Labor am MDC besteht Zugang zu mehreren, auch konfokalen Mikroskopen. Ein konfokales Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskop wäre dabei für die Untersuchungen zur Aufnahme von Thrombin (-Derivaten) durch lebende Zellen bzw. für die immunzytochemischen Arbeiten am Gewebe nach Dreifachmarkierung besonders geeignet. Ein solches Gerät steht innerhalb des SFB zur Verfügung (Projekt Z2).

Tierversuche

Zunächst sind für das Projekt selbst keine Tierversuche vorgesehen. Zu einem späteren Zeitpunkt sind Übertragungen der erhaltenen Ergebnisse in entsprechende *in vivo*-Ansätze sicher notwendig. Diese Teile würden dann zunächst von Kooperationspartnern getragen (University of Washington, Seattle). Eine danach evtl. beabsichtigte Aufnahme einzelner solcher Arbeiten in das Arbeitsprogramm des Projektes würde dann rechtzeitig beantragt.

3.5.3. Arbeitsplan

- **Welches Wirkungsspektrum besitzt Thrombin für die Mikroglia?** Welche Wirkungen entfaltet Thrombin auf die für mikrogliale Aktivierung typischen zellulären Veränderungen? Neben den bisher in den Vorarbeiten beschriebenen Einflüssen auf die Proliferation und die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und NO, sollen die Wirkungen auf Motilität, phagozytotische Aktivität, das zytotoxische Potential und die Expression bestimmter Oberflächenantigene charakterisiert werden. Die Erfassung dieser verschiedenen potentiellen Einflüsse soll anzeigen, ob Thrombin in ähnlicher oder anderer Weise wie bisher untersuchte Aktivatoren wirkt. Als molekulare Modellagenzien dienen dabei meist bakterielle Zellwandbestandteile, wie LPS. Beim Thrombin handelt es sich um ein endogenes Protein, das bei Störungen der Blut-Hirn-Schranke oder Gewebeschädigungen (unterschiedlichster Ursache) Zugang zur Mikroglia haben könnte. Neben anderen in solchen Situationen freigesetzten Faktoren wäre diese Serinprotease ein vorstellbar relevantes Signal, auch in nicht-infektiösen Pathologien. Thrombin wird daher mikroglialen Kulturen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Anschließend werden die zellulären Antworten oder veränderten zellulären Reaktionen (Release von Zytokinen, Chemokinen, NO oder toxischer Produkte, Motilität, Phagozytose, Expression von Oberflächenmolekülen) in geeigneter Weise dargestellt bzw. quantifiziert (siehe Abschnitt 3.5.2). Diese Effekte werden dabei für verschiedene native und manipulierte Thrombin-Präparationen verglichen bzw. in Gegenwart oder Abwesenheit von Inhibitoren oder (weiteren) mikroglialen Stimulatoren untersucht. Dieses Arbeitsschema gilt auch für die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte.
- **Wie allgemeingültig sind die darstellbaren mikroglialen Thrombin-Wirkungen?** Wie spezieübergreifend sind die mikroglialen Effekte? Wir konnten bisher mit Rinder-Thrombin als

Standard quantitativ reproduzierbar Effekte in Maus- und Ratten-Mikroglia beobachten bzw. mit Maus-Thrombin entsprechende Reaktionen in Maus-Mikroglia auslösen. Die zelluläre Wirksamkeit soll jedoch an ausgewählten (quantifizierbaren) Reaktionen systematischer belegt werden, um insbesondere Relevanz für das humane System zu zeigen. Dazu wird Thrombin unterschiedlicher Präparationen aus dem Plasma verschiedener Spezies verglichen. Insbesondere die Effekt innerhalb des Maus-, Ratten- und soweit zugänglich humanen Systems sollen die Allgemeingültigkeit der Aussagen stützen. Dafür werden mikrogliale Kulturen unterschiedlicher Spezies mit Thrombin unterschiedlicher Spezies behandelt. Eine Abhängigkeit mikroglialer Reaktionen von der Darbietungsform soll ebenfalls untersucht werden. So soll insbesondere geprüft werden, ob das Zymogen Prothrombin schon selbst bestimmte Wirkung zeigt, oder erst nach Umsetzung in aktives Thrombin. Dafür werden Mikroglia-Kulturen mit Thrombin, Prothrombin oder Prothrombin in Kombination mit aktiviertem Faktor X behandelt. Anschließend werden die jeweils erhaltenen Reaktionen verglichen.

- Welche Eigenschaften des Thrombins vermitteln welche Effekte?** Die bisher vorliegenden sowie vorläufigen Ergebnisse lassen einerseits eine proteolytische Rezeptoraktivierung erkennen, deuten aber andererseits auf zusätzliche Mechanismen hin, die keiner enzymatischen Aktivität bedürfen. Solch eine nicht-enzymatische ‚Aktivität‘ der Serinprotease hätte potentiell weitere zelluläre Konsequenzen nach einer proteolytischen Wirkphase. Die scheinbare Unabhängigkeit betreffender Mikroglia-Reaktionen von der Proteasenatur des Thrombins soll über mehrere unabhängige Ansätze unterlegt werden. Für die verschiedenen zellulären Konsequenzen wird daher eine jeweilige Beteiligung proteolytischer und nicht-proteolytischer Mechanismen untersucht. Experimentell wird dies durch Behandlung der Mikroglia mit Thrombin in Abwesenheit oder Gegenwart (einschließlich Thrombin-Vorbehandlung) von Inhibitoren erreicht, die die enzymatische Aktivität ausschalten. Die direkte Prüfung (Bestätigung) der tatsächlichen Hemmung (Wirkung des Inhibitors) wird über Messungen der proteolytischen Aktivität unter Verwendung eines chromogenen Substrats vorgenommen, bevor die zellulären Reaktionen untersucht werden. Außerdem stehen uns Thrombin-Varianten zur Verfügung, die ein gestörtes katalytisches (aktives) Zentrum bzw. veränderte Moleküldomänen besitzen. Zusätzlich haben wir in den Vorarbeiten eine Modifizierungsmethode erhalten, die bei Freisetzungsexperimenten selektiv die induktive Kapazität des Thrombins eliminiert, ohne die modulierende (inhibitorische) Komponente zu beeinflussen. Denaturiertes Thrombin wird für Kontrollen eingesetzt. Zusätzlich soll auch ausgeschlossen werden, dass Thrombin dennoch indirekt Faktoren aktiviert. Nachweisbar noch wirksames bzw. gezielt inaktiviertes Biotin-Thrombin wird dafür zunächst zur Behandlung von Mikroglia eingesetzt und danach über partikuläre Träger (Sepharose-Streptavidin) wieder aus den Überständen entfernt. Anschließend werden diese Überstände auf naive Zellen aufgebracht und deren Reaktionen bestimmt. Wir berücksichtigen auch einen Biotinylierungsansatz für Prothrombin, aus dem dann Thrombin durch Faktor X freigesetzt wird. Quantifizierbare Zellreaktionen, wie die Freisetzung von Zytokinen, sind bei diesen Studien die wichtigsten Reporter. Die jeweilige Konsequenz der abgestuft vornehmbaren Thrombin-Modifizierungen bzw. -Inhibierungen soll aber für weitere mikrogliale Parameter zumindest in einem Überblick erfasst werden.
- Welche PAR-Typen werden von Mikroglia exprimiert?** Ein struktureller Nachweis der bislang bekannten und relevanten PARs (PAR1, PAR3 und PAR4) in Mikroglia soll über RT-PCR bzw. über Antikörper erfolgen. Primer stehen dafür zur Verfügung, in einigen Fällen auch Antikörper. Einsatz verschiedener Primer-Kombinationen soll einerseits die Nachweissicherheit erhöhen. Andererseits könnten dabei auch evtl. ungewöhnliche Molekülformen (Amplifizierungsprodukte) erfasst werden. In Kooperation mit dem Partner in Seattle wird über Peptidantigen zur Zeit an der Herstellung weiterer Antikörper gearbeitet. Funktionell sind Effekte, die einer PAR1/4-Beteiligung unterliegen, auch durch die Wirkung synthetischer Agonisten zu prüfen. Dabei handelt es sich um die Sequenzen der Autoligandstrukturen der PARs. Dies ist teilweise schon für PAR1 und PAR4 in Vorarbeiten untersucht worden, soll aber systematischer und auf die verschiedenen mikroglialen Reaktionen ausgeweitet werden. Für PAR3 soll bei Nachweis mikroglialer Expression und bei Ausschluss von PAR1/4-Beteiligung geprüft werden, ob Thrombin evtl. über nicht-proteolytische Interaktion zelluläre Effekte vermitteln kann. Dazu soll PAR-Andockung ausgegrenzt werden (z.B. über γ -Thrombin). Die Charakterisierung des PAR-Expressionsprofils der Mikroglia ist ein wesentlicher

Schritt für die weitere Untersuchung der Thrombin-Effekte, die über ‚ungewöhnliche‘ Mechanismen umgesetzt werden. Nur bei weitgehender Klarheit über das strukturelle Repertoire der Zellen für potentiell proteolytisch aktivierbare Rezeptoren bzw. bei Nachweis ihrer Nichtbeteiligung auf struktureller (mRNA, Protein) und funktioneller Ebene können die weiteren Arbeiten auf die Charakterisierung alternativer Mechanismen oder Rezeptoren orientieren.

- **Ist Thrombin Protease und Ligand?** Nicht-proteolytische Effekte mögen tatsächlich über spezifische Bindung des Thrombins vermittelt werden. Lassen sich Bindung und evtl. Internalisation des (enzymatisch inaktiven) Thrombins durch Mikroglia nachweisen? Welcher Kinetik unterliegt die Bindung und wie ist sie in den Kategorien Spezifität und Affinität zu fassen? Lassen sich über geeignete Versuchsanordnungen Membranmoleküle mit Thrombin-Bindungseigenschaft nachweisen? Nachweis einer Bindung soll über Biotin-Thrombin (oder fluoreszenz-markiertes Thrombin) erzielt werden. Dazu werden Zellen mit entsprechenden Derivaten inkubiert, anschließend chemisch fixiert und mikroskopisch untersucht. Konfokale Mikroskopie erlaubt dabei auch Abschätzungen einer zellulären Aufnahme. Nach Erhalt solcher Hinweise ist vorgesehen, die Aufnahme eines entsprechenden fluoreszenten Thrombin-Derivats an lebenden Zellen zu verfolgen. Besonders geeignet wäre dafür der Einsatz eines konfokalen Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskops, wie es im SFB-Projekt Z2 bereit steht. Cytochalasin B kann die Aufnahme blockieren bzw. über dabei erhaltene Messungen zur mikroglialen Reaktion (Freisetzungsaktivität) Anhaltspunkte für den Beitrag eines transmembranen Signalgeschehens liefern. Konkurrenzexperimente mit nativem (unmarkierten) Thrombin, entsprechenden molekularen Varianten oder Kombinationen mit relevanten Blockern könnten Aufschlüsse zur Bindungseigenschaft geben. Thrombin-Varianten mit modifizierter Domänenstruktur oder Inhibitoren der PAR-Anlagerung, die uns beide vorliegen, sollen helfen, erste Eingrenzungen bzw. Ausgrenzungen von Molekülanteilen vorzunehmen. Dieser Projektabschnitt könnte in Abhängigkeit von den Ergebnissen zu weiterführenden Studien überleiten, für die dann (zu einem späteren Zeitpunkt) der Einsatz von einzelnen Thrombin-Sequenzabschnitten (z.B. als Fusionsproteine) zu berücksichtigen wäre. Biotin-Thrombin soll dabei auch schon jetzt als Fänger in Kopräzipitationen bzw. in Affinitätschromatografischen Verfahren Einsatz finden. Es wird versucht, dabei an Thrombin gebundene Moleküle anschließend elektrophoretisch aufzutrennen, nach Übertragung auf Trägermembranen zu biotinylieren und aus dem Differenzbild der ECL-Darstellung erste Rückschlüsse auf deren Existenz und molekulare Eigenschaften (Größe) zu gewinnen.
- **Lassen sich die zellulären Thrombin-Mechanismen weiter auftrennen?** Aus den Untersuchungen zur Steuerung mikroglialer Zyto- und Chemokin-Freisetzung wurden Hinweise auf zwei nicht-proteolytische Thrombin-Effekte abgeleitet. Neben der freisetzungsinduzierenden Wirkung wurde eine inhibierende Wirkung auf die LPS-evozierte Freisetzung beobachtet. Beide Effekte ließen sich kinetisch bzw. durch selektive Thrombin-Inaktivierung trennen. Deuten sich daraus zwei Mechanismen bzw. separate Thrombin-Interaktionen mit der Mikroglia an, die zusätzlich zur proteolytischen Aktivierung von Rezeptoren vorliegen könnten? In kinetischen Ansätzen soll diese Separation zunächst bestätigt werden. Dazu werden die Zellen mit Thrombin für unterschiedliche Perioden stimuliert und nach Entfernung des Thrombins die resultierenden zellulären Konsequenzen (Menge freigesetzter Faktoren) gemessen. Unterschiedliche Abhängigkeit der Effekte ‚Induktion und Modulation‘ von der Inkubationszeit wäre als Hinweis auf unterschiedliche Mechanismen zu werten. Dabei würden sich zumindest zwei vermuten lassen. Diese *kiss-and-run*-Kinetik wird dann für verschiedene Release-Produkte verglichen. Induktion und Inhibition sollten dabei jeweils gleichlaufende Abhängigkeiten zeigen, wenn (nur) zwei Mechanismen die Effekte auf die Freisetzung dieser Faktoren kontrollieren. Durch den vergleichenden Einsatz von Thrombin-Varianten bzw. Thrombin in Gegenwart von Inhibitoren sollen über die Auslösung zellulärer Reaktionen und intrazellulärer Konsequenzen weitere Aufschlüsse über das tatsächliche Vorliegen eines dualen nicht-proteolytischen Mechanismus erzielt werden. Dazu werden Zellen mit nativem und denaturiertem Thrombin, der selektiv ‚inhibitorischen‘ Variante oder mit Thrombin in Anwesenheit von Thrombin-Inhibitoren behandelt und die resultierenden Reaktionen (Intensitäten) bestimmt. Diese Serie wird einmal ohne und einmal mit dem zweiten mikroglialen Stimulus (LPS) ausgeführt. Außerdem wird für diese Kombinationen der Einfluss ausgewählter pharmakologischer Manipulationen intrazellulärer Signalelemente (z.B. durch den Zusatz von Proteinkinaseblockern) ermittelt. Aus den Ergebnissen sollte sich ableiten lassen, ob die verschiedenen zellulären Reaktionen

auf mehr als eine nicht-proteolytische Thrombin-Wirkung entfallen. Eine klare Dissoziation würde damit auch Rezeptorheterogenität vermuten lassen.

- Wie interferiert Thrombin mit anderen mikroglialen Aktivierungssignalen?** Über den inhibitorischen Effekt des Thrombins auf die LPS-evozierte Zyto- und Chemokin-Freisetzung wurde neben der induzierenden eine modulierende Wirkung registriert. Gilt dieses Prinzip nur für LPS-Stimulationen? Wie wirkt sich die Kombination eines anderen mikroglialen Stimulus mit Thrombin aus? Führt Thrombin in jedem Fall zu einer verminderten Netto-Freisetzungsaktivität oder wirkt sich seine Gegenwart in anderer Kombination synergistisch aus? Es wäre denkbar, dass sich der jeweilige Beitrag Thrombin-vermittelter Effekte situationsbedingt ergibt und Thrombin nicht als genereller ‚Inhibitor‘ schon aktivierter Mikroglia auftritt. Erste Hinweise haben wir auch dafür schon erhalten. Kostimulationsexperimente unter Verwendung anderer (bakterieller) Agenzien bzw. ausgewählter Zytokine (IFN γ) sollen daher die Kontextabhängigkeit prüfen. Dabei wird lediglich die Stärke der zellulären Antwort (vorzugsweise Release-Aktivität) für den betreffenden Stimulus in An- und Abwesenheit des Thrombins bestimmt. Wie in den Vorarbeiten zum LPS, werden sowohl für Thrombin, als auch für den betreffenden Stimulus Dosisabhängigkeiten geprüft. Diese dienen der Abschätzung des jeweiligen Einflusses auf den Nettoeffekt, der Erfassung evtl. biphasischer Phänomene und der Darstellung des Umschlagens der Nettowirkung bei gleichzeitigem Vorliegen gegenläufiger Effekte (Induktion/Inhibition). So lassen sich unter Berücksichtigung, dass der verbleibende Release unter Thrombin/LPS-Kostimulation im Prinzip auf der induzierenden Wirkung beider Substanzen beruhen kann, Inhibitionen der LPS-Komponente von bis zu über 90 % abschätzen. Für eine gegebene (mittlere) Thrombin-Dosis ist dabei der inhibitorische Effekt über weite Konzentrationsbereiche des Primärstimulus (LPS) relativ konstant und verliert sich nur bei sehr geringen Stimuluspiegeln. Dort geht die Wirkung des Thrombins in einen rein induzierenden Effekt über. Die Annahme, dass Thrombin als Inhibitor der LPS-induzierten Freisetzung auftritt und nicht umgekehrt, stützt sich bisher auf eine Reihe solcher quantitativer Untersuchungen, die hier für weitere Stimuli vorgesehen sind (reziproke Dosis-Wirkung-Beziehungen, Kinetik der induzierten Effekte in reziproken Vor- oder Kurzzeitstimulationen, Konsequenzen von Kostimulationen unter Verwendung einer rein inhibitorischen Thrombin-Form).
- Welche intrazellulären Konsequenzen hat Thrombin in der Mikroglia?** Für verschiedene Zelltypen sind in der Literatur bisher schon verschiedene (an PAR gekoppelte) Signalereignisse beschrieben. Für Mikroglia haben wir neben der transienten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ gewisse Besonderheiten der G-Protein-Beteiligung gezeigt. Erste Untersuchungen zur Thrombin-induzierbaren Auslösung intrazellulärer Signale in Mikroglia zeigen darüber hinaus die Rekrutierung verschiedener Proteinkinasen an. Dafür sprechen induzierbare Proteinphosphorylierungen, die wir inzwischen für einige Kinasen nachweisen konnten. So werden ERK/MAPK des Typs p38 und p42/44 nach Thrombin-Stimulation in aktivierungsrelevanter Form phosphoryliert. Für eine Erklärung des inhibitorischen Effekts auf die LPS-evozierte Zyto/Chemokin-Freisetzung sind jedoch insbesondere schon erste vorliegende Ergebnisse aus Proteinkinasehemmungen von Bedeutung. Diese lassen vermuten, dass es auf MAPK-Ebene zu Interferenzen im Thrombin- und LPS-Signalgeschehen kommen könnte. Außerdem vermuten wir, dass ein bestimmter Kinasetyp an einer Deaktivierung von ‚Rezeptoren‘ beteiligt ist, die in nicht-proteolytisch vermittelte mikrogliale Reaktionen auf Thrombin einbezogen sind. Die Rekrutierung ausgewählter Signalwege durch Thrombin und Thrombin-Varianten für (proteolytisch und nicht-proteolytisch auslösbare) Beispielreaktionen soll erste Einblicke in die zytosolische Übersetzung (intrazelluläre Interpretation) der einzelnen Wirkkomponenten des Thrombins geben. Neben den direkten Nachweisen aktivierter Komponenten (z.B. über Phosphorylierungsanalysen) sollen spezifische Hemmungen die Teilnahme von zytosolischen Faktoren anzeigen. Letzterer Ansatz hat den Vorteil, dass der Effekt auf die zelluläre Reaktion weitgehend quantifizierbar ist und dafür nur wenige Zellen benötigt werden. Dagegen stehen für die biochemischen Nachweise nur relativ geringe Zellproteinmengen zur Verfügung, da die Arbeiten auf der Basis von Primärkulturen erfolgen.
- Auf welcher Stufe greift Thrombin in die Freisetzungsmodulation ein?** Der Effekt des Thrombins, bei LPS/Thrombin-Kostimulation die Netto-Freisetzung von Zyto- und Chemokinen zu vermindern, kommt ersten Abschätzungen entsprechend durch eine Störung der LPS-evozierten

Release-Aktivierung zustande. Untersuchungen zum intrazellulären Angriffs(zeit)punkt der freisetzungsbegleitenden Thrombin-Wirkung lassen erkennen, dass der inhibitorische Effekt auf den LPS-evozierten Release noch relativ spät zum Tragen kommt. So führt Thrombin-Zugabe auch noch nach Stunden einer laufenden LPS-Stimulation zu einer effektiven Release-Verminderung. Da zu diesem Zeitpunkt durch LPS schon mRNA induziert ist, kann der inhibitorische Thrombin-Effekt kaum über eine Störung der mRNA-Bildung (Transkription) erfolgen. Um andererseits eine evtl. Blockade der eigentlichen Zyto- bzw. Chemokin-Freisetzung (Ausschleusung) auszuschließen, wurden in ersten Voruntersuchungen auch intrazelluläre Proteinmengen gemessen. Dabei wurden jedoch bisher keine offensichtlichen intrazellulären Akkumulationen beobachtet. Der Angriffspunkt der Inhibition sollte daher vorrangig im Bereich mRNA-Stabilität/Translation liegen. Da die bisher eingesetzten Techniken für den Nachweis intrazellulärer Zytokine evtl. falsch-negative Resultate geben könnten, soll diese Frage parallel über direktere molekulare Verfahren (Western-Blot) geklärt werden. Darüber hinaus sollen quantitative Messungen repräsentativer mRNA u.a. über die Zeit eingrenzen, ob sich die Thrombin-Wirkung auf der Ebene der Transkript(de)stabilisierung auswirkt. Wir erhoffen uns daraus letztlich präzisere Aussagen darüber, ob ‚inhibitorische‘ Thrombin-Wirkungen an der Translation, Posttranslation oder Proteinausschleusung angreifen. Bei den Untersuchungen zur verspäteten Thrombin-Zugabe bei laufender (LPS-)Stimulation spielt natürlich auch der Umstand eine Rolle, dass immer noch potentiell zwei gegenläufige Effekte zeitversetzt zur Wirkung kommen, die rasche Release-Inhibition und die langsamere Release-Induktion. Zur besseren Trennung sollen die geplanten Experimente daher mit nativen und partell inaktiviertem (‚inhibitorischen‘) Thrombin ausgeführt werden.

- **Ist Thrombin auch im Gewebe nicht-proteolytisch wirksam?** Die bisherigen Vorarbeiten und die bisher genannten Vorhaben basieren auf der mikroglialen Zellkultur. Eine Bestätigung der mikroglialen Wirksamkeit des Thrombins im Gewebe soll zunächst an Modellen organotypischer Kulturen erfolgen. Dazu sind Arbeiten sowohl an Retina-, als auch an Hirnschnittmodellen für den letzten Abschnitt des Arbeitsprogramms vorgesehen. In diesen Modellen können nicht nur mikrogliale Zellen, sondern auch weitere Zelltypen (Astrozyten) zur Gesamt-Reaktion (z.B. Release) beitragen. Andererseits werden in diesen Präparationen Bedingungen nachgestellt, die schon näher an der Situation *in vivo* sind. Es ist vorgesehen, die Wirkungen des Thrombins auf die Freisetzung bzw. Freisetzungsmodulation in ausgewählten Schlüsselexperimenten am Schnitt bzw. Gewebeexplantat zu prüfen. Insbesondere soll nachgewiesen werden, dass sich nicht-proteolytische Effekte tatsächlich innerhalb des komplexeren zellulären Kontext nieder schlagen. Dazu werden die organotypischen Kulturen, wie die Zellkulturen, mit Thrombin(varianten) in Abwesenheit und Gegenwart entsprechender Inhibitoren stimuliert und das resultierende Release-Profil im Überstand quantifiziert. Unter Nutzung des konfokalen Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskops (Projekt Z2) soll über immunzytochemische Dreifachfärbungen (Mikroglia, Astrozyten und ein jeweiliges Zytokin bzw. Chemokin) zusätzlich versucht werden, die zellulären Quellen für den Thrombin-induzierten Release zumindest an repräsentativen Faktoren fest zu machen. Dazu werden die Gewebe mit Thrombin(varianten) in Gegenwart von Monensin behandelt, um eine zelluläre Akkumulation des betreffenden (geeigneten) Zytokins oder Chemokins darstellen zu können. Daraus sollen Abschätzungen der mikroglialen und astrozytären Beiträge am jeweiligen Gesamtreleasepotential hervor gehen. Neben den Arbeiten mit Geweben in Kultur wäre für den letzten Abschnitt auch vorgesehen, durch Einsatz von Gewebeextrakten, angereicherten Gewebekomponenten oder von isolierten bzw. rekombinanten endogenen Proteaseinhibitoren Hinweise auf die Stabilität der zellulären Thrombinaktivitäten sowohl proteolytischer, als auch nicht-proteolytischer Natur zu erhalten. Damit soll über die Behandlung von Thrombin mit natürlichen, auch im Hirngewebe vorliegenden Inhibitoren eine immer noch nachweisbare Wirkung auf Mikroglia dargestellt werden. In Abhängigkeit von den aus laufenden Arbeiten erhaltenen Befunden wäre dann zu einem späteren Zeitpunkt auch eine Testung in geeigneten *in vivo*-Modellen denkbar und notwendig.

3.5.4. Zeitplan

Im ersten Teil werden die experimentellen Arbeiten ausgeführt, die für die Arbeitshypothesen und Grundannahmen stützenden bzw. spezifizierenden Charakter haben. Die Untersuchungen zur Allgemeingültigkeit der beobachteten Thrombin-Effekte auf Mikroglia zählen dazu. So werden zunächst die Studien mit verschiedenen Thrombin-Sequenzen in Zellen unterschiedlicher Spezies und zum Wirkungsspektrum generell vorgenommen. Danach wenden wir uns der Charakterisierung der proteolytischen und nicht-proteolytischen Wirkungskomponenten sowie intensiver der Darstellung von PARs in Mikroglia zu. Im Anschluß sollen die nicht-enzymatischen Effekte weiter untersucht bzw. aufgetrennt werden. Ansätze zum Nachweis evtl. alternativer Bindungsstrukturen fallen ebenfalls in diesen Zeitbereich. Arbeiten zum intrazellulären Signalgeschehen und zum Angriffspunkt inhibitorischer Thrombin-Effekte sind insbesondere für diesen zweiten Teil vorgesehen. Im letzten Abschnitt wollen wir die Arbeiten zur Kontextabhängigkeit in Kostimulationsexperimenten unter Verwendung weiterer Stimuli sowie unter Einsatz der organotypischen Kulturmodelle vornehmen.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Die Integration in den SFB ergibt sich natürlicherweise aus dem Anliegen, am Beispiel des Thrombins die Beiträge von Serinproteasen des Serums zu neuropathologischen Veränderungen zu charakterisieren. Neben mechanischen Gefäßverletzungen können Blut-Hirn-Schranken-Störungen als sekundäre Folgen unterschiedlichster pathologischer Prozesse auftreten. Das Projekt konzentriert sich dabei auf die Konsequenzen zellulärer Thrombin-Wirkungen für die Mikroglia, die als Zelltyp wesentlicher Sensor und Effektor neuropathologischer Ereignisse ist. Durch die Anstellung am MDC Berlin bestehen dabei intensive Interaktionen mit dem Projekt von **Prof. Helmut Kettenmann**. In der vergangenen Antragsperiode wurde auch intensiv mit dem Projekt von **Prof. Jörg Weber** zusammen gearbeitet. Diese erfolgreiche Kooperation soll in diesem Projekt weiter geführt werden, da Thrombin-Wirkungen bei Störungen der Blut-Hirn-Schranken-Integrität potentiell auch für die von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Pathologien von Bedeutung sind. Eine ähnliche Verzahnung der Interessen und teilweise Ergänzung der Methoden wird mit dem Projekt von **Prof. Ulrich Dirnagl** gesehen. **Prof. Robert Nitsch** wird Partner bei Fragen der Mikroglia-Aktivierung und bei der Etablierung und Optimierung organotypischer Modelle sein, wie schon in der Vergangenheit. Für die Untersuchungen an Gewebeschnitten (organotypischer Kulturen) ist für einen späteren Abschnitt des Arbeitsplans vorgesehen, morphologische Studien am Konfokalen Multiphotonen-Laser-Scanning-Mikroskop (**Projekt Z2**) auszuführen. **Außerhalb des SFB** besteht eine äußerst enge Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Möller (Seattle). Als Partner stellen wir uns nicht nur gegenseitig Materialien zur Verfügung, sondern bearbeiten an normierten Modellen gleichzeitig unterschiedliche Aspekte der Serinproteasefunktionen im ZNS.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
	BAT Va/b	1	67200	BAT Va/b	1	67200	BAT Va/b	1	67200	BAT Va/b	1	67200
	zus.:	1	67200	zus.:	1	67200	zus.:	1	67200	zus.:	1	67200
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	
				522	25000	522	25000	522	25000			
I				Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.				
				0		0		0				

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾ (einschl. Hilfskräfte)	Hanisch, Uwe-Karsten, PD Dr.	Biochemie/ Neurobiologie	MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	20	1998	
	Pavlovic, Sanja	Biochemie/ Neurobiologie	MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	2-5, B (phasisch)		
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾	Müller, Gerda		MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	8	1998	
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾²⁾ (einschl. Hilfskräfte)	—	—	—	—	—	—
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾	Fleischhauer, Silke		MDC Berlin Zelluläre Neurowissenschaften	40	1999	BAT Va/b

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit X gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

3.7.1.1. Dr. Uwe-Karsten Hanisch wird als Leiter des Projektes vorgesehen. Als Antragsteller ist er am MDC Berlin in der AG Zelluläre Neurowissenschaften angestellt. Frau **Sanja Pavlovic** ist Doktorandin im gleichen Labor. Sie besitzt Erfahrungen in molekularbiologischen Techniken und wird beratend tätig sein. Sie wird auch Arbeiten zur mRNA-Analytik ausführen (helfen) bzw. Untersuchungen an den (Gewebe)Kulturmodellen vornehmen.

3.7.1.2. Frau **Gerda Müller** wird, wie bisher, in diesem Projekt mit der Präparation von Zellkulturen betraut. Da Mikroglia-Kulturen wesentliche Grundlage des Projektes sind, wird sie als erfahrene Mitarbeiterin diesen wichtigen Teil des Projektes absichern.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

3.7.1.4. Frau **Silke Fleischhauer** ist seit 1999 Mitarbeiterin der AG Zelluläre Neurowissenschaften am MDC Berlin. Sie ist auch seit diesem Zeitpunkt als nichtwissenschaftliche Mitarbeiterin der Ergänzungsausstattung im SFB. Frau Fleischhauer ist eine sehr versierte und erfahrene technische Mitarbeiterin. Sie trägt nicht nur einen Großteil der analytischen Arbeiten (Protein-Elektrophoresen, Blot-Techniken, ELISA, Vitalitätsassays, immunzytochemische Färbungen), sondern führt auch selbständig experimentelle Arbeiten an Zellkulturen durch. Darüber hinaus verfügt sie über Computer- und Programmkenntnisse, die ihr eine Aufarbeitung und Darstellung von Daten ermöglichen.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	10000	10000	10000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	25000	25000	25000

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Die geplanten Arbeiten im Teilprojekt sind stark biochemisch bzw. molekular(biologisch) ausgerichtet. Sie beruhen zum überwiegenden Teil auf primären Zellkulturen, da von einer Verwendung von Zell-Linien abgesehen wird. Damit ergibt sich ein großer präparativer Aufwand für die Herstellung mikroglialer Kulturen, der mit einem entsprechenden Verbrauch von Zellkulturmaterial verbunden ist. Wie im Arbeitsprogramm dargelegt, sind Messungen der mikroglialen Zyto- und Chemokin-Produktion als quantifizierbare zelluläre Reaktionen in großem Umfang notwendig. Sie dienen als Reporter für die Konsequenzen der verschiedenen experimentellen Manipulationen. Die dafür einzusetzenden Assays sind zwar weitgehend im Labor als kostengünstige und optimierte Varianten auf der Grundlage zugekaufter Agenzien etabliert, werden aber in großer Menge benötigt. Der vorgesehene Einsatz von insbesondere ELISA-Kits, Antikörpern, Reagenzien für RNA- und Protein-Analytik sowie Zellkulturen erfordert daher einen Sachmittelbedarf von DM 22000 pro Jahr.

Ausgaben beschränken sich auf Verbrauchsmittel und Versuchstiere (522) und sind wie folgt untergliedert (Bedarf pro Jahr):

Proteine (Enzyme, Zytokine, Standards)	DM	3000
Antikörper (Proteinanalytik, einschließlich ELISA, Immunhistochemie)		6000
ELISA-Kits und Assay-Systeme (mRNA)		3000
Oligonukleotide		1000
Reagenzien für Immunhistochemie		1000
Reagenzien für Enzyminhibition und -aktivierung		2000
Reagenzien für Proteinanalytik		2000
Reagenzien für RNA-Analytik, einschließlich PCR		1000
Reagenzien für Zellkulturen		3000
Gesamt		22000
VERSUCHSTIERE (ZELLKULTUREN, GEWEBEKULTUREN)		3000

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

Es werden keine Investitionen beantragt..

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B11

3.1.1 Thema:

Die Rolle von Glia- und T-Zellen bei neuronaler Protektion und Reorganisation im ZNS – Untersuchungen im entorhinal-hippocampalen Modellsystem

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Anatomie, Zell- und Neurobiologie

3.1.3 Leiter/in:

Nitsch, Robert, 20.11.62

Institut für Anatomie, AG Zell- und Neurobiologie, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität Berlin, Universitätsklinikum Charité, 10098 Berlin

Telefon: 030-2802-3547

Telefax: 030-2802-1460

E-Mail: robert.nitsch@charite.de

Ist die Stelle des Leiters des Projektes befristet?

nein

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

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

Die Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche liegt vor.

Die genehmigung zur Durchführung von gentechnische Untersuchungen liegt vor.

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haus-Halts-Jahr	Personalkosten	Sächliche Verwaltungs-Ausgaben	Investition	gesamt
1995	42,8	15,0		57,8
1996	89,7	30,0		119,7
1997	89,7	30,0		119,7
1998	109,8	31,0		140,8
1999	128,4	32,0		160,4
2000	128,4	32,0		160,4
2001	128,4	32,0		160,4
Zwischensumme	449,6	112,0	55,5	617,1
2002	152,4	35,0		187,4
2003	152,4	35,0		187,4
2004	152,4	35,0		187,4

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Reorganisationsprozesse im ZNS nach traumatischer Schädigung verlaufen unter Beteiligung von Astrozyten und Mikrogliazellen ab, die degenerierendes Material phagozytieren und einwandernden T-Zellen Antigene präsentieren. Wir haben in der bisherigen Förderperiode *in vivo* und *in vitro* zeigen können, daß im Gefolge einer Schädigung des Tractus perforans, der als myelinisierter Fasertrakt den entorhinalen Cortex und den Hippocampus miteinander verbindet, astrozytäre und mikrogliale Proliferation, Phagozytose, Antigenpräsentation sowie eine spezifische Expression von costimulatorischen Molekülen zu einer nicht destruktiven Interaktion mit einwandernden T-Zellen führt. Untersuchungen am Nervus opticus sowie im Rückenmark *in vivo* haben gezeigt, daß Makrophagen und T-Zellen auch protektive Funktionen bei neuronalem Primärschaden übernehmen. Unter Einsatz von in unserem Labor etablierten axonalen Auswachsassays sowie der organotypischen Schnittkultur wollen wir nun die Mechanismen dieser protektiven Effekte von Gliazellen und T-Zellen im entorhinal-hippocampalen Modellsystem aufklären. Dabei soll geklärt werden, 1.) welche Mechanismen und Moleküle an der Reduktion des neuronalen Zellschadens durch T-Zellen beteiligt sind, 2.) welche Rolle autoantigenspezifischer T-Zellen bei Auswachs Vorgängen spielen, 3.) inwieweit solche Zellen bei axonalen Reorganisationsprozessen und der Neubildung von Synapsen beteiligt sind sowie 4.) ob eine Protektion von Dendriten nach partieller Deafferenzierung erzielt wird. Mit diesen Untersuchungen wollen wir dazu beitragen das protektive Potential von Gliazellen und T-Zellen in Abhängigkeit von ihrer spezifischen Interaktion sowie der T-Zell Antigenpezifität und Charakteristik bei traumatischer neuronaler Schädigung besser zu verstehen und therapeutisch nutzbar zu machen.

3.3 Stand der Forschung

Bei einer Verletzung des ZNS kommt es zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten. Diese Zellen sind in der Lage, eine Vielzahl von Zytokinen und anderen löslichen Wirkstoffen zu produzieren und mit infiltrierenden Lymphozyten in Wechselwirkung zu treten. Mikrogliazellen repräsentieren die lokalen Antigen präsentierenden Zellen des ZNS, die allerdings spezifische Unterschiede im Vergleich zu Makrophagen und dendritischen Zellen aufweisen (Shrikant and Benveniste 1996; Ma and Streilein 1999). Mikroglia kann zu Makrophagen-ähnlichen Zellen reifen und ist dann fähig proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- α), antiinflammatorische Zytokine (IL-10, TGF- β , Prostaglandin E2) sowie Leukozyten-attrahierende Chemokine zu exprimieren (Merrill and Benveniste 1996; Ransohoff 1997; Minghetti and Levi 1998). Die Hochregulation von MHC-II-Komplex und Adhäsions- sowie kostimulatorischer Moleküle (LFA-1, VLA-4, ICAM-1, CD40, CD80 und CD86) bei axonaler Schädigung legt nahe, daß Mikroglia zur weiteren Aktivierung von T Zellen *in situ* beitragen kann (Gerritse et al. 1996, Kreutzberg 1996, Hailer et al. 1997, Aloisi et al. 2000a; Aloisi et al. 2000b). Mikrogliazellen reagieren dabei vergleichbar mit Makrophagen der Peripherie und phagozytieren, prozessieren und präsentieren Proteinantigene und produzieren pro-inflammatorische Zytokine und Mediatoren wie IL-12, TNF, IL-1- β und NO (Coltman and Ide, 1996; Aloisi et al., 1999a). Sie sind in der Lage, antigenspezifische T-Zellen zu restimulieren, ihre Proliferation zu induzieren (Aloisi et al., 1999a) und neue Lymphozyten aus der Peripherie durch die Sekretion von Chemokinen zu rekrutieren (Hayashi et al., 1995). Nach mechanisch induzierten axonalen Läsionen im ZNS migrieren Mikrogliazellen in die Zonen anterograder Degeneration, proliferieren (Hailer et al., 1999) und phagozytieren degeneriertes Myelin (Bechmann and Nitsch 1997a; 1997b), welches sie über MHC-II Komplexe (Konno et al. 1989; Stoll et al. 1989; Popovich et al. 1997; Beyer et al., 2000; Bechmann et al. 2001) den einwandernden T Zellen präsentieren (Spinales Trauma: Popovich et al. 1997; Optikusquetschung: Hirschberg et al. 1998; entorhinale Läsion: Bechmann et al. 2001). Astrozyten hingegen sind in der Lage, die Aktivierung von Mikrogliazellen durch Freisetzung von TGF- β zu unterdrücken (Hailer et al., 1998).

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß Mikrogliazellen und Astrozyten gegenüber den T-Helferzell-Subtypen Th1 und Th2 und ihren Zytokinen unterschiedlich reagieren. Diese Subtypen unterscheiden sich in ihrem Zytokinmuster. Th1-Zellen produzieren IFN- γ , Lymphotoxin, TNF und IL-2, Th2-Zellen hingegen IL-4, IL-5 IL-10 und IL-13. In der MS und EAE gelten Th1-Zellen als pathogen, Th2- Zellen hingegen als protektiv. Während Mikrogliazellen IL-12 produzieren, welches den Hauptstimulus zur Th1-Differenzierung darstellt und Th2-Zellen unterdrückt, sind Astrozyten dazu nicht in der Lage, wodurch Th2-Zellen durch Astrozyten indirekt gefördert werden (Aloisi et al., 1999b).

Astrozyten hemmen hingegen die IL-12-Produktion durch Mikrogliazellen (Aloisi et al., 1997). Th1-Zellen können von Mikrogliazellen effektiver restimuliert werden als von Astrozyten, Th2-Zellen werden von Astrozyten besser restimuliert als von Mikrogliazellen (Aloisi et al., 1999a). Das Th1-Zytokin IFN- γ bewirkt eine Expression von MHC-II auf Mikrogliazellen und Astrozyten *in vitro*. Weiterhin induziert es die Expression der costimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 auf Mikrogliazellen, jedoch nicht auf Astrozyten (Aloisi et al., 1999b). Diese Moleküle machen eine Antigen-präsentierende Zelle erst effektiv, da sie nach der Interaktion von T-Zellrezeptor und MHC-II-Peptidkomplex das zweite Signal an die T-Zelle geben. Fehlt dieses zweite Signal nach erfolgtem erstem Signal, wird die T-Zelle anergisch. Es gibt jedoch auch Belege für eine direkte Förderung des neuroprotektiven Repertoires von Astrozyten durch Th2-Zellen bzw. deren Zytokine. Astrozyten sind die Hauptquelle für NGF, sie produzieren es nach Kontakt mit IL-4 und IL-10, während IFN- γ die IL-10 induzierte NGF-Produktion hemmt (Brodie, 1996). Weiterhin können Astrozyten das Auswachsen von Oligodendrozytenfortsätzen durch basic fibroblast growth factor (bFGF) und nicht identifizierte Oberflächenmoleküle fördern (Oh and Yong, 1996).

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 Assoziationcortices 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 Abschnitten 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 Drittel 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.

Entorhinale Deafferenzierung resultiert in einer 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. Experimentelle Daten konnten zeigen, daß Antikörper gegen NGF hippocampales "Sprouting" nach entorhinaler Läsion verhindern können (van der Zee et al., 1992). 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). Diese Veränderungen bleiben auf die Deafferenzierungszone in der mittleren und äußeren Molekularschicht beschränkt. Mikrogliazellen exprimieren TNF- α , wobei INF- γ als regulatives Molekül agiert (Jensen et al., 2000a). Die Mikrogliale Reaktion nach Läsion korreliert dabei mit der Dichte und dem Myelinisierungsgrad des Tractus perforans (Jensen et al., 1999). Oligodendrozyten zeigen in der Phase des axonalen sproutings eine Hochregulation der mRNA für MBP (Jensen et al., 2000b). T Zellen sind in der Lage, nach Läsion in die Deafferenzierungszone einzuwandern (Bechmann et al., 2001). 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). 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 (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).

Die Beteiligung von T-Zellen bei ZNS-Schädigungen wurde über lange Zeit allein als Ausdruck einer destruktiven autoimmunen Reaktion verstanden. Das humane T-Zellrepertoire ist allerdings auch normalerweise schon mit autoimmunen T-Zellen ausgestattet. In der letzten Zeit haben sich zunehmend Hinweise ergeben, die eine protektive Rolle von Makrophagen und T-Zellen nahelegen (zur Übersicht: Schwartz and Cohen, 2000). Autoimmune T-Zellen, die spezifisch für MBP sind, können verletzte Nervenzellen vor einem sekundären Fortschreiten der Primärschadens schützen (Moalem et al., 1999). Eine posttraumatische Ausbreitung des Schadens im Nervus opticus kann dabei durch den adoptiven transfer von autoimmunen MBP-spezifischen T-Zellen verhindert werden. Eine Immunisierung mit Copaxone-1 (Myelin-ähnliches Polypeptid Glatiramer, eingesetzt in der Therapie der MS als immunmodulatorische Substanz) und Adjuvans sowie der adoptive Transfer von Copaxone-1 spezifischen T-Zellen war in der Lage, das Fortschreiten einer sekundären Schädigung des Nervus opticus nach Quetschläsion zu verhindern (Kipnis et al., 2000). Es wurde gezeigt, daß T-Zellen neurotrophe Faktoren produzieren (Kerschensteiner et al., 1999). Inzwischen ist auch deutlich geworden, daß axonaler Schaden und seine Reparatur auch im Verlauf der MS Phänomene sind, die bei dem phasischen Verlauf der Erkrankung möglicherweise eine wichtige Rolle spielen (Trapp, 1998; Bitsch et al., 2000). Umgekehrt konnte gezeigt werden, daß neurotoxische Substanzen wie Glutamat inflammatorische Prozesse im Gehirn beeinflussen (Smith et al., 2000). Diese Befunde machen es denkbar, daß auch Remission im Verlauf neuroinflammatorischer Erkrankungen wie der MS oder der EAE Phänomene von gutartiger Immunität widerspiegeln (Hohlfeld et al., 2000).

Zitierte Literatur

- 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, Penna G, Cerase J, Menendez Iglesias B and Adorini L (1997) IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J. Immunol.* 159: 1604-1612.
- Aloisi F, Ria F, Columba CS, Hess H, Penna G and Adorini L (1999a) Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur. J. Immunol.* 29: 2705-2714
- Aloisi F, Penna G, Polazzi E, Minghetti L and Adorini L (1999b) CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *J. Immunol.* 162: 1384-1391.
- Aloisi F, Serafini B, Adorini L (2000a) Glia-T cell dialogue. *J-Neuroimmunol.*; 107(2): 111-7.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000b) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol-Today.* 21(3): 141-7.
- 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. 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.
- Bechmann I and Nitsch R (2001) Plasticity following lesion: Harm and help from the immune system. *Restorative Neurology*, in press
- Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R (2001) Presence of B-7.2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo. *The FASEB J.* in press
- Beyer M, Gimsa U, Eyüpoglu IY, Hailer NP, Nitsch R (2000) Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: upregulation of MHC Class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro. *Glia* 31:262-266
- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123: 1174-83.
- Braak H, Braak E (1993) Entorhinal-hippocampal interaction in Amnesic disorders. *Hippocampus* 3:239-241.

- Brodie C (1996) Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *FEBS Lett.* 394: 117-120.
- Coltman BW and Ide CF (1996) Temporal characterization of microglia, IL-1 beta-like immunoreactivity and astrocytes in the dentate gyrus of hippocampal organotypic slice cultures. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14: 707-719.
- 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.
- Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E (1996) CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 93(6): 2499-504.
- 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.
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R (1997) Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur. J. Neurosci.* 9: 863-866.
- Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S, Nitsch R (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus.* 1997; 7(3): 341-9.
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol.* 8: 459-474.
- Hailer, NP, Grampp A, Nitsch R (1999) Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative BrdU-labeling study. *European Journal of Neuroscience* 11: 3359-3364
- Hayashi M, Luo Y, Laning J, Strieter RM and Dorf ME (1995) Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells. *J. Neuroimmunol.* 60: 143-150.
- Hirschberg DL, Moalem G, He J, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1998) Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *J-Neuroimmunol.* 14; 89(1-2): 88-96.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. (2000) The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 24;107(2):161-6.
- 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.
- Jensen MB, Hegelund IV, Lomholt ND, Finsen B, Owens T (2000a) IFN γ enhances microglial reactions to hippocampal axonal degeneration. *J. Neurosci.* 15: 3612-21.
- Jensen MB, Hegelund IV, Poulsen FR, Owens T, Zimmer J, Finsen B (1999) Microglial reactivity correlates to the density and the myelination of the anterogradely degenerating axons and terminals following perforant path denervation of the mouse fascia dentata. *Neuroscience.* 3: 507-18.
- Jensen MB, Poulsen FR, Finsen B (2000b) Axonal sprouting regulates myelin basic protein gene expression in denervated mouse hippocampus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 221-35.
- 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.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 1999 Mar 1;189(5):865-70.

- Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M (2000) T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc.Natl.Acad.Sci.*20: 7446-51
- Konno H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Suzuki H, Saito T, Terunuma H (1989) Wallerian degeneration induces Ia-antigen expression in the rat brain. *J-Neuroimmunol.*; 25(2-3): 151-9.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.*;19(8):312-8. Review.
- Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F (1993) BDNF and trkB mRNA expression in the rat hippocampus following entorhinal cortex lesions. *Neuroreport* 2:191-194.
- Ma N, Streilein JW (1999) T cell immunity induced by allogeneic microglia in relation to neuronal retina transplantation. *J-Immunol.*; 162(8): 4482-9.
- Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends-Neurosci.*; 19(8): 331-8.
- Minghetti L, Levi G (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog-Neurobiol.*; 54(1): 99-125.
- Moalem G, Leibowitz AR, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5(1): 49-55
- Möller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A and Kettenmann H (1997) Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced [Ca²⁺]_i signaling in mouse microglia. *J. Neuroscience.* 17: 615-624
- 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.
- 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
- Nitsch R (1993) Transneuronal changes in lesion-induced entorhinal-hippocampal system, *Hippocampus*; 3: 247-56.
- Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U and Zipp F (2000) Human brain-cell death induced by tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 356:827-828.
- 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
- Oh LY and Yong VW (1996). Astrocytes promote process outgrowth by adult human oligodendrocytes in vitro through interaction between bFGF and astrocyte extracellular matrix. *Glia* 17: 237-253.
- Popovich PG, Wie P, Stokes BT (1997) Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J-Comp-Neurol.*; 377(3): 443-64.
- Ransohoff RM (1997) Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology. *J-Leukoc-Biol.*; 62(5): 645-52.
- Schwartz M, Cohen IR (2000) Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol. Today* 21(6): 265-8
- Shrikant P, Benveniste EN (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J-Immunol.*; 157(5): 1819-22.
- Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L (2000) Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat.Med.* 6: 62-66.
- 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.

- Stoll G, Trapp BD, Griffin JW (1989) Macrophage function during Wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J-Neurosci.* 1989 Jul; 9(7): 2327-35.
- 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.
- Trapp B, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 338: 278-285.
- 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.
- 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.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Im Rahmen des SFB 507 sind wir der Frage nachgegangen, welche immunologischen Konsequenzen mechanisch induzierte axonale Degeneration im ZNS hat. Dazu wurde das Modell der stereotaktischen entorhinalen Läsion (ECL) verwendet, das zum Studium reaktiver Synaptogenese und transneuronaler Veränderungen angewandt wurde. Es wurde zunächst untersucht, welche (glialen) Zellen degeneriertes Myelin nach solchen Läsionen phagozytieren. Zu diesem Zweck wurde eine Phagozytose-abhängiger Färbetechnik etabliert. Dieser Ansatz erlaubt die Beobachtung des Schicksals einzelner, vormalis phagozytoseaktiver Zellen zum Beispiel im Hinblick auf Migration, Veränderung der Zellmorphologie und des Expressionsmusters immunologisch relevanter Moleküle. Mit Hilfe dieser Technik zeigten wir, daß sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten an der Phagozytose degenerierter Axone nach ECL beteiligt sind (Bechmann and Nitsch 2000). In den ersten Tagen nach Läsion wanderten Mikrogliazellen in die Degenerationzone ein und zeigten dabei die typische Morphologie amoeboider Zellen. Diese Morphologie veränderte sich zugunsten der ramifizierten Form beginnend etwa 8 Tage nach ECL. Phagozytische Astrozyten konnten etwa ab dem dritten Tag nach Läsion identifiziert werden. Die Phagozytose von ZNS-Material führt zur Antigenpräsentation in einem MHC-II Kontext (Beyer et al., 2000). Phagozytische Mikroglia, aber nicht phagozytische Astrozyten exprimieren die zur Antigenpräsentation notwendigen Integrine VLA-4 und ICAM-1 sowie das kostimulatorische Adhäsionsmolekül LFA-1 (Bechmann and Nitsch, 2000).

Nach ECL wandern T Zellen in die Zonen anterograder und retrograder Degeneration, wo sie auf Myelinphagozytierende MHC-II-positive Mikrogliazellen treffen, die das kostimulatorische Molekül B7-2, nicht aber B7-1 exprimierten. Die Expression von MHC-II und B7-2 bleibt dabei für Wochen nach Läsion auf Mikroglia mit ramifizierter Morphologie sichtbar. Es finden sich dabei über lange Zeit nach Läsion CD4- und B7-2-positive α/β -T Zellen in retrograd degenerierenden Fasertrakten, z.B. dem Alveus (Bechmann et al. 2001). Die Präsenz von T Zellen in den Zonen anterograder Degeneration ist nur in der ersten Woche nach Läsion zu beobachten, welches durch die Hochregulation von CD95L (Bechmann et al., 1999) auf Astrozyten erklärt werden kann (Bechmann et al. 2000). Der Todesligand TRAIL ließ sich mit mehreren Antikörpern nach entorhinaler Läsion nicht nachweisen und scheint daher nicht an der Entfernung infiltrierender T Zellen beteiligt zu sein. Dagegen konnte TRAIL selbst Apoptose von glialen und neuronalen Zellen im kultivierten humanen Gewebe induzieren (Nitsch et al. 2000).

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein *in vitro*-Präparat entwickelt, welches es erlaubt, einen myelinisierten Fasertrakt mit erhaltenen Ursprungsneuronen und Zielzellen in einem organotypischen Gewebeverband über längere Zeit zu studieren (Kluge et al., 1998). Dieser Versuchsansatz erlaubt es, Schädigungen des myelinisierten Fasertraktes zwischen entorhinalen Cortex und Hippocampus, dem Tractus perforans zu studieren. Dabei wird analog zur Darstellung des Tractus perforans *in vivo* (Bechmann and Nitsch, 2000) im Komplexschnittpräparat von entorhinalen Cortex und Hippocampus das Vorhandensein dieser Faserverbindung *in situ* zur Darstellung gebracht (Kluge et al., 1998). Läsionen des Tractus perforans *in situ* führen zur Aktivierung von Gliazellen und zur Phagozytose. Unter Einsatz des von uns entwickelten Superkultivierungsansatzes, bei dem mit MiniRuby vormarkierte Mikrogliazellen in die organotypische Slicekultur migrieren, konnte nun das Verhalten nicht-neuronaler Zellen auf eine experimentell induzierte

neuronalen Schädigung durch NMDA untersucht werden. Die Befunde zeigten, daß vormarkierte Mikrogliazellen spezifisch zum Ort neuronaler Schädigung migrierten (Heppner et al., 1998). Unter Einsatz dieses Modells und Antisenseexperimenten konnten wir zeigen, daß hierfür mikrogliale Oberflächenmoleküle (z.B. CD 11a) vorhanden sein müssen, deren Expression über die PARP reguliert werden (Ullrich et al., 2001a; 2001b). T-Zellen nicht nur in der Lage sind, in die Schnittkultur einzuwandern, sondern dort auch Mikrogliazellen zu aktivieren. Diese Aktivierung führt zur Expression von MHC-II und ICAM-1 auf Mikrogliazellen. Während die MHC-II-Expression eine Voraussetzung für die Antigenpräsentation an CD4-T-Zellen darstellt, dient ICAM-1 als costimulatorisches und Adhäsionsmolekül der Kommunikation zwischen T-Zellen und Mikrogliazellen. Invasion von MBP-spezifischen T-Zellen aus MBP-transgenen Mäusen führt zu einer weitaus stärkeren Aktivierung der Mikrogliazellen als unspezifisch aktivierte T-Zellen von Wildtypmäusen (Gimsa et al., 2000). MBP-spezifische Th1- und Th2-Zellen führen zur zwar beide zur Expression des regulatorischen Moleküls CD40 aber nur Th1-Zellen zu einer Expression von ICAM-1 und der costimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80). Die Expression von B7-2 (CD86) wird durch Th1-Zellen unterdrückt, durch Th2-Zellen unterhalten (Peter et al., 2001; Gimsa et al., 2001).

Bei der Beeinflussung mikroglialer sowie monozytärer Reaktion sind Astrozyten wesentlich beteiligt. Wir konnten zeigen, daß sie die Fähigkeit besitzen, ins Hirn eindringende Makrophagen zu deaktivieren und somit das Immunprivileg des Hirns zu unterstützen. Die Ramifizierung wurde begleitet durch eine reduzierte Expression von MHC-II und der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und ICAM-1. Die physiologischen Effekte astrozytärer Faktoren auf Mikrogliazellen wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe Eder/Heinemann untersucht (Eder et al., 1999). Da dieser Effekt durch Astrozytenüberstand oder TGF- β induziert und durch anti-TGF- β reduziert werden konnte, gehen wir von einer Beteiligung von astrozytärem TGF- β aus (Hailer et al., 1998). Interessanterweise zeigte sich, daß die Beeinflussung der mikroglialen Reaktion (z.B. durch TGF- β) zu einer Protektion der Dendriten nach partieller Deafferenzierung führt (Eyüpoglu et al., 2001).

Wir haben zeigen können, daß MBP-spezifische und Copaxone-spezifische T-Zellen in Abhängigkeit des vorhandenseins des spezifischen Antigens im Gegensatz zu OVA-spezifischen T-Zellen den neuronalen Schaden in der Slicekultur substantiell verringern (Fisher et al., 2001). In einem anderen, durch den SFB 515/A5 geförderten Projekt haben wir Moleküle und Mechanismen axonaler Wegfindung im Hippocampus während der Entwicklung (Skutella and Nitsch, 2001) und nach Läsion des Tractus perforans untersucht (Savaskan et al., 2000). Hierbei haben wir zur Analyse löslicher Faktoren einen Kokulturassay (Steup et al., 2000) sowie den Streifenassay zur Analyse membrangebundener Faktoren eingesetzt (Skutella et al., 1999). Hierbei kann das Auswachsverhalten von Axonen aus einer Hirnschnittkultur (etwa von Hippocampus oder entorhinalem Cortex) als Reaktion attraktiver oder repulsiver Faktoren genau charakterisiert werden. Diese Methoden erlauben den Einsatz von blockierenden Antikörpern (Savaskan et al., 1999). Wir wollen diese Vorgehensweise nun für die Analyse glialer und T-zellulärer Faktoren einsetzen.

Eigene Literatur

(Antragsteller unterstrichen, SFB-Projektmitarbeiter fett gedruckt, geförderte Arbeiten während der laufenden Projektperiode mit *)

- *Bechmann I, Mor G, Nilson J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: Evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27:62-74
- *Bechmann I and Nitsch R (2000) Involvement of non-neuronal cells in entorhinal-hippocampal reorganization following lesions. *N.Y. Acad. Sci.* Vol. 911 (6):192-206
- *Bechmann I, Lossau S, Steiner B, Mor G, Gimsa U, Nitsch R (2000) Reactive astrocytes upregulate FAS (CD95) and FAS ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death in the course of anterograde degeneration. *Glia* 32:25-41
- *Bechmann I, Steiner B, Gimsa U, Mor G, Beyer M, Zipp F, Nitsch R (2000) Involvement of the Fas/FasL-pathway in astrocyte-induced T cells apoptosis. submitted

- *Bechmann I, **Peter SA**, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R (2001) Presence of B 7-2 (CD 86) and lack of B 7-1 (CD 80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo. *FASEB J.* (February 26, 2001) 10.1096/fj.00-0563fje
- *Bechmann I and Nitsch R (2001) Plasticity following lesion: Harm and help from the immune system. *Restorative Neurology*, in press
- *Beyer M, Gimsa U, Eyüpoglu IY, Hailer NP, Nitsch R (2000) Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: upregulation of MHC Class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro. *Glia* 31:262-266
- *Eder C, Schilling T, Heinemann U, **Haas D**, Hailer N, Nitsch R (1999) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglial in vitro. *European Journal of Neuroscience* 11 (12) : 4251-61
- *Eyüpoglu I, Bechmann I, Nitsch R (2001) Downregulation of microglial activity protects from dendritic retraction and results in increased sprouting of remaining fibers in the deafferented hippocampus. in preparation
- *Fisher J, **Peter SA**, Nitsch R, Schwartz M (2001) Autoantigen-specific T-cells protect neurons from glutamate-induced cell death in hippocampal slice cultures. in preparation
- *Gimsa U, **Peter SA**, Bechmann I, Nitsch R (2000) Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. *Brain Pathology*, 10:365-377
- *Gimsa U, **Peter SA**, Haas D, Bechmann I, Nitsch R (2001) Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain. submitted
- *Hailer NP, Heppner FL, **Haas D**, Nitsch R (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system, *Brain Pathology* 8:459-474
- *Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, **Haas D**, Nitsch R (1998) Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slices cultures. *European Journal Neuroscience* 10:3284-3290
- *Kluge A, Hailer NP, Horvath TL, Bechmann I, Nitsch R (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway *in vitro*. *Hippocampus* 8:57-68.
- *Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, **Haas D**, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F (2000) Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* Vol. 356, No. 9232:827-828
- ***Peter SA**, Gimsa U, Bechmann I, Nitsch R (2001) Differential regulation of B 7-1 (CD 80) and B 7-2 (CD 86) by invading Th-1 and Th-2 cells in organotypic central nervous system tissue in vitro indicates benign autoimmunity. (submitted)
- Savaskan NE, Plaschke M, Ninnemann O, Spillmann AA, Schwab ME, Nitsch R, Skutella T (1999) Myelin does not influence the choice behaviour of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length in vitro. *European Journal Neuroscience* 11:316-326.
- Savaskan NE, Skutella T, Plaschke M, Bräuer AU, Ninnemann O, Nitsch R (2000) Outgrowth-promoting molecules in the adult hippocampus after perforant path lesion. *European Journal of Neuroscience*, 12, (3): 1024-32.
- Skutella T, Savaskan NE, Ninnemann O, Nitsch R (1999) Target- and maturation-specific membrane-associated molecules determine the ingrowth of entorhinal fibers into the hippocampus. *Developmental Biology* 211: 277-292
- Skutella T and Nitsch R. (2001) New molecules for hippocampal development. *Trends in Neuroscience*, Vol. 24, 2:107-113.
- Steup A, Ninnemann O, Savaskan NE, Nitsch R, Püschel AW, Skutella T (2000) Semaphorin 3C and Netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15 (2): 141-55
- *Ullrich O, Bechmann I, **Diestel A**, Homberg M, Grune T, Hass R, Nitsch R (2001a) Turnover of oxidatively-damaged proteins in BV-2 microglia cells is proteasome-dependent and linked to its activation state by poly(ADP-ribose) polymerase. *FASEB J.* (April 16, 2001) 10.1096/fj.00-0540.fje
- *Ullrich O, **Diestel A**, Nitsch R (2001b) Regulation of microglial integrin-expression by PARP (submitted)

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

Ziele und Fragestellungen:

Ausgehend von unseren bisherigen Befunden wollen wir nun die zellulären Grundlagen der Beteiligung immunkompetenter Zellen bei Protektion und Reorganisation in unserem Modellsystem aufzuklären. Dabei werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ziel:

Aufklärung der Mechanismen und Moleküle, die an der Reduktion des neuronalen Zellschadens durch MBP-spezifische und Copaxone-spezifische T-Zellen beteiligt sind.

Experimentelle Fragestellungen:

- Ist die neuronale Protektion durch antigenspezifische T-Zellen abhängig von der Art der Schädigung (mechanisch vs. exzitotoxisch)?
- Spielt die T-Zell Spezifität (Th1 vs. Th2) eine Rolle?
- Sind der Zell-Zell-Kontakt und/oder lösliche Faktoren für die Protektion verantwortlich?
- Welche Wachstumsfaktoren sowie pro- und antiinflammatorische Zytokine spielen eine Rolle?
- Welche Rolle spielen Mikrogliazellen und die Antigenpräsentation?

Vorgehen:

Einsatz der organotypischen Schnittkultur, Durchführung unterschiedlicher Läsionen, Charakterisierung der T-Zellen (ELISA, FACS), Superkultivierung (mit und ohne Kontakt), Untersuchung der T-Zell-Mikroglia-Interaktion im fixierten Slice (Expression von Oberflächenmolekülen) und im 2-Photonenmikroskop.

2. Ziel:

Analyse der Beteiligung autoantigenspezifischer T-Zellen bei Auswachs Vorgängen.

Experimentelle Fragestellungen:

- Stimulieren verschiedene T-Zellen (antigenspezifisch, TH1/Th2) das Auswachsen von Neuriten aus entorhinalen Explantatkulturen unterschiedlich?
- Sind membrangebundene Faktoren und/oder lösliche Faktoren daran beteiligt?
- Ist die Interaktion von Mikrogliazellen und T-Zellen sowie die spezifische Antigenpräsentation von Bedeutung?
- Sind Astrozyten, Mikrogliazellen oder T-Zellen Produzenten von Wachstumsfaktoren?
- Welche Moleküle werden membrangebunden angeboten bzw. welche freigesetzt?

Vorgehen:

Einsatz verschiedener T-Zellen (Charakterisierung der T-Zellen siehe oben) im Streifenassay (membrangebundene Faktoren) und im Kokulturassay (lösliche Faktoren). Kombinatorischer Einsatz mit Mikrogliazellen und/oder Astrozyten. Einsatz inhibitorischer Antikörper.

3. Ziel:

Analyse der Beteiligung autoantigenspezifischer T-Zellen bei axonalen Reorganisationsprozessen.

Experimentelle Fragestellungen:

- Führt die Invasion von autoantigenspezifische T-Zellen zu einer Protektion von entorhinalen Ursprungsneuronen nach Durchschneidung ihrer Axone in der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur?
- Kann diese Invasion Neuauswachsen von Axonen und Reinnervation induzieren?
- Sind dabei Astrozyten, Mikrogliazellen oder T-Zellen Produzenten von Wachstumsfaktoren?

Vorgehen:

Einsatz der entorhinal-hippocampalen Komplexschnittkultur (mit vormarakiertem Tractus perforans, anterograd bzw. retrograd), mechanische Läsion, Superkultivierung mit verschiedenen T-Zellen,

retrogrades tracing zur Analyse der neuangewachsenen Fasern, Analyse in im fixierten Slice licht- und elektronenmikroskopisch sowie im 2-Photonenmikroskop.

4. Ziel:

Bestimmung der Rolle autoantigenspezifischer T-Zellen bei der Protektion von Dendriten nach partieller Deafferenzierung.

Experimentelle Fragestellungen:

- Führt die Invasion von autoantigenspezifischen T-Zellen zu einer Protektion der dendritischen Arborisation hippocampaler Zielneurone nach Durchschneidung ihrer Afferenzen in der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur?
- Kommt es zur Ausbildung neuer synaptischer Kontakte?

Vorgehen:

Einsatz der entorhinal-hippocampalen Komplexschnittkultur (mit vormarakiertem Tractus perforans, anterograd), Darstellung hippocampaler Dendriten, mechanische Läsion, Superkultivierung mit verschiedenen T-Zellen, Analyse im fixierten Slice (quantitative Analyse der dendritischen Arborisation), licht und elektronenmikroskopische Auswertung sowie im 2-Photonenmikroskop

Methoden:

T-Zelllinien zum Testen der Antigenabhängigkeit (MBP, OVA, Cop)

Adulte Lewis-Ratten werden mit 1mg/ml myelin basic protein (MBP), Copaxon (Cop), nicht Myelin-assoziierten Antigenen (z.B. S-100, Synaptophysin) sowie Ovalbumin (OVA) 1:2 in PBS und komplettem Freund's Adjuvans, das 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* enthält, immunisiert (rechter Hinterlauf). Nach 10 Tagen werden die Zellen aus den abfließenden Lymphknoten in Proliferationsmedium (DMEM, L-glutamin, 2-mercaptoethanol, sodium pyruvat, penicillin, streptomycin, non-essential amino-acids and autologous rat serum) mit dem entsprechendem Antigen (10µg/ml MBP, OVA, Cop) aktiviert und für 72h bei 37°C und 7%CO₂ kultiviert. Danach werden die Zellen in Propagationsmedium (DMEM, L-glutamin, 2-mercaptoethanol, sodium pyruvat, penicillin, streptomycin, non-essential amino-acids, fetales Kälberserum, T-Zell-Wachstumsfaktor aus concanavalin A-stimulierten Milzzellen) überführt. Nach 4 bis 10 Tagen erfolgt eine Restimulation der T Zellen mit dem entsprechendem Antigen (10µg/ml MBP, OVA, Cop) und bestrahlten Milz- oder Thymuszellen (2000rad) in Proliferationsmedium. Die T Zelllinien werden durch wiederholte Restimulation und Propagation expandiert. Damit keine Kontamination anderer Zelltypen vorliegt, werden die Zellen kurz vor dem Beginn der Kokultur mit einem magnetischen Zellsortiersystem (MACS, Milteny Biotech) CD4-positiv separiert.

Th1 und Th2 Zelllinien zum Testen der Subtypabhängigkeit (MBP und OVA)

Reine Th1 und Th2 Zelllinien werden aus transgenen Tieren gewonnen, deren T Zellen einen Rezeptor (TCR) spezifisch für das entsprechende Antigen tragen. Die aus Milz und Lymphknoten dieser transgenen Tiere gewonnenen Zellen werden in Propagationsmedium entweder mit 3µg/ml MBP-peptid Ac1-11 oder 3µg/ml OVA aktiviert. Es gibt keine Copaxon-transgenen Tiere. Daher entfällt dieses Antigen. Für die Th1 Zelllinie werden 1µg/ml IL-12 und anti-IL-4; für die Th2 Zelllinien 1mg/ml IL-4 und 1µg/ml anti-IL-12 verwendet. Nach 2 Tagen werden die Zellen expandiert und mit 100U/ml IL-2 zur Proliferation angeregt. Nach weiteren 3 Tagen werden die Zellen mit Antigen (3µg/ml MBP oder OVA) und den entsprechenden Cytokinen und bestrahlten Milzzellen restimuliert. Die Restimulation kann 2 bis 3 Mal erfolgen. Unmittelbar vor der Kokultivierung mit den slices werden die Zellen CD4-positiv selektiert.

Mikroglia- und Astrozytenkulturen zur Kokultivierung

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 eingeeignet 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 Aufnehmen 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.

Durchflußzytometrie zur Zellcharakterisierung

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. Hierfür werden die in den Vertiefungen einer 24-Loch-Kulturschale in Einzelzellkultur gehaltenen Mikrogliazellen oder Astrozyten durch Inkubation in Kalzium/Magnesium-freiem 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 PBS 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.

Zell- und Molekülmarkierung

Marker	Markierung von
Anti-LFA-1a	b ₂ -Integrin, a-Kette/Adhäsionsmolekül
Anti-LFA-1b	b ₂ -Integrin, b-Kette/Adhäsionsmolekül
Anti-VLA-4	b ₁ -Integrin, a-Kette/Adhäsionsmolekül
Anti-ICAM-1	Ig-Supergenfamilie, Adhäsionsmolekül
Anti-VCAM-1	Ig-Supergenfamilie, Adhäsionsmolekül
anti-MHC-I	Antigenpräsentation (CD8-restringiert)
anti-MHC-II	Antigenpräsentation (CD4-restringiert)
anti-GFAP	saure gliale Fibrillen (in Astrozyten)
anti-Connexin 43	Gap-Junctions
Mac-1	C3bi-Rezeptor Makrophagentypisch
GFS-B ₄	an Monozyten, Makrophagen, Mikroglia und Endothelien bindendes Lektin

Transfektion von 293 (HEK) Zellen als Expressionssystem

Kulturen von 293 Zellen (ATCC CRL 1573) werden in 250 ml Kulturflaschen angezogen. Bei einer Wachstumsdichte von 75% auf der Oberfläche der Kulturflasche werden sie transient mit einer Mischung aus 12 µg Plasmid DNA und 48 µl PerFect Lipid Pfx-4 (Invitrogen) transfiziert. Als Kontrolle dient leerer Vektor, der in gleicher Weise und Menge transfiziert wird. Aus den transfizierten Zellen werden

Kulturen angelegt. Dazu werden die Zellen trypsinisiert und in 500 µl 10% FCS in DMEM Medium (GIBCO BRL) geerntet. 25 µl der Zellsuspension werden auf die Deckel von 6Loch-Kulturplatten pipettiert und über Kopf hängend über Kulturmedium für 16 h bei 37 °C inkubiert. Durch die Schwerkraft sammeln sich die Zellen in dem Tropfen und bilden ein Aggregat.

Auswachsassay in einer drei-dimensionalen Kollagengelmatrix zur Analyse löslicher Faktoren

Zellaggregate (293 Zellen, T-Zellen) werden in eine 3-dimensionale Kollagen-Matrix eingebracht (Steup et al., 1999; 2000). Das dafür notwendige Kollagengel wird aus Typ I Kollagen (aus Rattenschwanz; Sigma C7661) hergestellt, welches in 0,1 M Essigsäure mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml gelöst wird. Diese Kollagenlösung wird mit MEM Medium (GIBCO BRL) gemischt und durch Zugabe von Rekonstituierungspuffer (2,2% NaHCO₃ in 0,8 M NaOH) neutralisiert. Die verschiedenen Explantate werden in die Kollagenmatrix eingebracht und in unmittelbarer Nähe der Zellaggregate positioniert. Nach dem Auspolymerisieren des Kollagens (30 min bei 37 °C) wird Kulturmedium hinzugefügt (Neurobasalmedium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% B27, 0,5 mM L-glutamine [GIBCO BRL], 10 µM Cytosin-Arabinosid [SIGMA]). Die Kokulturen werden für 2 Tage bei 35 °C und 4% CO₂ inkubiert.

Die Effekte der sekretierten Faktoren auf das Auswachsen der neuronalen Explantate werden in jeweils drei unabhängig durchgeführten Experimenten untersucht. Zur Auswertung wird das Gebiet, in dem das Auswachsen von Neuriten beobachtet wird in eine dem Zellaggregat zugewandte (proximale) und eine dem Zellaggregat abgewandte (distale) Hälfte unterteilt. Das Auswachsmuster wird als attraktiv eingestuft, wenn in der proximalen Hälfte des Explantates eine höhere Faserdichte als in der distalen Hälfte beobachtet wird. Dagegen wird das Auswachsmuster als repulsiv bewertet, wenn die Faserdichte in der proximalen Hälfte geringer war als in der distalen bzw. wenn keine Fasern in der proximalen Hälfte beobachtet werden können. Radiales Auswachsen wird als gleiche Faserdichte in beiden Hälften des Explantates definiert. Die Wachstumseffekte werden an einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und fotografisch dokumentiert. Dieser Assay erlaubt den Einsatz blockierender Antikörper (Steup et al., 2000; siehe oben)

Streifenassay zur Analyse membrangebundener Faktoren

T-Zellen werden in Homogenisierungspuffer aufgenommen (0,5-1 ml; Tris HCl 10mM pH 7,4, CaCl 2 1,5 mM, Spermidine 1mM, Proteinaseinhibitoren, Aprotinine 25 µg/ml, Leupeptine 25 µg/ml, Pepstatine 5µg/ml), in einen Sucrosegradienten gegeben und zentrifugiert (TL 100 Beckmann Swingout 10 min bei 28-58 x 10³ rpm). Die entstandene Bande wird in PBS gewaschen und danach mit einer Spritze abgesaugt. Das Material wird in PBS resuspendiert und anschließend noch einmal zentrifugiert (5 min bei 15000 rpm +4°C). Die Dichte der Membranen wird photometrisch bestimmt (in 2% SDS in H₂O, Ausgangsverdünnung 1:15 bis 1:30, OD= 0,1 bis 0,5). Die Membranen werden mit einem Fluoreszenzdyer markiert (Duke Scientific Corp. Covaspheres Reagents 122530 A). Danach werden die Membranen auf Nuclepore Membranen (Costar Corp. 113605) in Streifen aufgebracht. Das Wahlverhalten zwischen zwei Membranen (choice) oder die Auswachsänge (outgrowth length) erlaubt Rückschlüsse auf das Vorhandensein Wachstums-stimulierender bzw. hemmender Moleküle. Dieser Assay erlaubt den Einsatz blockierender Antikörper (Savaskan et al., 1999, siehe oben).

Organotypische entorhinal-hippocampale Komplexschnittkulturen

Organotypische entorhinal-hippocampale Komplexschnittkulturen werden gewonnen, indem 10 Tage alte Tiere des jeweiligen genetischen Backgrounds 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 Interfacetechnik auf Millipore-Filtermembranen der Porengröße 0,1 µm gebracht, die wiederum in die Vertiefungen einer 6Loch-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. Der Tractus perforans wird mittels Applikation von Micro-Ruby Kristallen anterograd markiert. Quetsch- oder Schnittläsionen werden mechanisch im Verlauf des Tractus perforans durchgeführt. Die Markierung der entorhinalen Ursprungsneurone nach Aussprossen im Gefolge einer Quetsch- oder Schnittläsion wird durch retrograde Tracer (z.B. Fast-Blue) erreicht. Die Färbung wird im Verlauf *in vitro* unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Dieses System eignet sich auch für *in vitro* Untersuchungen unter Einsatz des 2-Photonenmikroskops. Hierbei kann die Interaktion von T-Zellen – Mikrogliazellen – Neuronen direkt visualisiert werden. Methodische Vorarbeiten hierzu sind während der letzten Förderperiode durchgeführt worden.

Die zelltypenspezifische Darstellung von Neuronen und besonders ihrer Dendriten gelingt mit Antikörpermarkierung gegen Calcium-bindende Proteine (Parvalbumin für Interneurone, Calbindin für Körnerzellen und Pyramidenzellen). Neuronale Schädigung wird durch Zugabe von NMDA (50 μ M) oder Glutamat (10 mM) induziert (Heppner et al., 1998, siehe oben).

Kokulturen von antigen- und subtyp-spezifischen T Zellen mit organotypischen slices

Um den Einfluss des Zell-Zell-Kontaktes zu testen, werden pro slice 50.000 Zellen jeder Zelllinie in 5 μ l Kulturmedium direkt nach der Präparation auf slices von 7 Tage alten Lewis-Ratten (für MBP, OVA, Cop spezifische T Zellen) oder 9 Tage alten B10.PL (für MBP-spezifische Th1 und Th2 Zellen) oder 9 Tage alten Balb/c (für OVA-spezifische Th1 und Th2 Zellen) pipettiert (Gimsa et al., 2000, siehe oben; 2001; Peter et al., 2001, siehe oben). Soll die Rolle der löslichen Faktoren untersucht werden, werden die oben genannten Zellen in das Kulturmedium der slices zugegeben (0.5 Mill/ml für 4 slices pro well). Da die Slices durch eine Membran (0,4 μ m Porengröße) von den Zellen getrennt sind, kann man einen direkten Zell-Zell-Kontakt ausschliessen. Ein Teil der Slices wird mit den Zellen und dem entsprechendem Antigen behandelt (antigen-spezifische Aktivierung), ein anderer Teil nur mit den Zellen ohne zusätzliches Antigen. Als Kontrollen dienen Slices, die entweder nur mit Kulturmedium oder mit Kulturmedium und Antigen behandelt wurden.

Darstellung des neuronalen Überlebens

24h nach der Kokultivierung von T Zellen und slices werden die slices mit 5ng/ml Propidiumjodid (PI) für 30 min bei 37° inkubiert. Es folgen 3 Waschschritte für je 10 min mit frischem Kulturmedium bei 37°. Die slices werden mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C über Nacht fixiert. Die Behandlung mit einem aufsteigenden Saccharosegehalt (0,8 M; 1M; 1,4M) bereitet die slices für die Verarbeitung zu 16 μ m dicken Kryostatschnitten vor. Diese Schnitte werden auf gelatinierten Objektträgern aufgezogen und können für die Immunhistochemie verwendet werden. Durch die Markierung mit PI, die als rote Fluoreszenz dargestellt wird, können alle toten Zellen detektiert werden. Eine Auswertung innerhalb der Zellbänder des Hippocampus erlaubt Aussagen über Veränderungen in der Zahl überlebender Neurone. Mit einem Neurofilament-Antikörper (rabbit-anti-mouse-N200) können darüberhinaus Neurone markiert werden. Ein sekundärer Antikörper (goat-anti-rabbit) der mit fluorescein (FITC) gekoppelt ist, ermöglicht die Darstellung der Neurone in grüner Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop. Eine Überlagerung von grüner und roter Fluoreszenz stellt tote Neurone als gelbe Zellen dar. Die quantitative Analyse wird beobachterunabhängig mit einem Bildanalysesystem durchgeführt.

Bestimmung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen

In den Unterständen der Slices (1ml pro 4 Slices in einem well) wird die Menge zunächst folgender Wachstumsfaktoren und Zytokinen mit ELISA's bestimmt. Die Auswahl ergibt sich aus der Tatsache, daß diese Moleküle entweder als Wachstumsfaktoren für axonales Wachstum beschrieben sind bzw. als Zytokine von den Zellen bekanntermaßen freigesetzt werden. Um den aktiven "Cocktail" zu charakterisieren, werden diese messungen parallel durchgeführt.

Wachstumsfaktor/Cytok in	Produzierende Zelle	Funktion
BDNF	Neurone, T Zellen	Protektiv
NGF		Protektiv
NF4		Protektiv
NF5		Protektiv
IL-4	Th2 Zellen	Antiinflammatorisch
IL-10	Th1 und Th2 Zellen	Antiinflammatorisch
IL-6	Th1 und Th2 Zellen, (Mikroglia?)	pro- und antiinflammatorisch
IFN-g	Th1 Zellen	Proinflammatorisch
TNFa	Th1 und Th2 Zellen, Mikroglia	Proinflammatorisch
TGFb	Mikroglia, Astrozyten Th2-Zellen?	Antiinflammatorisch

Im Verlauf der Arbeiten sollen die Untersuchungen auch auf andere Faktoren und Moleküle ausgedehnt werden (siehe etwa: Skutella and Nitsch, 2001, siehe oben). Kandidaten der genannten Substanzen, die sich in Vorkommen oder Menge zwischen protektiven und destruktiven Behandlungen unterscheiden, werden mit entsprechenden Antikörpern blockiert (Hailer et al., 1998, siehe oben).

Bestimmung von Oberflächenmolekülen auf Gliazellen in den organotypischen slices

Aus den Voruntersuchungen ist bekannt, dass durch T Zellen aktivierte Mikroglia einen Einfluss auf das neuronale/axonale Überleben haben. Neben den sekretorischen Faktoren sollen Oberflächenmoleküle identifiziert werden, die nach Zell-Zell-Kontakt mit T Zellen aus den verschiedenen T Zelllinien exprimiert werden. Folgende Moleküle wurden für die Untersuchung ausgewählt:

Oberflächenmolekül	Funktion
MHCII	Antigenpräsentation/Aktivierung
ICAM.1	Adhäsion/Aktivierung
CD 40	Kommunikation/Stimulation
CD 86	Kostimulation
CD 80	Kostimulation

Die Erstantikörper dieser Moleküle werden mit einem biotinylierten sekundären Antikörper gekoppelt. Die Darstellung erfolgt über eine Avidin-Biotin-Komplex-Konjugation und eine Konvertierung dieses Komplexes mit 3'3 Diaminobenzidin (DAB). Die Mikrogliazelle wird in grüner Fluoreszenz mit einem an diese Zellen bindenden Lektin (GFS-B4), das FITC gekoppelt ist, dargestellt. Eine das entsprechende Molekül exprimierende Mikrogliazelle ist sowohl in grüner Fluoreszenz als auch im Durchlicht als schwarze (DAB-gefärbte) Zelle erkennbar. Die Analyse wird zunächst qualitativ durchgeführt. Die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung ist –gegebenenfalls im Labor vorhanden. Werden eines oder mehrere Moleküle in einer für Neurone protektiven und nicht-protektiven Behandlung unterschiedlich exprimiert, werden diese Kandidaten-Moleküle in einem weiteren Experiment blockiert. Der Einfluss der Blockierung auf das neuronale Überleben wird mit dem oben beschriebenen Essay kontrolliert.

Durch diese Vorgehensweise ist es möglich, die von T Zellen auf Mikrogliazellen induzierten Moleküle zu identifizieren, die eine Rolle beim neuronalen Überleben spielen. Durch eine Kombination von ELISA's und Immunhistochemie kann ein Zusammenhang von exprimierten Molekülen auf Mikroglia-Zellen und der Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die das neuronale Überleben beeinflussen, hergestellt werden.

Einsatz des "dual-photon" konfokalen Mikroskopes zur Analyse fluoreszenzmarkierter Gliazellen und T-Zellen in organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen in situ

Das "dual-photon" konfokale Mikroskop erlaubt das direkte Monitoring vormarkierter axonaler Fasern (Mini Ruby) oder vormarkierter Mikrogliazellen (Mini-Green) bzw T-Zellen (Fluorescein) in der lebenden organotypischen Kultur auch in den mittleren Schichten. Hierbei wird eine Auflösung erreicht, die die direkte Visualisierung von Phagozytoseprozessen und zellulärer Interaktion ermöglicht. In unserer Arbeitsgruppe ist ein begasbarer Miniaturbrutschrank zur Kultivierung von Slicekulturen unter einem

aufrechten Mikroskop entwickelt worden. Diese Einrichtung haben wir unter dem im Z2 Projekt aufgebauten "two-photon" Mikroskop adaptiert. Diese Kammer ermöglicht eine langandauernde sowie eine repetitive Analyse der Slicekulturen. Zur Zeit wird dieser Setup auch für Einzelzell-Zell PCR Analysen eingesetzt. Ein direktes Monitoring erlaubt, ein Verständnis der Pathophysiologie der T-Zell-Gliazell-Neuron-Interaktion zu erarbeiten und auch die Dynamik dieser Phänomene zu verstehen. Für die Etablierung eines interventionistischen Ansatzes (unter Anwendung von Pharmaka, Antikörpern oder Liganden) ist dieses Verständnis unabdingbare Voraussetzung.

Zeitplan

Mit Vorarbeiten ist begonnen worden. Die Arbeiten sollen parallel durchgeführt werden. Da alle Modellsysteme im Labor etabliert sind, gehen wir davon aus, daß wir in der ersten Phase der Förderperiode die Charakterisierung des protektiven Potentials der verschiedenen T-Zelllinien genau beschreiben können. Daran anschließend soll versucht werden, die potentiellen Moleküle einzugrenzen, die hierbei eine Rolle spielen. Zunächst wollen wir uns dabei auf solche Moleküle konzentrieren, von denen gezeigt ist, daß sie wachstumsfördernde bzw. protektive bzw. wachstumshemmende Funktionen haben (siehe Liste). Unsere Ansätze erlauben dabei auch, Kombinationen und synergistische Effekte zu charakterisieren. In einem dritten Schritt sollen dann durch den Einsatz dieser Moleküle in der organotypischen Schnittkultur die Effekte auch zellulär (Interaktion Gliazellen/Neurone) untersucht werden. Der Einsatz dieses Systems erlaubt auch *in vitro* Studien unter Einsatz der 2-Photonenmikroskops. Methodische Vorarbeiten während der letzten Antragsphase sind hierzu durchgeführt worden.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Das Projekt ist im Bereich "Entzündung" des SFB angesiedelt und dort eng mit den Projekten Weber/Braun; Hanisch; Volk; Zipp; Bechmann/Gimsa; Brück/Stangel vernetzt. Darüberhinaus wurde zusammen mit den Projekten Eder/Heinemann die Korrelation von Adhäsionsmolekülerpression 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 Mikroglia-Ramifizierung sowohl in der Slice-Kultur als auch nach Vitamin-E Gabe in der Einzelzellkultur untersucht. In Zusammenarbeit mit dem Projekt Zipp sind die Effekte Apoptose-induzierender Liganden sowie deren zelluläre Lokalisation untersucht worden. Mit dem Projekt Bechmann/Gimsa werden vielfältige methodische Überschneidungen bestehen.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004		
Verg.- Gr.	Anzah l	Betra g In DM	Verg.- Gr.	Anzah l	Betrag in DM	Verg.- Gr.	Anzah l	Betrag in DM	Verg.- Gr.	Anzah l	Betra g in DM
BAT IIa/2	2	79200	BAT IIa	1	94.800	BAT IIa	1	94.800	BAT IIa	1	94.800
BAT VIb	1	49200	BAT Vc	1	57.600	BAT Vc	1	57.600	BAT Vc	1	57.600
Zusamm en	3	128400	zusamme n	2	152.400	zusamme n	2	152.400	zusam men	2	152.400
Kostenkategorie oder Kennziffer	Betra g In DM	Kostenkategorie oder Kennziffer	Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer	Betrag in DM	Kostenkategorie oder Kennziffer	Betrag in DM	Kostenkategor ie oder Kennziffer	Betra g in DM		
522	32.000	522	35.000	522	35.000	522	35.000	522	35.000		
515		515		515		515		515			
Zusammen	32000	zusammen	35000	zusammen	35000	Zusammen	35000				

¹⁾ nur bei Fortsetzungsanträgen

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad Dienststellung	Engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Stunden pro Woche	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	derzeitige Einstufung in BAT ...
Grundausrüstung	Nitsch Robert, Prof. Dr. med.	Anatomie, Zellbiologie	Institut für Anatomie	5	1.7.95	C4
3.7.1.1 wissenschaftliche Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1. Ninnemann, Olaf, Dr. rer. nat. 2. Gimsa, Ulrike, Dr. rer. Nat.	Molekularbiologie Immunologie	Institut für Anatomie Institut für Anatomie	5 5	1.7.95 1.1.98	BAT Ib BAT IIa/Habil- Stipendiatin
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	1. Duwe, Gisela 2. Hildebrandt, Angelika	MTA MTA	Institut für Anatomie Institut für Anatomie	4 5	1.7.95 1.7.95	BAT IVb BAT Vc
Ergänzungsausstattung 3.7.1.3 wissenschaftliche Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1. Susanne Peter, Dipl.Biol., (Promotion feriggestellt)*	Immunologie	Institut für Anatomie	40	1.2.98 (über GRK238)	BAT IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	1. Haas, Dorit*	MTA	Institut für Anatomie	40	1.12.95	BAT VIb

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Das Projekt wird von Prof. Dr. Robert Nitsch geleitet und wissenschaftlich betreut. Herr Dr. Olaf Ninnemann hat das molekularbiologische Labor in der AG aufgebaut und leitet dieses. Er wird seine Expertise bei den Auswachs-asays zur Verfügung stellen. Frau Dr. Ulrike Gimsa verfügt aufgrund ihrer Tätigkeit im Deutschen Rheumaforschungszentrum (Prof. Mitchenson/Radbruch) über eine weitreichende immunologische Expertise (siehe auch gemeinsame Publikationen), die sie in dieses Projekt einbringen wird.

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 Angelika Hildebrandt betreut das Immunhistochemische Labor organisatorisch und arbeitet für alle zellbiologische Projekte der AG.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausrüstung

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Susanne Peter, Dipl. Biol (Promotion fertiggestellt) (BAT IIa)

Frau Peter hat in der vergangenen Förderperiode am Projekt als Doktorantin erfolgreich mitgearbeitet (siehe Publikationen). Sie hat unter Anleitung von Frau Dr. Ulrike Gimsa grundlegende Erfahrungen in der Immunologie gesammelt und hat im Institut einen wesentlichen Beitrag für den Aufbau des nun gut etablierten neuroimmunologisch orientierten Schwerpunkt geleistet. Sie soll nun als PostDoc ihre Expertise sowohl auf dem Gebiet der T-Zellkultur als auch der organotypischen Schnittkultur voll für das Projekt einbringen. Frau Peter war im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Labor von Michal Schwartz im Weizmann Institut, Rehovot, tätig. Diese Zusammenarbeit soll von ihr fortgeführt werden. Sie wird alle zellbiologischen Arbeiten verantwortlich durchführen. Die genannten Aufgaben erfordern zell- und molekularbiologische Vorkenntnisse sowie eine über einen Zeitraum von etwa drei Jahren erfolgende, kontinuierliche Mitarbeit an dem Projekt. 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

Dorit Haas (BAT Vc)

Die Notwendigkeit zur Mitarbeit einer technischen Assistentin ergibt sich aus dem großen Umfang arbeitsintensiver Routinarbeiten 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. Sie hat jeweils neue Techniken wesentlich mitetabliert. Dies zeigt sich durch die Tatsache, daß sie inzwischen vielfach als Koautorin in Veröffentlichungen ist. Sie ist für das Gelingen des Projektes außerordentlich wichtig gewesen. Für sie wird deshalb auch jetzt eine Stelle nach BAT Vc beantragt. Dieses ist auch gemäß Aufgabengebiet entsprechend den Vorgaben des BAT.

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 T-Zellkulturen werden ein hohes Maß an selbständiger Tätigkeit und Vorerfahrungen im Umgang mit Zellkulturen erwartet.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	10.000	10.000	10.000

Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausrüstung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausrüstung	35.000	35.000	35.000
---	--------	--------	--------

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur **Ergänzungsausrüstung** der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Folgende Verbrauchsmittel (inkl. MwSt) werden p.a. benötigt:

Versuchstiere	3.500 DM
Medien (PBS, RPMI, DMEM, HBSS, FBS, Penicillin, Streptomycin)	4.000 DM
Zellkulturmaterialien (Kulturflaschen, Kulturschalen, Zentrifugenröhrchen, Ficoll-Zentrifugationsmedium, Trypsin/EDTA)	7.500 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	35.000 DM

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

entfällt

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B12

3.1.1 Thema:

Die Rolle von oligodendrogialen Chemokinrezeptoren bei der Myelinisierung und Demyelinisierung – funktionelle *in vitro-in vivo* Korrelationen

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neuroimmunologie, Molekularbiologie, Neurologie, Neuropathologie

3.1.3 Leiter/in:

Brück, Wolfgang, 17.03.1961
Institut für Neuropathologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

Telefon: +49-30-450536073
Telefax: +49-30-450536940
E-Mail: wolfgang.brueck@charite.de

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

Ja, befristet bis zum 31.12.04

Stangel, Martin, 12.02.1964
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin

Telefon: +49-30-8445-2276
Telefax: +49-30-8445-4264
E-Mail: mstangel@zedat.fu-berlin.de

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

Ja, befristet bis zum 31.07.01, Verlängerung ist beantragt

3.1.4 entfällt

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

- Untersuchungen am Menschen nein
- klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie nein
- Tierversuche (EAE-Induktion in Mäusen) ja
- gentechnologische Untersuchungen ja

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-Jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-Ausgaben	Investitionen	gesamt
2002	96	25		121
2003	96	25		121
2004	96	25		121

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Oligodendrozyten und ihre Myelinscheiden sind das Ziel der Autoimmunantwort bei der Multiplen Sklerose. Der entzündliche Entmarkungsprozeß führt dabei zum Untergang der Oligodendrozyten. Bei manchen Patienten wird eine ausgeprägte Rekrutierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen in die Plaques beobachtet. Eine systematische Untersuchung von MS-Plaques definierte variable Muster der Oligodendrozytenpathologie in den Läsionen. Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die eine wesentliche Rolle bei der signalvermittelten Zellrekrutierung spielen. Sie werden aufgrund ihrer Struktur in 4 Familien eingeteilt und wirken auf unterschiedliche Zelltypen. Chemokine binden an komplementäre Rezeptoren, wobei die meisten Chemokine an mehr als einen Rezeptor binden. Im Zentralnervensystem sind Chemokine und deren Rezeptoren bei entzündlichen Prozessen nachgewiesen worden. Diese Untersuchungen zielten vorwiegend auf die Charakterisierung der Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression von Zellen des entzündlichen Infiltrats (T-Zellen, Monozyten). Erste Untersuchungen zeigen aber, daß auch Oligodendrozytenvorläuferzellen auf bestimmte Chemokine reagieren. Die Expression von mindestens 2 Chemokinrezeptoren wurde in eigenen Vorarbeiten (Dr. Martin Stangel) gezeigt, jedoch ist das Chemokinrezeptorexpressionsmuster von Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen sowie die Bedeutung der Rezeptoren für die Myelinisierung und Remyelinisierung bislang vollkommen ungeklärt. Im beantragten Projekt sollen in vitro und in vivo Untersuchungen durchgeführt werden, um die Rolle von Chemokinrezeptoren auf Oligodendrozyten und deren Vorläuferzellen während der Myelinisierung, der Demyelinisierung und der Remyelinisierung näher zu definieren. Dabei wird die Chemokinrezeptorexpression von Oligodendrozyten während der physiologischen Myelinisierung in Entwicklungsstudien sowie bei der De- und Remyelinisierung in experimentellen und humanen inflammatorischen Erkrankungen (EAE, MS) auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Parallel dazu erfolgen in vitro Studien, in denen funktionelle Assays durchgeführt werden, die die Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Migration und Proliferation von Oligodendrozytenvorläuferzellen klären sollen.

3.3 Stand der Forschung

Die Demyelinisierung im zentralen Nervensystem (ZNS) ist ein wesentliches Merkmal der Läsionen bei der Multiplen Sklerose (MS). Die Remyelinisierung, d.h. die Neubildung von Markscheiden in MS-Plaques, ist insbesondere in frühen Krankheitsstadien eine häufige Veränderung (Prineas et al., 1993; Raine and Wu, 1993; Lassmann et al., 1997), allerdings ist diese meist unvollständig und es ist unklar, welche Faktoren dafür verantwortlich sind. Differenzierte Untersuchungen zur Oligodendrozytenpathologie in MS-Plaques zeigten ein variables Überleben reifer Oligodendrozyten sowie differente Muster der Oligodendrozytenvorläuferzellrekrutierung in die Plaques mit einer daraus resultierenden unterschiedlichen Frequenz remyelinisierender Läsionen bei individuellen Patienten (Lucchinetti et al., 1999; Lucchinetti et al., 2000). Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPC, oligodendrocyte precursor cells), die für die Remyelinisierung verantwortlich zu sein scheinen, proliferieren und wandern in die Läsionen ein, bevor sie zu Oligodendrozyten differenzieren, die im ZNS die Myelinscheide bilden (Compston et al., 1997). In inaktiven, komplett entmarkten Plaques wurde eine ruhende Vorläuferzellpopulation beschrieben, die nicht dazu fähig ist, eine suffiziente Remyelinisierung durchzuführen (Wolswijk, 1998; Chang et al., 2000).

Eine Reihe von Wachstumsfaktoren kann die Proliferation, Migration und Differenzierung von OPC *in vitro* und *in vivo* beeinflussen (Woodruff and Franklin, 1997). Die Myelinisierung und Remyelinisierung erfordert ein exaktes, zeitlich genau determiniertes Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren, die in charakteristischer Weise unterschiedliche Stadien der Oligodendrozytenentwicklung beeinflussen. Diese zeitliche Sequenz ist notwendig, um die ungestörte Entwicklung von der Vorläuferzelle zum reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten zu gewährleisten (Copelman et al., 2000; Franklin and Hinks, 1999; Woodruff and Franklin, 1997; Franklin and Hinks, 1999; Dubois-Dalcq, 1995). Allerdings sind die exakten Abläufe und alle nötigen Faktoren für eine erfolgreiche Remyelinisierung, insbesondere auch unter pathologischen Bedingungen, noch nicht definiert. Aus Tierexperimenten ist bekannt, daß OPC nur über kurze Distanz wandern und dies einen limitierenden Faktor für eine erfolgreiche Remyelinisierung darstellt (Franklin et al., 1997).

Die entzündliche Reaktion bei der MS wurde bislang überwiegend als hinderlich für die Reparaturvorgänge angesehen. Neuere Untersuchungen zeigten allerdings, daß die infiltrierenden Entzündungszellen auch Wachstumsfaktoren wie BDNF produzieren können und somit auch eine protektive Wirkung ausüben könnten (Kerschensteiner et al., 1999). Weiterhin zeigte sich, daß transplantierte CG4 Zellen (eine OPC Zelllinie) in entzündlichen Läsionen besser überleben und über größere Distanzen migrieren als in normalem Gewebe (Tourbah et al., 1997). Unklar bleibt jedoch, welche Faktoren für dieses Verhalten verantwortlich sind. Möglicherweise haben neben Wachstumsfaktoren auch Zytokine einen Einfluß auf die Migration von OPC (Fok-Seang et al., 1998).

In den letzten 10 Jahren wurde eine Gruppe von kleinen Proteinen (8-10 kD), den sogenannten Chemokinen, charakterisiert, die strukturell und funktionell verwandt sind und die Rekrutierung von Entzündungszellen bei Immunreaktionen bewirken sind. Mittlerweile sind mehr als 50 Chemokine beschrieben. Sie werden entsprechend dem Abstand von Cysteinen im N-Terminus des Moleküls in 4 Gruppen unterteilt: Die CXC- oder α -Chemokine, CC- oder β -Chemokine, C- oder γ -Chemokine und ein CX₃C- oder δ -Chemokin (Wells et al., 1998; Rossi and Zlotnik, 2000; Luster, 1998). Entsprechend sind eine Reihe von Chemokin-Rezeptoren bekannt, wobei eine große Redundanz in der Bindungsfähigkeit herrscht. Eine Reihe verschiedener Chemokine kann an einen Rezeptor binden und umgekehrt ein Chemokin der Ligand für mehrere Rezeptoren sein (Mennicken et al., 1999; Luster, 1998). Ebenso wie bei immunologischen Abwehrreaktionen scheinen Chemokine auch bei der MS eine Rolle zu spielen, wo sie in Läsionen nachgewiesen wurden (McManus et al., 1998; Sorensen et al., 1999). Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) sind unterschiedliche Chemokine während einzelner Krankheitsphasen vorherrschend, so ist das CC-Chemokin MIP-1 α ein wichtiger Faktor im akuten Stadium der EAE, und das CC-Chemokin MCP-1 herrscht während eines erneuten Schubes bei chronischer EAE vor (Karpus and Ransohoff, 1998). Die meisten Arbeiten haben bislang den Einfluß von Chemokinen auf die Entzündungsreaktion untersucht. Jüngere Arbeiten zeigen jedoch, daß auch Neurone Chemokin-Rezeptoren exprimieren (Meucci et al., 1998) und zumindest das Chemokin RANTES auf das Migrationsverhalten von Neuronen einwirken kann (Bolin et al., 1998). Eine neue Studie zeigt erstmals die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren in der ZNS-Entwicklung, ohne aber den exprimierenden Zelltyp näher zu charakterisieren (van der Meer et al., 2001). Eine Reihe von Chemokinen wurde sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen im ZNS nachgewiesen, die meisten Untersuchungen beschränken sich auf Astrozyten, Neurone und Mikroglia (Mennicken et al., 1999; Asensio and Campbell, 1999).

Zur Chemokinrezeptorexpression von Oligodendrozyten sind bisher noch keine systematischen Untersuchungen durchgeführt worden. Indirekte Evidenz für eine Bedeutung dieser Rezeptoren wurde in Experimenten gezeigt, bei denen die Wirkung des Chemokins GRO- α (oder auch MGSA genannt, ein CXC-Chemokin) untersucht wurde. Dabei kam es zusammen mit PDGF zu einer Steigerung der Proliferation von OPC, wobei Astrozyten der zelluläre Ursprung des GRO- α zu sein scheinen (Wu et al., 2000; Robinson et al., 1998). Der Chemokinrezeptor CXCR2 ist der Ligand für dieses Chemokin und scheint damit eine besondere Bedeutung für die Proliferation von OPC zu haben. Da GRO- α auch bei der EAE exprimiert wird (Glabinski et al., 1997), ist eine Interaktion zwischen Immunreaktion und OPC über Chemokine wahrscheinlich. Eine der wesentlichen Aufgaben von Chemokinen ist die Rekrutierung von Zellen, somit könnten sie auch Einfluß auf die Migration und Proliferation von OPC haben und eine Remyelinisierung fördern. Obwohl die Wirkung von GRO- α auf OPC gezeigt wurde und über mögliche Funktionen von Chemokinen bei der Myelinisierung spekuliert wird, so liegt bislang keine Publikation vor, bei der ein Chemokinrezeptor auf OPC nachgewiesen wurde (Asensio and Campbell, 1999). Eigene

laufende Vorarbeiten (siehe unten) konnten zeigen, daß OPC neben dem GRO- α Rezeptor CXCR2 auch weitere Chemokinrezeptoren exprimieren. Die Funktion dieser Rezeptoren bzw. der Chemokine ist bislang jedoch unklar.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Eigene Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigten sich wesentlich mit der Oligodendrozytenpathologie bei der Multiplen Sklerose. Systematische immunpathologische Untersuchungen zeigten, daß die Pathogenese der Entmarkung bei der MS heterogen ist und daß unterschiedliche Muster der Myelin- und Oligodendrozytenschädigung innerhalb von MS-Läsionen existieren (Brück et al., 1994; Lucchinetti et al., 1996; Ozawa et al., 1994; Lucchinetti et al., 2000; Lucchinetti et al., 1999). Bezüglich der Oligodendrozytenpathologie wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Muster des Überlebens bzw. der Destruktion definiert. Eine Hauptgruppe von MS-Plaques zeigt entweder ein Überleben reifer Oligodendrozyten oder eine ausgeprägte Rekrutierung von Vorläuferzellen in die Plaques (Lucchinetti et al., 1999; Schönrock et al., 1998). Daraus resultiert eine rasche und suffiziente Remyelinisierung (Lassmann et al., 1997). Daneben zeigt sich eine große Gruppe von MS-Plaques, in denen Oligodendrozyten komplett zerstört werden und eine Remyelinisierung nicht möglich ist. Diese Untersuchungen führten zu der Hypothese, daß die Immunpathogenese der Entmarkung heterogen ist und daß verschiedene Effektormechanismen an der Plaqueentstehung beteiligt sind. Wir haben vier unterschiedliche immunpathogenetische Muster der Plaquebildung bei der MS herausarbeiten können (Lucchinetti et al., 2000). Diese beinhalten zum einen den Autoimmuntyp der Entmarkung mit T-Zell/Makrophagen- oder Antikörper/Komplement-mediierter Entmarkung, zum anderen oligodendrozytendystrophische Prozesse, die zu einer Degeneration der myelinbildenden Zellen mit daraus folgender Entmarkung führen. Verschiedene Effektormechanismen wie Zytokine oder Immunglobulin/Komplement-Komplexe spielen bei der aktiven Entmarkung eine entscheidende Rolle (Bitsch et al., 1998; Bitsch et al., 1999a; Bitsch et al., 2000a). Monozyten/Makrophagen sind die Hauptproduzenten dieser Zytokine, wobei diese Zellen bemerkenswerterweise nicht nur in Stadien der aktiven Myelinzerstörung im Plaque vorhanden sind (Brück et al., 1995a; Brück et al., 1996a; Bogumil et al., 1998). Gerade bei der frühen Remyelinisierung sind sie zahlreich in den Plaques nachweisbar, ohne daß ihre exakte Funktion bei diesem Prozeß bisher geklärt ist.

Der Zelltod wird durch zahlreiche fördernde und inhibierende Proteine reguliert. Das antiapoptotische bcl-2 Protein wird sowohl von T-Zellen als auch von Oligodendrozyten in Plaques exprimiert, wobei Patienten mit einem primär progressiven Verlauf eine deutlich höhere Expression in T-Zellen aufweisen als Patienten mit schubhaftem Verlauf, was die Bedeutung dieses Proteins für den Krankheitsverlauf unterstreicht (Zetzl et al., 1998). Die vermehrte Expression von bcl-2 durch Oligodendrozyten ist signifikant mit dem Nachweis von Remyelinisierung assoziiert (Kuhlmann et al., 1999) und eine Induktion von bcl-2 in einer Oligodendrozytenzelllinie ist mit einer Protektion vor TNF-induziertem Zelltod verbunden (Burgmaier et al., 2000). Die Expression des Zytokins IL-6 scheint ebenfalls mit einem Überleben von Oligodendrozyten in Plaques assoziiert zu sein (Schönrock et al., 2000). Neben der Oligodendrozytenpathologie spielt die Schädigung von Axonen in MS-Plaques eine entscheidende Rolle für die klinische Symptomatik der Patienten (Bitsch et al., 2000b; Mews et al., 1998). Die Axonreduktion im MS-Plaque trägt deutlich zur Hypointensität demyelinisierender Läsionen im T1-gewichteten MRT bei und die NAA-Reduktion bei der Magnetresonanztomographie korreliert signifikant mit der Axonreduktion im Plaque (Brück et al., 1997; Bitsch et al., 1999b).

Als elementares Modell der Zellinvasion in das geschädigte Nervensystem kann die Wallersche Degeneration herangezogen werden, bei der es aufgrund einer Schädigung der Nervenfasern zur Degeneration des Axons und der Myelinscheide kommt. Die Mechanismen der Zellrekrutierung in das Nervensystem, der Myelinabbau durch Makrophagen und deren regulatorische Grundlagen wurden in den letzten Jahren herausgearbeitet (Brück und Friede, 1989; Brück und Friede, 1990a; Brück und Friede, 1990b; Brück und Friede, 1991; Brück et al., 1992; Brück et al., 1995b; Brück et al., 1996b; Brück, 1997; da Costa et al., 1997; Vougioukas et al., 1998; Vougioukas et al., 2000; Liefner et al., 2000; Kuhlmann und Brück, 1999). Ein wesentlicher Fokus der Arbeiten liegt dabei auf der Definition von Chemokinen und Chemokinrezeptoren, die für die Zellinvasion in das Nervensystem von Bedeutung sind (Siebert et al., 2000).

Potentielle Reparaturmechanismen bei demyelinisierenden Erkrankungen wurden in den vergangenen Jahren anhand von Wirkmechanismen von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) untersucht. Aus dem

Tiermodell der Theiler's Virus Enzephalomyelitis ist bekannt, daß die Behandlung mit Immunglobulinen zu einer verbesserten Remyelinisierung führt (Asakura et al., 1997). Die Mechanismen für diesen Prozess sind jedoch unklar. Um herauszuarbeiten, ob die beobachtete Remyelinisierung durch direkte Aktivierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen erreicht wird oder ob es sich um einen indirekten immunmodulatorischen Effekt handelt, wurde der Einfluß von IVIg *in vitro* auf Oligodendrozyten und Mikroglia untersucht (Stangel and Compston, 2001; Stangel et al., 2000b; Stangel et al., 2000c; Stangel et al., 1999). Dabei stellte sich heraus, daß IVIg die Proliferation, Migration und Differenzierung von Oligodendrozyten nicht beeinflussen können, dagegen aber eine komplementvermittelte Schädigung der Oligodendrozyten verhindert werden kann. Weiterhin waren IVIg in der Lage, verschiedene Funktionen von Mikroglia zu modulieren. So erhöhte sich zusammen mit IFN- γ die Stickstoffmonoxid- (NO) Produktion, die Sekretion von TNF- α wurde erhöht und die Phagozytose konnte gehemmt werden. Neben diesen *in vitro* Untersuchungen wurden auch klinische Studien zur Remyelinisierung durch IVIg durchgeführt (Stangel et al., 2000a).

In direktem Bezug für das beantragte Vorhaben steht ein derzeit im Labor von Dr. Stangel laufendes Projekt zur Expression von Chemokinrezeptoren bei der Ratten OPC-Zelllinie CG4 sowie an Ratten-OPC aus Primärkulturen. Hierbei wurde zunächst die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 (an die ELR-positive CXC-Chemokine wie GRO- α und IL-8 binden) auf RNA-Ebene gezeigt. Um einen Artefakt der Zelllinie auszuschließen, wurde das CXCR2 Protein in OPC in Primärkulturen neugeborener Ratten immunzytochemisch nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind zur Publikation angenommen (Nguyen und Stangel, 2001). Bislang konnte in CG4 Zellen die mRNA auch für die Chemokine CCR1 und CCR3 nachgewiesen werden, wohingegen mRNA für CCR2, CCR4 und CCR5 nicht gefunden wurde. Das Vorhandensein weiterer Chemokinrezeptoren in der Zelllinie CG4 sowie in Primärkulturen wird zur Zeit untersucht.

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1 Ziele

Ziel des beantragten Vorhabens ist es, die Rolle des Chemokin-/Chemokinrezeptor-Systems bei der Myelinisierung und Remyelinisierung zu untersuchen. Das Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren während der physiologischen Myelinisierung soll sowohl bei der Maus als auch in humanem Hirngewebe bestimmt werden. Diese *in vivo* Daten sollen mit dem Expressionsmuster *in vitro* korreliert werden und die Funktionalität geprüft werden. Auf den CXCR2 Rezeptor, für den bislang die einzigen Daten für eine Bedeutung bei OPC vorliegen, soll ein Schwerpunkt gerichtet werden, indem die Myelinisierung bei CXCR2-defizienten Mäusen und auch die Funktion ihrer OPC *in vitro* untersucht werden soll.

Weiteres Ziel ist es, die Bedeutung des Chemokin-/Chemokinrezeptor-Systems bei der De- und Remyelinisierung zu untersuchen. Dafür soll das Tiermodell der MOG-induzierten EAE eingesetzt werden und das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren während der De- und Remyelinisierung bestimmt und mit dem der natürlichen Myelinisierung verglichen werden. In Vorversuchen zeigen sich in diesem Modell reproduzierbare demyelinisierte Läsionen sowie in den chronischen Läsionen (nach 40 Tagen) Hinweise auf Remyelinisierung. Im speziellen soll wieder die Rolle des CXCR2 mit Hilfe der EAE an den CXCR2-defizienten Mäusen geklärt werden. Die Bedeutung beim Menschen für die Remyelinisierung soll schließlich durch den Vergleich der Chemokinrezeptoren in remyelinisierenden und nicht remyelinisierenden MS-Läsionen untersucht werden.

Die funktionelle Relevanz der Chemokinrezeptoren soll in detaillierten *in vitro* Studien definiert werden. Die wichtigen Faktoren Migration und Proliferation werden dabei in unterschiedlichen funktionellen Assays geprüft. Es werden die Chemokinrezeptoren untersucht, die bei den Myelinisierungsuntersuchungen von Oligodendrozyten exprimiert gefunden wurden und deren Funktionalität durch Calcium-Einstrom gezeigt wurde. Ziel ist die Identifikation funktionell relevanter, oligodendroglialer Chemokinrezeptoren, die mit Migration, Proliferation und Myelinisierung assoziiert sind.

3.5.2 Arbeitsprogramm

Im einzelnen ist folgendes Arbeitsprogramm im Rahmen des geplanten Projektes angestrebt:

1. Analyse der exprimierten Chemokinrezeptoren während der Myelinisierung:

(i) Die Expression von Chemokinrezeptoren während der normalen Entwicklung des Maus-ZNS soll an histologischen Schnitten auf Protein- und auf mRNA-Ebene untersucht werden. Dabei soll das Muster der Chemokinrezeptorexpression von Oligodendrozyten während der Myelinisierung bestimmt werden. Hierfür sollen transgene Mäuse verwendet werden, die unter Kontrolle des Promotors für das Proteolipidprotein (PLP) das "green fluorescent protein" (GFP) exprimieren. Bei diesen GFP-PLP transgenen Tieren können myelinbildende Zellen besonders leicht verfolgt werden, da sie fluoreszierend markiert sind (Fuss et al., 2000). Die Untersuchungen sollen am Rückenmark erfolgen, da hier das Auftreten von Oligodendrozyten mit einer Ausbreitung von ventral nach dorsal gut charakterisiert ist (Miller, 1996). Untersucht werden sollen die Zeitpunkte E14, E18, neonatal, P4 und adulte Tiere. Immunhistochemische Doppelfärbungen für Chemokinrezeptoren und Myelinproteine sollen die Rezeptorexpression in Abhängigkeit vom Stadium der Myelinisierung aufzeigen. Diese Untersuchungen werden an dem dem SFB zugewiesenen Multiphotonen konfokalen Laser Scanning Mikroskop durchgeführt.

(ii) Entsprechende Untersuchungen sollen auch an humanem Rückenmark durchgeführt werden. Dabei wird auf paraffineingebettete Blöcke humaner Feten aus dem Institut für Neuropathologie zurückgegriffen, die im Rahmen der neuropathologischen Routinesektionsdiagnostik gesammelt wurden. Dieses Material ist hinsichtlich der Myelinprotein- und mRNA-Expression während der Myelinisierung bereits charakterisiert. Die Chemokinrezeptoren werden entweder immunhistochemisch oder mittels in situ Hybridisierung dargestellt, Oligodendrozyten werden mittels in situ Hybridisierung für PLP mRNA identifiziert.

(iii) Da bereits gezeigt wurde, daß das Chemokin GRO- α eine Rolle bei der Proliferation von OPC spielt, soll untersucht werden, ob die Myelinisierung bei transgenen Mäusen, denen der Rezeptor für GRO- α , der CXCR2, fehlt, genauso verläuft wie in Mäusen vom Wildtyp. CXCR2-K.O. Mäuse stehen kommerziell über Jackson Laboratories zur Verfügung. Der Verlauf der Myelinbildung soll histologisch mittels vergleichender Immunhistochemie für Myelinproteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert werden.

2. Analyse der exprimierten Chemokinrezeptoren während der Remyelinisierung:

Entsprechend der Versuche zur natürlichen Myelinisierung während der Entwicklung soll das Muster der exprimierten Chemokine bzw. der Chemokinrezeptoren auf OPC/Oligodendrozyten bei der Remyelinisierung bestimmt werden. Dafür sollen erneut mehrere Modelle eingesetzt werden:

(i) Im Tiermodell der durch MOG-Peptid₃₅₋₅₅ induzierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in der Maus (C57Bl) kommt es nach einer entzündlich medierten Demyelinisierung nach ca. 40 Tagen zu einer Remyelinisierung. Die Expression von Chemokinrezeptoren der remyelinisierenden Zellen soll untersucht werden, erneut an den GFP-PLP-Mäusen. In den CXCR2-K.O.-Mäusen soll geklärt werden, inwiefern die Remyelinisierung beeinträchtigt ist.

(ii) Die Bedeutung der Chemokinrezeptoren bei der Remyelinisierung bei humanen Erkrankungen soll an remyelinisierenden MS-Plaques untersucht werden. Im Institut für Neuropathologie steht eine große Sammlung von MS-Plaques aus Autopsie- und Biopsiegewebe zur Verfügung. Diese beinhalten zahlreiche remyelinisierende Läsionen, die ca. 30-40% aller Läsionen ausmachen. Dabei können früh und spät remyelinisierende Läsionen unterschieden werden.

3. In vitro Expression von Chemokinrezeptoren auf Oligodendroglia:

(i) Das Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren soll an OPC aus Primärkulturen von neugeborenen Mäusen in vitro untersucht werden. OPC sollen durch Immunpanning mit dem A2B5-Antikörper hoch angereichert werden (Shi et al., 1998). Alternativ könnten die fluoreszierenden OPC aus neugeborenen PLP-GFP Mäusen mittels FACS sortiert werden. Kontaminationen durch Mikroglia oder Astrozyten in der Präparation sollen durch Kontrolle mit Primern für mRNA von CD11b (Mikroglia) und GFAP (Astrozyten) mittels PCR ausgeschlossen werden. Die Chemokinrezeptoren sollen dann auf mRNA-Ebene (RT-PCR) und Proteinebene (Immunzytochemie) nachgewiesen werden.

(ii) An humanen oligodendroglialen Zellen soll das Expressionsmuster ebenfalls in vitro bestimmt werden. Hierzu werden immunhistochemische Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen OPC (A2B5) und die entsprechenden Chemokinrezeptoren durchgeführt. Es wird dabei auf adultes humanes Gewebe zurückgegriffen, das im Rahmen von neurochirurgischen Eingriffen entnommen wird. Es wird die Frage untersucht, ob Vorläuferzellen im adulten Gehirn ebenfalls Chemokinrezeptoren exprimieren.

4. Funktionelle Untersuchungen:

Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Chemokinrezeptorexpression sind von enormer Bedeutung für die Interpretation möglicher Befunde bei der Myelinisierung und Demyelinisierung. Voraussetzung für eine effektive Myelinisierung und Remyelinisierung durch Oligodendrozytenvorläuferzellen sind verschiedene Faktoren wie Migration, Proliferation und Differenzierung. Daher sollen detaillierte in vitro Untersuchungen zur Funktionalität der detektierten Chemokinrezeptoren durchgeführt werden, um die funktionelle Relevanz der exprimierten Chemokinrezeptoren nachzuweisen. Da Chemokinrezeptoren transmembrane G-Protein-gekoppelte Moleküle sind, kann nach Zugabe der entsprechenden Liganden (Chemokine) die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} in den Oligodendrozyten gemessen werden. Die Chemokinrezeptoren, durch die ein Ca^{2+} -Einstrom induziert wurde, werden in den Folgeexperimenten detailliert funktionell charakterisiert. Dabei sollen die Migration (Boyden Chamber) und die Proliferation (BrdU-Inkorporation) untersucht werden. Diese Experimente werden an OPC aus Maus-Primärkulturen durchgeführt. Welchen Einfluß der Chemokinrezeptor CXCR2 auf das Verhalten von OPC hat, soll wiederum an Zellen aus CXCR2-defizienten Mäusen geprüft werden. Unterschiedliche Kulturbedingungen werden eingesetzt, z.B. in Anwesenheit von Medium, welches durch Astrozyten konditioniert wurde. Von diesem Medium ist bekannt, daß es die Proliferation von OPC mittels GRO- α , einem Liganden von CXCR2, erhöhen kann (Robinson et al., 1998).

Im ersten Förderjahr sollen die Chemokine und Chemokinrezeptoren während der physiologischen Myelinisierung bei Maus und beim Menschen charakterisiert werden, sowie die Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf kultivierten OPC.

Im zweiten Förderjahr sollen die Untersuchungen auf die Remyelinisierung bei der EAE und bei MS Läsionen ausgeweitet werden. Weiterhin sollen die funktionellen Untersuchungen in vitro durchgeführt werden.

Im dritten Förderjahr werden parallele in vivo (EAE) und funktionelle in vitro Untersuchungen an Chemokinrezeptor-defizienten Tieren bzw. Zellen durchgeführt. Dabei liegt das Augenmerk auf den Rezeptoren, die sich bei der Myelinisierung als bedeutsam herausgestellt haben.

Die Arbeitsteilung zwischen den beiden Antragstellern ist wie folgt geplant. Die tierexperimentellen und histologischen Arbeiten mit Auswertung und Quantifizierung der Myelinisierung und Remyelinisierung, der Chemokinrezeptorexpression sowie die in situ Hybridisierung werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Brück vorgenommen. Die in vitro Arbeiten mit Aufreinigung der OPC sowie RT-PCR, Immunzytochemie und funktionelle Testung mit Proliferations- und Migrationsassays werden im Labor von Dr. Stangel vorgenommen.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Der SFB 507 beschäftigt sich mit der Rolle nicht-neuronaler Zellen bei Erkrankungen des Nervensystems. Das vorliegende Projekt fokussiert auf die Oligodendrozyten, die myelinbildenden Zellen des Zentralnervensystems. Oligodendrozyten sind das Ziel der Zerstörung bei Entmarkungserkrankungen. Das beantragte Projekt ergänzt ideal die bestehenden Teilprojekte im SFB507, da es sich im Detail mit Oligodendrozyten bei Myelinisierung und Remyelinisierung befasst. Eine Kooperation besteht im Rahmen des SFB mit Frau PD Dr. Frauke Zipp zur genetischen Prädisposition bei der MS sowie in dem von Frau Dr. Zipp beantragten Projekt bei der Untersuchung von MS-Plaques, die gemeinsam vorgenommen wird. Mit Prof. Dr. Jörg Weber besteht eine Zusammenarbeit bei der histologischen Charakterisierung der Meningitis, im Projekt von Prof. Weber anfallende Fragestellungen hinsichtlich Untersuchungen humaner Meningitis-Fälle (Autopsie) werden gemeinsam am Institut für Neuropathologie vorhandenen Gewebe bearbeitet. Kooperationen sind angestrebte mit Dr. Ingo Bechmann, wenn sich aus seinem Experimentalmodell Fragestellungen hinsichtlich einer entzündlichen Entmarkung ergeben. Die Untersuchungen zu Oligodendrozyten komplettieren somit die laufenden Studien zu anderen Gliazellen im SFB.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004				
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	
				IIa/2	2	96.000	IIa/2	2	96.000	IIa/2	2	96.000	
	zus.:			zus.:		96.000	zus.:		96.000	Zus.:		96.000	
SV			Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM			
			522	25.000	522	25.000	522	25.000	522	25.000			
I			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.				

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾ (einschl. Hilfskräfte)	1. Wolfgang Brück, Prof. Dr. med., Oberarzt 2. Martin Stangel, Dr. med., wiss. Mitarbeiter	1. Neuropathologi e 2. Neurologie	1. Institut für Neuropathologie der Charité 2. Klinik für Neurologie der FU Berlin	1. 5 2. 5		
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾²⁾ (einschl. Hilfskräfte)	1. N.N. X 2. N.N. X	1. Biologische/r Doktorand/in oder AiP/ÄiP 2. Biologische/r Doktorand/in	1. Institut für Neuropathologie der Charité 2. Klinik für Neurologie der FU Berlin	1. 38,5 2. 38,5		1. BAT IIa/2 2. BAT IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

1 Wolfgang Brück

Wolfgang Brück ist Teilprojektleiter. Er wird den/die beantragte/n Doktorand/in oder AiP/ÄiP bei der Projekt- und Experimentalplanung unterstützen sowie bei der Induktion der EAE anlernen.

2 Martin Stangel

Martin Stangel wird als Teilprojektleiter wesentlich bei der Durchführung und Planung der in vitro Experimente mitarbeiten.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

1 N.N.

Der/die Mitarbeiter/in wird immunhistochemische Untersuchungen und insitu Hybridisierungen durchführen. Dies betrifft die Experimente bei der Myelinisierung und Entmarkung im Rahmen der EAE. Er/sie wird die EAE in Mäusen induzieren, die Tiere neurologisch scoren sowie am Ende des Beobachtungszeitraums perfundieren. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen am konfokalen Lasermikroskop obliegt ihm/ihr ebenfalls.

2 N.N.

Der/die Mitarbeiter/in wird Primärkulturen von Oligodendrozyten anlegen und die RT-PCR für die zu untersuchenden Chemokinrezeptoren durchführen. Weiterhin wird er sämtliche funktionelle Untersuchungen an den Primärkulturen durchführen.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	10.000	10.000	10.000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	25.000	25.000	25.000

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Verbrauchsmittel (siehe Tabelle 2.4)
für 2002

Versuchstiere/Tierhaltung Zur Untersuchung der Myelinisierung werden PLP-GFP und CXCR2-defiziente Mäuse benötigt. Für PLP-GFP-Mäuse fallen die Haltungskosten (10 DM/Maus/Monat) an. CXCR2-defiziente Mäuse werden bei Jackson Lab. gekauft. Weiterhin werden ca. 200 neugeborene Mäuse (C57BL) zur Oligodendrozytengewinnung benötigt.	DM	5.000
Antikörper/Immunhistochemie Primär- und Sekundärantikörper werden für die Darstellung der Chemokinrezeptoren sowie der Myelinproteine benötigt.	DM	5.000
Reagentien für PCR	DM	8.000

Es werden Primer für die PCR aus Primärkulturen benötigt, weiterhin Reagentien für die in situ Hybridisierung

Zellkulturreagentien Diese werden für das Anlegen und Halten von Primärkulturen der Oligodendrozyten benötigt	DM	4.000
--	----	-------

Gewebeeinbettung/Chemikalien Paraffin/Araldit wird für die Gewebeeinbettung benötigt.	DM	3.000
--	----	-------

Verbrauchsmittel (siehe Tabelle 2.4)
für 2003

Versuchstiere/Tierhaltung Zur Untersuchung der EAE werden PLP-GFP und CXCR2-defiziente Mäuse benötigt. Für PLP-GFP-Mäuse fallen die Haltungskosten (10 DM/Maus/Monat) an. CXCR2-defiziente Mäuse werden bei Jackson Lab. gekauft. Weiterhin werden ca. 200 neugeborene Mäuse (C57BL) zur Oligodendrozytengewinnung benötigt.	DM	5.000
---	----	-------

Antikörper/Immunhistochemie Primär- und Sekundärantikörper werden für die Darstellung der Chemokinrezeptoren sowie der Myelinproteine benötigt.	DM	4.000
--	----	-------

Reagentien für PCR Es werden Primer für die PCR aus Primärkulturen benötigt, weiterhin Reagentien für die in situ Hybridisierung	DM	4.000
---	----	-------

Zellkulturreagentien Diese werden für das Anlegen und Halten von Primärkulturen der Oligodendrozyten benötigt	DM	4.000
--	----	-------

Chemokine Für die funktionellen Assays werden rekombinante Chemokine benötigt	DM	5.000
--	----	-------

Gewebeeinbettung/Chemikalien Paraffin/Araldit wird für die Gewebeeinbettung benötigt. Zur Induktion der EAE wird MOG-Peptid, CFA usw. benötigt	DM	3.000
---	----	-------

Verbrauchsmittel (siehe Tabelle 2.4)
für 2004

Versuchstiere/Tierhaltung Zur Untersuchung der EAE werden PLP-GFP und CXCR2-defiziente Mäuse benötigt. Für PLP-GFP-Mäuse fallen die Haltungskosten (10 DM/Maus/Monat) an. CXCR2-defiziente Mäuse werden bei Jackson Lab. gekauft. Weiterhin werden ca. 200 neugeborene Mäuse (C57BL) zur Oligodendrozytengewinnung benötigt.	DM	5.000
---	----	-------

Antikörper/Immunhistochemie Primär- und Sekundärantikörper werden für die Darstellung der Chemokinrezeptoren sowie der Myelinproteine benötigt.	DM	4.000
--	----	-------

Reagentien für PCR Es werden Primer für die PCR aus Primärkulturen benötigt, weiterhin Reagentien für die in situ Hybridisierung	DM	4.000
---	----	-------

Zellkulturreagentien Diese werden für das Anlegen und Halten von Primärkulturen der Oligodendrozyten benötigt	DM	4.000
Chemokine Für die funktionellen Assays werden rekombinante Chemokine benötigt	DM	5.000
Gewebeeinbettung/Chemikalien Paraffin/Araldit wird für die Gewebeeinbettung benötigt. Zur Induktion der EAE wird MOG-Peptid, CFA usw. benötigt	DM	3.000

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

entfällt

Literatur

- Asensio, V.C., Campbell, I.L. (1999) Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci.* 22, 504-512.
- Bitsch, A., Bruhn, H., Vougioukas, V., Stringaris, A., Lassmann, H., Frahm, J., Brück, W. (1999b) Inflammatory CNS demyelination: a comparison of biopsied lesion histopathology with quantitative proton magnetic resonance spectroscopy in vivo. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 20, 1619-1627.
- Bitsch, A., da Costa, C., Bunkowski, S., Weber, F., Rieckmann, P., Brück, W. (1998) Identification of macrophage populations expressing tumor necrosis factor- α mRNA in acute multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 95, 373-377.
- Bitsch, A., Kuhlmann, T., da Costa, C., Bunkowski, S., Polak, T., Brück, W. (2000a) Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia* 29, 366-375.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., Brück, W. (2000b) Axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123, 1174-1183.
- Bitsch, A., Wegener, C., da Costa, C., Bunkowski, S., Reimers, C.D., Prange, H.W., Brück, W. (1999a) Lesion development in Marburg's type of acute multiple sclerosis: from inflammation to demyelination. *Mult.Scler.* 5, 138-146.
- Bogumil, T., Rieckmann, P., Kubuschok, B., Felgenhauer, K., Brück, W. (1998) Serum levels of macrophage-derived protein MRP8/14 are elevated in active multiple sclerosis. *Neurosci.Lett.* 247, 195-197.
- Bolin, L.M., Murray, R., Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Schall, T.J., Bacon, K.B. (1998) Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. *J. Neuroimmunol.* 81, 49-57.
- Brück, W. (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* 7, 741-752.
- Brück, W., Bitsch, A., Kolenda, H., Brück, Y., Stiefel, M., Lassmann, H. (1997) Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann.Neurol.* 42, 783-793.
- Brück, W., Brück, Y., Friede, R.L. (1992) TNF- α suppresses CR3-mediated myelin removal by macrophages. *J.Neuroimmunol.* 38, 9-18.
- Brück, W., Brück, Y., Maruschak, B., Friede, R.L. (1995b) Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol.* 89, 363-367.
- Brück, W., Friede, R.L. (1989) Activation of macrophages by recombinant interferon-gamma has no effect on myelin phagocytosis but hinders invasion of nerves in organ culture. *J.Neuroimmunol.* 25, 47-55.
- Brück, W., Friede, R.L. (1990a) L-Fucosidase treatment blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *J.Neuroimmunol.* 27, 217-227.

- Brück,W., Friede,R.L. (1990b) Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol.* 80, 415-418.
- Brück,W., Friede,R.L. (1991) The role of complement in myelin phagocytosis during PNS Wallerian degeneration. *J.Neurol.Sci.* 103, 182-187.
- Brück,W., Huitinga,I., Dijkstra,C.D. (1996b) Liposome-mediated monocyte depletion during Wallerian degeneration defines the role of hematogenous phagocytes in myelin removal. *J.Neurosci.Res.* 46, 477-484.
- Brück,W., Porada,P., Poser,S., Rieckmann,P., Hanefeld,F., Kretzschmar,H.A., Lassmann,H. (1995a) Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann.Neurol.* 38, 788-796.
- Brück,W., Schmied,M., Suchanek,G., Brück,Y., Breitschopf,H., Poser,S., Piddlesden,S., Lassmann,H. (1994) Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 35, 65-73.
- Brück,W., Sommermeier,N., Bergmann,M., Zettl,U., Goebel,H.H., Kretzschmar,H.A., Lassmann,H. (1996a) Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiol.* 195, 588-600.
- Burgmaier,G., Schönrock,M.L., Kuhlmann,T., Richter-Landsberg,C., Brück,W. (2000) Association of increased bcl-2 expression with rescue from TNF- α induced cell death in the oligodendrocyte cell line OLN-93. *J.Neurochem.* 29, 1-2.
- Chang,A., Nishiyama,A., Peterson,J., Prineas,J., Trapp,B.D. (2000) NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J.Neurosci.* 20, 6404-6412.
- Compston, A., Zajicek, J., Sussman, J., Webb, A., Hall, G., Muir, D., Shaw, C., Wood, A., Scolding, N. (1997) Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J. Anat.* 190, 161-200.
- Copelman, C.A., Cuzner, M.L., Groome, N., Diemel, L.T. (2000) Temporal analysis of growth factor mRNA expression in myelinating rat brain aggregate cultures: increments in CNTF, FGF-2, IGF-I, and PDGF-AA mRNA are induced by antibody-mediated demyelination. *Glia* 30, 342-351.
- da Costa,C., van der Laan,L.J.W., Dijkstra,C.D., Brück,W. (1997) The role of the mouse macrophage scavenger receptor in myelin phagocytosis. *Eur.J.Neurosci.* 9, 2650-2657.
- Dubois-Dalcq,M. (1995) Regeneration of oligodendrocytes and myelin. *Trends Neurosci.* 18, 289-291.
- Fok-Seang, J., DiProspero, N.A., Meiners, S., Muir, E., Fawcett, J.W. (1998) Cytokine-induced changes in the ability of astrocytes to support migration of oligodendrocyte precursors and axon growth. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2400-2415.
- Franklin, R.J.M., Gilson, J.M., Blakemore, W.F. (1997) Local recruitment of remyelinating cells in the repair of demyelination in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 50, 337-344.
- Franklin, R.J.M., Hinks, G.L. (1999) Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *J. Neurosci. Res.* 58, 207-213.
- Franklin,R.J.M., Hinks,G.L. (1999) Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *J.Neurosci.Res.* 58, 207-213.
- Fuss,B., Mallon,B., Phan,T., Ohlemeyer,C., Kirchhoff,F., Nishiyama,A., Macklin,W.B. (2000) Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev.Biol.* 218, 259-274.
- Glabinski, A.R., Tani, M., Strieter, R.M., Tuohy, V.K., Ransohoff, R.M. (1997) Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 150, 617-630.
- Karpus, W.J., Ransohoff, R.M. (1998) Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: Temporal and spatial expression govern disease pathogenesis. *J. Immunol.* 161, 2667-2671.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Vargas Leal, V., Misgeld, T., Klinkert, W.E.F., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.-L., Bartke, I., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R. (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: A neuroprotective role in inflammation? *J. Exp. Med.* 189, 865-870.
- Kuhlmann,T., Brück,W. (1999) Immunoglobulins induce increased myelin debris clearance by mouse macrophages. *Neurosci.Lett.* 275, 191-194.
- Kuhlmann,T., Lucchinetti,C., Zettl,U.K., Bitsch,A., Lassmann,H., Brück,W. (1999) Bcl-2-expressing oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Glia* 28, 34-39.
- Lassmann,H., Brück,W., Lucchinetti,C., Rodriguez,M. (1997) Remyelination in multiple sclerosis. *Mult.Scler.* 3, 133-136.

- Liefner, M., Siebert, H., Sachse, T., Michel, U., Kollias, G., Brück, W. (2000) The role of TNF- α during Wallerian degeneration. *J. Neuroimmunol.* 108, 147-152.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 122, 2279-2295.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707-717.
- Lucchinetti, C.F., Brück, W., Rodriguez, M., Lassmann, H. (1996) Distinct patterns of Multiple Sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol.* 6, 259-274.
- Luster, A.D. (1998) Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436-445.
- McManus, C., Berman, J.W., Brett, F.M., Staunton, H., Farrell, M., Brosnan, C.F. (1998) MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J. Neuroimmunol.* 86, 20-29.
- Mennicken, F., Maki, R., de Souza, E.B., Quirion, R. (1999) Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 73-78.
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A.A., Bushell, T.J., Gray, P.W., Miller, R.J. (1998) Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 14500-14505.
- Mews, I., Bergmann, M., Bunkowski, S., Gullotta, F., Brück, W. (1998) Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions. *Mult. Scler.* 4, 55-62.
- Miller, R.H. (1996) Oligodendrocyte origins. *Trends Neurosci.* 19, 92-96.
- Nguyen, D., Stangel, M. (2001) Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in rat oligodendroglial cells. *Dev. Brain Res.*, im Druck
- Ozawa, K., Suchanek, G., Breitschopf, H., Brück, W., Budka, H., Jellinger, K., Lassmann, H. (1994) Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 117, 1311-1322.
- Prineas, J.W., Barnard, R.O., Kwon, E.E., Sharer, L.R., Cho, E.-S. (1993) Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann. Neurol.* 33, 137-151.
- Raine, C.S., Wu, E. (1993) Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 199-204.
- Robinson, S., Tani, M., Strieter, R.M., Ransohoff, R.M., Miller, R.H. (1998) The chemokine growth-regulated oncogene- α promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation. *J. Neurosci.* 15, 10457-10463.
- Rossi, D., Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217-242.
- Schönrock, L.M., Gawlowski, G., Brück, W. (2000) Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions. *Neurosci. Lett.* 294, 45-48.
- Schönrock, M.L., Kuhlmann, T., Adler, S., Bitsch, A., Brück, W. (1998) Identification of glial cell proliferation in early multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24, 320-330.
- Shi, J., Marinovich, A., Barres, B.A. (1998) Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J. Neurosci.* 18, 4627-4636.
- Siebert, H., Sachse, A., Kuziel, W.A., Maeda, N., Brück, W. (2000) The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J. Neuroimmunol.* 110, 177-185.
- Sorensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., Frederiksen, J.L., Ransohoff, R.M. (1999) Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Am. J. Pathol.* 103, 807-815.
- Stangel, M., Boegner, F., Klatt, C.H., Hofmeister, C., Seyfert, S. (2000a) A placebo-controlled pilot trial to study the remyelinating potential of intravenous immunoglobulins in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 89-92.
- Stangel, M., Compston, A. (2001) Polyclonal immunoglobulins (IVIg) modulate nitric oxide production and microglial functions in vitro via Fc receptors. *J. Neuroimmunol.* 112, 63-71.
- Stangel, M., Compston, A., Scolding, N.J. (1999) Polyclonal immunoglobulins for intravenous use do not influence the behaviour of cultured oligodendrocytes. *J. Neuroimmunol.* 96, 228-233.

- Stangel, M., Compston, A., Scolding, N.J. (2000b) Oligodendroglia are protected from antibody mediated complement injury by normal immunoglobulins ("IVIg"). *J. Neuroimmunol.* 103, 195-201.
- Stangel, M., Joly, E., Scolding, N.J., Compston, D.A.S. (2000c) Normal polyclonal immunoglobulins ("IVIg") inhibit microglial phagocytosis *in vitro*. *J. Neuroimmunol.* 106, 137-144.
- Tourbah, A., Linnington, C., Bachelin, C., Avellana-Adalid, V., Wekerle, H., Baron-Van Evercooren, A. (1997) Inflammation promotes survival and migration of the CG4 oligodendrocyte progenitors transplanted in the spinal cord of both inflammatory and demyelinated EAE rats. *J. Neurosci. Res.* 50, 853-861.
- van der Meer, P., Goldberg, S.H., Fung, K.M., Sharer, L.R., Gonzalez-Scarano, F., Lavi, E. (2001) Expression pattern of CXCR3, CXCR4, and CCR3 chemokine receptors in the developing human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 25-32.
- Vougioukas, V.I., Roeske, S., Brück, W. (2000) Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in myelin recognition by macrophages. *Acta Neuropathol.* 99, 673-679.
- Vougioukas, V.I., Roeske, S., Michel, U., Brück, W. (1998) Wallerian degeneration in ICAM-1-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 152, 241-249.
- Wells, T.N.C., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I. (1998) Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 376-380.
- Wolswijk, G. (1998) Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J. Neurosci.* 18, 601-609.
- Woodruff, R.H., Franklin, R.J.M. (1997) Growth factors and remyelination. *Histol. Histopathol.* 12, 459-466.
- Wu, Q., Miller, R.H., Ransohoff, R.M., Robinson, S., Bu, J., Nishiyama, A. (2000) Elevated levels of the chemokine GRO-1 correlate with elevated oligodendrocyte progenitor proliferation in the *jimpy* mutant. *J. Neurosci.* 20, 2609-2617.
- Zettl, U.K., Kuhlmann, T., Brück, W. (1998) Bcl-2 expressing T lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24, 202-208.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt <B13>

3.1.1 Thema:

Antigenpräsentation im Gehirn: Mechanismen des Immunprivilegs

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neuroimmunologie

3.1.3 Leiter/in:

Dr. med. Bechmann, Ingo, 28.10.1968

Dr. rer. nat. Gimsa, Ulrike, 3.9.1967

Institut für Anatomie, AG Zell- und Neurobiologie
Universitätsklinikum Charité, 10098 Berlin

Telefon: 030/2802-8455

030/2802-3877

Telefax: 030/2802-1460

030/2802-1460

E-Mail: ingo.bechmann@charite.de

ulrike.gimsa@charite.de

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

Ja, befristet bis zum 31.10.2006 (I.B.).

Ja, befristet bis zum 31.12.2005 (U.G.).

3.1.4 Neuantrag

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

Eine Genehmigung für die hier beschriebenen Experimente liegt vor (G0155/00).

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
2002	54.000	20.000		74.000
2003	54.000	20.000		74.000
2004	54.000	20.000		74.000

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Als Schutz vor Zellverlust durch Inflammation sind Antigen-spezifische Immunantworten im Zentralnervensystem (ZNS) unterdrückt. Dieser als Immunprivileg bezeichnete Zustand zeigt sich eindrucksvoll im Überleben allogenetischer Transplantate im Parenchym. Dabei ist Immunprivileg nicht, wie früher angenommen, allein durch Gewebebarrieren bedingt, die Antigen-spezifische Interaktionen verhindern, sondern scheint ein organspezifisch regulierter Mechanismus von Toleranz nach Antigenpräsentation zu sein. So wurde in jüngster Zeit gezeigt, daß ZNS-Antigen-spezifische T-Zellen im ZNS irreversibel anerg werden und daß die Injektion eines Antigens ins Gehirn zu einer Immunde- viation führt, die der Immunde- viation in der ebenfalls immunprivilegierten vorderen Augenkammer ähnlich ist. Die Mechanismen, von denen diese Form der Toleranz im Gehirn abhängt, sind derzeit unbekannt.

In diesem Projekt wollen wir deshalb die Immunantwort nach Antigenpräsentation im Gehirn in zwei Modellen, der entorhinalen Läsion und der intraparenchymalen Injektion von basischem Myelinprotein (MBP) als Selbst- und Ovalbumin (OVA) als Fremdan- tigen, im Hinblick auf die dadurch auftretende T-Zell-Differenzierung zellbiologisch und histologisch untersuchen. Durch Blockade von Kandidatenmolekülen nach Antigeninjektion wollen wir dann mögliche Mechanismen identifizieren, die die Immunde- viation/das Immunprivileg regulieren. Zudem wollen wir in diesem Modell die Hypothese verfolgen, daß sich durch experimentell gesetzte *Danger*-Signale und die Injektion ex vivo isolierter Dendritischer Zellen Toleranz gegenüber Autoantigenen im Gehirn aufheben und Autoimmunität erzeugen läßt.

3.3 Stand der Forschung

Die Frage, wie die delikate Balance der Toleranz gegenüber Antigenen des ZNS (Husbey und Goverman 2000) aufrecht erhalten wird, ist unzureichend verstanden. Einerseits sind Mechanismen zentraler und peripherer Toleranz für Antigene des ZNS unzureichend, was sich in der physiologischen Präsenz Myelin-spezifischer T-Zellen widerspiegelt (Burns et al. 1983, Schlüsener und Wekerle 1985), die unter noch zu identifizierenden Bedingungen expandieren können. Dadurch wird das ZNS Ziel autoimmuner Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS). Andererseits werden (Auto-) Antigene im ZNS erst nach peripherer Immunisierung attackiert (Freund et al. 1947), ein Zustand, der als Immunprivileg bezeichnet wird und sich deutlich in der Toleranz allogenetischer Transplantate im ZNS manifestiert (Medawar 1948). Die biologische Funktion von Immunprivileg im Gehirn läßt sich als Schutzmechanismus des Gewebes vor Zellverlust durch Inflammation interpretieren, der durch die Komplexität der Verschaltung und den postmitotischen Zustand neuronaler Zellpopulationen schwer zu kompensieren ist. Der Preis für unterdrückte Immunantworten im ZNS ist neben dem Verbleib von Pathogenen (Perry 1998) eine mangelnde Regeneration nach mechanischen Verletzungen (Schwartz et al. 1999), so daß das Verständnis der Regulation des Immunprivilegs therapeutische Ansatzpunkte zur Verbesserung der Regeneration nach Läsionen geben könnte, wenn die intrinsische Immunsuppression moduliert werden könnte, ohne damit destruktive Autoimmunität zu erzeugen. In der Tat führt mechanische axonale Läsion zur Expansion Myelin-spezifischer T-Zell Klone bei Menschen (Kil et al. 1999) und Ratten, deren adoptiver Transfer eine der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) ähnliche Erkrankung induziert (Popovich et al. 1996). Im primär geschädigten Organismus tritt dagegen eine solche Form der Autoimmunität nicht auf (Goddin et al. 1999), was nahelegt, daß mechanische Läsionen zusätzliche

Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs bzw. zum Schutz vor destruktiver Autoimmunität etwa in Form der Expression von Todesliganden (Bechmann et al. 1999, Moalem et al. 1999, Bechmann et al. 2000) induzieren. Insofern läßt sich die derzeit unverstandene Pathogenese von Autoimmunerkrankungen des ZNS eventuell teilweise als Dysregulation des Immunprivilegs beschreiben (Weller et al. 1996).

Medawar (1948) berichtet als erster, daß allogenetische Hauttransplantate im Gehirn von Hasen nicht abgestoßen werden, solange eine periphere Immunisierung unterbleibt. Dieser von ihm als Immunprivileg bezeichnete Zustand hat sich im folgenden in einer Reihe experimenteller Paradigmen für Transplantate im Gehirn auch von Mäusen und Ratten bestätigt (z.B. Head und Griffin 1985, Widner et al. 1989, Duan et al. 1997). Da das Immunprivileg für Transplantate nach peripherer Immunisierung, also etwa durch eine zweite Transplantation von Haut in die Bauchhaut, zusammenbricht, schloß schon Medawar, daß das Gehirn nicht prinzipiell unzugänglich für das Immunsystem ist, sondern durch Gewebebarrieren des afferenten Schenkels (Mangel an lymphatischem Abfluß) und des efferenten Schenkels des Immunsystems (Blut-Hirn-Schranke) Antigene ignoriert werden. Wenn dieser Mangel durch periphere Immunisierung umgangen wird, ist eine destruktive Immunantwort im ZNS dagegen möglich (*"A lymphatic drainage is required to create a state of immunity but not necessary to enforce a response to grafts". "It is concluded that skin homografts transplanted to brain submit to but cannot elicit an immune state." Medawar 1948*).

Diese Vorstellung wurde eingeschränkt, als deutlich wurde, daß Antigene aus dem ZNS über die Perineuralscheiden und die Lamina cribrosa in die zervikalen Lymphknoten drainieren (Cserr und Knopf 1992), wo sie die Bildung Antigen-spezifischer Antikörper induzieren. Die starke humorale Antwort zervikaler Lymphknoten nach Injektion von Ovalbumin ins ZNS oder die Liquorräume scheint aber von ZNS-spezifischen Signalen abhängig zu sein, da sich ähnliche Antworten nach Antigen-Injektion in die Mucosa der Nase, die auch in die zervikalen Lymphknoten drainiert, nicht induzieren ließen (Gordon et al. 1992). Während die Antikörperproduktion nach Antigeninjektion ins ZNS als Hinweis für eine Th2 Antwort gewertet werden kann (Harling-Berg et al. 1999), sind Th1 Antworten nach Antigenpräsentation bzw. Mechanismen der Th2/Th1-Konversion kaum untersucht. Die Bedeutung der zervikalen Lymphknoten für die Initialphase von Th1-Immunantworten gegen ZNS-Antigene ist aber in vivo gezeigt worden (Philips et al. 1997).

Auch die Vorstellung der Blut-Hirn-Schranke als mechanischer Barriere für Leukozyten als Ursache für Immunprivileg konnte nicht aufrecht erhalten werden, weil mehrere Arbeiten zeigten, daß aktivierte T-Zellen ungehindert ins ZNS eindringen (Hickey et al. 1992, Wekerle et al. 1993) und im Falle einer Antigen-spezifischen Interaktion dort verbleiben (Zeine und Owens 1992). Die Gewebebarrieren für den afferenten und den efferenten Schenkel des Immunsystems im ZNS sind also unvollkommen. Vor dem Hintergrund der Vorstellung, daß die Aktivierung naiver T-Zellen in den lymphatischen Organen und Geweben hauptsächlich zu deren Proliferation führt, während die Restimulation in den Zielorganen Effektor-Funktionen, ein Mangel an Restimulation dagegen Anergie induziert (Abkar et al. 1991), gilt nun der Regulation von T-Zellen im Zielgewebe ZNS ein besonderes Interesse.

Seit den Neunziger Jahren werden dort synergistisch wirkende Mechanismen für Immunprivileg diskutiert (Streilein 1996). Dazu gehören die Expression anti-inflammatorischer Cytokine durch Astrozyten (Hailer et al. 1997), die u.a. die Expression von MHC-II auf lokalen Antigen-präsentierenden Zellen niedrig halten (Panek und Benveniste 1985), und die Expression von Todesliganden (Gold et al. 1997), die infiltrierende T-Zellen durch die Induktion von Apoptose aus dem Gewebe entfernen, wie es auch für andere immunprivilegierte Organe postuliert wurde (Bellgrau et al. 1995, Griffith et al. 1995). Tatsächlich wurde schon 1991 die Apoptose von T-Zellen in der Experimentellen Allergischen Encephalomyelitis (EAE) beschrieben (Pender et al. 1991). Zudem wurde gezeigt, daß die intrinsischen Apoptose-induzierenden Signale des ZNS weniger in den perivaskulären Räumen, sondern vorwiegend im Parenchym liegen müssen, wo sie T-Zellen unabhängig von deren Antigen-Spezifität betreffen (Bauer et al. 1998). Zwei Todesliganden wurden bislang im EAE-Modell funktionell charakterisiert: Tumornekrose-Faktor (TNF), der über TNF-Rezeptor-1 T-Zell-Apoptose induziert (Bachmann et al. 1999), und Fas-Ligand (CD95-Ligand) (Sabelko-Downes et al. 1999, Wildbaum et al. 2000), der auf Zellen des Gehirns exprimiert wird (Bechmann et al. 1999, Bechmann et al. 2000). Allerdings sind die

Mechanismen, die eine EAE terminieren, nicht gleichzusetzen mit denjenigen Mechanismen, die das Immunprivileg aufrecht erhalten, da das Immunprivileg wie oben ausgeführt durch die zur Induktion der EAE verwendete periphere Immunisierung zusammenbricht (Medawar 1948). Ob die Induktion von Apoptose im Allgemeinen und die Expression bestimmter Todesliganden im Speziellen auch für den Toleranzerhalt nach mechanischer Schädigung eine Rolle spielt, wird nun zu untersuchen sein.

Für die Antigen-spezifische Aktivierung des Immunsystems bzw. der Unterscheidung zwischen gefährlichen Fremdanitgenen und "Selbst" liegen mehrere Modelle vor. Die *localization-dose-time*-Hypothese (Zinkernagel 2000) argumentiert etwa, daß eine spezifische Immunantwort nur folgen kann, wenn das entsprechende Antigen nicht nur lokal (im Gehirn also durch Mikrogliazellen), sondern in ausreichender Menge und für eine gewisse Zeitspanne in den Lymphknoten präsentiert wird. Die *Danger*-Hypothese (Matzinger 1994; Anderson und Matzinger 2000) postuliert, daß die Entscheidung zwischen Toleranz und Autoimmunität vom Aktivierungszustand Antigenpräsentierender (AP)-Zellen in den lymphatischen Organen *und* peripher abhängt: Periphere Antigenpräsentation unter physiologischen Bedingungen erfolgt nach dieser Vorstellung durch "nicht-aktivierte" AP-Zellen lediglich über MHC-II Moleküle (Signal 1), was zu T-Zell-Anergie führt und daher einen entscheidenden Mechanismus peripherer Toleranz darstellt (Gallucci et al. 1999). Erst durch die Induktion kostimulatorischer B7-Moleküle (Signal 2) auf AP-Zellen durch proinflammatorische Moleküle als *danger*-Signale oder durch CD40-Ligation kommt es diesem Modell zufolge zur vollen Aktivierung von Effektor-T-Zellen. In ähnlicher Weise betonen neuere Vorstellungen des Immunprivilegs von Geweben (Streilein 1996, Schwartz 2001) die (De-)Aktivierung von T-Zellen als ein lokales, gewebespezifisches Geschehen, das durch den Dialog von T-Zellen mit lokalen, in einem bestimmten, für das Immunprivileg notwendigen Zytokinmuster agierenden AP-Zellen determiniert wird (Gao et al. 1998; Wenkel et al. 2000; Brabb et al. 2000).

Der Verbleib aktivierter T-Zellen im ZNS nach Antigen-spezifischer Interaktion (Zeine und Owens 1992) weist in der Tat klar auf eine funktionell relevante Interaktion von T-Zellen mit lokalen AP-Zellen im Gehirn hin. Dabei besteht mittlerweile breiter Konsens, daß Mikrogliazellen die lokalen AP-Zellen des ZNS repräsentieren, die allerdings spezifische Unterschiede im Vergleich zu Makrophagen und Dendritischen Zellen aufweisen (Shrikant und Benveniste 1996; Ma und Streilein 1999). Mikroglia kann zu Makrophagen-ähnlichen Zellen reifen und ist dann fähig, proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- α), antiinflammatorische Zytokine (IL-10, TGF- β , Prostaglandin E2) sowie Leukozyten-attrahierende Chemokine zu exprimieren (Merrill und Benveniste 1996; Ransohoff 1997; Minghetti and Levi 1998). Die Hochregulation von MHC-II-Komplexen sowie Adhäsions- und kostimulatorischer Moleküle (CD11a, LFA-1, VLA-4, ICAM-1, CD40, B7-1 und B7-2) auf Mikroglia nach verschiedensten Stimuli legt nahe, daß Mikroglia zur weiteren Aktivierung von T-Zellen in situ beitragen kann (De Simone et al. 1995; Gerritse et al. 1996, Kreutzberg 1996, Hailer et al. 1997, Aloisi et al. 2000a; Aloisi et al. 2000b), während Astrozyten modulierend auf die lokale Antigenpräsentation einzuwirken scheinen (Hailer et al. 1997).

Gegensätzlich wird diskutiert, ob Mikrogliazellen als lokale AP-Zellen des Gehirns in der Tat auch naive T-Zellen stimulieren und damit spezifische Immunantworten initiieren können (Carson et al. 1998, Krakowski und Owens 2000). Nach Aktivierung mit GM-CSF, IFN-gamma und CD40L konnte in vitro B7-1 Expression auf Mikroglia induziert werden, was mit der Fähigkeit einhergeht, naive T-Zellen zu stimulieren. Dagegen wurde diese Fähigkeit nach Stimulation mit IFN-gamma alleine nicht erreicht. Aus der Interaktion solcher B7-2⁺/B7-1⁻ Mikroglia mit MBP-spezifischen CD4-T-Zellen unter Zugabe von MBP_{Ac1-11} resultierte T-Zell-Anergie (Matyszak et al. 1999) oder -unter etwas anderen Bedingungen- Apoptose (Ford et al. 1996). Dies fügt sich in jüngste Ergebnisse, daß Antigenpräsentation im ZNS zu einer Form von Toleranz führt, die von irreversibler T-Zell-Anergie (Brabb et al. 2000) und von Immundeavation (Wenkel et al. 2000) gekennzeichnet ist, widerspricht aber den "Two-Signal" Hypothesen, die unter Bedingungen einer Antigenpräsentation über MHC-II und B7 T-Zell-Aktivierung voraussagen. Die Injektion von Ovalbumin als Fremdanitgen ins Parenchym des ZNS führte zu einer der Immundeavation der vorderen Augenkammer (Streilein und Niederkorn 1985) ähnlichen Form der Toleranz, die sich in Ausfall der *delayed-type-hypersensitivity* (DTH) nach Antigeninjektion ins Ohr nach vorangegangener Injektion ins immunprivilegierte Organ zeigt. Diese als *BRAID* (*brain-associated immune deviation*) bezeichnete Immundeavation läßt sich unabhängig von einer intakten Blut-Hirn-

Schranke induzieren, geht aber dann verloren, wenn das Antigen in eine Region injiziert wird, in der zuvor die Aktivierung von Mikrogliazellen durch mechanische Läsionen induziert wurde (Wenkel et al. 2000). Da sich *BRAID* durch Injektion von Zellen der zervikalen Lymphknoten adoptiv transferieren läßt, kann die Bildung regulatorischer T-Zellen angenommen werden. Ob solche Zellen lokal im ZNS gebildet werden und dann in die zervikalen Lymphknoten migrieren, oder ob - in Analogie zur vorderen Augenkammer (Streilein et al. 1997) - Dendritische Zellen in lymphatische Organe wandern, um deviante Immunantworten zu induzieren, wird noch zu klären sein. Im Parenchym des intakten Gehirns können Dendritische Zellen als professionelle AP-Zellen nicht detektiert werden, wohl aber in der Pia mater (McMenamin 1999). Inwieweit Läsionen des Gehirns zur Rekrutierung solcher Zellen führt, wird von uns und anderen derzeit untersucht.

Zusammengenommen zeigen diese Befunde, daß das Immunsystem nicht ignorant gegenüber Antigenen im ZNS ist, sondern selbst gegenüber Fremdanitigenen aktiv Toleranz induziert wird. Durch die Interaktion mit Mikrogliazellen scheinen physiologischerweise ins ZNS eindringende T-Zellen (Hickey et al. 1992, Wekerle et al. 1993) normalerweise deaktiviert zu werden. Dieser Effekt geht aber dann verloren, wenn es zur Reifung von Mikrogliazellen zu voll kompetenten AP-Zellen (oder zur Rekrutierung von Dendritischen Zellen) kommt, die dann nicht mehr Anergie von T-Zellen, sondern Effektor-Funktionen induzieren oder sogar naive T-Zellen primen können (Matyszak et al. 1996, Wenkel et al. 2000). Für die Pathogenese von Autoimmunität im Gehirn wird dadurch folgende Hypothese denkbar:

Für sich harmlose und kontrollierbare Läsionen etwa in Form einer (lokalen) Virusinfektion führen durch die Sekretion pro-inflammatorischer Signale zur Reifung von Mikroglia oder zur Rekrutierung von Dendritischen Zellen, die lokal geschädigtes Material phagozytieren und präsentieren. Da Mechanismen zentraler und peripherer Toleranz für Autoantigene des ZNS unzureichend sind, können lokale Mikrogliazellen oder Dendritische Zellen (nach Migration in die Lymphknoten) auf naive, selbst-spezifische T-Zellen treffen, die dann expandieren und weite Bereiche des ZNS infiltrieren, wo sie Gewebeschäden verursachen. Solange eine maximale Reifung von Mikroglia/Rekrutierung von Dendritischen Zellen unterbleibt, führt die Präsentation von Selbstantigen dagegen zur Bildung regulatorischer T-Zellen und/oder zu Toleranz durch Induktion von T-Zell-Anergie.

Neben der Charakterisierung der T-Zell-Antwort nach Autoantigenpräsentation unter den Bedingungen einer minimalen Schädigung im ZNS und der Identifikation von Mechanismen des physiologischen Immunprivilegs wollen wir diese Hypothese im Rahmen dieses Projektes untersuchen.

Zitierte Literatur:

- Abkar AN, Salmon M, Janossy G (1991) The synergy between naive and memory T cells during activation. **Immunol. Today** 12:184-8.
- Aloisi F, Serafini B, Adorini L (2000a) Glia-T cell dialogue. **J. Neuroimmunol.** 107(2): 111-7.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000b) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. **Immunol. Today** 21(3): 141-7.
- Anderson CC, Matzinger P (2000) Danger: The view from the bottom of the cliff. **Sem. Immunol.** 12: 231-8.
- Bachmann R, Eugster HP, Frei K, Fontana A, Lassmann H (1999) Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. **Am. J. Pathol.** 154(5):1417-22.
- Bauer J, Bradl M, Hickley WF, Forss-Petter S, Breitschopf H, Linington C, Wekerle H, Lassmann H. (1998) T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. **Am. J. Pathol.** 153(3):715-24.
- Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunologic al brain barrier. **Glia** 27(1):62-74.

- Bechmann I, Lossau S, Steiner B, Mor G, Gimsa U, Nitsch R (2000) Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and FasL (CD95L) expression, but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. **Glia** 32: 25-41.
- Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R (2001) Presence of B-7.2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo. **FASEB J.** (im Druck).
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. **Nature** 377(6550):630-2.
- Brabb T, von Dassow P, Ordonez N, Schnabel B, Duke B, Goverman J (2000) In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity. **J. Exp. Med.** 192(6):871-80.
- Burns J, Rosenzweig A, Zweiman B, Lisak RP (1983) Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. **Cell. Immunol.** 81(2):435-40
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D (1998) Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. **Glia** 22(1):72-85.
- Cserr-HF; Knopf-PM (1992) Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. **Immunol. Today** 13(12): 507-12.
- De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C, Aloisi F (1995) The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 54(2): 175-87.
- Duan WM, Cameron RM, Brundin P, Widner H (1997) Rat intrastriatal neural allografts challenged with skin allografts at different time points. **Exp. Neurol.** 148(1):334-47.
- Ford AL, Foulcher E, Lemckert FA, Sedgwick JD (1996) Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. **J. Exp. Med.** 184(5):1737-45.
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. **Nat. Med.** 5(11): 1249-55.
- Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS, Ferguson TA (1998) Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. **J. Exp. Med.** 188(5): 887-96.
- Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E (1996) CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 93(6): 2499-504.
- Gordon LB, Knopf PM, Cserr HF. (1992) Ovalbumin is more immunogenic when introduced into brain or cerebrospinal fluid than into extracerebral sites. **J. Neuroimmunol.** 40(1):81-7.
- Goddin DS, Ebers GC, Johnson KP, Rodriguez M, Sibley WA, Wolinsky JS (1998) The relationship of MS to physical trauma and psychological stress: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology** 52(9):1737-45.
- Gold R, Hartung HP, Lassmann H. (1997) T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. **Trends Neurosci.** 20(9):399-404.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. **Science** 270(5239):1189-92.
- Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S, Nitsch R (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. **Hippocampus** 7(3): 341-9.
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. **Brain Pathol.** 8(3):459-74.
- Harling-Berg CJ, Park TJ, Knopf PM (1999) Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. **J. Neuroimmunol.** 101(2): 111-27.
- Head JR, Griffin WS. (1985) Functional capacity of solid tissue transplants in the brain: evidence for immunological privilege. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 224(1236):375-87.
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 51(3):246-56.
- Huseby ES, Goverman J (2000) Tolerating the nervous system: a delicate balance. **J. Exp. Med.** 191(5): 757-60.

- Kil K, Zang YC, Yang D, Markowski J, Fuoco GS, Vendetti GC, Rivera VM, Zhang JZ. (1999) T cell responses to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 98(2):201-7
- Krakowski ML, Owens T. (2000) Naive T lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation. **Eur. J. Immunol.** 30(4):1002-9.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.** 19(8):312-8.
- Ma N, Streilein JW (1999) T cell immunity induced by allogeneic microglia in relation to neuronal retina transplantation. **J. Immunol.** 162(8): 4482-9.
- Matyszak MK, Denis-Donini S, Citterio S, Longhi R, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P (1999) Microglia induce myelin basic protein-specific T cell anergy or T cell activation, according to their state of activation. **Eur. J. Immunol.** 29(10):3063-76.
- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. **Annu. Rev. Immunol.** 12: 991-1045.
- McMenamin PG (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. **J. Comp. Neurol.** 405(4):553-62.
- Medawar PB (1948) Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye., **British J. Exp. Pathol.** 29: 58-69.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. (2000) How does the immune system distinguish self from nonself? **Semin. Immunol.** 12(3):185-8.
- Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. **Trends Neurosci.** 19(8): 331-8.
- Minghetti L, Levi G (1998) Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanooids and nitric oxide. **Prog. Neurobiol.** 54(1): 99-125.
- Murphy JB, Sturm E (1923) Conditions determining the transplantability of tissues in the brain. **J. Exp. Med.** 38: 183-97.
- Moalem G, Monsonogo A, Shani Y, Cohen IR, Schwartz M. (1999) Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. **FASEB J.** 13(10):1207-17.
- Panek RB, Benveniste EN. (1995) Class II MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN-gamma, TNF-alpha, and TGF-beta. **J. Immunol.** 154(6):2846-54.
- Pender MP, Nguyen KB, McCombe PA, Kerr JF. (1991) Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. **J. Neurol. Sci.** 104(1):81-7.
- Perry VH. (1998) A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. **J. Neuroimmunol.** 90(2):113-21.
- Phillips MJ; Needham M; Weller RO (1997) Role of cervical lymph nodes in autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. **J. Pathol.** 182(4): 457-64.
- Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC (1996) Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. **J. Neurosci. Res.** 45(4): 349-63.
- Ransohoff RM (1997) Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology. **J. Leukoc. Biol.** 62(5): 645-52.
- Sabelko-Downes KA, Cross AH, Russell JH (1999) Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis. **J. Exp. Med.** 189(8):1195-205.
- Schluesener HJ; Wekerle H (1985) Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. **J. Immunol.** 135(5): 3128-33.
- Shrikant P, Benveniste EN (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. **J. Immunol.** 157(5): 1819-22.
- Schwartz M, Cohen I, Lazarov-Spiegler O, Moalem G, Yoles E. (1999) The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair. **J. Mol. Med.** 77(10):713-7.
- Schwartz M, Moalem G (2001) Beneficial immune activity after CNS injury: prospects for vaccination. **J. Neuroimmunol.** 113:185-92.
- Steinman RM. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.** 9:271-96.

- Streilein JW, Niederkorn JY (1985) Characterization of the suppressor cell(s) responsible for anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced in BALB/c mice by P815 cells. **J. Immunol.** 134(3): 1381-7.
- Streilein JW (1996) Peripheral tolerance induction: lessons from immune privileged sites and tissues. **Transplant. Proc.** 28(4): 2066-70.
- Streilein JW, Takeuchi M, Taylor AW (1997) Immune privilege, T-cell tolerance, and tissue-restricted autoimmunity. **Hum. Immunol.** 52(2):138-43.
- Wekerle H (1993) Lymphocyte traffic to the brain., In: The Blood-Brain Barrier, (W. M. Pardridge, ed., New York, Raven Press, pp 67-85.
- Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ (1996) Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. **Brain Pathol.** 6(3):275-88
- Wenkel H, Streilein JW, Young MJ (2000) Systemic immune deviation in the brain that does not depend on the integrity of the blood-brain barrier. **J. Immunol.** 164(10): 5125-31.
- Widner H, Brundin P, Bjorklund A, Moller E. (1989) Survival and immunogenicity of dissociated allogeneic fetal neural dopamine-rich grafts when implanted into the brains of adult mice. **Exp. Brain Res.** 76(1):187-97.
- Wildbaum G, Westermann J, Maor G, Karin N. (2000) A targeted DNA vaccine encoding fas ligand defines its dual role in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Clin. Invest.** 106(5):671-9.
- Zeine R, Owens T (1992) Direct demonstration of the infiltration of murine central nervous system by Pgp-1/CD44high D45RB(low) CD4+ T cells that induce experimental allergic encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.** 40(1):57-69.
- Zinkernagel RM (2000) Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. **Sem. Immunol.** 12:163-71.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Die Antragsteller befassen sich mit der Frage der Interaktion von Mikrogliazellen und T-Zellen, insbesondere der Präsentation von Myelin und der differentiellen Effekte Th1 und Th2 differenzierter T-Zellen auf Mikroglia im Kontext primär nicht-immunologischer Schädigungen. Zur Untersuchung dieser Frage wurde die organotypische entorhinal-hippocampale Schnittkultur und das Modell der stereotaktischen entorhinalen Läsion (ECL) verwendet (Bergmann et al. 1997), da mit der Verbindung des entorhinalen Cortex mit dem Hippocampus, dem Traktus perforans, ein stark myelinisierter Fasertrakt vorliegt, der sich selektiv in vivo und in vitro schädigen läßt. Dies erlaubt die Untersuchung immunologischer Prozesse nach Antigenpräsentation von Myelin in vivo (Bechmann et al. 2001) sowie der wechselseitigen Effekte verschieden differenzierter T-Zellen und Gliazellen und deren Auswirkung auf den Erhalt des myelinisierten Fasertraktes in vitro (Gimsa et al. 2000). Die Läsion des myelinisierten Fasertraktes im ECL-Modell induziert keinen Zusammenbruch der Toleranz gegenüber Myelin auch in EAE-suszeptiblen Stämmen (SJL-Mäuse, Lewis Ratten) und nach repetitiven Eingriffen.

Daher galt unser Interesse zunächst der Frage, welche (glialen) Zellen an der Phagozytose degenerierenden Myelins beteiligt sind, um dann AP-Zellen nach ECL zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde eine Technik Phagozytose-abhängiger Färbung etabliert (Bechmann und Nitsch 1997a, Bechmann et al. 2001b, Köbberts et al. 2000). Dieser Ansatz erlaubt die Beobachtung des Schicksals einzelner, vormals phagozytoseaktiver Zellen zum Beispiel im Hinblick auf Migration, Veränderung der Zellmorphologie und des Expressionsmusters immunologisch relevanter Moleküle und läßt sich auch in der organotypischen Schnittkultur einsetzen (Kluge et al. 1998, Gimsa et al. 2000). Mit Hilfe dieser Technik zeigten wir, daß sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten an der Phagozytose degenerierter Axone nach ECL beteiligt sind (Bechmann und Nitsch 1997b, Bechmann und Nitsch 2000). Im Hinblick auf die Präsentation des phagozytierten Materials als Antigen fanden wir, daß phagozytische Mikroglia, aber nicht phagozytische Astrozyten, die an der Antigenpräsentation und Kostimulation beteiligten Adhäsionsmoleküle VLA-4 und ICAM-1/LFA-1 (Hailer et al. 1997) sowie MHC-II Moleküle exprimieren. Die über Wochen sichtbare Hochregulation von MHC-II auf Mikroglia ist von Invasion und Persistenz von CD4-positiven α/β -T-Zellen in Zonen retrograder Degeneration begleitet, die aber im Gegensatz zu Befunden in immun-medierten Erkrankungen keine Transformation der umgebenden Mikroglia in eine deramifizierte ("aktivierte") Morphologie induziert.

Wir verfolgten daher im Sinne des *Danger*-Modells die Hypothese, daß die aufrechterhaltene Toleranz auf eine mikrogliale Antigenpräsentation über Signal 1 (MHC-II) in Abwesenheit von Signal 2 (B7) zurückzuführen sei. Wir fanden aber, daß Myelin-phagozytierende MHC-II-positive Mikrogliazellen zwar hohe Level der Expression des kostimulatorischen Moleküls B7-2, nicht aber von B7-1 nach ECL zeigten (Bechmann et al. 2001a). Die Toleranz gegenüber Myelin bleibt in Wistar und Lewis Ratten sowie SJL Mäusen auch bestehen, wenn durch Injektion von GM-CSF oder TNF die Expression von B7-1 auf Mikroglia induziert wird. Diese Experimente zeigen, daß die Induktion von B7-1-Molekülen allein nicht zur Induktion von Autoimmunität im ZNS ausreicht.

Frau Gimsa arbeitete zum Problem der Th1/Th2-Differenzierung bei Autoimmunität im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ) zunächst an Rheumatoider Arthritis (RA), die wie die MS als Autoimmunerkrankung des Th1-Phänotyps gilt. Dabei stellt Collagen II ein mögliches Autoantigen dar. Sie suchte im Rahmen einer klinischen Studie zur oralen Toleranzinduktion durch Collagen II in Patienten mit rheumatoider Arthritis nach Parametern, die einen Erfolg einer solchen Therapie vorhersagen können (Mitchison et al., 1995; Gimsa et al., 1997a; Gimsa et al., 1997b). Ein Zugang zur Untersuchung autoimmuner Erkrankungen ist das Zytokinmuster der T-Zellen, die an autoimmunen Prozessen beteiligt sind. Fraglich ist, ob eine Dominanz des Th1-Phänotyps in Erkrankungen wie RA und MS selbst pathogen ist oder nur ein Zeichen der Erkrankung. Um diese Frage beantworten zu können, wären immunmodulatorische Wirkstoffe, die Immunantworten vom Th1- zum Th2- Phänotyp verschieben könnten, von großem Interesse. Hierbei wurde besonders die Rolle von Tyrosinkinase der Src-Familie und ihr Einfluß auf die Th-Phänotypdifferenzierung untersucht. Es wurden Tyrosinkinaseinhibitoren gefunden, die in der Lage sind, die Immunantwort in Richtung Th2 zu verschieben (Gimsa und Mitchison, 1997; Müller et al., 1998; Gimsa et al., 1999). Aus dieser Arbeit ging auch ein Patent hervor (Gimsa et al., 1997c). Wenn die bei autoimmunen Erkrankungen des ZNS (EAE) stattfindende massive Infiltration Th1-differenzierter Lymphozyten im Modell der organotypischen Schnittkultur nachgeahmt wird, kommt es zur Expression von B7-1 und zur Herunterregulation von B7-2 auf Mikrogliazellen, während Th2-Zellen keine solchen Effekte hatten (Peter et al., eingereicht). Dies zeigt, daß T-Zellen selbst von ihrer Differenzierung abhängige, divergente Effekte auf die weitere Interaktion mit Mikrogliazellen haben können. Dafür spricht auch, daß Th1-Zellen in der organotypischen Schnittkultur eine mikrogliale Expression von ICAM-1 induzieren, während Th2-Zellen dazu nicht in der Lage sind. Darüber hinaus regulieren Th2-Zellen in konsekutiver Kokultur von Th1- und Th2-Zellen mit Schnittkulturen eine Th1-induzierte Expression von ICAM-1 aktiv herunter und verhindern eine solche Expression nachhaltig in konsekutiver Kokultur von Th2- und Th1-Zellen mit Schnittkulturen (Gimsa et al., eingereicht). Da ICAM-1 ein wichtiges kostimulatorisches Molekül ist, dessen Blockierung vermutlich durch eine Anergie-Induktion in den T-Zellen eine EAE verhindern kann, gehen wir davon aus, daß Th2-Zellen durch ihre Interaktion mit Mikrogliazellen eine Deaktivierung von T-Zell-Antworten bewirken können. Dies um so mehr, da Effektor-Th2-Zellen weniger auf Kostimulation angewiesen sind als Effektor-Th1-Zellen.

Das Ausbleiben destruktiver Immunität nach ECL könnte durch Entfernung hochaktivierter T-Zellen über die Expression des Todesliganden CD95L verursacht sein, der in Zonen anterograder Degeneration auf Astrozyten verstärkt exprimiert wird (Bechmann et al. 2000) und auch im intakten ZNS auf Astrozytenfortsätzen der Glia limitans nachweisbar ist (Bechmann et al. 1999). Dieses von uns als Immunologische Blut-Hirn-Schranke (IBB, Bechmann et al. 1999) interpretierte Expressionsmuster fügt sich gut in Befunde anderer, die T-Zell Apoptose unabhängig von Antigen-spezifischer Interaktion beschrieben. In der Tat konnten wir zeigen, daß Astrozyten unspezifisch aktivierte T-Zellen ohne Zugabe eines Antigens über den CD95/CD95L-Weg töten können (Bechmann et al., eingereicht). Wir planen deshalb in diesem Projekt in Experimenten mit blockierenden CD95L-Antikörpern und in der FasL-defizienten Maus zu untersuchen, inwieweit die inhibierte Antigen-Erkennung im ZNS durch CD95L-induzierte Apoptose von T-Zellen erklärbar ist.

Den Todesliganden TRAIL konnten wir nach ECL nicht nachweisen, was eine Rolle dieses Moleküls für das Immunprivileg zunächst nicht wahrscheinlich macht. Dagegen fanden wir, daß TRAIL selbst Apoptose von glialen und neuronalen Zellen im kultivierten humanen Gewebe induziert und damit einen Kandidaten für T-Zell-induzierte Schädigung im ZNS darstellt (Nitsch et al. 2000).

Als weiteren möglichen Kandidaten der Regulation des Immunprivilegs im ZNS, haben wir begonnen, die Rolle der Indolamin-2,3-Deoxygenase (IDO) im Gehirn zu untersuchen. Die IDO spaltet die essentielle Aminosäure Tryptophan und ist für das Immunprivileg der Plazenta von entscheidender Bedeutung. Nach gängiger Vorstellung kommt es durch die Depletion extrazellulären Tryptophans zur Inhibition der T-Zell Proliferation. Mit Hilfe von RT-PCR und einem von uns hergestellten Antiserum konnten wir die IDO auf Mikrogliazellen und Astrozyten nachweisen. In Kokulturen von Mikroglia und T-Zellen führt die Inhibition der IDO durch 1-Methyltryptophan zur gesteigerten T-Zell-Proliferation. Dies werten wir als Hinweis, daß auch im ZNS durch Expression der IDO eine proliferationsinhibierende Umgebung geschaffen wird, denn auch unter Bedingung der Antigenerkennung im ZNS während der EAE-Pathologie konnte T-Zell Proliferation in nur sehr niedrigen Raten nachgewiesen werden. Die Hypothese einer IDO-abhängigen Proliferationsinhibition im ZNS wollen wir im Rahmen dieses Antrages weiter untersuchen.

Zusammengenommen haben wir gefunden, daß axonale Läsion nicht zum Verlust der Toleranz gegenüber potentiell immunogenen Epitopen des Myelins führt. Dies ist auch bei MBP-spezifischen T-Zell-Rezeptor transgenen Mäusen der Fall, was darauf hinweist, daß nicht ein Mangel Antigen-spezifischer T-Zellen für das Ausbleiben der Immunität verantwortlich ist. Auch nach experimenteller Induktion von B7-1 Molekülen auf Mikroglia ließ sich kein Zusammenbrechen der Toleranz beobachten, was zeigt, daß B7-1 auf nicht voll ausgereifter (daher Anergie-induzierender) Mikroglia exprimiert wird oder daß zusätzliche immunmodulatorische Mechanismen die Induktion von Autoimmunität verhindern. Als solche konnten wir die Expression des Todesliganden TRAIL zumindest in der Ratte bisher nicht bestätigen, während wir Evidenzen gewonnen haben, daß der Todesligand CD95L sowie die Expression des Enzyms IDO an der Regulation der Immunantwort nach axonaler Läsion beteiligt sein könnte. Die Rolle dieser sowie weiterer in der Literatur beschriebener Mechanismen wie die Abwesenheit von Dendritischen Zellen und die lokale Expression von TGF- β für das Immunprivileg wollen wir in diesem Projekt untersuchen.

Eigene Vorarbeiten:

1. Bechmann, I. und *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. Cell Biol.** 107:391-7. (IF 1,687)
2. Bechmann, I. und *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. (IF 3,67)
3. Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., *Nitsch, R.*, Naftolin, C. (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain - Evidence for the existence of an Immunological Brain Barrier. **Glia** 27:62-74. (IF 4,245)
4. Bechmann, I., Lossau, S., Steiner, B., Mor, G, Gimsa, U., *Nitsch, R.* (2000) Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and FasL (CD95L) expression, but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. **Glia** 32:25-41. (IF 4,245)
5. Bechmann, I. and *Nitsch, R.* (2000) Involvement of non-neuronal cells in entorhinal-hippocampal reorganization following lesions. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 911:192-206. (IF 0,959)
6. Bechmann, I. and *Nitsch, R.* (2001) Plasticity following lesion: help and harm from the immune system. *Restor. Neurol. Neurosci.* (im Druck). (IF 1,196)
7. Bechmann, I., Peter, S., Beyer, M., Gimsa, U., *Nitsch, R.* (2001a) Presence of B-7.2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo. *FASEB J.* (im Druck). (IF 13,861)
8. Bechmann, I., Kwidzinski, K., Kovac, A.D., Simbürger, E., Horvath, T., Gimsa, U., *Dirnagl, U.*, *Priller, J.*, *Nitsch, R.* (2001b) Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol.* (im Druck) (IF 2,863)
9. Bergmann, M., Post, A., Rittel, I., Bechmann, I., *Nitsch, R.* (1997) Expression of synaptophysin in sprouting neurons after entorhinal lesion in the rat. **Exp. Brain Res.** 117:80-6. (IF 2,018)
10. Gimsa, U., Mitchison, N.A. (1997). New perspectives on the Th1/Th2 paradigm. **Curr. Opin. Organ Transpl.** 2:89-96.

11. Gimsa, U., Sieper, J., Braun, J., Mitchison, N.A. (1997a). Type II collagen serology: a guide to clinical responsiveness to oral tolerance? **Rheumatol. Int.** 16:237-240. (IF 1,108)
 12. Gimsa, U., Kamradt, T., Mitchison, A., Sieper, J. (1997b). Autoimmunity and immunological privilege in the eye. In Oculodermal diseases-immunology of Bullous Oculo-Muco-Cutaneous Disorders, U.Pleyer, C.Hartmann, and W.Sterry, eds. (Buren, NL: Aelous Press), pp. 33-42.
 13. Gimsa, U.C., Mitchison, N.A., Allen, R. (1997c). Pharmaceutical products containing protein tyrosine kinase inhibitors and anti-CD4 antibodies. PCT/GB97/02695[Intern. Pat. Applic.].
 14. Gimsa, U., Mitchison, A., Allen, R. (1999). Inhibitors of Src-family tyrosine kinases favour Th2 differentiation. **Cytokine** 11:208-215. (IF 2,291)
 15. Gimsa, U., Peter, S., Bechmann, I., Nitsch, R. (2000). Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. **Brain Pathol.** 10(3):365-377. (IF 4,154)
 16. Gimsa, U., Peter, S., Haas, D., Bechmann, I., Nitsch, R. (2000) Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain. (eingereicht).
 17. Hailer, P., Bechmann, I., Heizmann, S., Nitsch, R. (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. **Hippocampus** 7:341-9. (IF 4,00)
 18. Kluge, A., Hailer, N.P., Horvath, T.L., Bechmann, I., Nitsch, R. (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro. **Hippocampus** 8:57-68. (IF 4,00)
 19. Köbberts, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J.L., Mey, J., Thanos, S. (2000) Current concepts of neuroanatomical tracing. **Prog. Neurobiol.** 62(4):327-351. (IF 7,090)
 20. Mitchison, A., Gimsa, U., Sieper, J. (1995). Oral tolerance from a general perspective, and the possible role of side-effects in the gut. **Inflammopharmacology** 3:389-392.
 21. Müller, B., Gimsa, U., Mitchison, N.A., Radbruch, A., Sieper, J., and Yin, Z. (1998). Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis. **Springer Semin. Immunopathol.** 20:181-196. (IF 2,513)
 22. Nitsch, R., Bechmann, I.*, Deisz, R.A., Haas, D., Lehmann, T.N., Wendling, U., Zipp, F. (2000) Cell death induced by tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in adult human brain tissue. **Lancet** 356: 827-828. (IF 11,793)
- * equally contributing first author
23. Peter, S.A., Gimsa, U., Bechmann, I., Nitsch, R. (2000) Differential expression of the costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by autoimmune Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. (eingereicht).

Antragsteller: unterstrichen;

Kollegen im SFB: *kursiv*.

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

Ziele

Es gibt mittlerweile klare Hinweise dafür, daß Antigenen im ZNS nicht nur ignoriert werden, sondern daß die Antigenpräsentation nach Antigenexposition im Gehirn zur Toleranz von T-Zellen führt. Dies ist nicht Folge der Abwesenheit von Signal 2, da –wie wir zeigen konnten- die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Antigenpräsentierenden Zellen nicht notwendigerweise zum Verlust der Toleranz führt. Ausgehend von diesen Befunden wollen wir nun die Immunantwort nach Antigenpräsentation im ZNS weiter charakterisieren sowie die zellulären Signale, die Toleranz versus Autoimmunität bedingen, identifizieren.

1. Ziel:

Welche Auswirkung hat ECL auf DTH ?

-Kommt es zum Verlust der DTH als Zeichen der Immundevisation ?

-Ist dieser Effekt adoptiv transferierbar ?

Welche T-Zell-Antwort wird durch Präsentation von MBP als Selbstantigen und OVA als Fremdanigen induziert ?

- Kommt es zum Verlust der DTH ?
- Wie wirkt sich Injektion von MBP ins Parenchym auf eine danach induzierte EAE aus ?
- Welche Rolle spielen dabei die zervikalen LK ?
- Lassen sich regulatorische T-Zellen identifizieren ?
- Führt Injektion von MBP zu Th1- oder Th2-Differenzierung der T-Zellen in den zervikalen Lymphknoten? Ändert sich diese Reaktion im Laufe der Zeit nach der Injektion ?
- Bestehen Unterschiede der Immunantwort zur Injektion eines Fremdanigen (OVA) ?
- Welche Rolle spielt die Dosis des Antigen ?
- Welche Reaktionen treten in MBP-spezifischen T-Zell-Rezeptor transgenen Mäusen nach MBP Injektion auf?

3. Von welchen Faktoren hängt die Toleranz nach Antigenpräsentation von MBP im ZNS ab ?

- Bricht die Toleranz durch *Danger*-Signale, die zur Reifung und Aktivierung von AP-Zellen führen (CFA, LPS, sowie einen agonistischen anti-CD40 Antikörper) zusammen ?
- Bricht die Toleranz nach Inhibition von CD95L zusammen ?
- Bricht die Toleranz nach Inhibition von TGF- β zusammen ?
- Bricht die Toleranz nach Inhibition derIDO zusammen ?
- Was geschieht nach Blockade von Kombinationen dieser drei Mechanismen?
- Welchen Effekt hat die Injektion ex vivo isolierter Dendritischer Zellen ins Gehirn?

Die Untersuchungen werden zunächst an SJL, C57B16 und MBP(Ac1-11)-spezifischen T-Zell-Rezeptor transgenen Mäusen durchgeführt. Für einige Fragen werden auch OVA-spezifische T-Zell-Rezeptor-transgene Tiere sowie FasL-defiziente (gld)B6S und Fas-defiziente (lpr)B6m Tiere verwendet werden. Da die Immunregulation auf die Bildung regulatorischer T-Zellen zurückzuführen sein könnte, interessieren uns die Unterschiede in der Induktion der Deviation mittels adoptiven T-Zelltransfers in stark EAE-suszeptiblen (SJL) und weniger suszeptiblen Stämmen (B10.S). Diese Mäuse haben denselben MHC-Haplotyp, nämlich H-2s.

Arbeitsprogramm:

1. Unterscheiden sich zervikale von anderen Lymphknoten darin, eine Differenzierung von naiven T-Zellen hin zu Th2-Zellen gegenüber einer Th1-Differenzierung zu bevorzugen? Wird durch Antigenpräsentation in zervikalen Lymphknoten T-Zellenergie erzeugt?

Es ist bisher nicht geklärt, ob die durch Antigenpräsentation im Gehirn auftretende Suppression inflammatorischer Immunreaktionen dadurch realisiert wird, daß Th2-Antworten bevorzugt werden.

Die zervikalen Lymphknoten, welche die Lymphdrainage des Gehirns darstellen, könnten in einem Priming-Prozess eine Rolle spielen. Deshalb sollen die Lymphozyten zervikaler bzw. inguinaler Lymphknoten MBP-transgener Mäuse mit MBP-Peptid (Ac1-11) kultiviert und die Kulturüberstände auf IFN-gamma und TNF-beta als typische Th1-Zytokine, sowie IL-4 und IL-5 als typische Th2-Zytokine mittels ELISA überprüft werden. Sollten sich dabei Unterschiede ergeben, sollen aus diesen Lymphknoten die naiven T-Zellen (CD4⁺/CD62L_{high}) mittels Antikörper-gekoppelter magnetischer Partikel isoliert werden und mit unterschiedlichen AP-Zellpopulationen (Dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen) aus eben diesen Lymphknoten kultiviert werden, um festzustellen, ob diese Zellen für ein unterschiedliches Priming verantwortlich sind. Ebenfalls denkbar wäre, daß die quantitative Zusammensetzung der AP-Zellen eine Rolle spielt, da Dendritische Zellen und Makrophagen aufgrund ihrer IL-12-Produktion Th1-Antworten effektiver primen können als B-Zellen. Dazu sollen FACS-Färbungen für charakteristische Oberflächenmoleküle dieser AP-Zellen durchgeführt werden. Denkbar wäre auch, daß AP-Zellen der zervikalen Lymphknoten nicht effektiv kostimulieren können, was sich z.B. in einer fehlenden B7-Expression widerspiegeln könnte. Dazu soll die Expression von MHC-II, B7-1, B7-2 sowie ICAM-1 in zervikalen im Vergleich mit inguinalen Lymphknoten durchflußzytometrisch und immunhistochemisch bestimmt werden. Um Anergie nachzuweisen, sollen zudem T-Zellen Antigen-spezifisch stimuliert werden, um deren (ausbleibende) Proliferation zu untersuchen.

2. Welche Auswirkung hat ECL auf DTH nach peripherer MBP-Injektion ?

Dieses Experiment dient der Frage, ob eine Immundeviation, wie sie nach der Injektion von OVA beobachtet wurde (Wenkel et al. 2000), auch durch mechanisch-induzierte axonale Läsion verursacht sein kann. Wie sich ECL auf EAE auswirkt, wird von uns im Rahmen des Mikroglia-schwerpunktes (Be 2272) untersucht. Zur Detektion der Immundeviation, folgen wir hier dem Protokoll von Wenkel, Streilein und Young, das wir um eine Kontrolle (Kontrolle 2) und eine Verumgruppe (Verum 2) erweitern.

Dazu folgen wir zunächst folgendem Schema:

	Verum 1	Verum 2	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4
Tag 1	ECL	ECL	Schein-OP	peripheres Priming 50 µg MBP s.c.	kein Priming	Kein Priming kein Boostern
Tag 7	100 µg MBP+CFA s.c.		100 µg MBP+CFA s.c.	100 µg MBP+CFA s.c.	100 µg MBP+CFA s.c.	
<i>fortgesetzt</i>						
	<i>Verum 1</i>	<i>Verum 2</i>	<i>Kontrolle 1</i>	<i>Kontrolle 2</i>	<i>Kontrolle 3</i>	<i>Kontrolle 4</i>
Tag 14	200 µg MBP s.c. Ohr	200 µg MBP s.c. Ohr	200 µg MBP s.c. Ohr	200 µg MBP s.c. Ohr	200 µg MBP s.c. Ohr	200 µg MBP s.c. Ohr
Tag 15	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung
Tag 16	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung

CFA= complete Freund's adjuvans; n= 5 pro Gruppe (SJL & C57 BL6 Mäuse)

Dieser Versuchsaufbau wird uns erlauben, durch Messung der DTH nach peripherer Antigeninjektion eine durch ECL induzierte Immundeviation zu identifizieren und zu quantifizieren. Verum 1 soll zeigen, ob die mechanische Läsion, die Immunantwort auf ein später peripher verabreichtes Antigen (Tag 7) im Einflußbereich der zervikalen Lymphknoten (Ohr) als DTH-Reaktion am Ohr (Tag 14) beeinflussen kann. Verum 2 soll Auskunft darüber geben, ob ein durch die mechanische Läsion dem Immunsystem zugänglich gemachtes Autoantigen im Hirn selbst präsentiert wird bzw. über die zervikalen Lymphknoten das Hirn verläßt und dort eine Immunantwort induziert, so daß eine DTH-Reaktion nach Antigengabe ins Ohr hervorgerufen werden kann, oder die Antigenfreisetzung im Hirn aufgrund des Fehlens aktivierter AP-Zellen zu keiner produktiven Immunantwort führt. Kontrolle 1 dient dazu, einen durch ECL induzierten Effekt von einem Effekt durch den die OP begleitenden, unabhängig von der mechanischen Schädigung auftretenden, Stress unterscheiden zu können. Kontrolle 2 soll zeigen, ob es Unterschiede gibt zwischen dem Freisetzen von Autoantigen im ZNS durch ECL (Verum 1) und der peripheren Verabreichung von Autoantigen, beide ohne ein zusätzliches pro-inflammatorisches Signal, z.B. durch CFA. Kontrolle 3 dient als Positivkontrolle für die DTH, Kontrolle 4 als Negativkontrolle.

Sollte sich keine Immundeviation (also das Ausbleiben der DTH) nach ECL nachweisen lassen, werden wir die verwendeten Dosen (MBP und CFA) variieren. Sollte sich zeigen, daß die Verum-Gruppen eine stärkere DTH zeigen als die Kontrollen 1-3, werden wir die zugrundeliegenden T-Zell-Differenzierung in den nachfolgend beschriebenen Experimenten weiter charakterisieren. Wir hätten dann den wichtigen Befund gemacht, daß mechanische Läsion zum Priming (naiver) T-Zellen führt.

Im Fall des Auftretens einer Immundeviation werden wir untersuchen, ob diese auch nach Voraktivierung von Mikrogliazellen (siehe unten) induzierbar bleibt. Durch adoptiven Transfer von Zervikalen Lymphknoten-Zellen und Zellen aus inguinalen, poplitealen LK und anschließende Messung der DTH können wir Existenz und Lokalisation regulatorischer T-Zellen nachweisen. Ergeben sich Hinweise für deren Existenz, werden wir versuchen, diese zu isolieren (siehe Methoden).

In jedem Falle werden wir aus diesen Experimenten lernen können, ob mechanische axonale Läsion eine Immundeviation (im Sinne von Streileins Befunden in der Vorderen Augenkammer und Wenkel et al. im Gehirn) induziert, inwieweit diese von einer insuffizienten Reifung von Mikroglia zu voll-kompetenten AP-Zellen und von der Bildung regulatorischer T-Zellen abhängig ist.

3. Welche T-Zell-Antwort wird durch Präsentation von MBP als Selbstantigen im Gegensatz zu OVA als Fremdantigen induziert ?

Zunächst soll wie unter 2. beschrieben ein möglicher Verlust der DTH nach Injektion von MBP bzw. OVA ins Striatum beschrieben werden.

Dazu wählen wir zunächst folgenden Versuchsaufbau:

	Verum 1	Verum 2	Verum 3	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
Tag 1	Injektion von MBP/OVA Striatum	Injektion von MBP/OVA ins Striatum lymphadenektomierter Tiere	Injektion von MBP/OVA ins Striatum	Kein Priming Injektion von NaCl ins Striatum	kein Priming	Kein Priming kein Boostern
Tag 7	100 µg MBP/OVA+ CFA s.c.	100 µg MBP/OVA+ CFA s.c		100 µg MBP/OVA+ CFA s.c	100 µg MBP/OVA+ CFA s.c	
Tag 14	200 µg MBP/OVA s.c. Ohr	200 µg MBP/OVA s.c. Ohr	200 µg MBP/OVA s.c. Ohr	200 µg MBP/OVA s.c. Ohr	200 µg MBP/OVA s.c. Ohr	200 µg MBP/OVA s.c. Ohr
Tag 15	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung
Tag 16	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung	Messung der Schwellung

n= 5 pro Gruppe (SJL & C57 BL6 Mäuse)

Mit den MBP-Experimenten können wir sehen, ob auch nach Injektion von MBP als Autoantigen eine Immundeviation besteht (Verum 1). Da laut Literatur die zervikalen Lymphknoten für die Immundeviation von entscheidender Bedeutung sind, sollen diese in einer Gruppe von Tieren vor dem Versuch (Verum 2) entfernt werden. Von Verum 3 erwarten wir, ähnlich wie von Kontrolle 3 ein Ausbleiben der DTH, es sei denn, daß die geringfügige Verletzung des Gehirns durch die Injektion eine effektive Antigenpräsentation hervorruft. Hierbei werden auch Dosis-abhängige Effekte zu untersuchen sein. Bei Verlust der DTH soll durch adoptiven Transfer von T-Zellen aus Milz, zervikalen Lymphknoten und, wenn möglich, aus dem ZNS in unbehandelte Tiere die Existenz regulatorischer T-Zellen sowie deren Lokalisation und der Zeitpunkt ihrer Entstehung nachgewiesen werden.

MBP-spezifische T-Zellen aus Gehirn, zervikalen Lymphknoten und inguinalen, poplitealen LK sollen dann im Hinblick auf deren Differenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von MBP ins Striatum nach in vitro Restimulierung der T-Zellen untersucht werden, um Th1 und Th2 Antworten bzw. einen Th1/Th2 Shift mit der Zeit zu identifizieren. Zudem sollen Proliferation und Effektorfunktionen untersucht werden.

Mit diesen Experimenten können wir lernen, ob 1. die Präsentation eines Antigens unter den Bedingungen einer geringfügigen Verletzung (durch die Injektion) Th1 oder Th2 Antworten induziert, 2. sich ein Shift von Th1 nach Th2 mit der Zeit findet und 3. MBP als Autoantigen eine andere Differenzierung induziert als die Präsentation eines Fremdantigens.

4. Von welchen Faktoren hängt die Toleranz nach Antigenpräsentation von MBP im ZNS ab ?

Wir wissen bereits, daß die Injektion von MBP als Autoantigen ins Gehirn nicht zur Entwicklung von Autoimmunität führt. Da dies nicht auf Ignoranz beruht, sondern eine Form von Toleranz darstellt, die wir mit den experimentellen Ansätzen 2 und 3 charakterisieren wollen, soll nun untersucht werden, unter welchen Bedingungen diese Toleranz zusammenbricht.

Dazu werden zwei Wege gewählt:

1. soll durch "Danger-Signale" die Reifung, Rekrutierung und Aktivierung lokaler AP-Zellen induziert werden,
2. sollen intrinsische Moleküle, die als Kandidaten für die Regulation der Toleranz im ZNS gelten, blockiert werden.

zu 1. Als *Danger*-Signale wollen wir jeweils CFA, LPS oder einen agonistischen anti-CD40 Antikörper zusammen mit MBP ins Striatum injizieren. Zudem sollen ex vivo isolierte und MBP-gepulste Dendritische Zellen injiziert werden.

Wir wollen damit untersuchen, ob MBP-Präsentation im ZNS bei gleichzeitig vorliegenden *Danger*-Signalen zu EAE-ähnlichen Erkrankungen führt, welche Effekte diese Behandlung auf die T-Zell-Differenzierung hat und welche zellulären Veränderungen durch die Injektion der verschiedenen Substanzen und Zellen induziert wird. Dabei interessiert uns besonders die Expression von CD14, Toll-Rezeptoren, CD40, MHC-II, B7-1 und B7-2-Molekülen, sowie das Auftreten von Apoptose und Apoptose-induzierender Proteine (CD95 und CD95L, TRAIL und TRAIL-R 1-4), die mit Immunzytochemie oder RT-PCR (Toll-Rezeptoren) nachgewiesen werden. Eventuell auftretende Autoimmunität soll zugleich mit der Präsenz Dendritischer Zellen korreliert werden. Durch Injektion (GFP-) markierter Dendritischer Zellen wollen wir außerdem versuchen, den Weg dieser Zellen (in die zervikalen Lymphknoten?) zu verfolgen.

Mit diesen Experimenten wollen wir lernen, in wieweit sich das *Danger*-Modell auch auf das immunprivilegierte Gehirn anwenden läßt. Können die oben genannten Signale eine EAE-ähnliche Erkrankung erzeugen, haben wir ein Modell lokal-induzierter Autoimmunität für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Ist dies nicht der Fall, spricht dies für Mechanismen des Immunprivilegs, die nicht nur suppressiv auf die lokalen AP-Zellen wirken (denn die wurden durch die Behandlung maximal aktiviert), sondern auf T-Zellen direkt. Beide Ergebnisse würden unser Verständnis des Immunprivilegs erweitern.

zu 2. Als mögliche Mechanismen der Toleranz, deren Bedeutung durch ihre Blockade nach Antigen-Injektion untersucht werden sollen, stehen zunächst TGF- β , das CD95/CD95L-System und dieIDO an. Diese Liste kann durch die Einfachheit des Modells jederzeit erweitert werden, soweit blockierende Substanzen oder Gen-defiziente/knock-out Tiere zur Verfügung stehen. Blockiert wird TGF- β mit einem Antikörper, der alle drei Isoformen erkennt, dieIDO mit 1Methyltryptophan und CD95L mit einem antagonistischen Antikörper bzw durch Verwendung von *lpr* und *gld*-Mäusen, die wir selbst halten. Zunächst soll untersucht werden, wie sich Blockade der Kandidatenmoleküle nach Injektion von MBP allein, dann nach gleichzeitiger *Danger*-Simulation auswirkt. Als Readout der Experimente dient wieder die mögliche Entwicklung von Autoimmunität in Form einer (milden) EAE, die auch histologisch charakterisiert werden soll, die T-Zell-Differenzierung in ZNS, zervikalen Lymphknoten und Milz sowie die durch die Behandlung induzierten Veränderungen im Gewebe im Hinblick auf Expression von CD40, MHC-II, B7-1, B7-2, CD95, CD95L, TRAIL und TRAIL-R 1-4 und das Auftreten von Apoptose und Proliferation.

Bei entsprechenden Befunden sollen diese Experimente modifiziert vollzogen werden. Zunächst wird eine periphere Immunisierung mit MBP durchgeführt, die für sich nicht ausreicht, eine EAE zu induzieren. Danach wird MBP allein oder gemeinsam mit der blockierenden Substanz injiziert. Kommt es nach diesem Eingriff zu lokaler Inflammation oder einer EAE, haben wir gute Evidenz, daß es sich bei der untersuchten Substanz um einen wirksamen Mechanismus von Immunprivileg handelt.

Zusammengenommen erlauben diese Experimente bisher nur hypothetisch als Mechanismen des Immunprivilegs gehandelte Moleküle in dieser Eigenschaft *in vivo* zu charakterisieren.

Methoden

(bereits etablierte Methoden sind mit einem Stern* gekennzeichnet)

***Operationsmethoden**

Mäuse werden unter tiefer Nembutal-Anästhesie in einem Stereotaktischen Apparat eingespannt. Zur ECL wird eine 1,5 mm breite Klinge 1,5 mm von Lambda bis zur Basis der mittleren Schädelgrube geführt. Die Injektion von Antigen erfolgt ebenfalls stereotaktisch mit einer Hamiltonpipette. Die zervikalen Lymphknoten lassen sich unter der Faszia zervikalis superficialis problemlos operieren. Wundverschluß erfolgt jeweils durch Naht. Die Tiere werden in den Stunden nach der Operation warm gehalten (durch Rotlicht).

***Isolation von naiven T-Zellen und unterschiedlichen AP-Zell-Populationen aus Lymphknoten MBP-transgener Mäuse**

Zervikale und inguinale Lymphknoten werden getrennt homogenisiert und mononukleäre Zellen über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Um naive T-Zellen zu isolieren, muß man zunächst CD8⁺ T-Zellen und AP-Zellen aus der Zellsuspension depletieren. Dazu werden die Zellen mit anti-CD45R-antikörpergekoppelten magnetischen Partikeln für B-Zellen markiert, gewaschen und in einer Säule in einem starken Permanentmagneten zurückgehalten und anschließend eluiert. Dieser Vorgang wird wiederholt an den "negativen" Zellen, welche durch das Magnetfeld nicht zurückgehalten wurden, mit anti-CD11b-antikörpergekoppelten magnetischen Partikeln für Makrophagen, anschließend mit anti-CD11c-antikörpergekoppelten magnetischen Partikeln für Dendritische Zellen und zuletzt mit anti-CD8-antikörpergekoppelten magnetischen Partikeln für CD8⁺T-Zellen. Während die CD8⁺ Fraktion verworfen wird, werden die CD45R⁺, die CD11b⁺ und CD11c⁺ Zellen getrennt auf Eis aufbewahrt und später den naiven Zellen als AP-Zellen hinzugefügt. Die übriggebliebenen "negativen" Zellen enthalten naive (CD62L⁺) und memory (CD62L⁻)-CD4⁺ T-Zellen. Die naiven CD4⁺ T-Zellen werden mit anti-CD62L-antikörpergekoppelten magnetischen Partikeln von den memory CD4⁺ T-Zellen getrennt und anschließend eluiert. Die so gewonnenen Zellen werden mit den verschiedenen AP-Zell-Populationen und MBP-Peptid in vitro für 6 Tage restimuliert, anschließend mit Antigen und bestrahlten Milzzellen (26Gy), die zuvor durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von Erythrozyten getrennt wurden, restimuliert und die Überstände am Tag 2 nach Restimulation gesammelt und auf ihren IFN-gamma- und IL-4-Gehalt hin im ELISA getestet, um eine evtl. unterschiedliche Differenzierung in Richtung Th1 oder Th2 nachzuweisen.

***Charakterisierung der Zusammensetzung und Eigenschaften der AP-Zellen in zervikalen im Vergleich mit inguinalen Lymphknoten**

Dazu werden die entsprechenden Lymphknoten isoliert, homogenisiert und gefärbt mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4 (CD4⁺ -Zellen), CD45R (B-Zellen), CD11b (Makrophagen) und CD11c (Dendritische Zellen). Die prozentuale Zusammensetzung der Zellpopulationen in den Lymphknoten kann dann durchflußzytometrisch bestimmt werden. Ihre Eigenschaften als AP-Zellen (Expression von MHC-II, B7-1, B7-2, ICAM-1) werden durch Doppelfärbung mit den entsprechenden Antikörpern und anders-fluoreszenten Antikörpern gegen CD45R, CD11b bzw. CD11c bestimmt. Alternativ dazu ist eine qualitative Bestimmung mittels Immunhistochemie möglich.

Isolation von T-Zellen aus dem Gehirn

Die Isolation soll nach dem Protokoll von Brabb et al. (2000) durchgeführt werden. Dazu wird Gehirn und Rückenmark homogenisiert, kurz zentrifugiert, in 37% Percoll resuspendiert und bei 2.118g für 15min zentrifugiert. Danach werden die Zellen in 37% Percoll gewaschen, in 30% Percoll resuspendiert und auf 70% Percoll gelegt. Zellen am Gradientenübergang werden geerntet, gewaschen und in DMEM (mit 9,5% FCS, 1,9mM L-Glutamin, 0,95 mM Natriumpyruvat, 43 µM β-Merkaptoethanol, 95 U/ml Penicillin G, 95 µg/ml Streptomycin und 0.1 mM nicht-essentielle Aminosäuren) resuspendiert. Durch Injektion von Proflavin (20µg/ml i.v., ein nukleärer Farbstoff, der die Blut-Hirnschranke nicht überwindet) vor Behandlung der Tiere, wird der Anteil nicht-ZNS eigener mononukleärer Zellen in der Kultur bestimmt.

*Isolation MBP-spezifischer T-Zellen - Charakterisierung der T-Zell Differenzierung mittels FACS und ELISA

Milz und Lymphknoten werden homogenisiert und mononukleäre Zellen über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Diese Zellen werden mit MBP für 48h stimuliert. Die Überstände dieser Kulturen werden im ELISA auf ihren Gehalt an IFN-gamma, IL-4 und IL-10 hin getestet. Die T-Zellen werden auf ihren Aktivierungszustand hin mit Antikörpern gegen CD4 und CD25 (IL-2R; alpha-Untereinheit), CD40L, CD44, CD49d (VLA-4; alpha-Untereinheit), CD69 (very early activation antigen) und CD71 (Transferrin-Rezeptor) markiert und im FACS gemessen.

Identifikation regulatorischer T-Zellen

Da sich diese Zellen in vitro schlecht halten lassen, sind Experimente zum adoptiven Transfer dieser Zellen zunächst nicht geplant. Als Ersatz werden, je nach Fundort regulatorischer T-Zellen, CD4-positive Zellen adoptiv transferiert (1.000.000 pro Tier). Proliferationsassays mit MBP zur Bestimmung der Antigenspezifität sollen jedoch versucht werden (Kollaboration mit Thomas Ritter, Arbeitsgruppe Volk). Dazu werden je 50.000 T-Zellen mit bestrahlten Splenozyten (26 Gy) als AP-Zellen im Verhältnis 1:1-1:5 unter Zugabe von Myelin (oder MBP) für 48 h inkubiert. Nach 30 h wird Tritium-Thymidin zugegeben und die Proliferation nach 48 h im Betacounter gemessen. Als Kontrolle dient der Transfer von Zellen unbehandelter Tiere. Readout des Experimentes ist die Übertragung der Immundeprivation (periphere Injektion von MBP).

Regulatorische (MBP-spezifische) T-Zellen sollen dann aus Lymphknoten und Milz, wenn möglich auch aus dem ZNS isoliert werden. Dazu werden aus Homogenaten über Magnetic Sorting CD4-positive Zellen isoliert. Innerhalb dieser Zellen wird dann mit FACS nach CD45RB_{low} positiven Zellen gesucht, die dann mittels Sorter (Deutsches Rheumaforschungszentrum) isoliert werden können. Ihr Zytokinmuster (IL-4, IL-10, TGF- β) kann dann nach Restimulation, z.B. mit PMA und Ionomycin mittels ELISA ermittelt werden.

Isolation Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen werden aus dem Blut isoliert. Nach Gewinnung von PBMCs über einen Ficoll-Gradienten und Waschen in EDTA-PBS werden die Zellen in FCS unter Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 ausgesät. Nach 4-5 Tagen lassen sich dann Cluster Dendritischer Zellen ernten. Erfahrung in dieser Isolationsmethode hat Orhan Aktas aus der Arbeitsgruppe Zipp; eine Kollaboration ist vereinbart. Die Migration der Dendritischen Zellen nach Injektion soll untersucht werden. Deshalb werden in einem Teil der Experimente die Zellen vor Reinjektion mit einem intrazellulären Farbstoff (CFSE, 5 μ M, 5 min bei Raumtemperatur) markiert.

*Danger-Signale

Als "*Danger-Signale*" Signale werden CFA, LPS, CD40 in verschiedenen Dosen eingesetzt. Die Substanzen werden als in Zehnerpotenzen ansteigenden Einzeldosen stereotaktisch mit einer Hamiltonpipette ins Striatum 0, 24 und 48 h nach Antigeninjektion appliziert. Die Effekte werden zunächst klinisch durch eine Konversion der Toleranz in Autoimmunität evaluiert (EAE-ähnliches Bild?). Es erfolgt dann eine histologische Untersuchung des Gewebes (siehe unten).

*Inhibitionsexperimente (TGF- β ,IDO, CD95L)

Die Inhibitoren werden in verschiedenen Dosen und Regimen stereotaktisch lokal injiziert.

Zur Inhibition von TGF- β wird ein Antikörper eingesetzt, der alle drei Isoformen erkennt (R&D Systems). Die IDO kann mit 1-Methyltryptophan (Sigma) kompetitiv inhibiert werden.

Zur Blockade des CD95/CD95L Systems hat sich MFL3 (Pharmingen) als blockierender Antikörper bewährt. Zudem werden die gld und lpr Mäuse eingesetzt. Die Effekte werden wie oben beschrieben beobachtet.

*Histologie

Licht-, Doppelfluoreszenz- Konfokale- und lichtmikroskopische Untersuchungen werden an Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe nach transkardialer Perfusion vorgenommen. Die Färbungen erfolgen an Vibratomschnitten. Für Licht- und Elektronenmikroskopie wird die Antigen-Antikörperbindung durch Standard- ABC/DAB-Entwicklung visualisiert.

Immunzytochemisch nachgewiesen werden sollen MHC-II, B7-1 und B7-2, CD14, CD40, CD95, CD95L, TRAIL und TRAIL-R1-4, CD4, CD3, CD8. Als Marker für Apoptose dient ein Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 sowie fragmentierte Kerne im HE-Schnitt. Proliferation wird mit der BRDU-Methode nachgewiesen. Sollten Untersuchungen zur Demyelinisierung erforderlich sein, besteht eine Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Brück, die über ausgezeichnete Expertise verfügt.

Zeitplan

Die meisten der zur Beantwortung unserer Fragestellung benötigten Techniken sind in unserem Labor gut etabliert, so daß wir in der ersten Förderperiode die T-Zell-Antwort nach MBP-Injektion, sowie die Immundeviation in beiden von uns verwendeten *in-vivo*-Modellen charakterisieren können. Unklar ist, ob eine Isolation von T-Zellen in ausreichender Anzahl auch aus dem ZNS gelingt. Diese Experimente sind aber für die von zu treffenden Entscheidungen für das weitere Vorgehen nicht wesentlich.

Da schon jetzt bekannt ist, daß sowohl ECL als auch MBP-Injektion ins ZNS nicht zum Zusammenbruch des Immunprivilegs führt, kann mit den Blockade-Experimenten sowie den Experimenten zum Zusammenhang von *Danger* und Autoimmunität im Prinzip auch schon begonnen werden. Wir wollen aber zunächst die Zytokinmuster nach MBP-Injektion ohne weitere Beeinflussung evaluieren, um die durch Blockade oder Mikroglia-Stimulation erzielten Effekte auch auf der Ebene der T-Zell-Differenzierung (Th1/Th2, Zellzahlen, Sekretionslevel) vergleichen zu können und Dosis-Wirkungsbeziehungen der von uns eingesetzten Substanzen erstellen zu können.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Beide Antragsteller sind mit den Fragestellungen des SFB 507 durch Mitarbeit im Projekt Nitsch gut vertraut. Mit diesem Projekt werden weiterhin vielfältige inhaltliche und methodische Überschneidungen bestehen (siehe eigene Vorarbeiten). Unser Vorhaben wird Kooperationen auch mit allen anderen neuroimmunologisch arbeitenden Gruppen (Brück/Stangel, Volk, Weber, Zipp) ergeben. Etabliert sind bereits Kollaborationen mit der Arbeitsgruppe Zipp (TRAIL/CD95L, siehe eigene Vorarbeiten) und Weber (Rolle derIDO als lokaler T-Zell-Proliferationshemmer). Für die histologische Aufarbeitung EAE-ähnlicher Erkrankungen besteht eine Zusammenarbeit mit Herrn Brück.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

	Bewilligung 2001			2002			2003			2004		
PK	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM
				VIb	1	54.000	VIb	1	54.000	VIb	1	54.000
	zus.:			zus.:	1		zus.:	1		zus.:	1	
SV				Kosten-kategorie oder Kennziff.		Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.		Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.		Betrag DM
				522		20.000	522		20.000	522		20.000
I				Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.		
				entfällt			entfällt			entfällt		

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1. Bechmann, Ingo, Dr. med. Habilitationstipendiat der Charité	Neuroanatomie, Neuroimmunologie	Anatomie	15		
	2. Gimsa, Ulrike, Dr. rer nat. Habilitationstipendiatin der Charité	Immunologie Neuroimmunologie	Anatomie	15		
	3. Kwidzinski, Erik, Dipl. Biol., Doktorand	Neuroimmunologie	Anatomie	20		
	4. Øren, Anita, Dipl. Biophys. Doktorandin	Neuroimmunologie	Anatomie	20		
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter	entfällt					
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	1. n.n. X .		Anatomie	40		VIb

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

1. Bechmann

Ingo Bechmann beschäftigt sich seit 1994 mit der Frage der Antigenpräsentation im ZNS nach axonaler Läsion. Er arbeitete als Doktorand bei Prof. Nitsch in Frankfurt/Main und Berlin. Dort lernte er die wichtigen Methoden der Morphologie und der tierexperimentellen Arbeit, die er während mehrerer Forschungsaufenthalte im Labor von Prof. Leranthe in Yale vertiefte. Im Laufe der Arbeiten an immunologischen Reaktionen nach entorhinaler Läsion entwickelte sich die Fragestellung der durch diesen Eingriff induzierten T-Zell-Antwort sowie nach Mechanismen des Immunprivilegs im Allgemeinen. In diesem Projekt wird I.B. die Tieroperationen vornehmen sowie histologische Untersuchung des Gewebes durchführen.

2. Gimsa

Ulrike Gimsa arbeitet seit Jahren an Problemen der Th1/Th2 Differenzierung zunächst im Deutschen Rheumaforschungszentrum, wo sie sich mit dieser Frage bei Rheumatoider Arthritis beschäftigte. Seit 1998 hat Frau Gimsa ihr Labor im Institut für Anatomie, wo sie wesentlich an der Etablierung eines neuroimmunologischen Schwerpunktes beteiligt war. Seit dieser Zeit besteht eine enge Kollaboration mit I.B., die bisher zu vier Publikationen führte (Brain Pathology, Glia, Experimental Neurology, FASEB Journal). Mehrere Manuskripte sind zur Begutachtung eingereicht. U.G. besitzt breit gefächertes immunologisches Know-How und wird in diesem Projekt die Experimente zur Charakterisierung der T-Zell-Antworten leiten.

3. Kwidzinski

Herr Kwidzinski beschäftigt sich seit März 2000 mit der Rolle derIDO für das Immunprivileg im ZNS. Dieses Projekt wird seine Promotionsarbeit zum Doctor rer. med. darstellen.

Bisher wurde die Expression in Mikrogliazellen und Astrozyten nach IF-gamma nachgewiesen. Mikrogliazellen zeigten eine Inhibition von T-Zell Proliferation, die nach Gabe eines IDO-spezifischen Inhibitors (1-Methyltryptophan) unterdrückt wurde. Der Inhibitor blockiert keine Tryptophankanäle, wie mittels radioaktiv-markierten Tryptophans in Importassays von Herrn K. nachgewiesen wurde. Durch ein von ihm hergestelltes Antiserum konnte zudem die IDO im ZNS zellulär lokalisiert werden. Ausgehend von diesen Befunden soll nun im Rahmen des SFB 507 die Rolle der IDO in den unter 3.5. beschriebenen Experimenten *in vivo* funktionell charakterisiert werden.

4. Øren

Frau Øren beschäftigt sich seit Mai 2000 im Rahmen ihrer Promotionsarbeit zum Doctor rer. med. mit Interaktionen von Astrozyten und Th1- bzw. Th2-Zellen in Ko-Kulturen von Astrozyten und T-Zellen und im Modell der organotypischen Schnittkultur. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, unter welchen Bedingungen Astrozyten anti-inflammatorisch bzw. pro-inflammatorisch agieren und ob es, wie in der Literatur angedeutet, eine Bevorzugung von Th2-Immunantworten durch Astrozyten gibt. Erste Ergebnisse zeigen, daß Astrozyten in der Lage sind, T-Zellantworten herunterzuregulieren, wobei Th1-Zellen effektiver beeinflußt werden. Mit dieser anti-inflammatorischen Wirkung könnten Astrozyten als effektive Gegenspieler von Mikrogliazellen in neuroinflammatorischen Prozessen wirksam werden. Im Rahmen des SFB wird Frau Øren ihre *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* validieren.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

1. n.n.

Die Notwendigkeit der von uns beantragten MTA ergibt sich aus den zur Durchführung der geplanten Experimente notwendigen, teilweise sehr zeitaufwendigen Routinearbeiten.

Während die Antragsteller alle Eingriffe an Tieren (ECL, Injektion von Antigenen, Entnahme der Lymphknoten, Perfusionen) sowie die histologischen Untersuchungen selbst durchführen werden, sind sie auf Hilfe bei der Aufarbeitung des Gewebes (Schneiden der Hirne, Immunzytochemie, Fertigstellung der Präparate für die mikroskopische Untersuchung), Routinearbeiten der Zell-

Isolierung (Präparation der Medien, Magnetische Isolierung, Zentrifugationen), Tierpflege sowie bei der Durchführung der ELISAs auf Hilfe angewiesen. Da diese Routinearbeiten schnell erlernbar sind, wurde die Stelle einer Anfängerin als MTA (BAT VIb) beantragt.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausstattung voraussichtlich zur Verfügung:	5.000	5.000	5.000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausstattung	20.000	20.000	20.000

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur **Ergänzungsausstattung** der Sächlichen Verwaltungsausgaben

522 für 2002

	DM	<Antragssumme>
MBP/OVA zur Injektion	3000	
ELISAs zum Messen von Th1/Th2 Zytokinen	4000	
Zytokine als Danger-Signale	3000	
Antikörper für die histologische Aufarbeitung, als Blocker und zur Zellisolierung	5000	
Tiere (SJL, andere Tiere kommen aus eigener Zucht)	2000	
Zellkulturmaterial	3000	
>		20.000

522 für 2003

	DM	<Antragssumme>
MBP/OVA zur Injektion	3000	
ELISAs zum Messen von Th1/Th2 Zytokinen	4000	
Zytokine als Danger-Signale	3000	
Antikörper für die histologische Aufarbeitung, als Blocker und zur Zellisolierung	5000	
Tiere (SJL, andere Tiere kommen aus eigener Zucht)	2000	
Zellkulturmaterial	3000	
>		20.000

522 für 2004

	DM	<Antragssumme>
MBP/OVA zur Injektion	3000	
ELISAs zum Messen von Th1/Th2 Zytokinen	4000	
Zytokine als Danger-Signale	3000	
Antikörper für die histologische Aufarbeitung, als Blocker und zur Zellisolierung	5000	
Tiere (SJL, andere Tiere kommen aus eigener Zucht)	2000	
Zellkulturmaterial	3000	
>		20.000

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

entfällt

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Investitionen

entfällt

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt B14

3.1.1 Thema: Funktionelle Charakterisierung und Bedeutung des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neurologie, Neuroimmunologie

3.1.3 Leiter/in:

Zipp, Frauke, 17.3.63
 Charité, NWFZ, 10098 Berlin, Germany
 Tel +49-30-2802-3273
 FAX +49-30-2802-3083
 E-mail frauke.zipp@charite.de

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

Ja, befristet bis zum 31.8.2006

3.1.4 entfällt

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

Direkte Untersuchungen am Menschen sind nicht geplant. Es liegen Voten der Ethikkommission der Charité vor für die Arbeit im Bereich der Zellkultur und Gen-/Protein-Expression, basierend auf Blutentnahmen und Gewinnung von Liquor, sowie für histologische Arbeit an Biopsien von Epilepsie- und Multiple Sklerose (MS)-Patienten sowie Autopsiematerial (s. Anlage). Es wird nur Material von Personen eingeschlossen, die ihr Einverständnis gegeben haben. Die Untersuchungen von Liquor, Biopsien und Autopsien erfolgt an Material, welches im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen gewonnen wird und andernfalls verworfen würde. Die Risiken der diagnostischen Untersuchungen und operativen Eingriffe werden bei der Planung der Maßnahmen erörtert. Die vorgesehenen Blutentnahmen werden zumeist gesondert für Forschungszwecke durchgeführt. Die Patienten werden darüber aufgeklärt, daß es in Ausnahmefällen zu Hämatomen und Entzündungen an der Einstichstelle und zu vasovagalen Synkopen kommen kann.

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-Jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-Ausgaben	Investitionen	Gesamt
2002	148.8 TDM	30 TDM		178.8 TDM
2003	148.8 TDM	30 TDM		178.8 TDM
2004	148.8 TDM	30 TDM		178.8 TDM

3.2 Zusammenfassung

Bei der Multiplen Sklerose (MS) geht man davon aus, daß autoreaktive T-Zellen ins Zentralnervensystem (ZNS) wandern und zur Zerstörung von glialen/neuronalen Strukturen führen. Sowohl bei der Kontrolle von T-Zellen als auch bei Schadens-Mechanismen im ZNS spielt Apoptose eine Rolle. Therapeutisch ist einerseits die Eliminierung autoaggressiver T-Zellen, andererseits die Blockade der Schädigung im ZNS wünschenswert. In dieser dualen Rolle der Apoptose nimmt das TRAIL-Rezeptor/TRAIL-System nach ersten Ergebnissen eine besondere Funktion ein. Dieses kann Zelltod durch Apoptose-vermittelnde sowie -blockierende membranständige Rezeptoren regulieren und weist erhebliche Speziesunterschiede auf. Anders als bei dem TNF-Rezeptor/TNF und dem CD95/CD95-Ligand-System bedeutet die vermutete Beteiligung TRAIL-vermittelter Apoptose an der ZNS-Schädigung, jedoch nicht an der T-Zell-Elimination im Menschen eine gezielte therapeutische Interventionsmöglichkeit. Um die Rolle des TRAIL-Systems unter physiologischen Bedingungen und in der MS detailliert verstehen zu können, sollen 1) Beteiligung und Anteil dieses Systems an den T-Zell-Effektormechanismen im ZNS in Kokulturen aus humanen akuten Hirnschnitten und autologen Antigen-spezifischen T-Zellen geklärt, 2) Apoptose-unabhängige Funktionen dieses Systems in humanen T-Zell-Kulturen analysiert, 3) die Expression von TRAIL und den verschiedenen Rezeptoren im ZNS und Liquor von MS-Patienten charakterisiert und 4) die therapeutisch relevante Modulation TRAIL-vermittelter Apoptose im ZNS sowie in den humanen ZNS/T-Zell-Kokulturen untersucht werden.

3.3 Stand der Forschung

Bei der Multiplen Sklerose (MS) kommt es zu Autoimmunphänomenen mit Demyelinisierung und Inflammation im Zentralnervensystem (ZNS). Neuronale Strukturen sind jedoch früher und in Untergruppen der MS stärker betroffen (Trapp et al., 1998), als bislang angenommen, weshalb sich die Vielfalt der infragekommenden Pathomechanismen noch vergrößert (Lucchinetti et al., 2000). Voraussetzung ist höchstwahrscheinlich, daß autoreaktive T-Zellen vom Helfer-1-Typ (Th-1) die Blut-Hirn-Schranke durchwandern. Diese produzieren große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen, d.h. insbesondere Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF), und Gewebe-destruierende Mediatoren, wenn sie ihr Zielantigen finden. Sie unterscheiden sich von Lymphozyten der Th-2-Subpopulation, die vor allem die regulatorischen Zytokine Interleukin (IL)-4 und IL-10 ausschütten und mit B-Zellen interagieren. Von diesen produzierte Autoantikörper spielen in der Pathogenese entweder nur eine Verstärkerrolle oder sind für eine Untergruppe der Krankheitsverläufe von Bedeutung. Die therapeutischen Möglichkeiten bei der MS, die vor allem junge Erwachsene betrifft, sind in den letzten wenigen Jahren zwar durch immunmodulatorische Substanzen verbessert worden, jedoch insgesamt noch weit entfernt von zufriedenstellender Behandlung ohne viele Nebenwirkungen. Um spezifischer wirksame Medikamente entwickeln zu können, müssen wir die Pathogenese dieser Erkrankung besser verstehen.

Ein Regulationsprozeß, der höchstwahrscheinlich vielfältige Bedeutung in der MS-Pathogenese hat, ist die Apoptose, ein genetisch determiniertes physiologisches Zelltodprogramm, an dem eine Reihe von Mitgliedern der TNF/Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Superfamilie mitwirken (Malipiero et al., 1997; s. Gold et al., 1997; s. Pender 1998; Zhou et al., 1999; s. Zipp et al., 1999). Einerseits reguliert Apoptose die Anzahl der aktivierten T-Zellen im Blut (Krammer 1998) und im Nervensystem (Schmied et al., 1993; Bachmann et al., 1999; Bechmann et al., 1999). Andererseits ist Apoptose ein

wesentlicher Mechanismus der Schädigung von Oligodendrozyten und Neuronen. Diese duale Rolle der Apoptose und somit der Apoptose-induzierenden Todesrezeptor/-ligand-Systeme in den pathophysiologischen Prozessen der MS ist eine mögliche Erklärung für die fehlende therapeutische Wirkung der TNF-Blockade in zwei klinischen MS-Studien (van Oosten et al., 1996; The Lenercept MSSG, 1999) und für widersprüchliche Ergebnisse zum CD95/CD95-Ligand-System im Tierexperiment (Übersicht in Aktas et al., 2000).

Ein Todesrezeptor/-ligand-System, welches sich von den zuvor genannten nach bisheriger Datenlage erheblich unterscheidet, ist das kürzlich entdeckte TRAIL-Rezeptor/TRAIL-System. TRAIL bindet nicht nur Apoptose-vermittelnde (TRAIL-Rezeptor 1/DR4 und TRAIL-Rezeptor 2/DR5), sondern auch membranständige Rezeptoren, deren Todesdomäne fehlt (TRAIL-Rezeptor 3/DcR1/TRID) oder verkürzt ist (TRAIL-Rezeptor 4/DcR2/TRUNDD) (Walczak et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997). Diese blockieren Apoptose bzw. leiten kein Apoptose-Signal in die Zelle. Offensichtlich gibt es für das TRAIL-Rezeptor/TRAIL-System größere Spezies-Unterschiede (Jo et al., 2000) als für das TNF-Rezeptor/TNF und das CD95/CD95-Ligand-System. So wurde aufgrund von Tierexperimenten angenommen, daß TRAIL eine spezifische Tumorthherapie sein könnte (Ashkenazi et al., 1999; Roth et al., 1999; Walczak et al., 1999), ohne daß normales Gewebe, wie z.B. auch das ZNS geschädigt wird. Wir haben jedoch an humanen akuten Hirnschnitten erstmalig gezeigt, daß TRAIL im Gegensatz zur Maus im Menschen massiven Zelltod in lebendem ZNS-Gewebe induziert (Nitsch et al., 2000).

TRAIL-vermittelte Apoptose ist im Menschen nicht an der T-Zell-Elimination beteiligt und damit kein Kontrollmechanismus für T-Zellen (Wendling et al., 2000), jedoch ein potentieller Schädigungsmechanismus für ZNS-Gewebe (Nitsch et al., 2000). Somit liefert dieses System möglicherweise eine spezifischere therapeutische Interventionsmöglichkeit in einer Autoimmunkrankheit des ZNS wie der MS als die bisher erfolgten Ansätze im TNF-System. Eine Hochregulation des Liganden in peripheren Immunzellen bei MS-Patienten unterstützt die Annahme, daß TRAIL-vermittelte Apoptose ein Effektormechanismus der T-Zellen in der MS sein könnte (Huang et al., 2000). Die Blockade dieses Systems im ZNS sollte im Menschen protektiv sein, ohne daß die Elimination von T-Zellen eingeschränkt wird.

Unerwartet sind ganz neue Ergebnisse, die eine Exazerbation der experimentellen Arthritis (Song et al., 2000) und Encephalomyelitis (Hilliard et al., 2001) infolge einer peripheren TRAIL-Blockade beschreiben. Nach diesen Untersuchungen hemmt TRAIL die T-Zell-Proliferation sowie IFN- γ -Produktion. TRAIL hat somit zumindest im Tier offensichtlich noch andere als Apoptose-induzierende Wirkungen.

Literatur

- Aktas, O., U. Wendling, R. Zschenderlein, F. Zipp. (2000) Apoptose bei multipler Sklerose. *Nervenarzt*, 71: 767-73
- Ashkenazi, A., R.C. Pai, S. Fong, S. Leung, D.A. Lawrence, S.A. Marsters et al. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Inv.*, 104: 55-162
- Bachmann, R., H.P. Eugster, K. Frei, A. Fontana, H. Lassmann (1999) Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am. J. Pathol.* 154:1417-1422
- Bechmann, I., G. Mor, J. Nilsen, M. Eliza, R. Nitsch, F. Naftolin (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*; 27(1):62-74
- Degli-Esposti, M.A., W.C. Dougall, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, C.A. Smith, and R.G. Goodwin (1997) The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813
- Gold, R., H.P. Hartung, H. Lassmann (1997) T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. *TINS* 20:399-404
- Hilliard, B., A. Wilmen, C. Seidel, T.S.T. Liu, R. Göke, Y. Chen (2001) Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 166: 1314-1319

- Huang, W.X., P. Huang, A. Gomes, J. Hillert (2000) Apoptosis mediators FasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS. *Neurology*, 55: 928-934
- Jo, M., T.H. Kim, D.W. Seol, J. Esplen, K. Dorko, T.R. Billiar, S.C. Strom (2000) TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in normal human hepatocytes. *Nat. Med.*, 6: 564-567
- Krammer, PH. (1998) CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.*, 71, 163-210.
- Lucchinetti, C., W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, H. Lassmann (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47: 707-717
- Malipiero, U., K. Frei, K.S. Spanaus, C. Agresti, H. Lassmann, M. Hahne, J. Tschopp, H.P. Eugster, A. Fontana (1997) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient lpr and gld mice. *Eur. J. Immunol.* 27:3151-3160
- Nitsch, R., I. Bechmann, R.A. Deisz, D. Haas, D., T.N. Lehmann, U. Wendling, F. Zipp (2000) Human brain-cell death induced by tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet*, 356: 827-828
- Pender M.P. (1998) Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet* 351:978-81
- Roth, W., S. Isenmann, U. Naumann, S. Kügler, M. Bähr, J. Dichgans et al. (1999) Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res.*, 265: 479-483
- Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, Lassmann H. (1993) Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am. J. Pathol.*, 143, 446-52.
- Song, K., Y. Chen, R. Göke, A. Wilmen, C. Seidel, A. Göke, B. Hilliard, Y. Chen (2000) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J. Exp. Med.*, 191: 1095-1103
- The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group (1999) TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology*, 53: 457-65
- Trapp, B.D., J. Peterson, R.M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork, L. Bo (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338, 278-85
- van Oosten, B.W., F. Barkhof, L. Truyen, J.B. Boringa, F.W. Bertelsmann, B.M. von Blomberg, J.N. Woody, H.P. Hartung, C.H. Polman (1996) Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*, 47: 1531-4
- Degli-Esposti, M.A., P.J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C.-P. Huang, R.F. DuBose, R.G. Goodwin, and C.A. Smith (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.* 186:1165.
- Walczak, H., R.E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T.S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, et al. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.*, 5: 157-163
- Wendling, U., H. Walczak, J. Dörr, M. Weller, P.H. Krammer, F. Zipp (2000) Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *Cell Death Diff.*, 7: 637-644
- Zipp, F., P.H. Krammer, M. Weller (1999) Immune (dys)regulation in multiple sclerosis: role of the CD95/CD95 ligand system. *Immunol. Today*, 20: 550-554

3.4 Eigene Vorarbeiten

Im Zentrum der Untersuchungen stehen Mechanismen der Regulation von T-Zellen. Autoreaktive T-Zellen werden nämlich sowohl bei MS-Patienten als auch bei Gesunden gefunden. Zudem wissen wir mittlerweile, daß die Antigenerkennung durch T-Zellen nicht so spezifisch ist wie angenommen. Somit muß es Immunregulationsprozesse geben, die normalerweise eine Kontrolle der aktivierbaren Autoantigen-Immunreaktion darstellen und bei Patienten fehlerhaft sind. Das Verständnis dieser Mechanismen liefert möglicherweise neue therapeutische Ansätze.

Impfstrategien, die sich die Kontrolle autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen zu Nutzen machen wollen, stehen vor dem Problem, daß die Immunantwort auf den autoreaktiven T-Zell-Rezeptor sehr heterogen ist (Zipp et al. 1998b). Umgekehrt wurde wiederholt der Verdacht geäußert, daß Impfung mit anderen Antigenen Entmarkungsprozesse im Nervensystem hervorrufen kann. In der ersten kontrollierten Studie zur Hepatitis-B-Impfung zeigte sich an einer genetisch relativ homogenen Population in den USA kein Unterschied in der Inzidenz von Entmarkungsprozessen einschließlich MS bei Personen, die gegen Hepatitis-B geimpft wurden, im Vergleich zu nicht-geimpften (Zipp et al., 1999b). Hierzu laufen derzeit weitere Untersuchungen, die zeigen sollen, ob es durch die Hepatitis-B-Impfung zu einer Induktion der Myelin-spezifischen T-Zell-Antwort kommen kann, die im gesunden Immunsystem kontrolliert wird und im Patienten eine pathophysiologische Rolle spielen könnte.

Als mögliche therapeutische Strategie könnte die Induktion des sogenannten Aktivierungs-induzierten T-Zell-Tods genutzt werden (Wendling et al., 2000a). Es gibt Hinweise dafür, daß eine eingeschränkte T-Zell-Apoptose bei der MS zur pathologischen Persistenz autoaggressiver Myelin-spezifischer T-Zellen führt (Übersicht in Zipp et al., 1999a; Aktas et al., 2000). Die Apoptose-Suszeptibilität polyklonaler T-Zellen durch das direkte Triggern des CD95-Rezeptors unterscheidet sich nach unseren Beobachtungen jedoch nicht zwischen Patienten und Gesunden (Zipp et al., 1998a). Ein Faktor, der die Vulnerabilität der T-Zellen herabsetzen könnte und gleichzeitig ein Marker für das Ansprechen immunmodulatorischer Therapie zu sein scheint, ist der lösliche CD95-Rezeptor (Zipp et al., 1998c,d). In jedem Fall sind Antigen-spezifische T-Zellen weniger empfindlich gegenüber löslichem monomeren CD95-Ligand als maligne T-Zellen und Gliomzellen (Zipp et al., 1997). Die Ursache dafür, daß dieser lösliche CD95-Ligand maligne Zellen, jedoch nicht Antigen-spezifische T-Zellen lysiert, könnte u.a. in der differentiellen Regulation der Expression von Bcl-2-Familienmitgliedern liegen.

Ausgehend von Befunden zum CD95/CD95-Ligand-System, erfolgte die Untersuchung der T-zellulären Expression und Bedeutung Apoptose-regulierender Proteine für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose. Wir konnten zeigen, daß die in der Akutbehandlung der MS eingesetzten Glukokortikoide zwar Apoptose in humanen (Auto)antigen-spezifischen und polyklonalen T-Zellen induzieren, diese jedoch dann vor CD95-induzierter Apoptose schützen (Zipp et al. 2000c). Dieser Mechanismus kann vermutlich durch eine Hochregulation von anti-apoptotischem Bcl-2 erklärt werden und könnte zu der fehlenden langfristigen Wirkung von Glukokortikoiden in der MS-Therapie beitragen.

Für die immunmodulatorische Intervalltherapie durch Interferon-beta (IFN- β) konnten wir zeigen, daß sie den löslichen Apoptose-blockierenden CD95-Rezeptor nach mehreren Monaten herabreguliert (Zipp et al. 1998d). IFN- β induziert jedoch nach unseren Untersuchungen in humanen Antigen-spezifischen T-Zellen nicht direkt Apoptose (Zipp et al. 2000b). Derzeit werden noch Arbeiten zum löslichen CD95 sowie zur T-Zell-Apoptose in einer großen IFN- β -Therapie-Studie und zur Frage, welche Zellen für die Produktion des löslichen CD95 hauptverantwortlich sind, in *in vitro*-Experimenten abgeschlossen (s. Kongreßbeiträge in der Publikationsliste der Antragstellerin).

Weiterhin wurden die molekularen Mechanismen der ebenfalls immunmodulierend wirkenden Immunglobuline untersucht, deren Wirkmechanismus und Stand in der MS noch nicht geklärt und für die ein Einfluß auf den Zelltod beschrieben ist. Immunglobuline zeigen jedoch keine Induktion der Apoptose in den (Auto)antigen-spezifischen T-Zellen. Hingegen fand sich eine deutliche Inhibition der T-Zell-Proliferation (Aktas et al., 2001).

Wesentliche Grundlage für das Verständnis der Apoptose in der MS ist die Untersuchung der Rolle des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems, da sich dieses im Unterschied zu anderen Mitgliedern der TNF/NGF-Superfamilie durch ein Nebeneinander von membranständigen Apoptose-vermittelnden und -blockierenden Rezeptoren auszeichnet. Die erste Hypothese war demnach, daß dieses System durch unterschiedliche Expression und Verteilung der Rezeptoren auf T-Zellen deren Vulnerabilität mitbestimmt und somit eine besondere Rolle in der Autoimmunität spielen könnte. Mittlerweile wissen wir, daß dieses System nicht redundant zu den anderen Apoptose-vermittelnden Systemen ist, sondern andere Funktionen besitzt. T-Zellen exprimieren Apoptose-vermittelnde (TRAIL-Rezeptor-1, 2) und -blockierende (TRAIL-Rezeptor-3, 4) TRAIL-Rezeptoren, sind aber vollkommen resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose, induziert durch den trimerisierten Liganden oder durch

agonistische Rezeptor-Antikörper (Wendling et al. 2000a). Es fanden sich weder Annexin-V-Bindung, Caspasen-Aktivierung noch DNA-Fragmentierung. Die Resistenz gegenüber den Apoptose-induzierenden Antikörpern, die nur an die agonistischen TRAIL-Rezeptoren binden, zeigt, daß die Apoptose-blockierenden TRAIL-Rezeptoren auf den T-Zellen nicht verantwortlich sind für die fehlende Vulnerabilität gegenüber TRAIL.

Weiterhin fanden wir, daß sowohl Apoptose-vermittelnde als auch -blockierende TRAIL-Rezeptoren auf RNA-Ebene und auf Protein-Ebene im ZNS exprimiert sind. Im Gegensatz zum CD95-Liganden wird TRAIL selbst jedoch nicht im humanen adulten normalen ZNS exprimiert (Dörr et al., eingereicht). Eine Hochregulation des Liganden auf den (Auto)antigen-spezifischen T-Zellen (Wendling et al. 2000a) ließ uns vermuten, daß dieses System eine Rolle in den Effektormechanismen der T-Zellen spielen muß. Wir konnten zeigen, daß TRAIL in der Lage ist, im humanen lebenden Hirnschnitt neuronale und gliale Schädigung hervorzurufen (Nitsch et al., 2000). Die humanen Hirnschnitte wurden aus Epilepsie-chirurgischem Material gewonnen. Intrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen in den frischen Schnitten zeigten, daß diese in einem Liquor-ähnlichen Medium bis zu 48 Stunden lebendig waren und funktionsfähige Zellen enthielten. Zum ersten Mal sind damit humane "akute Hirnschnitte" unter elektrophysiologischer Ableitung funktionell für neuroimmunologische Fragestellungen eingesetzt worden.

Literatur

- Aktas, O., U. Wendling, U. Grieger, S. Waiczies, R. Zschenderlein, F. Zipp (2001) Polyspecific immunoglobulins ("IVIg") suppress proliferation of human (auto)antigen-specific T cells without inducing apoptosis. *J. Neuroimmunol.*, in press
- Aktas, O., U. Wendling, R. Zschenderlein, F. Zipp (2000) Apoptose bei Multipler Sklerose - Ätiopathogenetische Relevanz und Perspektiven für neue therapeutische Strategien. *Nervenarzt*, 71:767-73
- Nitsch, R., I. Bechmann, R.A. Deisz, D. Haas, T.N. Lehmann, U. Wendling, F. Zipp (2000) Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet*, 356: 827-828
- Wendling, U., O. Aktas, K. Schmierer, R. Zschenderlein, F. Zipp (2000a) Partial synergy of bisindolylmaleimide with apoptotic stimulus in antigen-specific T cells - Implications for MS. *J. Neuroimmunol*, 103: 69-75
- Wendling, U., H. Walczak, J. Dörr, M. Weller, P.H. Krammer, F. Zipp (2000b) Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *Cell Death Diff.*, 7: 637-644
- Zipp, F., R. Martin, R. Lichtenfels, W. Roth, J. Dichgans, P.H. Krammer, M. Weller (1997) Human autoreactive and foreign antigen-specific T cells resist apoptosis induced by recombinant CD95 ligand. *J. Immunol*, 159: 2108-15
- Zipp, F., E. Faber, N. Sommer, C. Müller, J. Dichgans, P.H. Krammer, R. Martin, M. Weller (1998a) CD95 expression and CD95-mediated apoptosis of T cells in multiple sclerosis. No differences from normal individuals and no relation to HLA-DR2. *J. Neuroimmunol*, 81: 168-172
- Zipp, F., M. Kerschensteiner, K. Dornmair, J. Makotka, S. Schmidt, A. Bender, G. Giegerich, R. de Waal Malefyt, H. Wekerle, R. Hohlfeld (1998b) Diversity of the anti-T-cell receptor immune response and its implications for T-cell vaccination therapy of multiple sclerosis. *Brain*, 121: 1395-1407 (s. Editorial)
- Zipp, F., K. Otzelberger, J. Dichgans, R. Martin, M. Weller (1998c) Serum CD95 of multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis. *J. Neuroimmunol*, 86: 151-154
- Zipp, F., M. Weller, P.A. Calabresi, J.A. Frank, C.N. Bash, J. Dichgans, H. McFarland, R. Martin (1998d) Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol*, 43: 116-120
- Zipp, F., P.H. Krammer, M. Weller (1999a) Immune (dys)regulation in multiple sclerosis: role of the CD95/CD95 ligand system. *Immunol. Today*, 20: 550-554
- Zipp, F., J.G. Weil, K.M. Einhäupl (1999b) No evidence for increased demyelinating diseases induced by hepatitis B vaccination. *Nat. Med*, 5: 964-965
- Zipp, F. (2000a) Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res*, 301: 163-171

- Zipp, F., M. Beyer, H. Gelderblom, D. Wernet, R. Zschenderlein, M. Weller (2000b) No induction of apoptosis by IFN- β in human. *Neurology*, 54: 524-526
- Zipp, F., U. Wendling, M. Beyer, C. Jacobi, U. Grieger, B. Wagenknecht, D. Wernet, J. Haas, M. Weller (2000c) Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *J. Neuroimmunol.*, 110: 214-222

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

Ziele

Um die Rolle des TRAIL-Systems unter physiologischen Bedingungen und in der MS vollständig verstehen zu können, sollen in diesem Projekt 1) Beteiligung und Anteil des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems an den T-Zell-Effektormechanismen im ZNS in Kokulturen aus humanen akuten Hirnschnitten und autologen Antigen-spezifischen T-Zellen geklärt, 2) Apoptose-unabhängige Funktionen dieses Systems in humanen T-Zell-Kulturen analysiert, 3) die Expression von TRAIL und den verschiedenen Rezeptoren im ZNS und im Liquor von MS-Patienten charakterisiert und 4) die therapeutisch relevante Modulation TRAIL-vermittelter Apoptose im ZNS sowie in den humanen ZNS/T-Zell-Kokulturen untersucht werden. Offene Fragen sind:

- 1) Ist TRAIL-vermittelte Apoptose ein möglicher Effektormechanismus von Myelin- und Kontrollantigen-spezifischen T-Zellen im ZNS ?
 - a) Wie groß ist der Anteil der TRAIL-vermittelten Apoptose in Abhängigkeit von der Antigen-spezifität und von der T-Helfer-Differenzierung (Th-1/Th-2) ?
 - b) Welche ZNS-Zellen sind jeweils Target ?
 - c) Gibt es einen Unterschied zwischen MS-Patienten und Kontrollen ?
- 2) Unter welchen Bedingungen inhibiert TRAIL die Proliferation von humanen T-Zellen ?
 - a) Welcher Mechanismus liegt dem zugrunde ?
 - b) Ist die Proliferationshemmung auf T-Zellen beschränkt, oder betrifft sie auch B-Zellen und Makrophagen ?
 - c) Hängt dieses Phänomen von dem Ausmaß der Aktivierung oder der T-Helfer-Differenzierung ab ?
 - d) Greift TRAIL nur in die Proliferation oder auch in das Zytokinmuster ein ?
 - e) Unterscheiden sich MS-Patienten und Kontrollpersonen in dem anti-proliferativen Effekt durch TRAIL ?
 - f) Ist die Inhibition der Proliferation modulierbar ?
- 3) Läßt sich aus der Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren im ZNS und im Liquor eine Bedeutung dieses Systems für die MS-Pathogenese ableiten ?
 - a) Werden TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in MS-Plaques exprimiert ?
 - b) Unterscheiden sich MS-Patienten von Gesunden in der Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in den Zellen des Liquors ?
- 4) Läßt sich die TRAIL-vermittelte Zytotoxizität im ZNS durch etablierte Therapeutika oder spezifische Apoptose-regulierende Substanzen modulieren ?

Arbeitsprogramm

zu 1) Unser Ziel ist es, die Funktion des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen vollständig zu verstehen.

zu a) Es soll die Beteiligung des TRAIL-Systems an den Effektormechanismen von T-Zellen, die Myelin- und Fremdantigene erkennen und entweder Th-1 oder Th-2-Zellen sind, im ZNS untersucht werden. Hierzu nutzen wir eine Kokultivierung von humanen Hirnschnitten und humanen T-Zell-Linien, spezifisch für Myelinbasiertes Protein, Tetanustoxoid oder Birkenpollen.

Die humanen akuten Hirnschnitte werden aus Epilepsie-chirurgischem Material gewonnen. Es besteht für dieses Projekt eine Kooperation mit dem Epilepsie-Zentrum Herzberge, der Neurochirurgie und der Anatomie der Charité. Durch die bereits erfolgte Etablierung dieser Kooperation ist eine direkte Übernahme des Hirngewebes aus dem Operationssaal in ein Liquor-ähnliches Medium gewährleistet. Intrazelluläre Ableitungen in den frischen Schnitten weisen die Intaktheit des Gewebes nach. Aus den

Voruntersuchungen wissen wir, daß in den akuten Schnitten bis zu 48 Stunden lang lebendige und funktionsfähige Zellen enthalten sind.

Einerseits werden autologe Antigen-spezifische T-Zellen von Patienten eingesetzt, bei denen ein Epilepsie-chirurgischer Eingriff geplant ist. Andererseits wird die Effektorfunktion von T-Zellen HLA-Klasse-II-äquivalenter MS-Patienten untersucht. Der HLA-Typ aller Patienten, von denen bereits in unserem Labor T-Zell-Linien oder -Klone etabliert sind, ist bekannt. Somit ist die Auswahl entsprechender T-Zell-Linien für diese Experimente je nach HLA-Typ des Hirnschnitts möglich. Die Isolierung und Charakterisierung von T-Zell-Linien, die verschiedene Antigene erkennen, setzt bei Epilepsie-Patienten mehrere Blutentnahmen im Vorfeld der Operation voraus. Da wir im Verlauf dadurch, daß nicht alle Epilepsie-Patienten schließlich der Operation zugeführt werden, mehr T-Zell-Linien generieren als wir für die Kokulturen benötigen, können diese dann als HLA-äquivalente Kontrollen eingesetzt werden. Für die spezifischen Stimulationen muß es von jedem Patienten einen Vorrat an Antigen-präsentierenden Zellen geben. Am Vortag bzw. direkt vor der Gabe der T-Zellen zu dem Hirnschnitt müssen die T-Zellen jedoch mit anti-CD3/anti-CD28 aktiviert und unmittelbar vor Applikation Fluoreszenz-markiert werden.

Durch gezielte Blockade des TRAIL-, TNF-, CD95- und des Perforin-Systems in den Kokulturen soll herausgearbeitet werden, ob sich T-Zell-Linien je nach Antigenerkennung und Zytokinmuster in Mechanismen der ZNS-Schädigung unterscheiden (Details sind in den Methoden beschrieben). Es soll insbesondere geklärt werden, ob proinflammatorische Myelin-spezifische Th-1-Zellen mehr TRAIL-vermittelte Gewebeschädigung induzieren als T-Zellen, die Fremdanitigen erkennen, für die Pathogenese der MS irrelevant und vom Th-2-Typ sind. Mögliche Unterschiede zwischen den T-Zellen könnte bedeuten, daß durch die Blockade des TRAIL-Systems vorwiegend die Gewebeschädigung durch pathogenetisch relevante T-Zellen beeinflusst wird. Nach unseren *in vitro*-Vorexperimenten mit Gliomzellen als Zielgewebe gibt es T-Zell-Linien, deren zytotoxische Eigenschaften vorwiegend durch eines dieser Systeme oder durch eine Kombination vermittelt sind.

Von den hier geplanten Kokulturrexperimenten versprechen wir uns, die Beteiligung und den Anteil TRAIL-vermittelter Apoptose an den Schadensmechanismen dieser T-Zell-Linien beurteilen zu können. Die Kokultur-Experimente einschließlich der Vorbereitung werden den gesamten Förderzeitraum beanspruchen.

zu b) Gleichzeitig soll in diesen Funktionsexperimenten analysiert werden, welche Zellen Ziel der Zytotoxizität sind. Aus unseren Ergebnissen zu TRAIL-vermittelter Apoptose in den humanen Hirnschnitten (Nitsch et al., 2000) vermuten wir eine vorrangige Bedeutung des TRAIL-Systems für den Zelltod von Neuronen und Oligodendrozyten. Die Beurteilung der Zellpopulationen, die geschädigt werden, erfolgt aufgrund der Lokalisation, Morphologie und unter Anwendung der Doppelfluoreszenz-Immunzytochemie.

zu c) Zusätzlich soll geklärt werden, ob sich T-Zellen der MS-Patienten von denen der Kontrollpersonen unterscheiden. Das Überwiegen TRAIL-vermittelter Zytotoxizität in Oligodendrozyten durch proinflammatorische Myelin-spezifische T-Zellen von MS-Patienten würde für die therapeutischen Erfolgsaussichten einer Blockade der TRAIL-vermittelten Apoptose im ZNS sprechen.

zu 2) Weiterhin soll geklärt werden, welche Apoptose-unabhängigen Funktionen das TRAIL-System hat. Tierexperimentelle Arbeiten haben gezeigt, daß eine Proliferationshemmung und Zytokinmodulation durch TRAIL in T-Zell-Linien induziert werden können (Song et al., 2000). Eine Hemmung der Proliferation ist nach unseren Vorarbeiten auch in einigen humanen T-Zell-Linien zu finden. Diese finden wir sowohl in der Antigen-spezifischen Aktivierung als auch in der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 (³H-Thymidin-Inkorporationstest). Warum induziert TRAIL in ZNS-Zellen Apoptose und inhibiert in einigen T-Zellen die Proliferation? Sind in der Regulation beider Phänomene dieselben Moleküle beteiligt (z.B. die Bcl-2-Familie), zumal wir wissen, daß z.B. Caspasen sowohl für Apoptose als auch Proliferation benötigt werden? Diese Arbeiten sollen an bereits etablierten T-Zell-Linien parallel zu den Kokulturrexperimenten durchgeführt werden. Sie werden die erste Hälfte des Förderzeitraums in Anspruch nehmen.

zu a) Unter TRAIL-Behandlung differentiell phosphorylierte (Signal-) Proteine im Western Blot, für die wir erste Hinweise haben, sollen durch Sequenzierung (Auftragsarbeit) identifiziert werden. Weiterhin ist geplant zu überprüfen, ob TRAIL Anergie in den T-Zellen induziert. Hierzu müssen die mit/ohne Inkubation mit TRAIL Antigen-spezifisch stimulierten Zellen nach einer Woche erneut

aktiviert werden. Eine herabgesetzte IL-2-Produktion und Proliferationshemmung (^3H -Thymidin-Inkorporationstest) würden diese Hypothese bestätigen. Eine Form der Anergie ist durch IL-2 reversibel, so daß die Reduktion der Anergie nach Hinzugabe von IL-2 mitgetestet werden soll.

zu b) Eine wesentliche Frage besteht darin, ob das beobachtete Phänomen auf T-Zellen beschränkt ist, oder ob TRAIL auch die Proliferation anderer Immunzellen hemmt. Dies kann im CFDA-Assay beurteilt werden, da die Zellpopulationen in diesem durchflußzytometrischen Proliferationstest unterschiedlich gefärbt werden können.

zu c) Der Einfluß des Aktivierungslevels und der T-Helfer-Differenzierung (Th-1/Th-2) wird durch Einsetzen unterschiedlicher T-Zell-Linien untersucht. Die in unserem Labor etablierten T-Zell-Linien sind bereits detailliert charakterisiert. Die Anzahl muß aber für dieses Projekt noch erweitert werden. Wir versprechen uns eine Erklärung der bisherigen Beobachtung, daß nicht alle T-Zellen durch TRAIL in ihrer Proliferation inhibiert werden.

zu d) Ist eine Modulation der Zytokinexpression in humanen T-Zellen ebenso wie in murinen (Song et al., 2000; Hilliard et al., 2001) zu finden? Hierzu werden IL-2, IFN- γ und TNF- α im Überstand von T-Zellen, die mit und ohne Inkubation mit TRAIL aktiviert werden, mit Bioassay (Standard-CTLL-Assay)/ELISA gemessen. Die Inhibition von IL-2 spräche für einen Eingriff von TRAIL in frühe Syntheseleistungen der T-Zellen. Ob die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen über die Proliferation hinaus blockiert wird, zeigen die IFN- γ - und TNF- α -Bestimmungen.

zu e) Es soll geklärt werden, ob sich MS-Patienten und Kontrollpersonen in der Wirkung des TRAIL auf die T-Zellen sowie ggf. andere Immunzellen unterscheiden.

zu f) Schließlich soll untersucht werden, ob sich diese Hemmung der Proliferation durch etablierte Therapeutika (z.B. IFN- β) oder andere Substanzen (z.B. selektive Caspaseninhibitoren) modulieren läßt. Eine unterschiedliche Modulierbarkeit der hier untersuchten TRAIL-Wirkung und TRAIL-vermittelter Apoptose würde gezielte Therapiestrategien ermöglichen.

zu 3) Um die Rolle des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems in der MS vollständig verstehen zu können, soll die Expression von TRAIL und den verschiedenen Rezeptoren im adulten ZNS sowie im Liquor und in Biopsien/-Autopsien von MS-Patienten (Kooperation mit Prof. Dr. W. Brück, Neuropathologie) immunzytochemisch und durch In situ Hybridisierung (Kooperation mit Dr. I. Bechmann und Dr. A. Bräuer, Neuroanatomie) detailliert analysiert werden. Die geplanten Untersuchungen werden zur Zeit im Labor der Antragstellerin etabliert, da das Ausmaß der Untersuchungen im Rahmen der bisherigen Kooperation mit der Anatomie nicht von dieser übernommen werden kann.

zu a) Hierzu muß zum einen noch durch Kolo-kalisation (Doppelfluoreszenz-Immunzytochemie, In situ-Hybridisierung) in humanem ZNS (Biopsien von Epilepsie-Patienten, Autopsien) analysiert werden, welcher der TRAIL-Rezeptoren auf welchen ZNS-Zellen exprimiert wird. Unsere Ergebnisse aus dem akuten Hirnschnitt deuten an, daß Mikrogliazellen in weitaus geringerem Maß suszeptibel gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sind als die übrigen ZNS-Zellen. Diese sind jedoch alle vulnerabel. Eine systematische Analyse soll die Verteilung der Apoptose-vermittelnden und trunkierten Rezeptoren und eine mögliche Korrelation mit der Apoptose-Suszeptibilität klären (s.a. 1 und 4). Eine Bestätigung der immunzytochemischen Daten soll mit der In situ-Hybridisierung erfolgen. Erste Experimente hierzu sind bereits durch den Medizindoktoranden Jan Dörr unter Anleitung von Dr. A. Bräuer (Neuroanatomie, Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité, Berlin) erfolgt. Da für diese Untersuchungen in der Anatomie jedoch keine ausreichende Kapazität besteht, werden sie im Labor der Antragstellerin etabliert. Nach diesen Vorarbeiten, also voraussichtlich nach 8 Monaten, ist dann zu klären, ob TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in MS-Plaques exprimiert werden. Hierzu gibt es eine Kooperation mit Herrn Prof. W. Brück, Neuropathologie Charité. Auch hier soll gezeigt werden, auf welchen Zellen sich welche Rezeptoren finden. Weiterhin soll die Expression von Ligand und Rezeptoren in unterschiedlichen MS-Plaques untersucht werden. Eine Verschiebung der Expression von trunkierten zu Apoptose-vermittelnden Rezeptoren auf Oligodendrozyten in aktiven Plaques z.B. wäre ein Hinweis dafür, daß TRAIL-vermittelte Schädigung eine Rolle für die MS spielt. Zu b) Parallel dazu werden Untersuchungen in Liquorzellen von MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden oder Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen Aufschluß über die Beteiligung des TRAIL-Systems in der MS-Pathophysiologie geben. Diese Analysen erfolgen mit der Taqman-RT-PCR und mit durchflußzytometrischer Oberflächenfärbung. Eine Hochregulation der Expression des Liganden auf T-Zellen in Patientenliquores z.B. würde die Rolle des TRAIL-Systems an den Effektormechanismen der MS bestätigen.

zu 4) Therapeutische TRAIL-bezogene Interventionen könnten bei der MS möglicherweise erfolgreicher sein als Strategien, die in das TNF-Rezeptor/TNF oder das CD95/CD95-Ligand-System eingreifen (zu Details s. 3.3). Aufbauend auf unseren Vorarbeiten zur ZNS-Schädigung durch TRAIL, ist die Modulation dieses Schädigungsmechanismus geplant. Es soll untersucht werden, ob etablierte Therapeutika (z.B. IFN- β , Glucocorticoide) TRAIL-induzierte Apoptose von neuronalen und glialen Zellen inhibieren und ob es Unterschiede gibt zu TNF- oder CD95-vermittelter Apoptose. Um Alternativen zur direkten Inhibition TRAIL-vermittelter Apoptose zu erhalten, sollen im zweiten Schritt andere Konzepte verfolgt werden, wie z.B. die selektive Inhibition von Caspasen. Ebenso wie die Vulnerabilität der ZNS-Zellen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose unterschiedlich zu sein scheint, ist bei den anti-apoptischen Therapieansätzen eine unterschiedlich starke Protektion der neuronalen/glialen Zellen denkbar. Die Experimente sollen immer im Vergleich zu anderen Apoptose-Stimuli als Kontrollen erfolgen. Diese Untersuchungen können zu Beginn der Antragsbearbeitung durchgeführt werden, da es Vorarbeiten gibt (Nitsch et al., 2000). In einem dritten Schritt sollen diese Strategien auf die Interaktion zwischen T-Zellen und ZNS-Gewebe übertragen werden. Wir versprechen uns von diesen Experimenten, die therapeutische Interventionsmöglichkeit in TRAIL-vermittelten Schadensmechanismen im Humanen beurteilen zu können.

Methoden

Die Methoden der *Antigen-spezifischen T-Zell-Kultur mit unterschiedlicher Antigen-Spezifität und unterschiedlichem THelfer-Profil sowie angrenzenden Methoden (z.B. Durchflußzytometrie, Bioassays, RT-PCR, Western Blot, ELISA)* sind in zahlreichen Vorarbeiten gezeigt (Aktas et al., 2001; Wendling et al., 2000a,b; Zipp et al., 1995, 1997, 1998, 2000b,c). Die Überprüfung der T-Helfer-Differenzierung erfolgt mit der *intrazellulären Durchflußzytometrie* (s. Zipp et al., Brain 1998). Zudem werden der Standard-*CTLL-Bioassay* für die IL-2-Messung und kommerzielle *ELISA* für die Analyse der Zytokinproduktion eingesetzt.

Die *HLA-Typisierung* erfolgt im Rahmen einer Kooperation Frau Dr. Schönemann, Transfusionsmedizin, Charité (Virchow-Klinikum).

Analyse der Proliferation unterschiedlicher Immunzellen mittels Durchflußzytometrie (CFDA-Assay): Aus peripherem Blut werden durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation PBMC isoliert (s.o.). Zur Entfernung freier Proteine werden die Zellen in PBS gewaschen und in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml aufgenommen. Zur Fluoreszenzmarkierung der intrazellulären Zellproteine wird 5-(and-6)-Carboxylfluoresceindiacetatsuccinimidylester (5(6)-CFDA-SE) (Mabtech) als Zellmembran-permeable Substanz in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ für 4 min bei RT zu den Zellen gegeben und anschließend durch Zugabe von PBS/0,5% BSA die Reaktion, bei der die zytoplasmatischen Zellproteine durch kovalente Bindung an Aminogruppen Fluorescein-markiert werden, gestoppt. Nach Waschen der Zellen und Aufnahme in Kulturmedium (RPMI, 5% AB-Serum) werden die Zellen in Kulturschalen bei 2×10^6 Zellen/ml kultiviert. Durch Zugabe von Mitogenen wird die Proliferation verschiedener Subpopulationen induziert und nach verschiedenen Inkubationszeiten die Zellen geerntet. Hierbei werden Phytohämagglutinin (PHA, $1 \mu\text{g/ml}$) für die T-Zellen, lyophilisierte *Staphylococcus aureus* Cowan I Bakterien (SAC, 0,01%; Calbiochem, Darmstadt) für die B-Zellen und CD137 humanes Ig Fusionsprotein (Alexis, Grünberg; Kulturplatten beschichtet bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$) für Monozyten/Makrophagen als Mitogene eingesetzt. Die Inkubationen erfolgen jeweils mit und ohne die Hinzugabe von verschiedenen Konzentrationen an TRAIL (Alexis). Die quantitative Auswertung erfolgt mittels der zytofluorometrischen Bestimmung des Anteils der Zellen, die nach den verschiedenen Generationen der Zellteilung jeweils eine Halbierung der Fluoreszenz aufweisen. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei, daß die Verwendung spezifischer Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper die Unterscheidung der einzelnen Subpopulationen wie B-Zellen (CD19), Makrophagen/Monozyten (CD14), CD4+ T-Zellen (CD3, CD4) und CD8+ T-Zellen (CD3, CD8) und ihrer jeweils individuellen Proliferationsrate ermöglicht.

Voraussetzung für die Untersuchungen der quantitativen Genexpression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in Liquorzellen ist ein Nachweisverfahren mit hoher Sensitivität und Reliabilität. Bei der *“realtime” RT-PCR* wird durch den direkten Nachweis des Amplifikationsproduktes über den

gesamten Verlauf der PCR erstmals eine objektive Quantifizierung ermöglicht. Die quantitative PCR soll daher mit der **Taqman Methode** durchgeführt werden. Bei diesem Verfahren wird die parallel zur PCR Amplifikation stattfindende Degradation einer zweifach fluoreszenzmarkierten Sonde während des gesamten Reaktionsablaufes aufgezeichnet. Die Ausgangsmenge an RNA korreliert dabei mit der Zeit (gemessen in PCR-Zyklen), bei der die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes der Sonde einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Die Experimente werden als 2-Stufen PCR durchgeführt werden. Zuerst wird von allen Proben RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Die gleichen cDNAs dienen somit als Ausgangsmaterial für die Untersuchung mehrerer unterschiedlicher Gene. Die Sequenzen für die Primer und Sonden der im Projekt zu untersuchenden Gene sind bereits weitgehend etabliert. Für alle Genexpressionsstudien werden die Ergebnisse im Verhältnis zu HPRT als housekeeping gene berechnet werden. Die Quantifizierung der Oberflächenexpression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in Liquorzellen erfolgt mit der Standard-**Durchflußzytometrie**.

Vorarbeiten gibt es darüberhinaus zur akuten **Hirnschnitt-Kultur** (Nitsch et al., 2000). Die **Kokultivierung von Hirnschnitt mit autologen humanen Antigen-spezifischen T-Zellen** setzt sich demnach aus bereits vorhandenem Know how (Kooperation mit PD Dr. R. Deisz, Anatomie, mit Dr. T.N. Lehmann, Neurochirurgie, und mit dem Epilepsie-Zentrum Herzberge) sowie dem Isolieren von T-Zell-Linien aus Epilepsie-Patienten und dem Applizieren dieser T-Zellen auf die autologen Hirnschnitte. Analog zu den tierexperimentellen Vorerfahrungen soll eine Kinetik erfolgen, bei der die Applikation der T-Zellen direkt nach der Aktivierung mit anti-CD3 (Hybridom von ATCC)/anti-CD28 (Alexis) bis zu 24 h danach vorgenommen wird. Unmittelbar vor der Applikation der T-Zellen erfolgt eine Markierung mit 5-(and-6)-Carboxylfluoresceindiacetatsuccinimidylester (5(6)-CFDA-SE) (Mabtech). Man muß jedoch damit rechnen, daß nicht jeder Patient, der für einen Epilepsie-chirurgischen Eingriff vorbereitet wird und aus dem T-Zell-Linien isoliert werden, schließlich einer Operation zugeführt wird. Aus dem Grund und weil außerdem T-Zell-Linien von Patienten eingesetzt werden sollen, muß jeder Patient HLA-typisiert werden, um auch HLA-äquivalente Kokulturen anlegen zu können.

Blockade von Zelltod-vermittelnden Systemen: Für die Blockade des TRAIL-Systems werden rhTRAIL-R2:Fc Fusionsprotein (Alexis, San Diego, USA) in einer Konzentration von 1µg/ml, für die Blockade des CD95/CD95-Ligand-System anti-CD95 Ligand-Antikörper (NOK-1; PharMingen, San Diego USA) in einer Konzentration von 5µg/ml und für die Blockade des TNF-Systems anti-TNF-α Serum (Prepro Tech Inc., Rocky Hill, USA) ebenfalls in einer Konzentration von 5µg/ml eingesetzt. Getestet wird die Funktion dieser Inhibitoren mit löslichem TRAIL (Alexis, San Diego, USA), CD95-Ligand-Leucin-Zipper (Prof. Krammer, DKFZ, Heidelberg) und TNF-α (Prepro Tech Inc. Rocky Hill, USA). Bleibt nach der Summe dieser Blockaden noch eine zytotoxische Aktivität übrig, soll außerdem versucht werden, den Perforin-vermittelten Anteil durch Blockade mit Concanamycin A (CMA) herauszuarbeiten.

Biopsie-Material von MS-Patienten wird in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. W. Brück, Neuropathologie Charité, untersucht, der als einer der international führenden Experten für die Beurteilung von MS-Läsionen ausgewiesen ist. Es soll die Expression von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren in aktiven und chronisch inaktiven Plaques untersucht werden. Dazu werden standardisierte immunhistologische Verfahren mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern (Dörr et al., eingereicht) sowie neuen kommerziellen Antikörpern und In situ-Hybridisierung eingesetzt.

Vorarbeiten gibt es zur **Immunzytochemie** und **Zelltodmessung** (Nitsch et al., 2001; Dörr et al., eingereicht). Für das hier beantragte Projekt muß der Zelltod quantifiziert werden. Die Färbung für Zelltod im lebenden humanen ZNS-Gewebe erfolgt mit Propidiumjodid. Die Quantifizierung wird mit einer automatisierten Bildauswertesoftware durchgeführt, Vorarbeiten sind bereits abgeschlossen (Kollaboration mit Dr. K. Roth, Anatomie). Der Nachweis von Zelltod in fixiertem Gewebe kann mit Hoechst 33342-Farbstoff (Mabtech) erfolgen. Um zu bestätigen, daß es sich bei dem Zelltod um Apoptose handelt, soll außerdem eine Caspase-3-Färbung (R & D, Wiesbaden, Dtl.) durchgeführt werden.

Zur zellulären Lokalisation der toten Zellen, die jedoch wegen möglichen Fehlens der Oberflächenmarker auch aufgrund der Lokalisation und Morphologie beurteilt werden, und der TRAIL-Rezeptoren im humanen Gewebe erfolgt **Doppelfluoreszenz-Immunzytochemie**, die derzeit in Kollaboration mit der Anatomie durchgeführt, jedoch aus Kapazitätsgründen dort nicht bearbeitet werden kann und daher in der Anatomie erlernt und in dem Labor der Antragstellerin etabliert werden soll (Bechmann und Nitsch; 1997). Paraformalin-fixierte Schnitte werden in einer Dicke von 70 µm mit einem Vibratom geschnitten. Die Schnitte werden mehrfach in 0,1 M Phosphat Puffer (PP) gewaschen und bis zu Beginn der Inkubationen bei 4°C verwahrt. Die Antikörper (für jeden Rezeptor gibt es mehrere kommerzielle Antikörper von Alexis, Chemikon und Pharmingen) werden in PP verdünnt, der 0,1% Triton X und 1% Serum aus der Spezies des jeweiligen Zweitantikörpers enthält. Über Nacht werden die Schnitte in Propidiumjodid, Hoechst 33342-Farbstoff oder im Erstantikörper gegen TRAIL-Rezeptoren bei 4°C inkubiert. Es folgt Inkubation für 2 h in einem Fluoreszein-gekoppelten Zweitantikörper. Zur Identifikation glialer/neuronaler Zellpopulationen werden Färbungen für PLP (Oligodendrozyten) (Serotec, Oxford, UK), CD68 (Mikroglia) (DAKO, Hamburg, Dtl.), GFAP (Astrozyten) (DAKO) und MAP-2 (Neurone) (Sigma) durchgeführt. Die gebundenen Antikörper werden durch Rhodamin-gekoppelte Zweitantikörper markiert. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgen an einem Olympus BX-50, das mit Engbandfiltern (U-MWU für Hoechst 33342-Fluoreszenz) ausgestattet ist.

In situ-Hybridisierung: Dazu wird gefrorenes ZNS-Gewebe eingebettet (Tissue-Tec.), im Kryostaten mit einer Schichtdicke von 19 µm geschnitten, auf sterilen Objektträgern in einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (PP) (pH 7,4) fixiert, in PP und DEPC-H₂O gewaschen und zuletzt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 80, 96, 2 x 100%) dehydriert. Als Sonden für den Nachweis von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren wurden spezifische Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 50 Basen und einem Cytosin/Guanosin-Gehalt von etwa 50% entworfen. Die Spezifität der Sonden wurde durch eine BLAST Genbank-Suche bestätigt bevor die Sonden kommerziell hergestellt wurden (Metabion, Martinsried): β-Aktin (Nukleotide 421-470) ACATGGCTGGGGTGGTGAAGGTCTCAA CATGATCTGGGTCATCTTCTCG, TRAIL-R1 (Nukleotide 296-347) TGATCATGAAGTT TGATGGTTGCAGCTGAGCTAGGTACGACCTGCAGCAGGA, TRAIL-R2 (Nukleotide 471-516) AGCTCCACTTCACCTGAATCACACCTGGTGCAGCGCAAGCAGAAAA, TRAIL-R3 (Nukleotide 635-684) AGCAGCTGGGGTTTCCACAGTGGCATTGGCACCAA ATTCTTCAACACACT, TRAIL-R4 (Nukleotide 606-652) CCCAGTGGAAGTGGCAGCT GATTCATTTTTGCACTTGATGTCCTCC, TRAIL (Nukleotide 141-190) AAGTTACAG CCACACAGAGAGACTGCAGGAGCACTGTGAAGATCACGATC, Maus-TRAIL (Nukleotide 514-558) ACGTGGTTGAGAAATGAATGCCCTTCCGAGAGGACTCCCA GGAT, Maus-TRAIL-Rezeptor (Nukleotide 697-741) CGTGTTGTGGTTAGAGTCATTTG TCGTGCTAGATGTCTGTCCGTC. Diese Sonden werden entsprechend einem Standardprotokoll mit α-³⁵S dATP (NEN, Boston, USA) unter Verwendung von Terminaler Desoxynukleotidtransferase (Boehringer, Mannheim) radioaktiv endmarkiert:



Die markierten Sonden werden aus dem Reaktionsansatz durch Säulenchromatographie extrahiert (Bio-Spin 6 Säulen, BIORAD, Hercules, USA), und in einem Szintillationszähler (Beckman, USA) quantifiziert. Anschließend wird pro Schnitt 30 µl Hybridisierungslösung mit einer Aktivität von jeweils 4x10⁵ Impulsen/min (≈ 6,6x10³ Bq) aufgetragen. Von jeder Sonde wird stets eine Negativkontrolle (Verhältnis unmarkierte/markierte Sonde 100:1) angefertigt. Anschließend werden die Schnitte für 16 h bei 42°C in einer feuchten Kammer inkubiert, um die Hybridisierung der Sonden mit der RNA zu ermöglichen. Im Anschluß daran werden die Schnitte mehrfach in SSC gewaschen um nicht gebundene Radioaktivität zu entfernen. Zuletzt werden die Schnitte in einer Ethanolreihe (50, 70 und 96%) dehydriert, getrocknet und in einer Silberhalogenidemulsion (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 21 d bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Durch die Energie der Strahlung werden die Silberhalogenoide zu einer metallischen Silberkörnung reduziert, die sich dann lichtmikroskopisch als schwarze Signale darstellen läßt. Anschließend werden die Schnitte entwickelt (Kodak, Rochester,

USA) und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch und wird photographisch dokumentiert. Für diese Methode gibt es bereits eine Kooperation mit der Neuroanatomie (Dr. A. Bräuer), die jedoch die Untersuchungen aus Gründen der Kapazität nicht durchführen kann.

Ergänzende Literatur:

Bechmann, I., R. Nitsch (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerated fibres following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia*, 20: 145-154

Dörr, J., U. Wendling, U. Grieger, H. Walczak, P.H. Kramer, R. Nitsch, I. Bechmann, F. Zipp. Expression of the TRAIL receptor/TRAIL system in human brain - implications for effector mechanisms in multiple sclerosis. (eingereicht)

Gimsa, U., S. Peter, I. Bechmann, R. Nitsch (2000) Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells. *Brain Pathology*, 10: 365-377

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Es bestehen bereits Kooperationen mit Prof. W. Brück, Neuropathologie, zur Erfassung von Polymorphismen in Apoptose-regulierenden Genen und mit Prof. R. Nitsch sowie Dr. I. Bechmann, Anatomie/Institut für Zell- und Neurobiologie, zur TRAIL-vermittelten Apoptose im ZNS (Nitsch et al., 2000). Sowohl mit Prof. W. Brück als auch mit Prof. R. Nitsch und Dr. I. Bechmann sind eine Reihe der hier beschriebenen Experimente in enger Zusammenarbeit bereits intiiert und geplant.

Mit Prof. W. Brück soll die Bedeutung des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems bei Multiple Sklerose-Patienten an Biopsien und Autopsien untersucht werden. Herr Prof. Brück hat das Gewebe in den letzten Jahren verstärkt gesammelt und ist international anerkannt in der Beurteilung der unterschiedlichen MS-Plaques.

Die Zusammenarbeit mit Prof. R. Nitsch und Dr. I. Bechmann ist bereits durch gemeinsame Publikationen erfolgreich. Die Synergie besteht in dem Zusammenfließen von Know how im Hirnschnittbereich und histologischen Methoden auf der einen und Know how in humaner T-Zell-Kultur einschließlich T-Zell-Klonen von MS-Patienten auf der anderen Seite.

Mit Prof. J. Weber bestehen methodische Verknüpfungen und werden Techniken gemeinsam genutzt und etabliert.

Zudem besteht eine Kooperation der Antragstellerin mit Dr. O. Ullrich, Anatomie, deren Erfolg sich bislang in einem Abstract des Neuroscience-Bandes ausgedrückt hat (s. Publikationsliste). Gegenstand sind Untersuchungen zur Mikrogliaaktivierung durch Myelinabbauprodukte, die sich in Liquores von MS-Patienten finden.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001 ¹⁾			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg. .-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg. .-Gr.	Anz.	Betrag DM
				BATIIa	1	94.800	BAT IIa	1	94.800	BAT IIa	1	94.800
				BATVIb	1	54.000	BAT VIb	1	54.000	BAT VIb	1	54.000
	zus.:			zus.:	2	148.800	zus.:	2	148.800	Zus.:	2	148.800
0												
SV			Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff	Betrag DM	Kosten- Kategori e Oder Kennziff	Betrag DM	Kosten- Kategori e Oder Kennziff	Betrag DM	Betrag DM	Betrag DM
			522	30.000	522	30.000	522	30.000	522	30.000		
I			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel Insges.			
			0			0			0			

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾ (einschl. Hilfskräfte)	1.) PD Dr. F. Zipp, Oberärztin	Neuroimmunologie	Neurologie	10 h		
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾²⁾ (einschl. Hilfskräfte)	1.) Dr. E. Grundström, PhD	Biologie	Neurologie	40 h		BATIIa
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾	1.) B. Seeger, MTA		Neurologie	40 h		BATVIb

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

¹⁾ Bitte durchnummerieren und Aufgabenbeschreibung nachfolgend erläutern

²⁾ Bitte Verfahrensgrundsätze der DFG zur Bezahlung wissenschaftl. Mitarbeiter beachten

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

1.) Frauke Zipp, PD Dr. med.

Das Projekt wird von Frau PD Dr. med. F. Zipp geleitet. Neben den Koordinationsleistungen für dieses Projekt betreut sie die Multiple Sklerose-Patienten.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Die Arbeitsgruppe verfügt nicht über eine MTA aus der Grundausrüstung.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausrüstung

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1.) Eva Grundström, PhD

Die Stelle ist für das Gelingen des Projekts absolut notwendig. Die Zell- und Hirnkultur mit angrenzenden Methoden in dem geforderten Umfang sowie die therapeutisch relevante Modulation der T-Zell-Effektorfunktionen setzen Fachkenntnisse einer/eines Biologin/Biologen voraus. In dem Projekt sind sowohl funktionelle Assays von T-Zellen mit unterschiedlicher Antigen-spezifität und unterschiedlichem T-Helfer-Status, durchflußzytometrische und Western Blot-Methoden als auch die Anleitung der immunzytochemischen und In situ-Hybridierungs-Arbeiten notwendig. Für die komplexen Problemstellungen in den beschriebenen Experimenten sind neben der Antragstellerin, die gleichzeitig Aufgaben als Oberärztin in der Neurologie erfüllt, Arbeit und Expertise einer/eines Postdoktorandin/en erforderlich. Frau Dr. E. Grundström eignet sich durch ihre tierexperimentelle Hirnschnitt-Erfahrung in besonderer Weise für diese Aufgaben. Sie hat sich aufgrund ihrer Ausbildung sowie Vorerfahrung im Bereich der Neurowissenschaften bereits schnell in die Thematik eingearbeitet. Methodisch bringt sie, den Anforderungen des Projekts entsprechend, insbesondere Kenntnisse aus dem Bereich der Gewebeschnittkultur, von Autopsien sowie histologisches und molekularbiologisches Know how mit. Es erfolgt zudem eine direkte Betreuung und je nach klinischer Verpflichtung Mitarbeit in allen Anteilen des Projekts durch die Antragstellerin.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

1.) Bibiane Seeger, MTA

Diese Stelle ist für die aufwendigen Kolokalisations-Untersuchungen in humanem ZNS-Gewebe notwendig. In der Arbeitsgruppe gibt es keine MTA aus der Grundausrüstung. Die Methoden wurden bereits durch die Kollaboration mit der Anatomie eingesetzt. Aufgrund der Vielzahl der Experimente müssen diese Arbeiten im Labor der Antragstellerin etabliert werden. Ein Medizindoktorand hat die Techniken teilweise im Rahmen seiner Arbeit bereits in der Anatomie erlernt. Im Folgenden sollen die immunzytochemischen und In situ-Hybridisierungs-Arbeiten detailliert im ZNS und insbesondere an Patientenmaterial ausgeführt werden. Hierbei ist eine enge Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Grundström geplant, die eigentliche Durchführung der Kolokalisations-Experimente kann jedoch von einer MTA geleistet werden. Gleichzeitig ist diese Stelle aber auch sowohl für die humane T-Zell-Isolierung und -Charakterisierung als auch für Vorbereitung und Applikation der T-Zellen auf Hirnschnitten vorgesehen. Diese Arbeit erfordert aufwendige T-Zell-Isolierung sowie logistische Arbeit, die von einer/einem MTA durchgeführt werden müssen. Frau B. Seeger hat bereits ein Jahr sehr erfolgreich im Bereich der humanen T-Zell-Kulturen gearbeitet, so daß sie für dieses Projekt ausgezeichnet geeignet wäre.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als <u>Grundausstattung</u> voraussichtlich zur Verfügung:	5.000	5.000	5.000

Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als <u>Ergänzungsausstattung</u> beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	30.000	30.000	30.000
--	--------	--------	--------

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

<522: Plastikwaren, Medien, Zusätze (Zellkultur)	15.000,- DM/Jahr
Antikörper und Material für Histologie	10.000,- DM/Jahr
<u>Oligonukleotide und Zusätze für In situ-Hybridisierung</u>	<u>5.000,- DM/Jahr</u>
Summe	30.000,- DM/Jahr

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

entfällt

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Investitionen

entfällt

3.1 ALLGEMEINE ANGABEN ZUM TEILPROJEKT NR. B15

3.1.1 Thema:

Interaktionen zwischen Entzündungsprozessen im ZNS und dem peripheren Immunsystem: Untersuchungen zum Infektionsrisiko und -prävention bei einer ZNS-vermittelten systemischen Immunsuppression am Ratten-Modell

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Klinische Neuroimmunologie / Neurochirurgie / Infektionsimmunologie

3.1.3 Leiter/in:

PD Dr. med. Christian Woiciechowsky

Oberarzt

geb. am 24. 06. 1962, deutsch

Klinik für Neurochirurgie,

Charité-Campus Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität zu Berlin,

Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin

Tel. (030) 450 560714, FAX (030) 450 560900

Privatadresse: 14089 Berlin, Sakrower Landstr. 23-29

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

Nein

Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

Institutsdirektor

geb. am 13. 05. 1953, deutsch

Institut für Medizinische Immunologie,

Charité-Campus Charité-Mitte, Humboldt-Universität zu Berlin,

Schumannstr. 20/21, 10098 Berlin

Tel. (030) 2802 5501, FAX (030) 2802 5461

Privatadresse: 10178 Berlin, Rathausstr. 11

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

Nein

3.1.4 Aktenzeichen SFB-Projekt:

SFB 507/B15

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haushalts- jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.- ausgaben	Investitionen	gesamt
1998	50,4 TDM	12,5 TDM		62,9 TDM
1999	103,2 TDM	25 TDM		128,2 TDM
2000	104,4 TDM	25 TDM		129,4 TDM
2001	106,8 TDM	25 TDM		131,8 TDM
Zwischen- summe				
2002	106,8 TDM	25 TDM	24,2	156,0 TDM
2003	106,8 TDM	25 TDM		131,8 TDM
2004	106,8 TDM	25 TDM		131,8 TDM

3.2 Zusammenfassung

In der zurückliegenden Antragsphase konnten wir am Modell der intracerebralen Zytokininfusion die Mechanismen einer ZNS-gesteuerten systemischen anti-inflammatorischen Reaktion bzw. Immunsuppression entschlüsseln. Dabei zeigte sich, daß durch eine IL-1-bedingte Aktivierung des sympathischen Nervensystems ein erhöhter IL-10-Release in der Peripherie erzeugt wird, der mit Propranolol - einem β 2-Blocker - inhibiert werden kann. Dieser sympathogene Pathway einer Neuroimmunomodulation wurde in weiteren Untersuchungen bestätigt. So konnten wir *in vitro* durch Zusatz von Adrenalin bzw. Noradrenalin eine IL-10-Freisetzung aus Monozyten ins Kulturmedium hervorrufen. Interessanterweise war dies wiederum durch den β -Blocker Propranolol zu inhibieren. Zudem konnten wir tierexperimentell und in klinischen Studien darlegen, daß eine Erhöhung des intrakraniellen Drucks mit einer IL-10-Ausschüttung über einen vergleichbaren Mechanismus (Sympathicusaktivierung) einhergeht. Das Phänomen einer peripheren IL-10-Freisetzung konnten wir auch mittels einer intraventrikulären IL-1- bzw. Pneumokokkenzellwand (PCW)-Bolusinjektion auslösen. Letztlich konnten wir auch im Lipopolysaccharid (LPS)-Sepsis-Modell zeigen, daß in der Akutphase der IL-10-Release neben einer Beeinflussung durch die neuroendokrine Achse auch stark an das sympathische Nervensystem gekoppelt ist.

Somit läßt sich zusammenfassen, daß wir in der zurückliegenden Antragsphase die Kaskade Hirnläsion (Infektion/SHT) → Hirndruckanstieg/lokaler Zytokinrelease → Sympathicusaktivierung → Adrenalin-/Noradrenalinrelease → systemische Immunveränderungen gut charakterisiert haben, wobei sich herausstellte, daß die Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels über β -Rezeptoren für die IL-10-Ausschüttung von wesentlicher Bedeutung sind.

Ausgehend von den klinischen Erfahrungen, wo Patienten mit einer nachgewiesenen ZNS-vermittelten Immunsuppression (hohes Plasma-IL-10) ein erhöhtes Infektionsrisiko haben, ergibt sich die Frage, ob ein solches Szenario an unserem Tiermodell simuliert werden kann. Dies würde Möglichkeiten eröffnen, die Effektivität verschiedener Infektionspräventions-Strategien vor der klinischen Testung tierexperimentell zu prüfen.

Dazu sind folgende Ansätze vorgesehen:

- Untersuchung der biologischen Relevanz einer ZNS-bedingten Immunsuppression im Ratten-Pneumonie-Modell.
- Untersuchungen zur Infektionsprävention bei einer ZNS-bedingten Immunsuppression im Ratten-Pneumonie-Modell durch Blockade der cerebralen Transmission (IL-1ra, Anti-CRF) und Blockade der Rezeptoren auf Immunzellen (Propranolol, RU 486).
- Untersuchungen zur Infektionsprävention bei einer ZNS-bedingten Immunsuppression im Ratten-Pneumonie-Modell durch Applikation von Immunmodulatoren (DHEA, G-CSF, IFN- γ).

3.3 Stand der Forschung

Eine Untersuchung an 734 Patienten der "Traumatic Coma Data Bank" ergab, daß die Pneumonie mit 40,6 % der Fälle und die Sepsis mit 10 % der Fälle die häufigsten extrakraniellen Komplikationen nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) sind, und es wurde postuliert, daß eine Senkung der Infektionsrate eine Verbesserung des Outcomes bei ca. 5 % der Patienten herbeiführen könnte [23]. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Mehrheit der SHT-Patienten eine Pneumonie innerhalb der ersten 3 Tage, d.h. in der Frühphase nach Trauma entwickelt und daß ein SHT ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer Pneumonie/Infektion bei polytraumatisierten Patienten ist [10,25].

Hieraus ergibt sich die Frage, warum SHT-Patienten ein erhöhtes Pneumonie-Risiko haben?

Wie in zahlreichen neuroimmunologischen Arbeiten, so konnte auch in unseren Untersuchungen gezeigt werden, daß eine direkte Beeinflussung des Immunsystems durch das ZNS existiert. Dabei ist die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HHN)-Achse und des sympathischen Nervensystems von wesentlicher Bedeutung [7,18]. Die freigesetzten neuroendokrinen Hormone (ACTH, Cortisol) und Neurotransmitter (Adrenalin, Noradrenalin) wirken vorwiegend immuninhibitorisch u.a. durch ein Stimulieren der Produktion anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- β) und die Hemmung der pro-inflammatorischen (TNF- α , IFN- γ , IL-12) [28]. Dies hat physiologische Bedeutung, um eine Überstimulation des Immunsystems zu verhindern, da pro-inflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α) die inhibitorischen Neuro-Immuno-Signalkaskaden aktivieren. Es führt jedoch bei einem SHT/Infektion/Ischämie, wo vorwiegend eine lokale Inflammation mit lokaler Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α stattfindet, zu einer zentral bedingten Immunsuppression, die Ursache des beschriebenen erhöhten Infektionsrisikos bei SHT-Patienten zu sein scheint [1,2,19,24,31-33]. Die Reproduzierbarkeit der klinischen Phänomene am Tiermodell erlaubte es uns, die einzelnen Wege näher zu charakterisieren und damit die Möglichkeiten einer Restauration/Modulation des zentral supprimierten Immunsystems zu prüfen. Insbesondere konnte durch eine β -adrenerge Blockade effektiv die überhöhte IL-10-Sekretion inhibiert werden.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob die im Ratten-Modell erzeugte zentral-bedingte systemische Immunsuppression eine biologische Relevanz hat, in der Hinsicht, daß diese Tiere ein nachweisbar erhöhtes Infektionsrisiko haben, ähnlich den SHT-Patienten.

An einem Tiermodell, an dem das erhöhte Infektionsrisiko infolge zentraler Immunsuppression simuliert werden kann, könnte geklärt werden, ob der klinisch beschriebene Zusammenhang zwischen zentraler Immunsuppression und Infektion wirklich kausal ist, da im Tiermodell sekundäre Einflußfaktoren, wie systemische Erkrankungen, Alter, Alkoholkonsum, zusätzliche Gewebsschäden etc., die beim traumatisierten Patienten eine große Rolle spielen und auch die Immunkompetenz beeinflussen, ausgeschlossen werden könnten. Außerdem würde ein solches Modell auch andere Situationen repräsentieren, wo eine intracerebrale Zytokinfreisetzung mit daraus resultierenden systemischen Immunveränderungen vorliegt, wie bspw. beim Hirninfarkt oder der Meningitis [3,30]. Letztlich könnten die so gewonnenen Erkenntnisse auch allgemein auf Stress-induzierten systemischen Immunveränderungen übertragen werden, bei denen ebenfalls zentrale immun-inhibitorische Pathways aktiviert werden [14,26,27].

Deshalb soll in diesem Projekt am Ratten-Modell der experimentellen Pneumonie das postulierte erhöhte Infektionsrisiko bei Vorliegen einer ZNS-vermittelten systemischen Immunsuppression überprüft werden [9,15,21]. Dieses Modell erscheint deshalb so geeignet, da – wie bereits erwähnt – die Pneumonie mit ca. 40 – 50 % die häufigste Infektion auf einer Intensivstation ist und zudem ein direkter Zusammenhang zwischen SHT und Pneumonierisiko zu bestehen scheint [10,23,25,29,31]. Zudem wurden an diesem

Modell bereits andere immunsupprimierende Einflüsse wie Alkohol untersucht, und es konnte gezeigt werden, daß eine Alkohol-induzierte Immunsuppression zu einer Verringerung des Immunzell-Recruitments in die Lunge, zu einer Verringerung der TNF- α -Synthese der Alveolarmakrophagen und zu einer Verringerung der bakteriellen Clearance in der Lunge führt [9,15]. Diese Veränderungen konnten durch die Applikation von Immunmodulatoren wie IFN- γ teilweise normalisiert werden [15]. Somit sind klar definierte Untersuchungsparameter vorhanden, und es wäre eine direkte Vergleichbarkeit mit anderen Formen einer Immunsuppression möglich.

Hieraus ergibt sich konsequenterweise die Frage, wie kann das zentral inhibierte Immunsystem moduliert/restauriert werden, um eine effektive Infektionsprävention zu erreichen.

Prinzipiell gibt es 2 Möglichkeiten ein durch zentrale Effektormechanismen supprimiertes Immunsystem zu modulieren/restaurieren, um die Infektabwehr zu normalisieren:

1. Blockade der zentralen Neuro-Immuno-Pathways auf unterschiedlichen Ebenen, um zu verhindern, daß die Effektormoleküle (Neurotransmitter, neuroendokrine Hormone) auf ihren Zielzellen (Monozyten/Makrophagen und/oder Lymphozyten) den Release/Synthese von Zytokinen beeinflussen.
2. Stimulation des Immunsystems, um den negativen Effekten einer zentralen Immunsuppression entgegenzuwirken..

Ad 1. kann durch zentral applizierte Antikörper/Rezeptorantagonisten die Wirkung der lokal produzierten pro-inflammatorischen Zytokine, vor allem von IL-1 inhibiert werden, die vornehmlich für die Aktivierung der inhibitorischen Neuro-Immuno-Pathways verantwortlich zu sein scheinen. Hierbei könnte durch die Applikation des IL-1 Rezeptorantagonisten (ra) eine Blockade dieser Effektor-Kette versucht werden. Weiterhin wäre eine intracerebrale Applikation von Corticotropin Releasing Factor (CRF)-Antikörpern sinnvoll, da die Freisetzung von CRF direkt durch IL-1 erfolgt und CRF dann sowohl die neuroendokrine Achse als auch das sympathische Nervensystem aktiviert. Unter anderen Fragestellungen wurde sowohl der Einsatz von IL-1ra zur Blockade von IL-1 als auch der Einsatz von CRF-Ak zur Blockade der CRF-Wirkung bereits untersucht und diese prinzipielle Möglichkeit experimentell bestätigt [4,11,13,22].

Weiterhin konnte sowohl in fremden als auch unseren Arbeiten gezeigt werden, daß durch eine periphere β 2-adrenerge Blockade die Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β) wirkungsvoll unterbunden werden kann [20,31]. Zudem kann die Aktivität von Mediatoren der neuroendokrine Achse gehemmt werden, so z.B. von Cortisol durch den Antagonisten RU 486 [6,16]. Dadurch erscheinen der β -Blocker Propranolol und RU 486 geeignet eine effektive Blockade der Neuro-Immuno-Pathways auf Rezeptorebene zu erzeugen.

Ad 2. Eine Stimulation des Immunsystems kann sowohl durch die Monozyten/Makrophagen stimulierendes IFN- γ als auch durch das Granulozyten stimulierendes G-CSF erfolgen [5,8]. Dabei konnte bereits bei der Alkohol-induzierten Immunsuppression im Ratten-Pneumonie-Modell demonstriert werden, daß durch IFN- γ die Infektabwehr wesentlich verbessert werden kann [15]. Desweiteren kann eine Immunstimulation durch Dehydroepiandrosteron (DHEA) erfolgen. Für dieses Steroidhormon konnte sowohl in *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien eine stimulierende Wirkung auf die Synthese der Zytokine IL-4, IL-2, TNF- α und IFN- γ gezeigt werden, während die Produktion von IL-10 eher erniedrigt wird [12]. Durch DHEAS konnte eine effektive Immunrestauration sowohl bei der Alkohol-bedingten Immunsuppression als auch nach Blutungs-bedingter Immundepression erreicht werden [17].

Literaturverzeichnis

1. Asadullah K, Woiciechowsky C, Döcke WD, Egerer K, Kox W, Vogel S, Sterry W, Volk HD (1996) 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 Emerg Med* 2:184-190.
2. Asadullah K, Woiciechowsky C, Döcke WD, Liebenthal C, Wauer H, Volk HD, Kox W, Vogel S, von Baehr R (1995) Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med* 23:1976-1983.

3. Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR (1995) Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol* 37:800-805.
4. Berkenbosch F, van OJ, del RA, Tilders F, Besedovsky H (1987) Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238:524-526.
5. Catania RA, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH (1999) Dehydroepiandrosterone restores immune function following trauma- haemorrhage by a direct effect on T lymphocytes. *Cytokine* 11:443-450.
6. Compton MM, Caron LA, Cidlowski JA (1987) Glucocorticoid action on the immune system. *J Steroid Biochem* 27:201-208.
7. Falaschi P, Martocchia A, Proietti A, Pastore R, D'Urso R (1994) Immune system and the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. Common words for a single language. *Ann N Y Acad Sci* 741:223-233.
8. Gibbons RA, Martinez OM, Lim RC, Horn JK, Garovoy MR (1989) Reduction in HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP expression by Leu-M3+ cells from the peripheral blood of patients with thermal injury. *Clin Exp Immunol* 75:371-375.
9. Greenberg SS, Ouyang J, Zhao X, Parrish C, Nelson S, Giles TD (1999) Effects of ethanol on neutrophil recruitment and lung host defense in nitric oxide synthase I and nitric oxide synthase II knockout mice. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1435-1445.
10. Hsieh AH, Bishop MJ, Kubilis PS, Newell DW, Pierson DJ (1992) Pneumonia following closed head injury. *Am Rev Respir Dis* 146:290-294.
11. Ichijo T, Katafuchi T, Hori T (1994) Central interleukin-1 beta enhances splenic sympathetic nerve activity in rats. *Brain Res Bull* 34:547-553.
12. Inserra P, Zhang Z, Ardestani SK, Araghi-Niknam M, Liang B, Jiang S, Shaw D, Molitor M, Elliott K, Watson RR (1998) Modulation of cytokine production by dehydroepiandrosterone (DHEA) plus melatonin (MLT) supplementation of old mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 218:76-82.
13. Katsuura G, Gottschall PE, Dahl RR, Arimura A (1988) Adrenocorticotropin release induced by intracerebroventricular injection of recombinant human interleukin-1 in rats: possible involvement of prostaglandin. *Endocrinology* 122:1773-1779.
14. Keller SE, Weiss JM, Schleifer SJ, Miller NE, Stein M (1983) Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science* 221:1301-1304.
15. Kolls JK, Lei D, Stoltz D, Zhang P, Schwarzenberger PO, Ye P, Bagby G, Summer WR, Shellito JE, Nelson S (1998) Adenoviral-mediated interferon-gamma gene therapy augments pulmonary host defense of ethanol-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res* 22:157-162.
16. Laue L, Lotze MT, Chrousos GP, Barnes K, Loriaux DL, Fleisher TA (1990) Effect of chronic treatment with the glucocorticoid antagonist RU 486 in man: toxicity, immunological, and hormonal aspects. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1474-1480.
17. Lee J, Sepulveda RT, Jiang S, Zhang Z, Inserra P, Zhang Y, Hosseini S, Watson RR (1999) Immune dysfunction during alcohol consumption and murine AIDS: the protective role of dehydroepiandrosterone sulfate. *Alcohol Clin Exp Res* 23:856-862.
18. Madden KS, Sanders VM, Felten DL (1995) Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:417-448.
19. McCann SM, Lyson K, Karanth S, Gimeno M, Belova N, Kamat A, Rettori V (1994) Role of cytokines in the endocrine system. *Ann N Y Acad Sci* 741:50-63.
20. Meisel C, Vogt K, Platzer C, Randow F, Liebenthal C, Volk HD (1996) Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. *Eur J Immunol* 26:1580-1586.
21. Mimoz O, Elhelali N, Leotard S, Jacolot A, Laurent F, Samii K, Petitjean O, Nordmann P (1999) Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 44:91-97.
22. Panegyres PK und Hughes J (1998) The neuroprotective effects of the recombinant interleukin-1 receptor antagonist rhIL-1ra after excitotoxic stimulation with kainic acid and its relationship to the amyloid precursor protein gene. *J Neurol Sci* 154:123-132.
23. Piek J, Chesnut RM, Marshall LF, van Berkum Clark M, Klauber MR, Blunt BA, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Foulkes MA (1992) Extracranial complications of severe head injury. *J Neurosurg* 77:901-907.

24. Ramierz F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D (1996) Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol* 156:2406-2412.
25. Rodriguez JL, Gibbons KJ, Bitzer LG, Dechert RE, Steinberg SM, Flint LM (1991) Pneumonia: incidence, risk factors, and outcome in injured patients. *J Trauma* 31:907-912.
26. Roszman TL und Brooks WH (1980) Immunobiology of primary intracranial tumours. III. Demonstration of a qualitative lymphocyte abnormality in patients with primary brain tumours. *Clin Exp Immunol* 39:395-402.
27. Stein M, Schiavi RC, Camerino M (1976) Influence of brain and behavior on the immune system. *Science* 191:435-440.
28. Sundar SK, Cierpial MA, Kilts C, Ritchie JC, Weiss JM (1990) Brain IL-1-induced immunosuppression occurs through activation of both pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci* 10:3701-3706.
29. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC, Hemmer M (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee [see comments]. *JAMA* 274:639-644.
30. Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T (1989) Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med* 170:1859-1867.
31. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD (1998) Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 4:808-813.
32. Woiciechowsky C, Schöning B, Daberkow N, Asche K, Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD (1999) Brain-IL-1b induces local inflammation but systemic anti-inflammatory response through stimulation of both hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system. *Brain Res* 816:563-571.
33. Woiciechowsky C, Schöning B, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD (1999) Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrom causing immunodepression. *J Mol Med* 11:769-780.

3.4 Eigene Vorarbeiten

In klinischen Untersuchungen konnten wir zeigen, daß sterile ZNS-Traumata zur lokalen Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen in den Liquor führen. Dies war – zeitlich verzögert - mit einer Deaktivierung der Blutmonozyten assoziiert, was zu einer vermehrten Produktion anti-inflammatorischer (IL-10) und einer verminderten Synthesekapazität für pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α) sowie einer verminderten Fähigkeit zur Antigenpräsentation führte. Ein Persistieren dieses Zustands war mit einem erhöhten Infektionsrisiko verbunden. Aus diesen klinischen Beobachtungen resultierte die Hypothese, daß lokal im ZNS freigesetzte pro-inflammatorische Zytokine inhibitorische Neuro-Immuno-Pathways aktivieren, die eine systemische anti-inflammatorische Reaktion triggern. Um diese Hypothese zu überprüfen/beweisen, wurde ein entsprechendes Rattenmodell aufgebaut. In der Tat konnten wir durch die kontinuierliche intracerebro-ventrikuläre Applikation von TNF- α und IL-1 β über zwei Tage das Phänomen der peripheren Monozytendeaktivierung simulieren, wobei die Effekte bei IL-1 β wesentlich stärker ausgeprägt waren. Dies war gleichzeitig mit einer Entzündung im Liquorraum und einer Zellinvasion ins Hirnparenchym verbunden. Es bestand zudem eine Korrelation zwischen der Schwere der lokalen Entzündung und der Schwere der systemischen immunsuppressiven Effekte.

Entsprechend diesem Kenntnisstand war die Ausgangsfragestellung für das o.g. SFB-Teilprojekt, die Mechanismen dieses für Trauma, Streß und Infektion klinisch relevanten Phänomens zu klären, wobei die Schwerpunkte auf der Charakterisierung der intracerebralen Zielzellen für die pro-inflammatorische Zytokine und der Aufklärung der Regulationsprozesse lagen. Weiteres Interesse galt der Kommunikation zwischen den ortsständigen Immunzellen und den Blut-Immunzellen.

2. Angewandte Methoden

Tiermodelle

1. Chronische intracerebro-ventrikuläre Zytokinapplikation über ALZET-Minipumpen für 48 Stunden

Die möglichen Pathways der systemischen anti-inflammatorischen Reaktion bei cerebraler Inflammation wurde einzeln durch folgende Ansätze untersucht:

- Sympathische β 2-Rezeptorblockade durch Applikation von Propranolol zur Beurteilung des Einflusses des sympathischen Nervensystems auf die systemischen Immunveränderungen.
- Hypophysektomie zur Beurteilung des Einflusses der Hypophysen-Nebennieren-Achse auf die systemischen Immunveränderungen.
- Co-Applikation des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zur Frage einer Hemmung der lokalen pro-inflammatorischen Effekte von IL-1 β .
- Co-Applikation von ICAM-Antisense zur Hemmung der Zellinfiltration.
- Reinfusion von *ex vivo* mit CFDA-SE markierten Peritonealmakrophagen zur Beurteilung der Invasion peripherer Blutmonozyten/Makrophagen ins Hirnparenchym nach einem cerebralen Entzündungsreiz (IL-1 β).

2. Akute intracerebro-ventrikuläre Applikation von IL-1 und Pneumokokkenzellwänden (Kooperation mit Teilprojekt Weber/Einhäupl)

Modell zur Beurteilung der akuten innerhalb der ersten 4 Stunden ablaufenden lokalen und systemischen Immunveränderungen nach einem cerebralen inflammatorischen Stimulus.

3. Intrakranielle Druckerhöhung über einen subdural platzierten Fogarty-Katheter

Modell zur Erzeugung eines "vegetativen Sturms" mit einer systemischen sympathinergen Reaktion zur Charakterisierung der Immunveränderung infolge intrakranieller Druckerhöhung, als Simulation eines SHT.

Histologie und Immunhistologie

1. Histologie

zur Beurteilung der Lage der Kanüle sowie des Ausmaßes der Immunzellinfiltration im Liquorraum und Hirnparenchym.

2. Immunhistologie unter Einsatz der nachfolgenden Antikörper

- ED1 zur Markierung von Gewebsmakrophagen,
- MRC OX-6 zur Markierung von Ratte I-A-Antigen (entspricht MHC Klasse II-Antigenen) auf antigenpräsentierenden Zellen,
- MRC OX-52 zur Markierung von T-Lymphozyten,
- HIS-48 zur Markierung von Granulozyten,
- 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,
- Doppelfärbungen mit Lectin und OX-6 sowie 1A29.

Die immunhistologischen Ergebnisse wurden mit dem System Image-Pro Plus 1.3, Media Cybernetics L.P., Carlsbad, USA quantitativ ausgewertet.

Blut- und Liquoruntersuchungen

1. Liquor

- Leukozytenzahl
- Bestimmung von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α)

2. Blut

- Leukozytenzahl/Differentialblutbild
- Bestimmung von Zytokinen im Plasma (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α)
- Bestimmung der *ex vivo* LPS-induzierten TNF- α /IL-10-Sekretionskapazität in Vollblutzellkulturen

Ergebnisse und ihre Bedeutung

Die erzielten Ergebnisse lassen sich entsprechend der im Antrag formulierten Fragen folgendermaßen zusammenfassen:

1. Charakterisierung der lokalen Entzündungsreaktion

In Dosis- und Zeitverlauf-Studien konnten wir eine klare Abhängigkeit der lokalen Entzündung (Zellzahl im Liquor und Zellzahl im Parenchym) von der infundierten IL-1-Menge nachweisen, wobei die Infusion von 10 ng/h die stärkste Entzündungsreaktion erzeugte, während 0,1 ng/h zu keinen wesentlichen Veränderungen führte. Hinsichtlich des Zeitverlaufs gab es Unterschiede zwischen den Arten der infiltrierenden Immunzellen. So konnten wir eine massive Einwanderung von Granulozyten in den Liquorraum und beginnend ins Parenchym bereits nach 8 Stunden demonstrieren, während Monozyten eine verzögerte Einwanderung ins Parenchym zeigten mit Peaks nach 48 Stunden. Weiterhin konnte eine Mikrogliaaktivierung beschrieben werden. Diese Ergebnisse sind zusammengestellt in:

Schöning B, Elefant P, Daberkow N, Rupprecht S, Volk HD, Woiciechowsky C: Differences in the granulocyte and monocyte recruitment into the cerebrospinal fluid and brain parenchyma resulting from cerebral infusion of pro-inflammatory cytokines, (submitted).

2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Entzündung im Gehirn und der systemischen Immundepression mit Deaktivierung des Monozytensystems?

Dies konnte nur unzureichend geklärt werden, da es schwierig war die Entzündungsreaktion im Gehirn zu blocken. Trotz umfangreicher Versuche mit einer lokalen Applikation von Anti-ICAM-Antisense, konnte eine durch die Oligos selbst ausgelöste Entzündung bei Kontrolltieren, nicht verhindert werden. Durch verschiedene Ansätze wurde jedoch herausgearbeitet, daß Stabilisierungsfaktoren in den Oligos - die die Wirkung von RNAasen mindern sollen - für diese Oligo-bedingte Entzündungsreaktion wahrscheinlich verantwortlich sind. Diese Beobachtungen werden in einer Veröffentlichung zusammengefaßt.

Elefant P, Rupprecht S, Schöning B, Daberkow N, , Volk HD, Woiciechowsky C: Synthetic oligonucleotides induce an abacterial meningoencephalitis when infused into the brain (in prepare).

Ein anderer Ansatz zur Verhinderung der lokalen Entzündungsreaktion erfolgte durch die gleichzeitige Gabe des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 mit IL-1 in einer Pumpe. Dies hatte jedoch keinen Einfluß auf das Ausmaß der lokalen Entzündung und die systemischen Immuneffekte.

3. Was ist der zentrale Mechanismus der peripheren Deaktivierung, welche anderen Systeme sind beteiligt?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst Versuche mit hypophysektomierten Tieren und andererseits nach peripherer Sympathicusblockade im Modell der chronischen intracerebro-ventrikulären IL-1-Infusion durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, daß sowohl die Hypophysektomie als auch die periphere Sympathicusblockade mit dem β 2-Rezeptorantagonisten Propranolol zu einer Abschwächung der Monozytendeaktivierung führten. Es zeigte sich, daß insbesondere durch die Sympathicusblockade die systemische IL-10-Produktion effektiv gesenkt werden konnte:

Woiciechowsky C, Schöning B, Daberkow N, Asche, K., Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD: Brain-IL-1 β induces local inflammation but systemic anti-inflammatory response through stimulation of both hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system. **Brain Research** 816:563-571, 1999.

Woiciechowsky C, Schöning B, Daberkow N, Asche, K., Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD: Brain-IL-1 β increases neutrophil and decreases lymphocyte counts through stimulation of neuroimmune pathways. **Neurobiol Dis** 6:200-208, 1999.

Entsprechend diesem Ergebnis wurden weitere Studien zur Frage der Bedeutung des sympathischen Nervensystem für die systemische IL-10-Produktion durchgeführt. Dazu wurde ein weiteres Tiermodell in die Untersuchungen einbezogen. Hierbei wurde mittels eines subdural platzierten Katheters der intrakranielle Druck schrittweise erhöht und dadurch ein "vegetativer Sturm" mit Sympathicusaktivierung erzeugt. Unter diesen Bedingungen konnte eine beeindruckende systemische anti-inflammatorische Reaktion mit hohem Plasma-IL-10-Konzentrationen hervorgerufen werden. Auch dies war mit Propranolol zu blocken. Die Ergebnisse wurden durch *in vitro* Daten gestützt und durch klinische Untersuchungen bestätigt.

Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk HD Döcke WD: Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. **Nature Med** 4:808-813, 1998.

4. Gibt es Effekte auf weitere Komponenten des Immunsystems

Diese Fragestellung konnte leider infolge der Mittelkürzungen (eine wissenschaftliche Doktorandenstelle wurde nicht genehmigt) nicht bearbeitet werden.

5. Welche lokalen und systemischen Effekte verursacht eine Pneumokokken-induzierte Meningitis

Es konnte klar gezeigt werden, daß die Bolusinjektion von Pneumokokkenzellwänden (PCW) zu einem akuten systemischen Release von IL-10 führt. Dabei wurden Maximalkonzentrationen bereits nach 30 Minuten gemessen mit einem allmählichen Abfall. Desweiteren war ein verzögerter IL-6-Anstieg meßbar. Weitere Versuche sind am Laufen, um die Beteiligung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse und des sympathischen Nervensystems für diese Phänomene zu erfassen.

Offene Fragen

1. Überprüfung der klinischen Relevanz einer ZNS-bedingten Immunsuppression am Ratten-Pneumonie-Modell, denn trotz vieler Arbeiten zur Neuroimmunomodulation fehlen tierexperimentelle Daten zur direkten Auswirkung auf das Infektionsrisiko. Dies ist besonders wichtig, um ein Modell zu etablieren an dem präventive Maßnahmen getestet werden können.
2. Möglichkeiten einer Modulation/Restauration des zentral-inhibierten Immunsystems (Fließschema)
 - 2.1. Blockade der cerebralen Transmission, d.h. der IL-1-vermittelten Aktivierung der inhibitorischen Neuroimmuno-Pathways durch die intracerebrale Applikation von IL-1ra und Anti-CRF-Ak im Modell der durch Pneumokokkenzellwände und IL-1 induzierten systemischen Immunveränderungen. Weitere Versuche an einem Schädel-Hirn-Trauma-Modell sind dann – in Abhängigkeit von den erzielten Ergebnisse - geplant.
 - 2.2. Periphere Rezeptorblockade durch Applikation von Propranolol und RU 486.
 - 2.3. Immunstimulation durch periphere Applikation von Immunmediatoren, die in die Regelkreise der ZNS-bedingten Immunsuppression eingreifen wie DHEA, G-CSF.

Dadurch diese Ansätze soll das Infektionsrisikos im Tierexperiment gesenkt werden., wobei Punkt 2.1. und 2.2. zur Aufklärung der bereiligten Mechanismen dient. Punkt 2.3. könnte als Vorstufe für klinische Studien angesehen werden.

direkt projektassoziierte Veröffentlichungen

1. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Schöning B, Glöckner F, Döcke WD, Vogel S, Volk HD: Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: Effect of tumor extirpation. **J Neuroimmunol** **84**:164-171, 1998.
2. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD: Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. **Nature Med** **4**:808-813, 1998.
3. Woiciechowsky C, Schöning B, Daberkow N, Asche, K., Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD: Brain-IL-1 β induces local inflammation but systemic ant-inflammatory response through stimulation of both hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system. **Brain Research** **816**:563-571, 1999.
4. Schöning B, Elepfandt P, Lanksch WR, Volk HD, Woiciechowsky C: Continuous infusion of pro-inflammatory cytokines into the brain to study brain cytokine induced local and systemic immune effects. **Brain Res Protoc** **1**:217-222, 1999.
5. Woiciechowsky C, Schöning B, Daberkow N, Asche, K., Stoltenburg G, Lanksch WR, Volk HD: Brain-IL-1 β increases neutrophil and decreases lymphocyte counts through stimulation of neuroimmune pathways. **Neurobiol Dis** **6**:200-208, 1999.
6. Woiciechowsky C, Schöning B, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD: Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory response syndrome causing immunodepression. **J Mol Med** **77**:769-780, 1999.
7. Woiciechowsky C, Schöning B, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD: Catecholamine-induced interleukin-10 release – a key mechanism in systemic immunodepression after brain injury. **Crit Care** **3**:R107-R111, 1999.
8. Woiciechowsky C, Rupprecht S, Döcke WD, Volk HD: Role of the sympathetic nervous system and the hypothalamic pituitary adrenal axis in brain-mediated compensatory anti-inflammatory response. **Biomed Rev** (in press).
9. Woiciechowsky C, Schöning B, Cobanov, J, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD: Early IL-6 plasma concentrations correlate with severity of brain injury and can predict short-term prognosis and pneumonia in brain-injured patients, (submitted).
10. Schöning B, Elepfandt P, Daberkow N, Rupprecht S, Volk HD, Woiciechowsky C: Differences in the granulocyte and monocyte recruitment into the cerebrospinal fluid and brain parenchyma resulting from cerebral infusion of pro-inflammatory cytokines, (submitted).
11. Elepfandt P, Rupprecht S, Schöning B, Volk HD, Woiciechowsky C: Synthetic oligonucleotides induce abacterial meningoencephalitis when infused into the brain (in prepare).

Weitere Veröffentlichungen mit Bezug zum Antragsthema:

1. Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prösch S: Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. **Eur J Immunol** **29**:3098-3104, 1999.
2. Platzer C, Döcke WD, Volk HD, Prösch S: Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. **J Neuroimmunol** **105**:31-38, 2000.
3. Hartung T, Döcke WD, Bundschuh D, Foote MA, Gantner F, Hermann C, Lenz A, Milwee S, Rich B, Simon B, Volk HD, Aulock S v., Wendel A: Effect of filgrastim treatment on inflammatory cytokines and lymphocyte functions. **Clin. Pharm. Therap** **66**:415-24, 1999.
4. Stover JF, Schöning B, Beyer TF, Woiciechowsky C, Unterberg AW: Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats. **Neurosci Lett** **288**:25-28, 2000.
5. Stover JF, Sakowitz OW, Schöning B, Rupprecht S, Kroppenstedt SN, Woiciechowsky C, Unterberg AW: Norepinephrine increases plasma and cerebrospinal fluid interleukin-6 in brain injured rats, (submitted).

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Nachdem das Tiermodell zu Fragen einer neurogenen Beeinflussung systemischer Immunprozesse etabliert wurde, soll Ziel der weiteren Untersuchungen das Studium der Auswirkungen der zentralbedingten Immunsuppression auf das Infektionsrisiko sowie die Möglichkeiten der Immunrestauration sein. Daraus erhoffen wir uns neue therapeutische Ansätze zur Senkung des Infektionsrisikos nach einem SHT.

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) oder die Applikation von PCW (Meningitis-Modell, Kooperation AG Weber) führt einerseits zu lokalen Effekten (Endothelzellaktivierung, Infiltration mit mononukleären Zellen, Gliareaktion) und andererseits zu systemischen Effekten (Deaktivierung der peripheren Monozyten, Aufregulation der IL-10-Synthese).

Daraus leiten sich folgende Fragen ab:

Überprüfung der klinischen Relevanz einer ZNS-bedingten Immunsuppression am Ratten-Pneumonie-Modell. Denn trotz vieler Arbeiten zur Neuroimmunomodulation fehlen tierexperimentelle Daten zur direkten Auswirkung auf das Infektionsrisiko. Dies ist besonders wichtig, um ein Modell zu haben, an dem präventive Maßnahmen getestet werden können.

Nach Etablierung des Modells sollen die inhibitorischen Neuro-Immuno-Pathways an folgenden Signalübertragungswegen unterbrochen werden (vgl. Fließschema):

- I. Blockade der cerebralen Transmission, d.h. der IL-1-vermittelten Aktivierung der inhibitorischen Neuro-Immuno-Pathways durch die intracerebrale Applikation von IL-1ra und/oder Anti-CRF.
- II. Blockade der Rezeptoren auf Immunzellen, d.h. Unterbrechung der Signalübertragung an der Effektorzelle durch Applikation von Rezeptorblockern (Propranolol für den Sympathicus und RU 486 für die neuroendokrine Achse).
- III. Immunstimulation durch periphere Applikation von Immunmodulatoren, die in die Regelkreise der ZNS-bedingten Immunsuppression eingreifen wie DHEA, G-CSF, IFN- γ .

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.

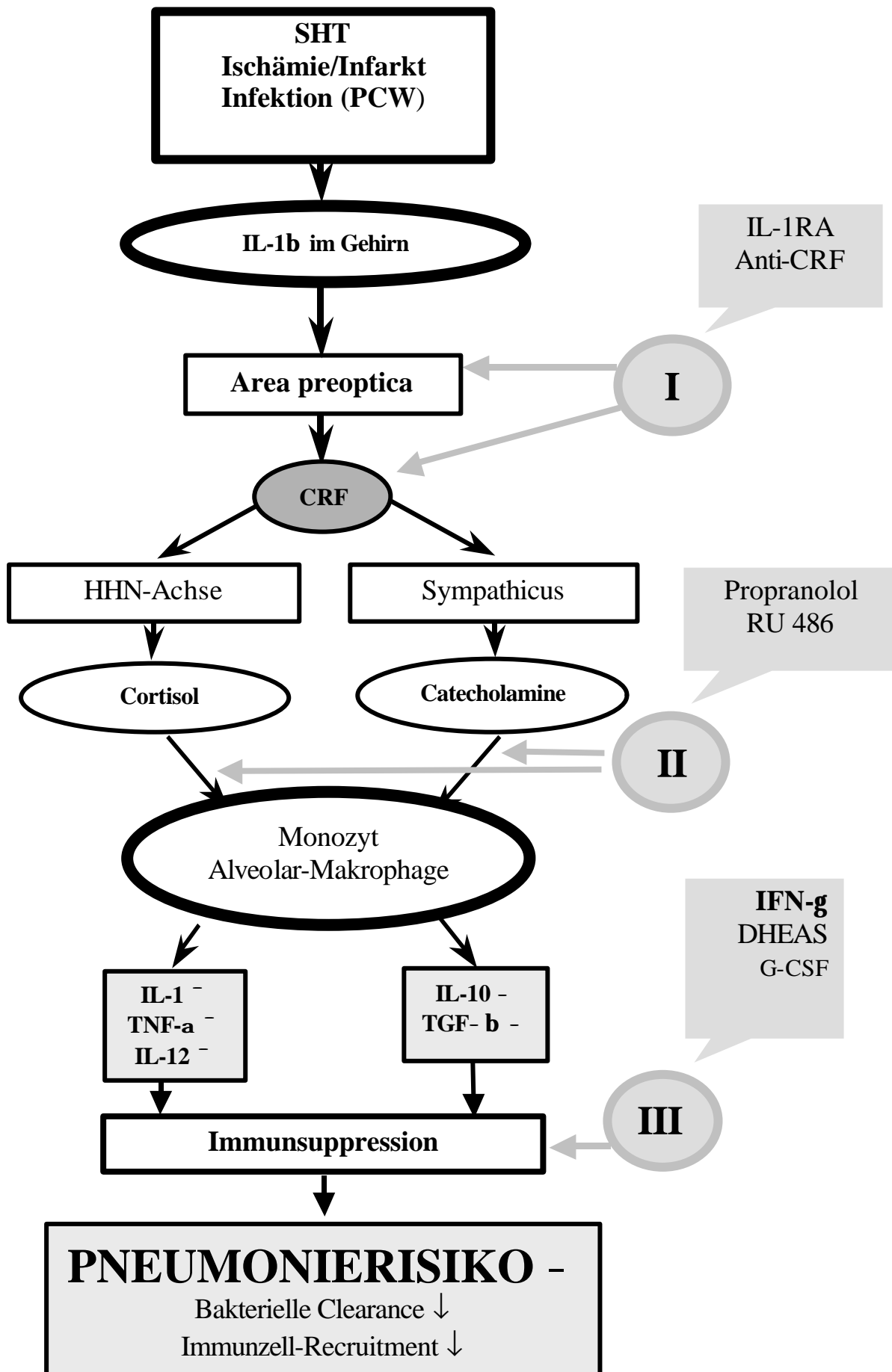
Die an unserem gut definierten Modell gewonnenen Erkenntnisse sollen in weiteren Untersuchungen auch an komplexeren Modellen (mechanisches Trauma, Ischämie/Reperfusion) evaluiert werden, um ihre klinische Signifikanz weiter zu verifizieren.

3.5.2 Methoden

Im Rahmen des Projektes werden die nachfolgenden Methoden etabliert:

- Mikrochirurgische Operationen und Stereotaxien in Inhalationsnarkose an der Ratte.
- Blutentnahmen aus dem retro-orbitalen Venenplexus.
- Durchführung von Stimulationen mit Endotoxin an Vollblutzellkulturen zur Bestimmung des Zytokinrelease.
- Entnahme von Gehirn und Anfertigen von Gefrierpräparaten und Paraffinschnitten für histologische und immunhistologische Untersuchungen
- ELISA zur Messung von Zytokinen im Plasma und nach Zellstimulation.

Übersicht über das Arbeitsprogramm (Fließschema)



Im einzelnen erfolgt die Materialaufarbeitung wie folgt:

Bis auf die Aufbereitung der Lungen sind alle Methoden in der Arbeitsgruppe des Projektleiters am Virchow-Klinikum und dem Institut für Medizinische Immunologie (Mitantragsteller) etabliert.

Das Ratten-Pneumoniemodell mit *Klebsiella pneumoniae* und die damit verbundenen Untersuchungen werden in Kooperation mit Dr. Jay K. Kolls durchgeführt, wo das Modell bereits in Anwendung ist. Es besteht die Möglichkeit einen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe als Hospitanten nach New Orleans zu schicken. Die AG Prof. Volk hat eine langjährige Kooperation mit der Gruppe Dr. Jay K. Kolls im Bereich der Gentherapie.

Die Versuche mit *Streptococcus pneumoniae* werden in Zusammenarbeit mit der AG Dirnagl/Meisel durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe ist ebenfalls an der Charité und hat das Modell in ihren Labors etabliert, wodurch kurzfristig bereits die entsprechenden Untersuchungen durchgeführt werden können

Vollblutstimulation

entspricht dem bereits im Vorantrag formulierten Protokoll.

Bronchiallavage

Entnahme beider Lungen in toto und Durchführung einer Lavage mit PBS, das 3mM EDTA enthält bei Raumtemperatur. Die Lavageflüssigkeit wird zentrifugiert (200 x g für 5 min) und das Zellpallet in 1ml Kochsalz resuspendiert.

Bestimmung des Immunzellrecruitments in der Lunge

Zählen der Zellen in der Bronchiallavage in der Neubauer-Zählkammer
Zellausstrich, Giemsa-Färbung und Differenzierung der Zellen

Bestimmung der bakteriellen Clearance in der Lunge

Die Lungen werden aseptisch entfernt und in 25 ml eiskalter Kochsalzlösung homogenisiert. Das Homogenat wird fortlaufend um den Faktor 10 verdünnt und die entsprechenden Verdünnungsreihen in 3facher Ausfertigung auf Blut-Agar über Nacht bei 37°C kultiviert. Die lebensfähigen Bakterienkolonien werden ausgezählt und als log₁₀cfu/g Lungengewebe dargestellt.

Stimulationstest der Alveolarmakrophagen

entspricht dem Protokoll zur Stimulation von Vollblutzellen.

Bestimmung nachfolgender Zytokine im Zellkulturüberstand (Vollblut, Alveolarmakrophagen) und in Bronchiallavage mittels ELISA

TNF- α , IL-10, IFN- γ , IL-4 mittels kommerziell erhältlicher Tests.

Bestimmung nachfolgender Neurotransmitter im Plasma

Adrenalin, Noradrenalin.

3.5.4 Zeitplan

Vergleiche die genaue Fragestellung und Wege der Beantwortung entsprechend Arbeitsprogramm im Abschnitt 3.5.3

- | | |
|------|---|
| 2002 | Etablierung des Ratten-Pneumonie-Modells und Untersuchungen zur Frage eines erhöhten Infektionsrisikos bei zentraler Immunsuppression. |
| 2003 | Kann das Infektionsrisiko durch einer Hemmung der cerebralen Transmission (IL-1RA, Anti-CRF) bzw. peripheren Rezeptorblockade (Propranolol, RU 486) gesenkt werden? |
| 2004 | Kann das Infektionsrisiko durch die Applikation von Immunstimulatoren (IFN- γ , G-CSF, DHEAS) gesenkt werden? |

3.6 Stellung innerhalb des Programms des Sonderforschungsbereichs

Die besondere Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereiches wird dadurch bestimmt, daß die Auswirkungen einer systemischer Immunsuppression nach cerebraler Applikation von IL-1 β bzw. PCW an einem Infektionsmodell *in vivo* untersucht werden. Wie andere und unsere Untersuchungen zeigen, können Entzündungsreaktionen im ZNS, wie sie nach Trauma, Ischämie und Infektion vorliegen die

systemische Immunkompetenz durch Aktivierung der neuroendokrinen Achse und des Sympathicus beeinflussen. Dabei stellt IL-1 β einen wesentlichen Mediator in der Kommunikation zwischen dem Zentralnervensystem und dem Immunsystem dar.

Daraus ergibt sich die Frage, ob lokale inflammatorische Prozesse im ZNS, die zu einer Beeinflussung der Immunantwort führen auch ein nachweisbar erhöhtes Infektionsrisiko bedingen und das Outcome bspw. nach SHT infolge Infektionen teilweise verschlechtern. Weiterhin wäre zu prüfen, ob durch eine Beeinflussung der inhibitorischen Neuro-Immuno-Pathways das Infektionsrisiko verringert werden kann. Hierbei sollen diese Pathways auf verschiedenen Ebenen (cerebrale Transmission, periphere Rezeptorblockade, systemische Immunstimulation/-restauration) moduliert werden

Innerhalb des SFB gilt unser besonderes Interesse der Zusammenarbeit mit dem Projekt von Herrn Prof. Weber. Dabei soll die Frage eines erhöhten Pneumonie-Infektionsrisikos im Modell der Pneumokokken-induzierten Meningitis bearbeitet werden. An diesem Modell konnte bereits die IL-1-induzierte systemische Immunsuppression reproduziert werden, wobei scheinbar gleiche Effektorsysteme wie bei der intra-cerebralen IL-1-Infusion angeschaltet werden.

Weiterhin ergibt sich eine Zusammenarbeit mit der AG Prof. Dirnagl/Dr. Meisel, die im einem assoziierten Projekt Immunveränderungen im Zusammenhang mit Hirninfarkt/Ischämie untersucht. Dabei konnte vor allem eine Thymusinvolution mit T-Zell-Depletion nachgewiesen werden. In dieser AG werden auch die Auswirkung auf das systemische Infektionsrisiko am Modell der Pneumokokken-Pneumonie studiert. Die Erfahrungen dieser AG mit dem Pneumokokken-Modell, erlauben eine kurzfristige Anwendung der Methoden auf unsere Fragestellung. Außerdem ergeben sich durch die Untersuchungen am Lymphozytensystem Ergänzungen zu unseren Untersuchungen am Monozyten/Makrophagensystem, da ähnliche Mechanismen und Regelkreise der neurogenen Immunmodulation in beiden System wirken.

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)

Bewilligung 2001 ¹⁾			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag TDM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag TDM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag TDM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag TDM
	BAT IIa	1	106,8	BAT IIa		106,8	BAT IIa		106,8	BAT IIa		106,8
	zus.:		106,8	zus.:		106,8	zus.:		106,8	zus.:		106,8
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.		Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.		Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.		Betrag DM
				522 Sachmittel		25	522		25	522		25
				515 Kleingeräte		24,2						
I				Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel insges.		
				24,2								

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. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾ (einschl. Hilfskräfte)	PD Dr. Ch. Woiciechowsky	Neurochirurgie	Charité	4 Stunden	BAT Ib	
	Prof. Dr. H.-D. Volk	Immunologie	Charité	4 Stunden	C3	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾²⁾ (einschl. Hilfskräfte)	Dr. S. Rupprecht	Neurochirurgie	Charité	38,5 Stunden		BAT IIa
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Die wissenschaftlichen Mitarbeiter der Grundausrüstung verknüpfen die unterschiedlichen wissenschaftlichen Spezifikationen.

Herr PD 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 für die immunologischen und mikrobiologischen Methoden (Zellkulturen mit Stimulation, ELISA) und die damit verbundenen Fragestellungen zuständig. Er verfügt über die Erfahrungen im Umgang mit den genannten Immunstimulatoren in verschiedenen experimentellen Studien und ersten Pilotstudien an Sepsispatienten. Zudem besteht eine jahrelange Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Jay K. Kolls, wodurch auf die Expertise dieser AG hinsichtlich der mikrobiologischen Untersuchungen zurückgegriffen werden kann.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

entfällt

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Ein(e) wissenschaftliche(r) Mitarbeiter(in) Postdoc

Die umfangreichen tierexperimentellen, immunologischen und mikrobiologischen Arbeiten können nicht durch das vorhandene Personal in ihrer Gesamtheit bewältigt werden, da sie mit ihrem erheblichen Zeitaufwand eine Ganztätigkeit darstellen. Die Antragsteller sind durch ihre Beschäftigung als Institutsdirektor (Prof. Volk) bzw. Oberarzt (PD 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, Immunhistologie durchzuführen, die Vorkenntnisse in der Laborarbeit erfordern und schnell erlernt werden sollten, da diese ebenfalls selbständig durchzuführen sind. Desweiteren ist die Übernahme/Etablierung des Pneumonie-Modells und der damit verbundenen mikrobiologischen Methoden aus einem anderen Labor erforderlich.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

entfällt

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	7 TDM	7 TDM	7 TDM
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausrüstung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausrüstung	25 TDM	25 TDM	25 TDM

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der sächlichen Verwaltungsausgaben

Verbrauchsmittel für 2002

Versuchstiere/Tierhaltung Für die Untersuchungen zur Immunsuppression werden ca. 60-100 Tiere (Sprague-Dawley)/Jahr benötigt.	DM	2.000
ALZET-Pumpen	DM	3.000
Immunhistochemie Primär (HIS-48, ED1, OX-52, 1A29, Anti-GFAP, OX-6, Lektin I B4) und Sekundärantikörper.	DM	5.000
ELISA für TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1, IL-12, IL-4	DM	10.000
IL-1 für intra-cerebrale Infusion	DM	3.000
Reagenzien und Materialien für mikrobiologische Untersuchungen	DM	2.000

Verbrauchsmittel für 2003

Versuchstiere/Tierhaltung Für die Untersuchungen zur Immunsuppression werden ca. 60-100 Tiere (Sprague-Dawley)/Jahr benötigt.	DM	2.000
ALZET-Pumpen	DM	2.000
Immunhistochemie Primär (HIS-48, ED1, OX-52, 1A29, Anti-GFAP, OX-6, Lektin I B4) und Sekundärantikörper.	DM	2.000
ELISA für TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1, IL-12, IL-4	DM	10.000
IL-1 für intra-cerebrale Infusion	DM	3.000
Reagenzien und Materialien für mikrobiologische Untersuchungen	DM	2.000
Reagenzien für Hemmung der cerebralen Transmission (IL-1RA, Anti-CRF-Ak und periphere Rezeptorblockade (Propranolol, RU 486)	DM	4.000

Verbrauchsmittel für 2004

Versuchstiere/Tierhaltung Für die Untersuchungen zur Immunsuppression werden ca. 60-100 Tiere (Sprague-Dawley)/Jahr benötigt.	DM	2.000
ALZET-Pumpen	DM	2.000
Immunhistochemie		

Primär (HIS-48, ED1, OX-52, 1A29, Anti-GFAP, OX-6, Lektin I B4) und Sekundärantikörper.	DM	2.000
ELISA für TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1, IL-12, IL-4	DM	10.000
IL-1 für intra-cerebrale Infusion	DM	3.000
Reagenzien und Materialien für mikrobiologische Untersuchungen	DM	2.000
Reagenzien für Immunstimulation (IFN- γ , G-CSF, DHEAS)	DM	4.000

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

Alle Preisangaben in DM einschließlich Mehrwertsteuer, Transportkosten usw.

	Beantragt für das Haushaltsjahr		
	2002	2003	2004
Summe:	24.189,32 DM		

(Alle Preisangaben in DM einschl. MwSt., Transportkosten etc.)

Bezeichnung des Gerätes	Einzelpreis 2002 Lt Katalog novodirect GbmH, Jahr 2000
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II	
+Untergestell	17.361,00 DM
+Zeitschaltuhr für UV-Lampe	1.041,00 DM
+Abluftaktivkohlefilter	355,00 DM
+HOSCH-Abluftfilter	
+MwSt	233,00 DM
	1.862,00 DM
	3.336,32 DM
Summe	24.189,32 DM

Begründung

Die mikrobiologischen Arbeiten erfordern eine hohe Sicherheit. Entsprechend der Biostoffverordnung vom 27. Januar 1999 (BGBl. I S.50; 1999 S. 2059) wird bei der Sicherheitsstufe II der Umgang mit infiziertem Material, einschließlich aller Tiere, in einer Sicherheitswerkbank oder einem Isolierraum oder einem anderen geeigneten Raum wo angebracht, gefordert. Da Klebsiella pneumoniae und Streptococcus pneumoniae primär humanpathogene Keime sind und die Infektion der Tiere über ein Aerosol erfolgt ist eine Sicherheitswerkbank mit Unterdruck entsprechend der Technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) notwendig.

PROJEKTBEREICH C
Neurodegeneration und Tumore
 (Projektbereichsleiter: Prof Dr.H.Kettenmann)

- C 3** Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse
Heinemann
- C 6** Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone: Signalwege oxidativ modifizierter Lipide
Ullrich
- C 7** Physiologische Mechanismen der Lysophospholipid-vermittelten Aktivierung von
Mikrogliazellen
Eder
- C 8** Physiologische Eigenschaften glialer Tumore
(war Kettenmann
B 1)
- C 9** Molekulare Mechanismen der Invasion von Gliomzellen
(war v.Deimling
B 10)

Zusammenfassende Darstellung des Projektbereiches C

Der Projektbereich C umfasst Projekte, die sich auf die Reaktion von Astrozyten bei Schädigungen durch Epilepsie konzentrieren, auf Mechanismen der Mikrogliaaktivierung und auf die zellbiologischen Eigenschaften von Gliomzellen und der Kontrolle ihres Wanderungsverhaltens. Im Projekt C3 wird der Zusammenhang zwischen erhöhtem Blutfluss, verstärkter intrazellulärer Bildung freier Radikale, Mitochondrienschädigung und induziertem Zelltod in Zusammenhang mit Temporallappenepilepsie untersucht. Eine wichtige Rolle für den Zusammenhang dieser Parameter wird über NO vermutet, und es sollen Tiere eingesetzt werden, bei denen die NO Synthetase ausgeschaltet ist. In akuten Gewebeschnitten aus Epilepsiematerial soll untersucht werden, inwieweit sich die physiologischen Eigenschaften der Astrozyten in diesem pathologischen Gewebe verändern. Im speziellen soll die Kaliumregulation und die Transporteraktivität Glutamat zwischen Astrozyten aus normalem und Epilepsie-Gewebe verglichen werden.

Die Projekte C6 und C7 konzentrieren sich auf Signale, die Mikroglia aktivieren. Im Projekt C6 stehen die oxidativ modifizierten Lipide im Vordergrund. Es ist bekannt, dass in der Frühphase eines neuronalen Schadens Proteine oxidiert werden. Dies trifft auch auf Membranlipide zu, die jedoch einem bedeutend höheren Umsatz unterliegen und damit als Signal für eine Schädigung angesehen werden können. Es soll nun geprüft werden, inwieweit diese oxidativ modifizierten Lipide ein Aktivierungssignal für Mikrogliazellen darstellen und welche Aktivierungsparameter eingeschaltet werden. Im Projekt C7 soll untersucht werden, inwieweit Lysophospholipide Mikrogliazellen aktivieren können. Da aus Makrophagen bekannt ist, dass diese Lipide Sauerstoffradikale freisetzen und damit als Aktivierungssubstanzen dienen, sollen kultivierte Mikrogliazellen mit diesen Substanzen konfrontiert und die Aktivierung anhand der Veränderung von Ionenkanälen gemessen werden. Es soll auch geprüft werden, ob durch die Blockade der aktivierten Ionenströme wiederum rückwirkend das morphologische und immunphänotypische Verhalten der Mikrogliazellen beeinflusst werden kann. Die Untersuchungen sollen dann auch auf organotypische Hirnschnittkulturen ausgedehnt werden.

Die Projekte C8 Kettenmann und C9 von Deimling konzentrieren sich auf das Infiltrations- und Proliferationsverhalten von Gliomzellen. Während die Arbeitsgruppe Kettenmann die Zellkulturmodelle, Schnittmodelle und das experimentelle Tiermodell etabliert hat, komplementiert die Arbeitsgruppe von Deimling diesen Ansatz durch umfangreiche molekularbiologische Untersuchungsmethoden. In einem *in situ* Ansatz sollen migrierende und nicht-migrierende Gliomzellen unterschieden und separiert werden. Die Gruppe von Deimling wird nach Genen suchen, die als Kandidaten für Proliferationskontrolle in Frage kommen. Diese Gene werden dann auf ihre Funktionalität in den zellbiologischen Untersuchungen in der Gruppe Kettenmann erforscht. Während das Projekt C9 diese Fragestellung neu aufnimmt, ist C8 ein Fortsetzungsantrag, und daher werden zwei Kandidatenmoleküle aus der laufenden Periode weiter untersucht: GABA_A Rezeptoren und der Transkriptionsfaktor ETS1.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C3

3.1.1 Thema:

Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neurophysiologie

3.1.3 Leiter/in:

Prof. Dr. med. Uwe Heinemann, 17.02.1944, C4

Johannes Müller Institut für Physiologie

AG Zelluläre Neurophysiologie

Universitätsklinikum Charité

Tucholskystr. 2

D 10117 Berlin

Tel 030/2802 6640 Fax 030 2802-6669 E-mail uwe.heinemann@charite.de

Tel. ab 5.5.2001: 030/450 528 152 Fax030/450 528 962

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

nein

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

3.1.5 **In dem Teilprojekt sind vorgesehen:** (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

3.1.6 **Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)**

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
bis 1998	312.0	180.2		492.2
1999	146.4	30		176.4
2000	146.4	30		176.4
2001	146.4	30		176.4
Zwischen-summe	751.2	270.2		1021.4
2002	178.8	79.2		258
2003	178.8	31		209.8
2004	178.8	31		209.8

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Kennzeichen mesialer Temporallappenepilepsien sind progrediente Zellverluste und Neogenese von Astrozyten mit vermutlich veränderten Funktionen. Uns interessieren die Mechanismen, die zum Zelltod während eines Status epilepticus (SE) führen. Wir untersuchen den Zusammenhang zwischen erhöhtem Blutfluss, verstärkter intrazellulärer Bildung freier Radikale, progredienter Mitochondrienschädigung und induziertem Zelltod. An humanen Hirnschnittpräparaten von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie soll getestet werden, ob Mitochondrienfunktionen verändert sind. Wir wollen außerdem ermitteln, ob NO an diesen Prozessen beteiligt ist. Dabei sollen auch transgene e-NOS, iNOS und nNOS defiziente Tiere eingesetzt werden. Strategien zur Neuroprotektion bei Status epilepticus sollen an organotypischen Hirnschnittkulturen evaluiert werden und dann auf die intakte Ratte bzw. Maus übertragen werden.

Außerdem werden Veränderungen an Astrozyten weiter charakterisiert werden, die eine Störung der Kaliumregulation im Gewebe bewirken. Dabei verfolgen wir die Hypothese, dass eine Herabregulation von "Two Pore Domain"-Kalium-Kanälen beteiligt ist. Wir wollen weiter untersuchen, welche Konsequenzen veränderte Kaliumregulation für die Entstehung epileptischer Aktivität hat. Wir wollen schließlich die Hypothese testen, dass Transportprozesse für Glutamat an Astrozyten verändert sind.

Die Untersuchungen werden im wesentlichen an Hirnschnittpräparaten und Hirnschnittkulturen durchgeführt. Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen und elektrophysiologische Techniken werden durch histologische Verfahren ergänzt.

3.3 Stand der Forschung

Pharmakoresistente Epilepsien sind zumeist Temporallappenepilepsien (TLE). Resektion der betroffenen hippocampalen Strukturen führt häufig zur Anfallsfreiheit. Das entnommene Gewebe bietet die Chance, Mechanismen zu untersuchen, die der erhöhten Anfallsbereitschaft zugrunde liegen. Wir nutzen dieses Gewebe für eine Reihe von Fragestellungen, wobei wir tierexperimentelle Modelle der Temporallappenepilepsie zum Vergleich heranziehen. TLE sind sehr oft durch eine Ammonshorn-Sklerose (AHS) mit mehr oder minder weitreichenden Zellverlusten in der Area Dentata, dem Hilus, der CA3 und CA1 Region sowie den mittleren Schichten des medialen entorhinalen Kortex gekennzeichnet (Babb et al, 1984, Zentner et al, 1995). Gleichzeitig weist das Gewebe eine Astrozytose auf. Als Ursachen der TLE mit AHS werden komplizierte Fieberkrämpfe oder ein langanhaltender Status epilepticus (SE) angeführt. Daneben werden Enzephalitiden und hypoxische Schädigungen des Hippokampus als Ursache diskutiert. Tatsächlich entwickeln Nager nach einem SE [ausgelöst durch Pilocarpin, Kainat oder langanhaltende repetitive elektrische Stimulation des Tr. Perforans oder der Amygdala (SSSE)] sowohl eine AHS als auch eine nachfolgende TLE (z.B. Cavalheiro, 1995; Lothman et al., 1989).

Die Minderheit der Patienten mit TLE ist durch das Fehlen einer AHS (nAHS) gekennzeichnet. Hier werden Tumoren und Fehlbildungen für die Epileptogenese verantwortlich gemacht. Auch in diesem Gewebe treten mit der Dauer der Erkrankung zunehmend Zellverluste auf. Die Kindling-Epilepsie gilt als Modell der pharmakoresistenten nAHS-TLE (z.B. Löscher & Rundfeldt, 1991). Bei der nAHS-TLE stehen funktionelle Veränderungen im Gewebeverbund im Vordergrund, die transient oder persistierend sein können.

Um die Mechanismen, die zur AHS führen, zu verstehen, ist es notwendig, sich mit den Prozessen auseinanderzusetzen, die zu einer Schädigung des Gewebes führen. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Schädigungen durch einen Energiemangel infolge einer Ischämie entstehen. Allerdings nimmt während eines epileptischen Anfalls der CBF stark zu und erst bei langanhaltenden Krämpfen (SE) kommt es zu einer Reduktion des ATP-Gehaltes der Zellen (Folbergrova et al., 1999). Exzitotoxische Mechanismen wurden ebenfalls diskutiert (Meldrum, 1993). Allerdings ist es immer noch umstritten, ob exzitierende Aminosäuren zu einem schnellen Absterben von Astrozyten führen, was von verschiedenen Arbeitsgruppen als Folge eines SE beschrieben wurde (z.B. Schmidt-Kastner & Ingvar, 1996). Mittlerweile gibt es erste Hinweise, dass es während eines Status zu einer vermehrten Bildung

freier Radikale (ROS) kommt, die möglicherweise an der Entstehung der Zellschäden beteiligt sind (Frantseva et al., 2000).

Die ROS-Bildung steigt unter anderem bei Depolarisationen der Mitochondrien an und es wurde gezeigt, dass im Verlauf von Krampfanfällen Mitochondrien depolarisieren, möglicherweise aufgrund einer exzessiven Akkumulation von Kalzium in den Zellen (Bindokas et al., 1998). Andererseits könnte Kalzium auch das entscheidende Signal sein, mit dem die ATP-Produktion an den metabolischen Bedarf der Zellen angepasst wird. Eine erhöhte ATP-Produktion während eines SE ist erforderlich, um das während der Anfälle in die Zellen einströmende Na^+ wieder aus den Zellen herauszutransportieren. Ca^{2+} kann die Bildung von ATP dadurch fördern, dass mehrere Enzyme des Zitronensäurezyklus Ca^{2+} -abhängig gesteuert werden

Wir verfolgen aufgrund dieser Überlegungen die Hypothese, dass es während neuronaler Aktivität zu intrazellulärer und intramitochondrialer Kalziumakkumulation kommt, dieses Ca^{2+} den Zitronensäurezyklus aktiviert, dadurch mehr NADH und letztlich vermehrt ATP zur Verfügung gestellt wird. Eine eintretende Mitochondriendepolarisation könnte die Sauerstoffverwertung beeinträchtigen und dadurch zur vermehrten Produktion von ROS führen, die u.a. die Mitochondrien schädigen können. Kalzium-Akkumulation kann neben der Aktivierung der Mitochondrien auch zu einer vermehrten Produktion von NO führen, das in Verbindung mit ROS-Molekülen in Form von Peroxynitrit besonders schädigend wirken kann (Noack et al., 1999).

Mittlerweile stehen eine Reihe von Fluoreszenzindikatoren zur Verfügung, mit denen einige dieser Prozesse verfolgt werden können. Gut etabliert sind Methoden zur Messung der intrazellulären und intramitochondrialen Kalziumakkumulation. Ebenso lässt sich das Mitochondrienpotential messen. Die Bildung von freien Radikalen kann durch oxydationssensitive Farbstoffe verfolgt werden, deren Fluoreszenz gut mit der chemisch nachgewiesenen Bildung von ROS-Molekülen korreliert. Eine Differenzierung verschiedener ROS-Spezies ist allerdings mit den unzureichend selektiven Farbstoffen wenig erfolgversprechend. Der ATP-Verbrauch lässt sich gegenwärtig mit biochemischen und histologischen Verfahren nachweisen, aber noch nicht direkt im Experiment verfolgen. Dies könnte möglicherweise gelingen, indem die freie Mg^{2+} -Konzentration in den Zellen gemessen wird. Anstiege der Mg^{2+} -Konzentration können entweder durch ATP-Verbrauch oder Einstrom von Mg^{2+} über NMDA Rezeptoren vermittelt sein. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass bei lokaler Applikation von NMDA die extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration absinkt (unveröffentlichte Beobachtung). Ein Anstieg der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration während Krampfanfällen, die durch Absinken der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration ausgelöst wurden, könnte demnach auf einen erhöhten ATP-Verbrauch hinweisen. Es lohnt sich deshalb, die intrazellulären Mg^{2+} -Konzentrationsänderungen mit fluoreszierenden Farbstoffen zu verfolgen.

Für den Nachweis von NO stehen mehrere Indikatoren zur Verfügung (z.B. Heiduschka & Thanos, 1998; Kojima et al., 1998; Meinecke et al. 2000). DAQ ist zellpermeabel, nicht toxisch und bildet mit NO eine wasserunlösliche Verbindung, die entweder histologisch oder fluoreszenz-mikroskopisch dargestellt werden kann. Zwei andere Indikatoren, mit denen wir aber noch keine Erfahrung besitzen, werden nach Aufnahme in die Zelle in Form einer Esterverbindung freigesetzt und zeigen entweder die Synthese von NO oder ONOO an. Wir planen, uns mit der Spezifität dieser Farbstoffe auseinanderzusetzen und dann der Frage nachzugehen, unter welchen Bedingungen es zur Bildung von Peroxynitrat kommt.

Bei diesen Untersuchungen bietet es sich an, die neuroprotektive Wirkung verschiedener Radikalfänger zu nutzen. Es kommen neben Tocopherol verschiedene Tocopherol-Derivate (Sen et al., 2000), ungesättigte Fettsäuren und die Heraufregulation des intrinsischen Radikalfängers Glutathion in Betracht.

Bezüglich der NO Bildung werden NO-Donatoren und NOS-Inhibitoren sowie Mausmutanten wie e-NOS, i-NOS und n-NOS eingesetzt, die uns von Herrn Dirnagl zur Verfügung gestellt werden. Die Spezifität der NO-Farbstoffe gegenüber freien Radikalen kann durch Experimente, in denen die ROS-Produktion z.B. durch Paraquat oder Menadion angeregt wird, geprüft werden. Zusätzlich können Einflüsse der Xanthinoxidase oder der Monoaminoxidase anhand pharmakologischer Eingriffe (z.B. Allopurinol) getestet werden.

Veränderte Eigenschaften von Astrozyten

Veränderungen von Astrozyteneigenschaften aus AHS-Gewebe oder nach Läsionen wurden vor allem von Bordey und Sontheimer (Bordey & Sontheimer, 1998) und Steinhäusers Arbeitsgruppe in Bonn (z.B. Hinterkeuser et al., 2000) beschrieben. Viele Zellen weisen einen erhöhten Eingangswiderstand sowie eine Herabregulation von Kalium-Einwärtsgleichrichtern, wahrscheinlich des Kir 4.1 Typs und der adjunkten Kir 6 Untereinheit (Steinhäuser et al., 2000) auf. Diese Änderungen könnten mit einem Verlust oder einer Reduktion der Fähigkeit zur Aufnahme extrazellulären Kaliums einhergehen, das während neuronaler Aktivität auf bis zu 12 mM akkumulieren kann (Heinemann & Lux, 1977). Zur Zeit werden fünf Mechanismen diskutiert, die an diesen Prozessen beteiligt sein können: ein Furosonid-sensitiver KCl Transport (Walz & Hertz, 1984), ein DIDS-sensitiver KCl Transport (Walz & Wuttke, 1999), die Aktivierung einer glialen Na-K-ATPase (Griesar et al., 1978), Umverteilung durch Diffusion und die räumliche Umverteilung von K^+ durch Astrozyten (Coles & Orkand 1983). Dieser Mechanismus ist besonders effizient, wenn es zu einer lokalen Kaliumerhöhung kommt. Räumlich ausgedehnte Gliazellen oder über GAP-junctions gekoppelte Astrozyten werden durch die K^+ -Akkumulation depolarisiert. Die lokale Depolarisation dissipiert im Syncytium und ist deshalb kleiner als die durch die Kaliumakkumulation bedingte Veränderung des Kaliumgleichgewichtspotentials. Damit entsteht eine treibende Kraft für die Kaliumaufnahme in die Gliazellen. An entfernten Orten ist die Gliazelle ebenfalls depolarisiert, obwohl dort das Kalium nicht primär erhöht ist. Es entsteht eine treibende Kraft für die Kaliumfreisetzung. Diese Prozesse sind mit der Genese negativer Feldpotentiale am Ort großer Kaliumakkumulation und mit der Genese positiver Potentiale am Ort der Kaliumfreisetzung assoziiert (Dietzel et al., 1986). Ein solcher Mechanismus verteilt Kalium sehr schnell und effizient im Gewebe. Große Kaliumakkumulation ist deshalb gefürchtet, weil die neuronale Erregbarkeit gesteigert wird und epileptische Anfälle ausgelöst werden können (Traynelis & Dingledine 1988, Leschinger et al., 1996; Schweitzer et al., 1992).

Neben einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen sind wahrscheinlich auch Hintergrund-leitfähigkeiten beteiligt, die das Ruhemembranpotential von Zellen regulieren. Die Ruhekalium-leitfähigkeit wird dabei besonders von "Two Pore Domain"-Kalium-Kanälen bestimmt, die spannungsunabhängig sind, nur eine geringe Rektifizierung aufweisen und nicht inaktivieren (Lesage & Lazdunski, 2000). Im Gehirn sind bisher KCNK 1-4, 9 und 13 nachgewiesen worden, die unterschiedlich verteilt sind (Kindler et al., 2000; Medhurst et al. 2001) und sich pharmakologisch durch ihre Sensitivität gegenüber Ba^{2+} , TEA, Quinin, Quinidin, Zn^{2+} , Na^+ , DNP und pH unterscheiden. Ein Teil der Kanäle kann durch Arachidonsäure sowie verschiedene ungesättigte Fettsäuren reguliert werden. Einige der Leitfähigkeiten sprechen auch auf volatile Anaesthetika an. Besonders interessant ist der Effekt von Riluzole und TNP. Damit steht ein reichhaltiges differentielles pharmakologisches Instrumentarium zur Verfügung, mit dem zumindest educated guesses zur Beteiligung dieser Kaliumkanäle an der Regulation des Ruhemembranpotentials und der Pufferfähigkeit für Kalium getestet werden kann. Direkte Messungen werden dadurch erleichtert, dass es dem Labor von Herrn Kettenmann und Herrn Kirchhoff gelungen ist, eine transgene Maus herzustellen, die in GFAP-positiven Astrocyten GFP-Protein exprimiert, wodurch Untersuchungen mit Patch clamp-Verfahren entweder an akut isolierten Zellen oder in situ erleichtert werden. Akut isolierte Zellen können darüber hinaus durch facs-sorting aufgereinigt werden, wodurch eine molekularbiologische Untersuchung dieser Zellen erleichtert wird.

Gliazellen spielen darüber hinaus in der Bereitstellung von Glutamin und Cystein eine große Rolle (z.B. Bender *et al.*, 2000; Brookes 2000). Diese Substanzen werden den Neuronen zur Synthese von Glutamat und Glutathion zu Verfügung gestellt. Sie haben daneben die Funktion, die ambienten Spiegel von Glutamat und GABA sowie anderer Neurotransmitter zu regeln. Für Glutamat gibt es zwei prinzipielle Aufnahmesysteme: die Na^+ -abhängigen Glutamatttransporter EAAT 1-5 (Sims & Robinson, 1999; Tanaka, 2000) sowie die noch nicht klonierten Austauscher für saure Aminosäuren. Einer dieser Austauscher, der Cystin-Glutamat-Antiporter, ist sensitiv für α -Aminoadipat (Reichelt *et al.*, 1997), während für die Na^+ -abhängigen Transporter kompetitive und nicht-kompetitive Hemmsubstanzen zur Verfügung stehen (z.B. Bridges *et al.*, 1999). Allerdings haben einige dieser Substanzen auch Wirkungen auf metabotrope Rezeptoren (L-*trans*-2,4-PDC) oder ionotrope Glutamatrezeptoren (Dihydrokainat). Eine sehr wirksame Substanz ist DL-TBOA, das wenig unspezifische Wirkung aufweist (Shimamoto *et al.*, 1998). Im Gewebe von Epilepsie-Patienten ist eine Änderung der Expression metabotroper Rezeptoren gefunden worden (z.B. Lie et al., 2000). Diese Veränderungen im Expressionsmuster könnten Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit bedingen. Ihre Bedeutung für die Epileptogenese ist noch weitgehend ungeklärt.

Änderungen der Funktion von Gliazellen könnten direkte Wirkungen auf die Krampfbereitschaft und/oder iktale Schädigungsprozesse haben. Wir und andere konnten zeigen, dass in normalen Hirnschnittpräparaten Barium epileptiforme Entladungen auslösen kann - ebenso wie eine Erhöhung der Kaliumkonzentration. Tiere, denen der Glutamattransporter GLT1 fehlt, entwickeln epileptische Anfälle (Tanaka et al., 1997). Die Latenz bis zum Auftreten anoxischer Depolarisationen ist bei Applikation von Glutamattransportblockern stark verkürzt, während EAAT3 KO Tiere eine erhöhte Sauerstoffmangeltoleranz aufweisen (Gebhardt, unveröffentlicht). Es wird deshalb von Wichtigkeit sein, die Auswirkungen solcher Defekte auf die Krampfbereitschaft in chronisch epileptischen Geweben der Ratte oder Maus und des Menschen vergleichend zu untersuchen.

Literatur zum Stand der Forschung

- Babb, T.L., Brown, W.J., Pretorius, J.K., Davenport, C.J., Lieb, J.P. & Crandl, P.H. (1984) Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **25**(6), 729-740.
- Bender, A. S., Reichelt, W., & Norenberg, M. D. (2000). Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem.Int.* **37**, 269-276.
- Bindokas VP, Lee CC, Colmers WF, Miller RJ (1998) Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci*, **18**, 4570-4587
- Bordey, A. & Sontheimer, H. (1998) Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *Epilepsy Research*, **32**, 286-303.
- Bridges, R. J., Kavanaugh, M. P., & Chamberlin, A. R. (1999). A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Curr.Pharm.Des* **5**, 363-379.
- Brookes, N. (2000). Functional integration of the transport of ammonium, glutamate and glutamine in astrocytes. *Neurochem.Int.* **37**, 121-129.
- Cavalheiro, E.A. (1995) The pilocarpine model of epilepsy. *Ital. J. Neurol. Sci.*, **16**, 33-37
- Coles, J.A. & Orkand, R.K. (1983) Modification of potassium movement through the retina of the drone (*Apis mellifera*) by glial uptake. *J.Physiol.(Lond.)*, **340**, 157-174.
- Dietzel, I. & Heinemann, U. (1986) Dynamic variations of the brain cell microenvironment in relation to neuronal hyperactivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **481**, 72-86.
- Frantseva, M.V., Perez Velazquez J.L., Tsoraklidis, G., Mendonca, A.J., Adamchik, Y., Mills, L.R., Carlen, P.L. & Burnham, M.W. (2000) Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. *Neuroscience*, **97**, 431-435.
- Grisar, T., Franck, G. & Schoffeniels, E. (1978) K⁺-activation mechanisms of the (Na⁺, K⁺)-ATPase of bulk- isolated glia and neurons. In Schoffeniels,E. (ed), *Dynamic Properties of Glia Cells*. Pergamon Press, Oxford and New York, pp. 359-369.
- Heiduschka, P. & Thanos, S. (1998) NO production during neuronal cell death can be directly assessed by a chemical reaction in vivo. *NeuroReport*, **9**, 4051-4057.
- Heinemann,U. & Lux,H.D. (1977) Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Res.*, **120**, 231-249.
- Hinterkeuser, S., Schröder, W., Hager, G., Seifert, G., Blümcke, I., Elger, C.E., Schramm, J. & Steinhäuser, C. (2000) Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy: display changes in potassium conductances. *Eur.. J. Neurosci.*, **12**, 2087-2096
- Kindler, C.H., Pietruck, C. Yost, C.S., Sampson, E.R. & Gray, A.T. (2000) Localization of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1 in the rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **80**, 99-108
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. & Nagano, T. (1998a) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.*, **70**, 2446-2453.
- Lesage, F. & Lazdunski, M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **279**, F793-F801
- Leschinger, A., Stabel, J., Igelmund, P. & Heinemann, U. (1993) Pharmacological and electrographic properties of epileptiform activity induced by elevated K⁺ and lowered Ca²⁺ and Mg²⁺ concentration in rat hippocampal slices. *Exp. Brain Res.*, **96**, 230-240.
- Lie, A.A., Becker, A., Behle, K., Beck, H., Malitschek, B., Conn, P.J, Kuhn, R., Plaschke, M., Schramm, J., Elger, C.E., Wiestler, O.D. & Blümcke, I. (2000) Upregulation of the

- metabotropic glutamate receptor mGluR4 on hippocampal neurons with reduced seizure vulnerability. *Ann. Neurol.*, **47**, 26-35
- Löscher, W. & Rundfeldt, C. (1991) Kindling as a model of drug-resistant partial epilepsy: selection of phenytoin-resistant and non-resistant rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 483-489
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Bekenstein, J.W. & Perlin, J.B. (1989) Self-sustaining limbic status epilepticus induced by 'continuous' hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. *Epilepsy Res.*, **3**, 107-119
- Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kellsell, R.E., Gloger, I.I. & Pangalos, M.N. (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Molecular Brain Research*, **86**, 101-114
- Meineke, P., Rauen, U., de Groot, H., Korth, H.-G. & Sustmann, R. (2000) Nitric oxide detection and visualization in biological systems. Applications of the FNOCT method. *Biol. Chem.*, **381**, 575-582.
- Meldrum, B. S. (1993) Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol.*, **3**, 405-412
- Noack, H., Possel, H., Rethfeldt, C., Keilhoff, G. & Wolf, G. (1999) Peroxynitrite mediated damage and lowered superoxide tolerance in primary cortical glial cultures after induction of the inducible isoform of NOS. *Glia*, **28**, 13-24.
- Reichelt, W., Stabel-Burow, J., Pannicke, T., Weichert, H., & Heinemann, U. (1997). The glutathione level of retinal Muller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience* **77**, 1213-1224.
- Robinson, M. B. (1999). The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem.Int.* **33**, 479-491.
- Schmidt-Kastner, R. & Ingvar, M (1996) Laminar damage of neurones and astrocytes in neocortex and hippocampus of rats after long-lasting status epilepticus induced by pilocarpine. *Epilepsy Res.*, **Suppl. 12**, 309-316
- Schweitzer, J.S., Patrylo, P.R. & Dudek (1992) Prolonged field bursts in the dentate gyrus: dependence on low low calcium, high potassium, and nonsynaptic mechanisms. *J. Neurophysiol.*, **68**, 2016-2025
- Seifert, G., Schumacher, T., Weber, M., Schramm, J. & Steinhäuser, C. (1999) AMPA receptor properties of astrocytes in human epilepsy. *J. Neurochem.*, **73**, S135, (Abstract).
- Sen, C.K., Khanna, S., Roy, S. & Packer, L. (2000) Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60(c-Src) kinase activation and death of HT4 neuronal cells. *J Biol Chem.*, **275**, 13049-13055
- Shimamoto, K., Lebrun, B., Yasuda-Kamatani, Y., Sakaitani, M., Shigeri, Y., Yumoto, N., & Nakajima, T. (1998). DL-threo- β -benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol.Pharmacol.* **53**, 195-201.
- Sims, K. D. & Robinson, M. B. (1999). Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit.Rev.Neurobiol.* **13**, 169-197.
- Steinhäuser, C. Schröder, W., Hinterkeuser, S., Wilkin, G.P., Knott, C. & Seifert, G. (2000) Functional and molecular analysis of KIR channels in hippocampal astrocytes of epilepsy patients. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiology*, **Suppl.6, 439**, S07-3 (Abstract)
- Tanaka, K. (2000). Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci.Res.* **37**, 15-19.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ischihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M. & Wada, K. (1997) Epilepsy and Exacerbation of brain injury in mice, lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, **276**, 1699-1702
- Traynelis, S.F. & Dingledine, R. (1988) Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice *J. Neurophysiol.*, **59**, 259-276
- Walz, W. & Hertz, L. (1984) Intense furosemide-sensitive potassium accumulation in astrocytes in the presence of pathologically high extracellular potassium levels. *J.Cereb.Blood Flow Metab.*, **4**, 301-304.
- Walz, W. & Wuttke, W.A.(1999) Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue. *J. Neurosci. Res.*, **56**, 595-603.
- 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.

3.4 Eigene Vorarbeiten

3.4.1. Dissoziierte Hippokampus-Kulturen der Maus und Ratte

An dissoziierten Kulturen der Maus hatte sich gezeigt, dass α -Tocopherol gegen den basalen Zelltod schützen konnte. Als Ursachen des basalen Zelltodes wurden Störungen im freien Radikalen-Stoffwechsel identifiziert (Schuchmann und Heinemann 2000a), die unter anderem zu einer Zunahme der basalen Kalziumkonzentration (Schuchmann und Heinemann 1998) und einer Abnahme der Glutathionkonzentration geführt hatten (Schuchmann et al., 2000b). Blockade des glialen Glutamat-Cystin-Antiporters (α -Aminoadipat) oder Blockade des glialen Stoffwechsels (Fluorazetat) verursachte eine Senkung des neuronalen Glutathionspiegels, die durch Cysteingabe verhindert werden konnte. Eine kritische Abnahme der Glutathionkonzentration führte zum Absterben der Nervenzellen.

Wir konnten weiter zeigen, dass Glutamatexposition Dosis-abhängig einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, eine Depolarisation des Mitochondrienpotentials und eine biphasische Veränderung der NAD(P)H Autofluoreszenz hervorrief. Bei älteren Kulturen verschwand der sekundäre NAD(P)H Overshoot, während gleichzeitig die Produktion freier Radikale zunahm. Die fluorimetrisch ermittelten Befunde konnten dank kooperativer Unterstützung der AG Blasig durch chemische Messungen erhärtet werden. Die Ergebnisse führten uns zu der Annahme, dass bei diesen Kulturen eine Schädigung der Mitochondrienfunktion vorlag, die wir mit verschiedenen pharmakologischen Messverfahren auf den Komplex I der Atmungskette lokalisieren konnten (Schuchmann & Heinemann, 2000 a).

Ausgehend von diesen Befunden entstand die Hypothese, dass an Krampf-bedingtem Zelltod ebenfalls eine Schädigung der Mitochondrienfunktion beteiligt sein könnte. Wir haben deshalb an dissoziierten Kulturen 4AP appliziert und tatsächlich synchronisierte Aktivität beobachtet. Das pharmakologische Profil dieser Aktivität wich jedoch so stark von den charakteristischen Profilen der am Hirnschnitt (Brückner et al., 1999, 2000a, 2000b) bzw. in vivo beobachteten Aktivität ab, dass wir die Idee, Details der Schadenskaskaden während epileptischer Aktivität an dissoziierten Kulturen zu untersuchen, aufgegeben haben.

3.4.2 Status epilepticus an komplexen Hirnschnittpräparaten des entorhinalen Kortex und Hippokampus.

An diesen Präparaten lässt sich durch Absenken der Mg^{2+} -Konzentration, Applikation von 4-AP etc. epileptiforme Aktivität induzieren. Im Hippokampus CA3 und CA1 werden kurze rekurrente Entladungen, im entorhinalen Kortex, im Subikulum und im benachbarten Neokortex krampfartige Entladungen beobachtet. Wie Messungen mit intrinsisch optischen Signalen und Mehrfachableitungen mit ionenselektiven Mikroelektroden ergaben, beginnt die Aktivität meist im entorhinalen Kortex und breitet sich dann langsam auf die benachbarten Rindfelder aus (Buchheim et al, 1999, 2000; Weissinger et al. 2000). Im Unterschied dazu war in epileptischem Gewebe nach Kindling oder Pilokarpin-induziertem Status epilepticus auch eine Ausbreitung auf den Hippokampus nachweisbar. Dies konnte unter anderem mit fokaler Applikation von Kalium und Bicucullin im entorhinalen Kortex gezeigt werden [Behr et al., 1998; Wozny et al., 2000 (Abstract); Manuscript under revision].

Die Anfälle sind durch eine Reduktion des ECS (um ca. 30 %) , einen starken Anstieg der $[K^+]_o$, und einen Abfall der $[Na^+]_o$ und $[Mg^{2+}]_o$ gekennzeichnet (Gutschmidt et al., in prep). Während die $[Ca^{2+}]_o$ um ca. 0.3 – 0.6 mM abnimmt, steigt die $[Ca^{2+}]_i$ um 750 nM an (Gloveli et al., 1999).

Diese Befunde führten zu Untersuchungen, bei denen an identifizierten Hippokampusneuronen der Zusammenhang zwischen Kalziumakkumulation und Mitochondriendepolarisation untersucht wurde. Es zeigt sich, dass die Mitochondriendepolarisation tatsächlich von der Akkumulation intrazellulären Kalziums abhängt (Schuchmann et al. 2000). Von besonderem Interesse war aber die Beobachtung, dass die Mitochondriendepolarisation immer mit einer Verzögerung auf die intrazelluläre Kalziumakkumulation folgte.

Wenn sich die konvulsiven Ereignisse über längere Zeit wiederholen, kommt es zu einem Übergang in späte Entladungen, die auf klassische Antikonvulsiva nicht mehr ansprechen und einem pharmakoresistenten Status epilepticus entsprechen (Dreier et al., 1998). Die durch Aktivierung der elektrogenen Na-K-ATPase verursachten Nachhyperpolarisationen werden im Verlauf des Status immer kürzer und verschwinden vollends beim Übergang in pharmakoresistente Statusaktivität (Behr et al., 1996). Dies führte zur Hypothese, dass es während eines Status epilepticus zu einer zunehmenden Schädigung der Mitochondrien kommen könnte, aus der eine Entkopplung metabolischer und neuronaler Aktivität resultiert. Wir haben deshalb die NAD(P)H Autofluoreszenzsignale an Hirnschnittpräparaten verfolgt. Es zeigte sich, dass es wie bei Glutamataexposition initial zu einem Abfall der Fluoreszenz und anschließend zu einem Überschwingen der NAD(P)H Signale kommt. Dieses Überschwingen wurde im Verlauf des Status bei jedem Anfall kleiner. Zum Zeitpunkt des Übergangs in die späte, pharmakoresistente Aktivität fielen die Anstiege der NAD(P)H-Fluoreszenz aus (Schuchmann et al., 1999; Schuchmann et al., in prep.). Da die Versorgungsbedingungen am Hirnschnittpräparat sehr inhomogen sind und das Gewebe durch eine längere Hypoxieperiode während der Präparation vorgeschädigt sein kann, haben wir uns entschlossen, weitere Untersuchungen an Hirnschnittkulturen zu unternehmen.

3.4.3 Organotypische Hirnschnittkulturen und epileptische Aktivität

Organotypische Kulturen zeigen eine erhöhte Krampfbereitschaft, die u.a. auf der Ausbildung aberranter Verbindungen beruht (Gutierrez et al., 1999 a,b). Diese sind in vielerlei Hinsicht jenen Veränderungen ähnlich, die wir in Pilocarpin behandelten Ratten mit einer spontanen Epilepsie finden (Lehmann et al., 2000, Lehmann et al. under revision). Wir konnten nachweisen, dass an diesen Kulturen Status-, aber auch Hoch-Sauerstoff-Behandlung zu einem vermehrten Zelltod führt (Kovacs et al., 1999, Pomper et al. 2001 in press). In den Hirnschnittkulturen synchronisiert epileptiforme Aktivität sehr rasch. Dies bietet den Vorteil, Lichtsignale aus einem großen Gewebeareal mit reduzierter Anregungsenergie und folglich verminderter Phototoxizität auffangen zu können.

Kopplung metabolischer und neuronaler Aktivität in organotypischen Kulturen

Ausgehend von diesen Vorbefunden haben wir den Zusammenhang zwischen Krampfaktivität und intrazellulären Signalen erfassen können. Während eines konvulsiven Ereignisses fällt die extrazelluläre Kalziumkonzentration ab (bis zu 1 mM), das zytoplasmatische Kalziumsignal und das intramitochondriale Kalzium steigen annähernd zeitgleich an. Allerdings kehrt das intramitochondriale Signal verzögert und langsamer als die cytosolische Kalziumkonzentration auf das Ausgangsniveau zurück. Das NAD(P)H-Signal beginnt mit Verzögerung anzusteigen, die Mitochondriendepolarisation folgt mit noch größerer Verzögerung. Schließlich kommt es, gemessen anhand des HET-Signals, zur Bildung freier Radikale. Das HET-Signal ist nach Vorbehandlung mit freien Radikal-Scavengern wie Tocopherol stark reduziert (Kovacs et al., 2001 in press). Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgendes Szenario ableiten:

Das während neuronaler Aktivität einströmende Kalzium dringt rasch in die Mitochondrien ein, stimuliert dort Enzyme des Zitronensäurezyklus und sorgt für eine erhöhte Bereitstellung von NADH. Um das Kalzium aus den Mitochondrien zu entfernen, wird der Natrium-Kalzium-Austauscher aktiviert, der für die Mitochondriendepolarisation sorgt. Die dadurch bedingte

Mitochondriendepolarisation verschlechtert die Verwertung von O₂ und es werden vermehrt freie Radikale erzeugt.

Veränderungen der intrazellulären Signale während eines Status epilepticus

Während die extrazellulären Signale nach Beginn des Status zunächst konstant bleiben, nimmt die intrazelluläre Kalziumakkumulation während der ersten drei Anfälle um ca. 30 % ab, die intramitochondriale Kalziumakkumulation sogar um 60 %. Ebenso nimmt das NAD(P)H-Signal ab, während die Mitochondriendepolarisation weitgehend gleich bleibt, und das Het-Signal von Krampfanfall zu Krampfanfall immer größer wird. Die Veränderungen des Mitochondriensignals und des NAD(P)H-Signals fallen an Tocopherol-vorbehandelten Schnittkulturen geringer aus. Das HET-Signal steigt deutlich später an, offenbar erst dann, wenn das Tocopherol durch Oxydation verbraucht wurde.

Wir haben deshalb geprüft, ob α -Tocopherol auch neuroprotektiv wirken kann. Wir fanden, dass α -Tocopherol gegen Hoch-Sauerstoff-induzierten Zelltod ebenso schützen kann wie gegen Status epilepticus induzierten Zelltod (Kovacs et al., Manuscript wird 3/2001 eingereicht). Im Kontext zu diesen Ergebnissen erhebt sich die Frage, ob auch unter physiologischen Bedingungen eine Stimulation der NAD(P)H- und ROS-Bildung erfolgt und weiter, ob Peroxinitritbildung evtl. kritisch in die Schadenskaskaden des Status epilepticus involviert ist.

Physiologische Aspekte der Kopplung neuronaler und metabolischer Aktivität und Beteiligung von NO an Schadenskaskaden während eines Status epilepticus.

Zu beiden Themen liegen bereits Ergebnisse vor, die in Manuskriptform zur Veröffentlichung eingereicht sind (von Bohlen und Halbach et al., under revision; Schuchmann et al., submitted) oder vorbereitet werden (Kann et al., in Vorbereitung). Bezüglich der Darstellung dieser Ergebnisse verweisen wir auf den Arbeitsbericht.

Zusammenfassend ergibt sich aufgrund unserer Voruntersuchungen die Hypothese, dass intrazelluläre Kalziumakkumulation die vermehrte Bildung von NADH fördert, dass aber verbunden mit der Aktivierung der Mitochondrien vermehrt freie Radikale gebildet werden, die allein oder in Verbindung mit NO für die Schädigung von Neuronen und Gliazellen verantwortlich sein könnten. Häufig wiederkehrende langanhaltende Krampfanfälle könnten insgesamt zu einer Schädigung von Mitochondrien führen, die es den Zellen erschwert, mit den Belastungen während eines Krampfanfalles fertig zu werden und möglicherweise zu einem kontinuierlichen Zellverlust bei fokalen Epilepsien im Bereich des epileptischen Herdes führt.

3.4.4 Veränderte Eigenschaften von Astrozyten im chronisch epileptischen Gewebe

Wir sind der Hypothese nachgegangen, dass Astrozyten im sklerotischen Gewebe ihre Fähigkeit zur Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration verlieren könnten.

Zunächst gingen wir davon aus, dass die über Ionenkanäle und GAP-junctions vermittelte gliale Aufnahme und räumliche Umverteilung von K⁺ besonders geeignet ist, aktivitätsabhängige, lokale Konzentrationsanstiege zu begrenzen. Da der Kaliumstrom über gliale Kaliumkanäle durch Barium blockiert werden kann, prüften wir, ob Bariumapplikation mit einer Vergrößerung evozierter Kaliumanstiege in der hippokampalen Ca1-Region normaler, gekindelter und chronisch epileptischer Ratten einhergeht.

Wir konnten zeigen, dass Barium in gesunden Kontrolltieren reiz- und iontophoretisch induzierte Kaliumanstiege stark vergrößert (Gabriel et al. 1998a, Heinemann et al. 1999, Heinemann et al. 2000). In juvenilem Gewebe bleibt dieser Effekt aus (Gabriel et al. 1998b). Ebenso fanden wir in der sklerotischen Area CA1 von Pilokarpin-behandelten Tieren einen stark reduzierten Effekt von Barium (Gabriel et al. 1998a), wobei der Grad der Reduktion in der chronischen Phase mit der Dauer des drei Monate zurückliegenden Status zunahm (Heinemann et al. 2000). Vor diesem Hintergrund führten wir weitere Untersuchungen durch, in denen die räumliche Verteilung von Kalium-Signalen (laminares Profil) unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Barium gemessen wurde. Es ergab sich, dass Barium die laminaren Profile bei Kontrolltieren und gekindelten Tieren deutlich modifizierte, während bei den Pilokarpin-Tieren nur geringe Veränderungen beobachtet werden konnten [Eilers et al. 1999, (Abstract); Eilers et al. in prep].

Untersuchungen in humanen Hirnschnittpräparaten von Patienten mit Ammonshorn-Sklerose bzw. ohne Ammonshorn-Sklerose ergaben, dass Barium in sklerotischen Arealen keine Steigerung der Kalium-Akkumulation bewirkt (Gabriel et al. 1998c, Kivi et al. 2000). Aus diesen Untersuchungen konnte gefolgert werden, dass Gliazellen in sklerotischen Gebieten des humanen Hippokampus die Fähigkeit zur Kalium-Regulation verlieren. Außerdem stellten wir fest, dass die Vergrößerung der Kaliumsignale in nicht-sklerotischem Gewebe mit der Bariumkonzentration zunahm. Im Vergleich mit Ergebnissen aus dem Labor von Christian Steinhäuser muss offen bleiben, ob die Reduktion Barium-sensitiver Pufferkapazität in der sklerotischen Area CA1 nur durch die beschriebene Herabregulation astrozytärer Einwärtsgleichrichter (Hinterkäufer et al., 2000, siehe Lit.I) bedingt ist. Aus der Tatsache, dass Barium in Anwesenheit von Glutamatrezeptorantagonisten im sklerotischen Gewebe eine signifikante Vergrößerung des Kaliumsignals um 40 % auslösen konnte (Kivi et al., 2000), geht hervor, daß gliale Kalium-Einwärtsströme auch durch Glutamat, möglicherweise infolge vermehrter Expression von nicht desensitisierenden AMPA-R flip-splice-Varianten (Seifert et al., 1999, siehe Lit I), gehemmt werden könnten.

Um ausschließen zu können, dass eine Verminderung von Connexinen beteiligt ist, wurde die Expression von Connexinen an Hippokampi von epileptischen Tieren mit und ohne Ammonshorn-Sklerose in Kooperation mit Klaus Willecke untersucht, aber es wurden keine Änderungen gefunden (Söhl et al, 2000).

Da Barium auch neuronale Kalium-Kanäle blockiert, führten wir zunächst vergleichende Untersuchungen mit anderen Kalium-Kanal-Blockern in Gegenwart von 2-APV und NBQX durch. Während Barium die durch Reizung im Alveus induzierten Kalium-Anstiege auch bei blockierter synaptischer Transmission mehr als verdoppelte (Kivi et al., 2000), waren unter diesen Bedingungen weder Veränderungen durch 4-AP (400µM) und TEA (2mM), noch durch Cäsium (2 mM) hervorzurufen [Eilers et al. 1998, (Abstract); Gabriel et al. in prep.]. Auch die zusätzliche Applikation von 9 µM Ouabain führte lediglich zu einer weiteren Zunahme um 30%.

In einer parallelen Messserie testeten wir den Effekt verschiedener Substanzen auf iontophoretisch induzierte Kalium-Signale. Alle Experimente wurden in Gegenwart von 2-APV und CNQX durchgeführt. Barium verdoppelte die iontophoretisch induzierten Kalium-Signale - auch bei zusätzlicher Applikation von TTX, während DIDS, ein Blocker von Chlorid-Kanälen, keine Wirkung zeigte. Furosemid, ein Blocker des K-Cl-Kotransporters, hatte ebenfalls keinen Effekt und Ouabain vergrößerte die iontophoretischen Kalium-Signale lediglich um 20-30 %. Im sklerotischen Humanhippokampus war, wie zuvor bei den reizinduzierten Signalen, keine Wirkung auf die iontophoretisch induzierten Anstiege der Kalium-Konzentration nachweisbar (Jauch et al. 1999, Abstract; Jauch et al., in prep).

Diese Befunde lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

I Kurzzeitige aktivitätsabhängige Steigerungen der extrazellulären Kaliumkonzentration werden im Wesentlichen durch eine Aufnahme von Kalium in Gliazellen begrenzt. Das Kalium diffundiert durch Barium-sensitive Kaliumkanäle. Sind diese Kanäle blockiert, verdoppelt sich die extrazelluläre Kaliumakkumulation (gliale Barium-sensitive Kalium-Pufferkapazität).

II Im sklerotischen Hippokampus von Epilepsie-Patienten fehlt die Pufferkapazität. Eine mögliche Ursache dafür ist die Verminderung Barium-sensitiver einwärtsgerichteter Kaliumströme (Hinterkäuser et al. 2000, siehe Lit I).

III Es bleibt zu klären, ob der Mangel an Pufferkapazität auch auf Veränderungen der Hintergrund-Kaliumkanäle (vermutlich "Two Pore Domain"-Kalium-Kanäle) und eine Glutamat-induzierte Blockierung von Kaliumeinwärtsströmen zurückzuführen ist.

IV Weiterhin bleibt nachzuweisen, dass Verminderung der Pufferkapazität die Entstehung oder Ausbreitung von Krampfaktivität begünstigt.

Wir haben deshalb untersucht, ob und unter welchen Bedingungen die Reduktion der glialen Kalium-Pufferkapazität mittels Barium epileptiforme Aktivität induzieren kann.

Dabei hat sich gezeigt, dass Gabe von Barium in einer Konzentration von 2 mM im sklerotischen Hippokampus mit erhaltener neuronaler Responsivität oder der Area dentata von AHS-Patienten keine epileptiformen Entladungen induzieren konnte, während sie in den entsprechenden Regionen von Patienten ohne-AHS häufig zu beobachten waren [Kivi et al., 2000 (Abstract); Lehmann et al. in prep]. Das heißt, dass Barium im Gewebe mit verminderter glialer Pufferkapazität keine epileptiforme Aktivität auslöst. Gleichzeitig müsste bei verminderter Kalium-Regulation eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Anstiegen der Kalium-Konzentration vorliegen. Deshalb prüften wir, ob eine Erhöhung der Kalium-Konzentration in der Area dentata sklerotischer Hippokampi epileptiforme Entladungen auslösen kann. Gegenwärtig sieht es so aus, als wäre die Empfindlichkeit gegenüber Hoch-Kalium im sklerotischen Gewebe gesteigert. (Gabriel et al., in prep).

Funktion von Gliazellen bei der Regulation extrazellulärer GABA- und Glutamat-Spiegel

Im chronisch epileptischen Gewebe verändert sich die Expression von GABA-Transportern, Glutamattransportern und metabotropen Glutamatrezeptoren. Wir haben mit der Untersuchung von Wirkungen verschiedener Glutamattransport-Blocker auf EPSPs im entorhinalen Kortex begonnen. Die EPSPs werden in Gegenwart von PDC Dehydrokainat und TBOA reduziert (Iserhot et al, 1999; Iserhot et al. in prep). Wir versuchten, die Freisetzung von Glutamat in ihrer Kinetik anhand der langsam desensibilisierenden NMDA Antworten zu bestimmen. Dazu wurde eine Nervenzelle auf +40 mV geklemmt und die Aktivierung von AMPA-Kainat-Rezeptoren blockiert. Es zeigte sich, dass Hydro-Kainat unter diesen Bedingungen epileptiforme Entladungen auslösen kann. Gegenwärtig prüfen wir, wie Glutamattransport-Blocker auf die Entstehung epileptischer Entladungen wirken.

Tiagabin, ein Blocker des GAT1-Transporters, hatte keinen Effekt auf das paired-pulse-Verhalten. Schlüssige Aussagen in bezug auf die Dauer von IPSPs und ihre Regulation durch verschiedene GABA-Transporter sind noch nicht möglich.

Literatur zu den eigenen Vorarbeiten

- Behr, J. & Heinemann, U. (1996) Low Mg²⁺ induced epileptiform activity in the subiculum before and after disconnection from rat hippocampal and entorhinal cortex slices. *Neurosci. Lett.*, **205**, 25-28
- Behr, J., Lyson, K.J. & Mody, I. (1998) Enhanced propagation of epileptiform activity through the kindled dentate gyrus. *J. Neurophysiol.*, **79**, 1726-1732.
- Brückner, C., Stenkamp, K., Meierkord, H. & Heinemann, U. (1999) Epileptiform discharges induced by combined application of bicuculline and 4-aminopyridine are resistant to standard anticonvulsants in slices of rats. *Neurosci. Lett.*, **268**, 163-165.

- Brückner, C. & Heinemann, U. (2000) Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Res.*, **859**, 15-20.
- Brückner, C., Stenkamp, K., Meierkord, H. & Heinemann, U. (2000) Effects of bicuculline and different glutamate receptor antagonists on 4aminopyridine-induced epileptiform discharges in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Neurosci. Res. Comm.*, **26**, 41-49.
- Buchheim, K., Schuchmann, S., Siegmund, H., Gabriel, H.-J., Heinemann, U. & Meierkord, H. (1999) Intrinsic optical signal measurement reveal characteristic features during different forms of spontaneous neuronal hyperactivity associated with ECS shrinkage *in vitro*. *Eur.J.Neurosci.*, **11**, 1877-1882.
- Buchheim, K., Schuchmann, S., Siegmund, H., Weissinger, F., Heinemann, U., & Meierkord, H. (2000) Comparison of intrinsic optical signals associated with low Mg^{2+} - and 4-aminopyridine induced seizure-like events reveals characteristic features in adult rat limbic system. *Epilepsia*, **41**, 635-641.
- Dreier, J.P., Zhang, C.-L. & Heinemann, U. (1998) Phenytoin, phenobarbital, and midazolam fail to stop status epilepticus-like activity induced by low magnesium in rat entorhinal slices, but can prevent its development. *Acta Neurol. Scand.*, **98**, 154-160.
- Eilers, A., Kivi, A., Gabriel, S., and Heinemann, U. (1998) Efficacy of glial spatial potassium buffering in area CA1 of rat Hippokampus *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.*, **10 Suppl. 10**, 338-338. (Abstract).
- Eilers, A., Schulze, K., Kivi, A., Lehmann, T.-N., Gabriel, S., & Heinemann, U. (1999) Spatial K^+ buffering in area CA1 of kindled and chronic epileptic rats *in vitro*. *Göttingen Neurobiol.Report* 1999, Vol **II**, 529-529 (Abstract).
- Gabriel, S., Eilers, A., Kivi, A., Kovács, R., Schulze, K., Lehmann, T.-N. & Heinemann, U. (1998a) Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats. *Neurosci. Lett.*, **242**, 9-12.
- Gabriel, S., Kivi, A., Eilers, A., Kovács, R. & Heinemann, U. (1998b) Effects of barium on stimulus induced rises in $[K^+]_o$ in juvenile rat hippocampal area CA1. *NeuroReport*, **9**, 2583-2587.
- Gabriel, S., Kivi, A., Kovács, R., Lehmann, T.-N., Lanksch, W. Meencke, H. & Heinemann, U. (1998c) Effects of barium on stimulus-induced changes in $[K^+]_o$ and field potentials in dentate gyrus and area CA1 of human epileptic hippocampus. *Neurosci.Lett.*, **249**, 91-94.
- Glovei, T., Egorov, A.V., Schmitz, D., Heinemann, U. & Müller, W. (1999) Carbachol-induced changes in excitability and $[Ca^{2+}]_i$ signalling in projection cells of medial entorhinal cortex layers II and III. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3626-3636.
- Gutiérrez, R., Armand, V., Schuchmann, S. & Heinemann, U. (1999) Epileptiform activity induced by low Mg^{2+} in cultured rat hippocampal slices. *Brain Res.*, **815**, 294-303.
- Gutiérrez, R. & Heinemann, U. (1999) Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. *Brain Res.*, **815**, 304-316.
- Heinemann, U., Gabriel, S., Schuchmann, S. & Eder, C. (1999) Contribution of astrocytes to seizure activity. *Adv.Neurol.*, **79**, 583-590.
- Heinemann, U., Gabriel, S., Jauch, R., Schulze, K., Kivi, A., Eilers, A., Kovacs, R. & Lehmann, T.-N. (2000) Alterations of glial cell function in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **41**, **Suppl. 6**, S185-S189.
- Iserhot, C., Gloveli, T. & Heinemann, U. (1999) Effects of glutamate uptake blockers on stimulus-induced field potentials in rat entorhinal cortex *in vitro*. *Neurosci.Lett.*, **259**, 103-106.
- Jauch, R., Gabriel, S., Kivi, A. & Heinemann, U. (1999) Spatial buffering of iontophoretically applied K^+ in rat hippocampal CA1. *Pflüg. Arch. Eur..J. Physiol.*, **437**, Suppl., P17-4, (Abstract)
- Kivi, A., Lehmann, T.-N., Kovács, R., Eilers, A., Jauch, R., Meencke, H.-J., von Deimling, A., Heinemann, U., & Gabriel, S.(2000) Effects of barium on stimulus-induced rises of $[K^+]_o$ in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur.J. Neurosci.*, **12**, 2039-2048.
- Kivi, A., Lehmann, T.-N., Eilers, A., Jauch, R., Heinemann, U. & Gabriel, S. (2000) Epileptiform activities in slices from human hippocampi without ammon's horn sclerosis. *Eur. J. Neurosci.*, **12 (suppl. 11)**, p. 109 (Abstract).

- Kovács, R., Gutiérrez, R., Kivi, A., Schuchmann, S., Gabriel, S. & Heinemann, U. (1999) Acute cell damage after low Mg^{2+} -induced epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *NeuroReport*, **10**, 207-213.
- Kovács, R., Szilágyi, N., Barábás, P., Heinemann, U., & Kardos, J. (2000) Low- $[Mg^{2+}]$ -induced Ca^{2+} fluctuations in organotypic hippocampal slice cultures. *NeuroReport*, **11**, 2107-2111.
- Lehmann, T. N., Gabriel, S., Kovacs, R., Eilers, A., Kivi, A., Schulze, K., Lanksch, W. R., Meencke, H. J., & Heinemann, U. (2000) Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia*, **41**, S190-S194.
- Schuchmann, S., Müller, W. & Heinemann, U. (1998) Altered Ca^{2+} signaling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mouse: a model of Down's syndrome. *J. Neuroscience* **18**, 7216-7231.
- Schuchmann, S., Buchheim, K., Meierkord, H. & Heinemann, U. (1999) A relative energy failure is associated with low- Mg^{2+} but not with 4-aminopyridine induced seizure-like events in entorhinal cortex. *J. Neurophysiol.*, **81**, 399-403.
- Schuchmann, S. & Heinemann, U. (2000a) Diminished glutathione levels causes spontaneous and mitochondria-mediated cell death in neurons from trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *J. Neurochem.*, **74**, 1205-1214.
- Schuchmann, S. & Heinemann, U. (2000b) Increased mitochondrial superoxide generation in neurons from trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 235-250.
- Schuchmann, S., Lückermann, M., Kulik, A., Heinemann, U. & Ballanyi, K. (2000) Ca^{2+} -and metabolism-related changes of mitochondrial potential in voltage-clamped CA1 pyramidal neurons in situ. *J. Neurophysiol.*, **83**, 1710-1721.
- Söhl, G., Guldenagel, M., Beck, H., Teubner, B., Traub, O., Gutierrez, R., Heinemann, U., & Willecke, K. (2000) Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **83**, 44-51.
- Weissinger, F., Buchheim, K., Siegmund, H., Heinemann, U., & Meierkord, H. (2000) Optical imaging reveals characteristic seizure onsets, spread patterns and propagation velocities in hippocampal-entorhinal cortex slices of juvenile rats. *Neurobiol. Dis.*, **7**, 286-98.
- Wozny, C., Heinemann, U., Gabriel, S. & Behr, J. (2000) The entorhinal cortex entrains epileptiform activity in area CA1 in a model of temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* **12**, Suppl **11**, 102.02

in press:

- Kovacs, R., Schuchmann, S., Gabriel, S., Kardos, J., & Heinemann, U. Ca^{2+} signalling and changes of mitochondrial function during low- Mg^{2+} induced epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.*
- Pomper, J., Graulich, J., Gabriel, S., Kovács, R., Hoffmann, U., & Heinemann, U. High oxygen tensions leads to cell death in organotypic hippocampal slice cultures. *Dev. Brain Res.*

3.5. Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1 Ziele

Mechanismen, die während eines Status epilepticus zu akutem und verzögerten Zelltod führen, sollen weiter charakterisiert werden. Wir gehen davon aus, dass physiologische Signale noch nicht mit einer Steigerung der ROS-Produktion einhergehen.

Es soll getestet werden, ob während rekurrenter epileptiformer Aktivität mehr Glutathion und ATP verbraucht wird.

Es soll nachgewiesen werden, dass Hochregulation des Glutathions nach Gabe von Cystin, Verbesserung des Energiestatus der Zellen durch Kreatin (Luhmann and Heinemann, 1992) und Applikation von ROS-Scavengern bei SSSE in organotypischen Zellkulturen und im intakten Tier neuroprotektiv wirken.

An humanen Hirnschnittpräparaten von Patienten mit Epilepsie und an Hirnschnittpräparaten gekindelter bzw. Status-behandelter Ratten soll der Frage nachgegangen werden, ob und in welchen Subregionen des Hippokampus möglicherweise die Mitochondrienfunktion geschädigt ist.

Die Beteiligung von NO abhängigen Prozessen an krampf-induzierten Schadenskaskaden soll durch vergleichende Messungen an normalen Hirnschnittkulturen der Maus und an Hirnschnittkulturen von e-NOS- und n-NOS- defizienten Tieren verifiziert werden.

Es soll die Hypothese geprüft werden, dass astrogliale "Two Pore Domain"-Kalium-Kanäle an der K⁺-Regulation beteiligt sind, und dass Veränderungen in der Expression dieser Kanäle an der gestörten Kaliumregulation in AHS-Gewebe beteiligt sind.

Es soll untersucht werden, ob in chronisch epileptischem Gewebe die Funktion von Glutamattransportern reduziert ist.

Es soll mit Hilfe von Barium, spezifischen Antagonisten von "Two Pore Domain"-Kalium-Kanälen und Applikation von Hoch-Kaliumlösungen die Hypothese geprüft werden, dass Störungen der Kaliumregulation zur erhöhten Anfallsbereitschaft in chronisch epileptischem Gewebe beitragen.

Wir streben an, aus der fallspezifischen Koinzidenz funktioneller, morphologischer und molekularbiologischer Veränderungen der Eigenschaften von Gliazellen und Neuronen an Epilepsie-Modellen und humanen Resektaten zu Einsichten hinsichtlich der Bedeutung glialer Funktionsstörungen im Krankheitsbild der Temporallappen-Epilepsie zu gelangen.

3.5.2 Methoden

3.5.2.1. Präparate:

Die Untersuchungen werden an Hirnschnitten und Hirnschnittkulturen des Hippokampus und entorhinalen Kortex durchgeführt. Zusätzlich sollen akut dissoziierte Zellen aus normalen und chronisch veränderten Tieren verwendet werden. Die Präparate stammen von Ratte und Maus und von humanem Gewebe, das zum Zwecke der Behandlung pharmakoresistenter Temporallappen-Epilepsien reseziert wird.

3.5.2.2 Messmethoden:

A. elektrophysiologische Verfahren:

ionenselektive Mikroelektroden, intrazelluläre Ableitungen, single electrode voltage clamp, patch clamp

B. Bildgebende Messverfahren (Fluoreszenzmikroskopie, Photomultiplier, Multi-Photonen-konfokale Mikroskopie)

Cytoplasmatisches Ca²⁺ (Fura, Fluo), intramitochondriales Ca²⁺ (Rhod-2); Mitochondrienpotential (123-Rhodamin, ratiometrisch mit IC-1 (5,5'-6,6'-tetrachloro-1.1'-3.3'-tetraethylbenzimid-azolo carboxyamin jodid), Produktion freier Radikale (Hydroxyrhodamin, Dihydroethidium, DCF); Glutathion (Monochlorobimane), NO (Diaminoanthraquinone, DAQ, fluorescent nitric oxide chelotropic traps (FNOCTs), ONOO 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF); ATP, Mg (Mg-Fura). NAD(P)H-Bildung wird mit Hilfe der Autofluoreszenz verfolgt. Die Messungen erfolgen mit dem vorhandenen PTI-System (Monochromator, Photomultiplier, Kamera), und ergänzend mit dem Multi-Photonen-konfokalen System.

C. Histologie

Zelltod wird an organotypischen Kulturen mit Propidiumjodid nachgewiesen. Zum Teil werden Gegenfärbungen mit Acridin-Orange durchgeführt. Um die elektrophysiologischen Messungen an Hirnschnittpräparaten von normalen Ratten, von verschiedenen tierexperimentellen Epilepsie-Modellen und humanen Resektaten mit morphologischen Befunden zu korrelieren, werden in Zusammenarbeit mit dem Graduiertenkolleg GRK 238 (Thomas Lehmann, Marleisje Njunting) und dem geplanten Trans-Regio SFB 6006 (Ingmar Blümcke, Bonn) die vorhandenen histologischen Methoden (Anfertigung von Gefrierschnitten, Zellzählung nach Anfärbung mit Kresylviolett oder Toluidinblau, Neo-Timm-Färbung, Nachweis von GFAP, Nachweis aberranter Verbindungen mittels Applikation Dextranamin-konjugierter Fluoreszenzfarbstoffe) durch immunocytochemische Nachweisverfahren für S100 β , GAD-65,67, GAT-1 und 3, Glutamat-Transporter) schrittweise ergänzt (Siegrun Gabriel). Am Versuchstier wird Zelltod mit der Tunnel-Methode (Kooperation Hrissanthi Ikonomidou) und unter Verwendung der Vanadium-Acid-Fuchsin-Färbung (Victorov I.V., Prass K., Dirnagl U. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. Brain Res. Protoc. 2000 Apr; 5 (2):135-9) bzw. Hematoxilin-Eosin-Färbung (Kooperation Ulrich Dirnagl) gemessen.

3.5.2.3 Epilepsie-Modelle

Epileptiforme Aktivität wird durch Absenken der Magnesiumkonzentration [Mg²⁺], durch Applikation von 4-AP und durch Applikation von Cäsium ausgelöst. Von besonderem Interesse sind auch epileptiforme Entladungen, die durch Barium oder Erhöhung der Kaliumkonzentration ausgelöst werden können. Neben diesen akuten Modellen werden chronische Tiermodelle eingesetzt, die am humanen Resektionsmaterial orientiert sind.

20 - 30 % des Resektionsmaterials stammt von Patienten mit extrahippokampalen Läsionen (Zysten, Tumoren, Entwicklungsstörungen etc.). Klinische Erfahrungen zeigen, dass die Patienten nur anfallsfrei werden, wenn der Hippokampus mit entfernt wird. Ein tierexperimentelles Modell für diese Form epileptischer Aktivität ist die Kindling-Epilepsie. Wir implantieren bipolare Stimulationselektroden unter Barbiturat-Anästhesie in die Mandelkerne. Nach einer Erholungsphase von 7-10 Tagen werden die Tiere einmal täglich mit Reizserien (1s, 100 Hz, 0.1 ms, 400 μ A) gereizt, bis an 5 aufeinanderfolgenden Tagen sekundär generalisierte Anfälle (Stadium V nach Racine) ausgelöst wurden. Kombinierte Hirnschnittpräparate des entorhinalen Kortex und Hippokampus werden 1-2 Tage und 4 Wochen nach dem letzten Anfall präpariert. Nach Vorbehandlung mit Kollagenase und DN-ase bzw. Pronase oder Trypsin werden einzelne Nervenzellen durch ein Piezoovibrationsverfahren freigesetzt und für Messungen mit Hilfe der Patch-clamp Methode genutzt.

70 – 80 % des Resektionsmaterials ist durch eine Hippokampussklerose gekennzeichnet. Die Hippokampussklerose ist am Tier durch einen länger dauernden Status epilepticus auslösbar. Bisher haben wir das Pilocarpinmodell eingesetzt, bei dem aber viele Tiere den Status nicht überleben. Ein Teil der begonnenen Untersuchungen soll unter Verwendung dieses Modells abgeschlossen werden. Dieses Modell soll auch an ϵ -NOS- und n -NOS-Mäusen und anderen transgenen Tieren wie der GFAP-GFP-Maus eingesetzt werden. Das Überleben der Tiere ist deutlich besser, wenn durch kontinuierliche Reizung des Tractus perforans ein Status epilepticus ausgelöst wird. Hirnschnitte und akut dissoziierte Zellen werden eine Woche bzw. 2 Wochen nach Beginn spontaner Anfälle präpariert und untersucht.

Humanes Gewebe erhalten wir von der Neurochirurgischen Klinik der Charité im Campus Virchow-Klinikum. Während der Operation exzerpiert Frau Siegrun. Gabriel die wesentlichen Patientendaten und dokumentiert den OP-Verlauf. Sie übernimmt das Gewebe und transportiert es in einer gekühlten artifiziellen Lösung mit erniedrigtem Na⁺-Gehalt und Tocopherol. Das Gewebe erreicht das Labor normalerweise zwischen 14.00 und 15.00 Uhr. Dort werden Hirnschnittpräparate hergestellt und Gewebe für histologische Untersuchungen (Timm, GFAP etc.) aufbereitet. Die Hirnschnittpräparate werden auf mehrere Messplätze verteilt und unter Anleitung von Siegrun. Gabriel während der Nacht und dem folgenden Tag dektrophysiologisch bzw. bildgebend untersucht. Eine Gewebeprobe erhält die Neuropathologie (v. Deinling, Brück), die uns auch bei weiteren histologischen Untersuchungen an diesem Gewebe unterstützt.

3.5.3 Arbeitsprogramm

3.5.3.1 Mechanismen, die während eines Status epilepticus zu akutem und verzögerten Zelltod führen, sollen weiter charakterisiert werden. Es soll zunächst die Hypothese geprüft werden, dass physiologische Signale noch keine vermehrte ROS-Produktion bedingen.

Physiologisch kann die $[K^+]_o$ aktivitätsabhängig in verschiedenen Strukturen des ZNS zwischen 2.8 - 4.5 mM variieren. Diesen Anstiegen folgt extrazellulär ein Unterschwingen, das von einer Nachhyperpolarisation begleitet wird, die durch Ouabain hemmbar ist. Reizinduzierte Änderungen der $[K^+]_o$ in diesem Konzentrationsbereich an organotypischen Hirnschnittkulturen werden mit intrazellulärem und intramitochondrialem Kalzium, Mitochondrienpotential, (NAD(P)H-Autofluoreszenz und HET-Signal sowie Dihydrorhamin-Signal korreliert. Um die Bedeutung intrazellulärer und intramitochondrialer Kalziumakkumulation für die Stimulierung der NAD(P)H-Signale zu erfassen, werden die Messungen in O-Kalzium-ACSF wiederholt.

3.5.3.2. Kommt es während rekurrenter epileptiformer Aktivität zu einem vermehrten Glutathion und ATP-Verbrauch?

Exp. I: Änderungen des Glutathiongehaltes während rekurrenter epileptiformer Entladungen sollen nach Vorbehandlung der organotypischen Hirnschnittkulturen mit Monochlorobimane dargestellt werden. Wir werden dann die folgenden Fragen beantworten können: Wie wirkt sich rekurrente durch Niedrig-Magnesium induzierte epileptiforme Aktivität auf den Glutathiongehalt aus? Kann durch Vorbehandlung mit N-Acetylcystein sowie Cystein und Cystin der Glutathiongehalt günstig beeinflusst werden?

Exp. II: Zur Darstellung von Änderungen des ATP-Gehaltes in organotypischen Hirnschnittkulturen während O-Mg-induzierter Krampfaktivität werden Änderungen der Mg-Fura-Fluoreszenz dargestellt und mit extrazellulärem Kalium- und Kalziumsignal korreliert. Wiederholung der Messungen bei Krämpfen, die durch 4-AP in Gegenwart von MK-801 ausgelöst wurden. Kontrolle fehlender Mg^{2+} -Aufnahme durch extrazelluläre Mg^{2+} -sensitive Mikroelektroden. Kontrolle der Veränderungen des ATP-Gehaltes mit histologischen bzw. biochemischen Nachweisverfahren. Wie sich Kreatin-Vorbehandlung auf die Veränderung der intrazellulären $[Mg^{2+}]$ auswirkt, wird im gleichen experimentellen Ansatz untersucht.

3.5.3.3 Es soll die Hypothese geprüft werden, dass Hochregulation des Glutathions durch Cystin, Verbesserung des Energiestatus der Zellen durch Kreatin (Luhmann and Heinemann, 1992), und durch Applikation von ROS-Scavengern in organotypischen Zellkulturen und im intakten Tier bei SSSE neuroprotektiv wirkt.

Exp. I: Vorbehandlung der organotypischen Hirnschnittkulturen mit der jeweiligen neuroprotektiven Substanz. Messung des Zelltods durch Bestimmung der Propidiumjodidfluoreszenz nach 2 Std. und 4 Std. eines durch Niedrig-Mg-induziertem SE in Gegenwart oder Abwesenheit der zu prüfenden Substanz. Als putative Neuroprotektiva werden Tocopherol und Tocopherolderivate, β -Liponsäure, Kreatin und Acetylcystein bzw. Cystin eingesetzt.

Exp. II: Es wird geprüft, ob das beste Protektivum auch im intakten Tier nach intraperitonealer Injektion gegen SSSE induzierten Zelltod schützt. Bestimmung des Zelltodes mit Tunnelfärbung 24 Std. und 28 Std. nach SE und mit Hematoxylin-Eosinfärbung bzw. Vanadium Acid Fuchsin-Färbung 2 Std. und 24 Std. nach SE (in Kooperation mit Ulrich Dirnagl und Hrisanthi Ikonomidou).

Führt häufig wiederkehrende epileptische Aktivität zu Mitochondrienschädigung?

An humanen Hirnschnittpräparaten von Patienten mit Epilepsie und an Hirnschnittpräparaten gekindelter bzw. SSSE-behandelter Ratten werden reizinduzierte NAD(P)H-Signale in verschiedenen Subregionen des Hippokampus daraufhin untersucht, wie reizinduzierte Änderungen der $[K^+]_o$ und $[Ca^{2+}]_o$ mit den NAD(P)H-Autofluoreszenzsignalen korrelieren. Bei SSSE-Tieren werden die

Untersuchungen im Krampf-freien Intervall und 2 und 6 Wochen nach Beginn der spontanen Anfälle durchgeführt. Bei gekindelten Tieren sollen die Untersuchungen nach 5, 20 und 40 Stadium V-Krämpfen vorgenommen werden. In einer tierexperimentellen und einer humanen Versuchsgruppe soll der Versuch gemacht werden, durch Cystinvorbehandlung den Glutathiongehalt hochzuregulieren und zu prüfen, ob auch unter diesen Bedingungen die vermuteten Anstiege der NAD(P)H-Autofluoreszenz ausbleiben.

3.5.3.5. Beteiligung von NO abhängigen Prozessen an den Schadenskaskaden während eines epileptischen Anfalls

Die Untersuchungen werden an Hirnschnittkulturen der normalen Maus sowie an n-NOS-, i-NOS- und e-NOS- defizienten Tieren durchgeführt. Drei Farbstoffe werden verwendet (Vorbehandlung mit DAQ, DAF bzw. FNOCTs).

Exp. I: Wird während repetitiver elektrischer Reizung bzw. epileptischer Aktivität (4-AP im Vergleich zu Niedrig-Mg) vermehrt NO gebildet? Messungen mit Photomultiplier bzw. 2-Photonen-konfokaler Mikroskopie. Kontrollen mit Paraquat und Menadione sowie MAO-Hemmern und Hemmern der Xanthinoxidase (Allopurinol). Wenn notwendig, Kontrollmessungen in Kooperation mit Tilman Grune.

Exp. II: Wird während repetitiver elektrischer Reizung bzw. epileptischer Aktivität (4-AP im Vergleich zu Niedrig-Mg) vermehrt Peroxinitrit gebildet? Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF. Kontrollen mit Tocopherol bzw. Heraufreglung von Glutathion durch Cystinapplikation und mit NO Synthesehemmern.

Exp. III: Welche Auswirkungen haben NO-Synthesehemmer (z.B. L-NAME, L-NA, ONO-1714 7-Nitroindazole und S-Methylisothiurea) auf reizinduzierte und krampfinduzierte NO-Signale, und wie verhalten sich die Signale in den KO Tieren?

Exp. IV: Wie wirkt sich die Reduktion der NO- bzw. ONOO-Bildung auf krampfinduzierte Schäden aus? Untersuchung mit Propidiumjodid nach 2 Std. SE in Hirnschnittkulturen normaler und verschiedener NOS-defizienter Tiere sowie bei Einsatz von NOS-Inhibitoren.

3.5.3.6 Beteiligung von astroglialen "Two Pore Domain"-Kalium-Kanälen an der K⁺ Regulation und ihren Störungen

Exp. I: Ermittlung der beteiligten "Two Pore Domain"-K⁺-Kanäle (Kandidaten KCNK) durch pharmakologisches Screening. Die Wirkungen verschiedener Antagonisten und Agonisten der "Two-Pore-Domain"-K⁺-Kanäle auf K⁺-Signale in der CA1 und der Area dentata sollen an normalen Kontroll-Ratten untersucht werden. Die K⁺-Signale werden in Gegenwart von TTX, 2APV und CNQX iontophoretisch induziert und extrazellulär gemessen. Eine Blockade der beteiligten glialen K⁺-Kanäle sollte zur Vergrößerung, ihre Aktivierung zur Verkleinerung der iontophoretisch induzierten Signale führen.

Getestet werden die Effekte der Antagonisten Bupivacain (TASK-1), Gadolinum (TRAAK und TREK-1), Quinin (TWIK-1), Quinidin (TREK-2 und TWIK-1) und der Agonisten Arachidonsäure, Docosahexaenoat und Lysophospholipid (aktivieren THIK-1, TRAAK, TREK-1 und 2). Die Substanzen Halothan (hemmt THIK-1, stimuliert TRAAK, TREK-1) Chloroform (stimuliert TREK-1), Riluzol (stimuliert TRAAK) und Phorboläther (stimulieren TWIK, hemmen TREK-1) könnten nach geeigneter Vorbehandlung zur Differenzierung eingesetzt werden.

Exp. II: Welche spezifischen Wirkungen haben die im Experiment I ermittelten effektiven Substanzen auf das Membranverhalten von Astrozyten und Neuronen? Untersuchungen mittels intrazellulärer Messtechniken.

Exp. III: Welche Kandidaten-KCNK sind im epileptischen Gewebe herunterreguliert? Untersuchung der Effekte wirksamer Substanzen auf iontophoretisch induzierte Signale in Area CA1 und Gyrus dentatus von Patienten mit AHS und nAHS-TLE sowie von GFAP-GFP Mäusen mit und ohne Pilocarpin-induzierter TLE. Testung der Effekte auf das Membranverhalten von Neuronen und Gliazellen.

Exp. IV: Identifizierung der Kandidaten-KNCK: Färbung mit Antikörpern an humanem und Mäuse-Gewebe. Isolierung von Astrozyten durch Facs-Sorting und RT-PCR-Bestimmung der vorhandenen KCNK-Untereinheiten (in Kooperation mit Frank. Kirchhoff in Göttingen sowie Christian Steinhäuser in Bonn).

Exp. V: Bedeutung der Kandidaten-KCNK für die Entstehung und Ausbreitung epileptiformer Aktivität: Induzieren KCNK-Hemmer epileptische Aktivität und können KCNK-Aktivatoren epileptiforme Aktivität hemmen? Untersuchungen an transversalen EC-Hippokampuschnitten mit Niedrig-Mg-induzierter und 4AP induzierter epileptischer Aktivität. Registrierung der $[K^+]_o$ und des FP.

Exp. VI: Bleiben die Effekte von KCNK-Hemmern an Fluoracetat- bzw. Fluorocitrat-behandelten Hirnschnitten auf iontophoretische Kaliumsignale bestehen?

3.5.3.7 Ist im chronischen epileptischen Gewebe die Funktion von Glutamattransportern verändert?

Veränderte Glutamattransporteigenschaften an Astrozyten könnten Auswirkungen auf synaptische Potentiale, Glutathiongehalt von Nerven- und Gliazellen und präsynaptische Freisetzung von Glutamat haben.

Exp. I: Zunächst soll die Effizienz des Glutaminexports aus Astrozyten untersucht werden. Die Arbeitsgruppe von Herrn Richter in Göttingen hat gezeigt, daß in Gegenwart von Glia-Toxinen EPSPs nicht mehr ausgelöst werden können, aber nach Supplementierung mit Glutamin wieder auftreten. Wir messen die Zeit, die vom Beginn der Behandlung mit Fluoracetat bis zum Verschwinden der EPSP's bzw. EPSC's vergeht, und die Zeit, die erforderlich ist, um die EPSPs durch Glutaminperfusion wieder herzustellen. Diese Messungen sind an chronisch-epileptischen Gewebe des Menschen und der Ratte geplant. Verwendet werden soll zunächst hippocampales Gewebe von gekindelten und SSSE behandelten Tieren.

Exp. II: Na-abhängiger Glutamattransport.

Exp IIa: Welche Auswirkungen hat TBOA in Gegenwart und Abwesenheit von MCPG, einem Antagonisten verschiedener, teil präsynaptisch lokalisierter, metabotroper Glutamatrezeptoren, auf EPSPs und reizinduzierte Kaliumsignale in normalen Hirnschnittpräparaten der Ratte, in SSSE-behandelten Ratten und in nAHS- und AHS-Gewebe des Menschen. Untersucht werden EPSPs an Körnerzellen und CA1 Pyramidenzellen.

Exp. IIb: Messung von Glutamat-Uptake-Strömen an akut isolierten GFP-positiven Astrozyten der Pilo-Maus und von Kontrolltieren. Untersuchung des humanen Gewebes sowie der Mäusepräparate mit Antikörpern gegen EAATs.

Exp III: Glutamat-Cystin-Antiporter. Es soll der Versuch gemacht werden, durch Cystin den Glutathiongehalt der Hirnschnitte hochzuregulieren bzw. durch Alpha-Aminoadipat herabzuregulieren. Messparameter ist die Monochlorobiman-Fluoreszenz. Diese Versuche sollen an Hirnschnittpräparaten des Menschen und an Hirnschnittpräparaten von SSSE-Ratten und Kontrolltieren durchgeführt werden.

3.5.3.8 Auswirkungen gestörter Kaliumregulation auf die Anfallsbereitschaft in chronisch epileptischem Gewebe.

Exp I: Untersuchungen an humanem AHS- und nAHS-Gewebe sowie an Pilokarpin-GFAP-GFP-Mäusen. Registrierung von FP und [K+]o in der Area CA1 und der Area Dentata. Bestimmung der Anfallsbereitschaft nach Applikation von Barium, Hoch-Kalium und der in den Experimenten 3.5.3.6 gefundenen relevanten KCNK-Antagonisten.

Exp. II: Können epileptische Entladungen in AHS- und nAHS-Gewebe durch KCNK-Agonisten unterbrochen werden.

3.5.4 Zeitplan:

Die Experimente zu den Schädigungsprozessen während epileptischer Aktivität an Hirnschnittkulturen werden parallel zu den Messungen glialer Eigenschaften betrieben. In die Experimente an organotypischen Kulturen wird ein Student des Graduiertenkollegs – vorbehaltlich der Verlängerung des Antrages - eingebunden.

3.5.5. Die Versuchsgenehmigungen für die Epilepsiemodelle der Ratte (Temporallappen-Epilepsie nach Status epilepticus durch chronische Reizung bzw. Pilokarpin-Gabe) liegen vor. Die Untersuchungen an den humanen Hirnschnitten sind durch die Ethikkommission der Charité genehmigt. Sie werden nur mit Zustimmung der Patienten durchgeführt.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Notwendige Ergänzungsuntersuchungen zur Bildung freier Radikale und der Spezifität der verwendeten Farbstoffe werden mit Tilman Grune durchgeführt. Beziehungen gibt es zum Projekt von Claudia Eder, die bildgebende Messungen an Mikrogliazellen durchführt. Das Projekt Dreier/Einhäupl wird in meinem Labor einen Messplatz für Messungen an humanen Hirnschnittpräparaten einrichten und bezüglich der Nutzung bildgebender Verfahren (intrinsisch optische Signale, ionenselektive Mikroelektroden) von uns mit betreut werden. Ulrich Dirnagl stellt uns die transgenen Tiere mit Defekten in der NO-Synthese zur Verfügung und hilft uns bei der Etablierung der Vanadium-Acid-Fuchsin-Färbung. Hrissanthi Ikonomido wird uns bei der Etablierung der Tunnel-Methode in unserem Labor unterstützen. Von Helmut Kettenmann erhalten wir die GFAP-GFP-Mäuse. Herr von Deimling hat uns für einzelne Kontrolluntersuchungen autoptisches Kontrollmaterial zur Verfügung gestellt und berät uns ebenso wie Herr Brück bei der Durchführung histologischer Untersuchungen. Mit Herrn Ullrich ist ein Gedankenaustausch verabredet.

3.7 Nationale Kooperation mit Frank Kirchhoff, Göttingen, und Christian Steinhäuser, Bonn.

3.8 Internationale Kooperation mit Dr. E.A. Cavalheiro und Dr. E.R. G. Sanabria, Neurologia Experimental, UNIFESP-EPM, Sao Paulo, Brazil

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	An z.	Betrag DM	Verg.- Gr.	An z.	Betrag DM	Verg.- Gr.	An z.	Betrag DM	Verg.- Gr.	An z.	Betrag DM
		Ib	1	106 800	Ib	1	106 800	Ib	1	106 800	Ib	1
	IIa/2	1	42 000									
				VIb	1	54 000	VIb	1	54 000	VIb	1	54 000
				StHk	1	18 000	StHk	1	18 000	StHk	1	18 000
	zus.:	2	148 800	zus.:	3	178 800	zus.:	3	178 800	zus.:	3	178 800
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM			
				515	48 200	522	25 000	522	25 000			
				522	25 000	522	5 990	522	5 990			
				522	5 990							
I				Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.				

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾ (einschl. Hilfskräfte)	Prof. Dr. U. Heinemann Dr. O. Kann	Neurophysiologie Neurophysiologie	J. Müller Inst. Physiologie J. Müller Inst. Physiologie	10 20	1995	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾	K. Schulze		J. Müller Inst. Physiologie			
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾²⁾ (einschl. Hilfskräfte)	Dr. S. Gabriel NN (X)	Neurophysiologie Neurophysiologie	J. Müller Inst. Physiologie J. Müller Inst. Physiologie	40 20		
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾	NN (X)		J. Müller Inst. Physiologie	20		

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung:

Prof. Dr. med. Uwe Heinemann leitet das Projekt, berät bei der Experimentierplanung und der Datenanalyse und ist an der Abfassung der Manuskripte beteiligt.

Dr. Oliver Kann übernimmt einen Teil der bildgebenden Messungen und betreut in diesem Zusammenhang Medizinstudenten, die sich an den Experimenten beteiligen. Er ist stark an der Experimentierplanung für die organotypischen Kulturen beteiligt, übernimmt die Auswertungen und beteiligt sich an der Anfertigung von Manuskripten. Er übernimmt auch die Messungen am 2-Photonen-konfokalen Mikroskop.

3.7.1.2. Technische Mitarbeiter der Grundausrüstung:

Frau K. Schulze steht dem Projekt halbtags zur Verfügung. Sie implantiert die Tiere für SSSE-Experimente und Kindling-Experimente, induziert Pilocarpin-Statnen, betreut die Tiere postoperativ, wertet zusammen mit studentischen HK die spontan auftretenden Krampfanfälle aus und unterstützt O. Kann bei der Herstellung organotypischer Hirnschnittkulturen.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausrüstung

Personal der Ergänzungsausrüstung:

3.7.1.3.1 Dr. med. S. Gabriel BAT Ib-O

Frau Dr. Gabriel übernimmt die Betreuung der Experimente zu veränderten Funktionen der Gliazellen. Sie organisiert den Ablauf der Experimente an humanem Gewebe, bei denen das Gewebe meist auf drei verschiedene Messplätze verteilt wird und steht beteiligten Medizinstudenten bei den Untersuchungen, die meist gegen 20 Uhr beginnen, hilfreich zur Seite. Sie übernimmt die Auswertung aller Experimente, und beteiligt sich an der Erstellung der Publikationen. Sie übernimmt auch die Analyse veränderter Gliafunktionen bei den tierexperimentellen Untersuchungen. Sie organisiert weiter die Dokumentation der Patientendaten, des OP-Verlaufs und der verschiedenen, an den Präparaten erhobenen Befunden. Sie übernimmt die Interaktion mit den Tierschutzbehörden und dem Tierstall.

Sie betreut die beantragte technische Mitarbeiterin. Frau Dr. Gabriel ist in alle geplanten Untersuchungstechniken voll eingearbeitet, beherrscht extra- und intrazelluläre Messtechniken an Interfacekammern und dem Infrarotvideo-Fluoreszenzmessplatz für Messungen an identifizierten Neuronen und Gliazellen. Sie arbeitet sehr gewissenhaft, sehr systematisch und gründlich.

Frau Dr. Gabriel hat einen unbefristeten Vertrag nach BAT Ost, der so lange gilt, solange dieses Drittmittelprojekt durch die DFG gefördert wird. Da sie bereits seit 1969 am Institut tätig ist, steht ihr tarifrechtlich eine BAT Ib Stelle zu.

3.7.1.3.2. NN Eine studentische Hilfskraftstelle mit 20 Std. pro Woche. (Medizinstudenten im 3. Studienjahr, Naturwissenschaftler nach Vordiplom) Die außerordentlich aufwendigen und zeitaufwendigen Messungen erfordern – wo möglich – die gleichzeitige Bearbeitung verschiedener Fragestellungen an Hirnschnittpräparaten aus einem Tier oder von einem Patienten. Die vorgeschlagenen Messungen sind dazu geeignet, Medizinstudenten bereits während des Studiums an die Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellungen heranzuführen. Die einfacheren Screening-Untersuchungen sind dazu geeignet, die Studenten auch auf aufwendige Untersuchungstechniken vorzubereiten. Die studentische Hilfskraft soll für durchschnittlich ein Jahr im Projekt beschäftigt werden und kann bei entsprechenden Voraussetzungen anschließend eine anspruchsvolle Promotionsarbeit aufnehmen.

3.7.1.4. NN BAT VIb/2 halbe Stelle.

Die beantragte Person soll Frau Schulze bei der Betreuung der chronisch epileptischen Tiere und der Herstellung der Schnittkulturen unterstützen. Sie soll ionenselektive Mikroelektroden für die geplanten Untersuchungen herstellen, kalibrieren und chlorierte Silberdrähte, Reizelektroden und die AgCl-Pellets fabrizieren. Sie soll die Ionen-sensitiven Mikroelektroden mit Iontophorese- bzw.

Druckapplikationspipetten zusammenfügen. Sie wird Nährlösungen bereitstellen. Ihre Hauptaufgabe wird aber in der Durchführung der histologischen Arbeiten liegen. Da in meiner Arbeitsgruppe in den letzten drei Jahren zwei Überhangpositionen und weitere 4 TA Stellen abgebaut werden mussten, stehen mir für die aufwendigen Untersuchungen meines Labors mit den unabhängigen Arbeitsgruppen von Frau PD Dr. Manahan Vaughan, Herrn PD Dr. Andreas Draguhn, Herrn PD Dr. Wolfgang Müller, Herrn PD Dr. Volker Schmieden und meiner engeren Arbeitsgruppe nur noch 2,5 TA Stellen und eine Sekretärin zur Verfügung. Frau Latta arbeitet hauptsächlich für Frau Dr. Eder und stellt darüber hinaus dissoziierte Hippokampuskulturen für Projekte von Herrn Müller und Herrn Draguhn her. Frau Piechotta betreut die Projekte von Andreas Draguhn und unterstützt Herrn PD Dr. Schmieden bei molekularbiologischen Untersuchungen. Frau Schulze ist mit der Präparation der Tiere und der Überwachung der Videoanlage etc. vollständig ausgelastet.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	7000	7000	7000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausstattung	79190	30990	30990

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur **Ergänzungsausstattung** der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Kennziffer 515 Kleingeräte bis 20 TDM brutto für Haushaltsjahr 2002

1. Infrarotkamera Kappa, Videorecorder,
mit Standbildfunktion, Monitor und Framegrabbercard 10.700.-- DM

Die Einrichtung soll dazu dienen, die Hirnschnittpräparate des Menschen und der Tiere an einem Messplatz zu dokumentieren und für Abbildungen zur Verfügung zu stellen. Bei Untersuchungen zur epileptischen Aktivität dient die Einrichtung dazu, anhand intrinsischer Signale die Ausbreitung der konvulsiven Aktivität zu erfassen.

2. Manipulatorenteile und ein Piezo-Stepper (Physikinstrumente) 8.500.—DM

Die Teile werden zur Herstellung eines Präzisionsmanipulators benötigt. Am eingesetzten Mikroskop ist ein hydraulischer Narashigenmanipulator vorhanden, der für die Platzierung von Reizelektroden bzw. Substanzapplikationen benötigt wird. Der Manipulator soll für die Patch-registrierung von identifizierten Neuronen und Astrozyten verwendet werden.

3. 1 Filtersatz und ein 1.6 Objektiv für Zeiss Axioskop 4.000.-- DM

Der Filtersatz wird für die Darstellung der GFP-Fluoreszenz benötigt. Das 1.6 Objektiv für orientierende Übersichtsaufnahmen, Platzierung der Reiz- und Applikationselektroden etc.

4. Objektivwechsler, Schiefebeleuchtung und Gradientenkontrast. 7.000.—DM

Die Einrichtung soll an dem vorhandenen Axioskop angebracht werden und erlauben, die Elektroden auf identifizierte Zellen zu plazieren.

5. P-clamp-Interface mit Software 18.000.—DM
 Das beantragte Gerät soll der Erfassung elektrophysiologischer Daten in Voltageclamp-und Currentclamp-Messungen dienen und ein noch in Köln aus DFG Mitteln beschafftes Gerät ersetzen.

515 Kleingeräte Summe DM 48.200.--

Kennziffer 522 Verbrauchsmaterial jeweils für die Jahre 2002, 2003, 2004

1. Elektrodenmaterial (Silber- Platindrähte, Theta, Filamnetglas, Ionenaustauscher)	DM 1.000.--
2. El. Und mech. Bauteile (Reizisolatoren, Badheizg,	DM 2.900.--
3. Gase	DM 2.000.--
4. Pharmaka, Toxine	DM 6.100.--
5. Antikörper, Histologie, Farbstoffe	DM 6.900.--
6. Zellkulturmaterial	DM 6.100.--
Summe	DM 25.000.--

Die relativ hohen Mittel für Elektrodenmaterial kommen durch die hohen Kosten für ionenselektive Mikroelektroden zustande. Elektronische und mechanische Bauteile werden für die Herstellung einer Badheizung für das Axioskop, div. Kammern, Reperaturen von Verstärkern etc. benötigt. Für die Untersuchungen an organotypischen Hirnschnittkulturen werden Spezialabfüllungen mit verschiedenen O₂-Anteilen, N₂-Anteilen und 5 % CO₂ benötigt, die nicht vom Institut getragen werden können. Die verwendeten Pharmaka und Toxine sind teilweise sehr teuer. Die Messung der verschiedenen intrazellulären Signale erfordern teure Fluoreszenzindikatoren. Auch die Antikörper sind oft nicht preiswert zu haben. Für die organotypischen Kulturen wird 2x in der Woche präpariert und Medien, Zellkulturmaterial etc. erfordern die hohen Aufwendungen.

Tierbedarf pro Jahr

DM 5.990.40

180 Ratten im Alter von 8 Tagen aus Nachzucht (Schnittkulturen)	DM 900.--
180 Ratten adult aus Nachzucht (Kontroll- und Behandlung)	DM 900.--
60 GFAP-GFP Mäuse für Zellkultur und Status-Untersuchungen	DM 900.--
Haltungskosten für 8 Tage alte Ratten	DM 360.--
Haltungskosten für adulte Ratten	DM 2.520.--
Haltungskosten für chronisch epil. Ratten	DM 360.--
Haltungskosten für GFAP-GFP Mäuse	DM 50.40

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

entfällt

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C6

3.1.1 Thema:

Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone: Signalwege oxidativ modifizierter Lipide

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung:

Neurobiologie, Biochemie

3.1.3 Leiter/in:

Dr.med. Dr.rer.nat. Oliver Ullrich, geb. 09.07.1970
 AG Zell- und Neurobiologie
 Institut für Anatomie
 Medizinische Fakultät (Charité)
 Humboldt-Universität zu Berlin
 Philippstr. 12
 10115 Berlin

Telefon: 450-528245
 Telefax: 450-528902
 E-Mail: oliver.ullrich@charite.de

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

Ja, befristet bis zum 31.09.2003

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
2002	42,0	25,0	-	67,0
2003	42,0	25,0	-	67,0
2004	42,0	25,0	-	67,0

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Ein charakteristisches Merkmal der Frühphase eines neuronalen Schadens ist die Oxidation biologischer Makromoleküle. Die dabei entstehenden Oxidations- und Degradationsprodukte sind langlebig genug, um in geschädigten Neuronen zu akkumulieren und sind vermutlich wesentlich an der Vermittlung der intrazellulären Toxizität freier Sauerstoffradikale beteiligt. Während nun geschädigte zytosolische und nukleäre Proteine einem selektiven und effektiven intrazellulären Abbau zugeführt werden können und die Zellgrenzen üblicherweise erst bei schweren Membranschäden oder dem Zelltod verlassen, unterliegen die Membranlipide nicht nur einer Vielzahl oxidativer Modifikationen, sondern auch einem hohen Turnover mit dem Extrazellularraum, z.B. im Rahmen der Wiederaufnahme von Membranlipiden aus geschädigten Neuronen bei axonalem Wachstum oder Regeneration. Dadurch entsteht das grundsätzliche Problem, daß aufgrund einer neuronalen Zellschädigung entstandene oxidativ modifizierte Lipide wieder in regenerierende Neurone eingeschleust werden können und dort eine toxische Wirkung entfalten könnten. Wahrscheinlich kommt der aktivierten Mikroglia dabei eine zentrale Funktion in der Aufnahme und Entgiftung der neurotoxischen Lipidoxidationsprodukte zu, wobei sie selbst toxische Produkte wie Zytokine oder freie Sauerstoffradikale freisetzt. In diesem Projekt soll daher im ersten Schritt untersucht werden, welche oxidativ modifizierten Lipide in welchem Umfang als extrazelluläres "Signal" der exzitotoxischen Schädigung von vitalen Neuronen sowohl in der Primärkultur als auch in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur freigesetzt werden und welche davon in der Lage sind, eine mikrogliale Aktivierung zu induzieren. In einem zweiten Schritt soll anhand von primären Mikrogliazellkulturen untersucht werden, welche intrazellulären mikroglialen Signalwege dabei aktiviert werden, wobei die durch Cholesteroxidations- und Lipidperoxidationsprodukte ausgelösten spezifischen Signalwege von unspezifischen redoxsensitiven Signalwegen unterschieden werden. Die Beteiligung dieser Signalwege für Neuroprotektion oder Neurodegeneration soll in einem dritten Schritt durch Suprakultivierung stabiler anti-sense-Transfektanten einer Mikroglia-Zelllinie im organotypischen Gewebeverband untersucht werden. Das Projekt soll somit durch die Untersuchung der Bedeutung oxidativ modifizierter Lipide am Crosstalk zwischen geschädigten Neuronen und Mikroglia zum besseren Verständnis der Interaktion von nichtneuronalen und neuronalen Zellen bei Neurodegeneration und -regeneration beitragen.

3.3 Stand der Forschung

Ein wesentlicher Bestandteil der Frühphase eines neuronalen Schadens ist die Oxidation neuronaler Makromoleküle (Calingasan et al., 1999; Yoshino et al., 1997; van der Veen et al., 1997). So bewirken Agonisten an ionotropen Glutamatrezeptoren wie NMDA, Kainat oder AMPA eine konsekutive massive intraneuronale Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen (Kucukaya et al., 1996; Mattson et al., 1995; Bondy et al., 1993), wobei eine Ca^{2+} -abhängige Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette (Dugan et al., 1995) und ein Transpeptidase-induzierter Glutathion-Efflux (Wallin et al., 1999) als Ursache diskutiert werden. Die dabei freigesetzten Sauerstoffradikale sind hochreaktiv und kurzlebig und reagieren sofort mit intrazellulären Molekülen wie Proteinen, Lipiden und DNA. Die dabei entstehenden Oxidations- und Degradations-endprodukte sind teilweise langlebig genug, um unter den Bedingungen eines neuronalen Primärschadens zu akkumulieren, und wahrscheinlich ursächlich für die letztendliche Toxizität freier Sauerstoffradikale (Keller et al., 1998; Esterbauer et al., 1991).

Während nun geschädigte zytosolische und nukleäre Proteine einem selektiven und effektiven intrazellulären Abbau durch das Proteasom-System zugeführt werden (Grune et al., 1997; Ullrich et al., 1999) und die Zellgrenzen üblicherweise erst bei schweren Membranschäden oder dem Zelltod verlassen, unterliegen die Membranlipide nicht nur einer Vielzahl oxidativer Modifikationen (Esterbauer et al., 1991), sondern auch einem hohen Turnover mit dem Extrazellularraum (Pitas et al., 1987; Posse de Chavres et al., 2000). So wird beispielsweise angenommen, daß wachsende oder regenerierende Axone das zur Expansion der axonalen Membran notwendige Cholesterol neben der de-novo-Synthese in Nervenzellsomata auch zum großen Teil aus extrazellulären Lipoproteinen beziehen, die aus degenerierenden Axonen oder Myelin entstanden sind (Posse de Chavres et al., 2000; Mahley, 1988). Dadurch entsteht das grundsätzliche Problem, daß aufgrund einer neuronalen Zellschädigung entstandene oxidativ modifizierte Lipide wieder in regenerierende Neurone eingeschleust werden und dort eine

toxische Wirkung entfalten könnten. Bisher ist über die Art und Quantität der nach exzitotoxischer Schädigung freigesetzten Lipidoxidationsprodukte so gut wie nichts bekannt.

So ist z.B. das Cholesterol als ein quantitativ bedeutender Membranbestandteil auf der einen Seite sehr oxidationsempfindlich (Sevanian et al., 1994), während die dabei entstehenden Cholesteroloxidationsprodukte auf der anderen Seite eine ausgeprägte Neurotoxizität aufweisen (Kölsch et al., 1999; Chang et al., 1998a, 1998b, 1998c, 1998d, 1998e, 1997). Weiterhin gibt es Hinweise, daß die spezifische Oxidation von Cholesterol zu 24-Hydroxycholesterol von Enzymen der Cytochrom P-450-Familie in Neuronen einen wesentlichen Stoffwechselweg zur Ausschleusung von Cholesterol aus dem ZNS darstellt (Bjorkhem et al., 1998; Lund et al., 1999). Gleichzeitig erwies sich auch dieses Cholesteroloxidationsprodukt als ausgesprochen neurotoxisch (Kölsch et al., 1999). Daher ist von einer hohen Produktion spezifischer Cholesteroloxidationsprodukte sowohl unter physiologischen, als auch unter Schädigungsbedingungen auszugehen, wobei sich diese hinsichtlich des Produktspektrums und der Quantität deutlich unterscheiden können.

Weitere potentiell neurotoxische Lipidoxidationsprodukte gehören zu der Gruppe der aldehydischen Lipidperoxidationsprodukte, die einerseits durch radikalische Kettenreaktionen in großer Menge in oxidierten Membranen entstehen und andererseits stabil genug sind, um dort zu akkumulieren. Diese aldehydischen Lipidperoxidationsprodukte, darunter das gut charakterisierte 4-Hydroxynonenal als Hauptprodukt, sind neurotoxisch (Ito et al., 1999; Camandola et al., 2000; Keller et al., 1999; Springer et al., 1997) und können darüber hinaus mit Membranproteinen oder Apolipoproteinen zu stabilen neurotoxischen kovalenten Addukten reagieren (Reagan et al., 2000; Malecki et al., 2000; Vieira et al., 2000). So besteht dabei die direkte Gefahr, daß diese toxische Lipidoxidationsprodukte im Rahmen eines axonalen Regenerations- oder Wachstumsprozesses neuronal wiederaufgenommen werden und das wachsende Neuron schwer schädigen oder töten. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, daß die Aufnahme von oxidativ geschädigten High-Density-Lipoproteinen (HDL) in primären Neuronen zum Zelltod führt (Keller et al., 2000; Kivatiniz et al., 1999). Daher muß ein System existieren, das in der Lage ist, die neurotoxischen Produkte der oxidativen Modifikation von Lipiden zu erkennen und aus dem Kreislauf der Membranlipide des ZNS zu entfernen.

Während gut beschrieben ist, daß Makrophagen über ihre scavenger-Rezeptoren in der Lage sind, neben nativen auch oxidierte Lipoproteine zu erkennen und aufzunehmen, so daß sich intrazellulär eindeutig entsprechende Cholesterol- und Lipidperoxidationsprodukte nachweisen lassen (Maor et al., 2000), gibt es ebenfalls deutliche Hinweise, daß dies auch in den funktionell vergleichbaren Mikrogliazellen der Fall ist (Bell et al., 1994; Christie et al., 1996; Pitas et al., 1987). Darüber hinaus wirken oxidierte Lipoproteine in dem für Neurone toxischen Konzentrationen auf Mikrogliazellen oder Astrozyten nicht toxisch (Keller et al., 2000). So kann vermutet werden, dass der aktivierten Mikroglia eine zentrale Funktion in der Aufnahme und Entgiftung der neurotoxischen Lipidoxidationsprodukte zukommt, wobei sie selbst anscheinend gut gegen diese Toxizität geschützt ist. Der besondere Schutz von Mikrogliazellen gegenüber Oxidantien-induziertem Streß wurde schon früher (Noack et al., 1998) und in eigenen Vorarbeiten beschrieben (Ullrich et al., 1999, 2001). Daher ist es von Interesse, ob und auf welchem Wege neurotoxische Lipidoxidationsprodukte protektive Signalwege in Mikrogliazellen induzieren.

Die Mikrogliaaktivierung ist ein charakteristisches Merkmal der Frühphase des neuronalen Schadens und geht mit spezifischen morphologischen, immunphänotypischen und funktionellen Veränderungen einher (Kreutzberg, 1996). Zu den spezifischen intrazellulären Signalen, die zu einer Aktivierung der Mikrogliazelle führen, gehören zytosolisch die an den IL-15-Rezeptor-gekoppelte JAK-Aktivität (Hanisch et al., 1997) und weitere Serin/Threonin-Kinasen und-Phosphatasen (Lockhart et al., 1998), nukleär das CREB-Protein (Herdegen et al., 1992), NF- κ B (Lockhart et al., 1998) und Corticoid-Rezeptoren (Drew et al., 2000). Über die intrazelluläre Wirkung von oxidativ modifizierten Lipiden in Mikrogliazellen ist bisher so gut wie nichts bekannt. Untersuchungen an anderen Zelltypen, vor allem außerhalb des ZNS, beschreiben eine Phosphorylierung von JNK und p38-MAPK durch 4-Hydroxynonenal (Uchida et al., 1999), eine Hemmung der I κ B-Phosphorylierung (Page et al., 1999), eine erhöhte DNA-Bindung von AP-1 (Camandola et al., 2000; Uchida et al., 1999) und CREB (Ito et al., 1999). Über die intrazellulären Signalwege von Cholesteroloxiden ist noch so gut wie nichts bekannt, ein vor kurzem beschriebener und in CHO-Zellen funktionell charakterisierter Oxysterol-Rezeptor (Ridgway et al., 1998) ist im Zytosol und Golgi-Kompartiment lokalisiert und reguliert die HMG-CoA-Expression und Sphingomyelin-Synthese (Lagace et al., 1999). Erkenntnisse über die dabei beteiligte

Transkriptionsfaktoren gibt es noch nicht, ebenso gibt es bisher keinerlei Untersuchungen über die Signalwege von 4-Hydroxynonenal und Cholesteroloxiden in Mikrogliazellen.

Aktiviert Mikrogliazellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen (z.B. IL-1, TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-10) mit proinflammatorischen, zytotoxischen oder protektiven Funktionen, setzen aber auch große Mengen freier Sauerstoffradikale und exzitatorischer Aminosäuren frei, die neurotoxisch wirken (Banati et al., 1993). Diese Produkte wirken ihrerseits auch wieder aktivierend auf Mikrogliazellen (Takeda et al., 1998), so daß die Gefahr eines circulus vitiosus im Sinne einer nun pathologischen Mikrogliazellaktivierung besteht. Diese duale Funktion der Mikroglia wird in der Literatur intensiv diskutiert, da aktivierte Mikrogliazellen dadurch selbst zur Ursache eines neuronalen (Sekundär-)schadens werden können (Gebicke-Haerter et al., 1996; Heppner et al., 1998) und diese anhaltende Mikrogliaaktivierung ein wesentliches Merkmal vieler neurodegenerativer und neuroinflammatorischer Krankheiten darstellt (Gebicke-Haerter et al., 1996). Daher ist es von grundsätzlichem Interesse, ob ein Mikroglia-aktivierender Signalweg, insbesondere infolge einer Mediation durch primär geschädigte Neurone, zu einer eher neuroprotektiven oder neurodegenerativen Reaktion im Gewebeverband führt.

Die Kenntnis der Regulation der intrazellulären mikroglialen Signalwege in Folge eines aktivierenden Stimulus ist daher auch von klinischer Relevanz, da dadurch eine gezielte und differenzierte pharmakologische Intervention möglich werden könnte, die zwar die protektiven Fähigkeiten der Mikroglia (z.B. die Aufnahme neurotoxischer Degenerationsprodukte) erhält, aber auf der anderen Seite beispielsweise eine überschießende neurotoxische Aktivierung verhindern könnte.

Zitierte Literatur

- Alexander L, Lee H, Rosenzweig M, Jung JU, Desrosiers RC. EGFP-containing vector system that facilitates stable and transient expression assays. *Biotechniques* 23(1997): 64-66
- Bell MD, Lopez-Gonzales R, Lawson L, Hughes D, Frasier I, Gordon S, Perry VH. Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J. neurocytol.* 23 (1994): 605-613
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7 (1993): 111-118
- Bjorkhem I, Lutjohann D, Diczfalusy U, Stahl L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* 39 (1998): 1594-1600
- Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 31 (1992): 616-621
- Bondy SC, Lee DK. Oxidative Stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* 610 (1993): 229-233
- Calingasan NY, Chun WJ, Park LC, Uchida K, Gibson GE. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58 (1999): 946-958
- Camandola S, Poli G, Mattson MP. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J. Neurochem.* 74 (2000): 159-168
- Chang JY, Chavis JA, Liu LZ, Drew PD. Cholesterol oxides induce programmed cell death in microglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (1998a): 817-821
- Chang JY, Liu LZ. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Int.* 32 (1998b): 317-323
- Chang JY, Phelan KD, Chavis JA. Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on sympathetic neurons. *Brain Res. Bull.* 45 (1998c): 615-622
- Chang JY, Phelan KD, Liu LZ. Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on NGF-differentiated PC12 cells. *Neurochem. Res.* 23 (1998d): 7-16
- Chang JY, Liu LZ. Toxicity of cholesterol oxides on cultured neuroretinal cells. *Curr. Eye Res.* 17 (1998e): 95-103
- Chang JY, Liu LZ. 25-Hydroxycholesterol causes death but does not prevent nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 31 (1997): 517-523
- 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 (1996): 399-403

- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262 (1993): 689-695
- Czapiga M, Colton CA. Function of microglia in organotypic slice cultures. *J. Neurosci. Res.* 56(6) (1999): 644-651
- Drew PD, Chavis JA. Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Res. Bull.* 52 (2000): 391-396
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rithman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15 (1995): 6377-6388
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992): 341-390
- Esterbauer H, Zollner H, Lang J. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991): 81-128
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.* 186 (1990): 407-421
- Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B. Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 45 (1995): 143-164
- Gebicke-Haerter PJ, van Calker D, Norenberg W, Illes P. Molecular mechanisms of microglial activation. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 29 (1996): 1-12
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11 (1997): 526-534
- Hanisch UK, Lyons S, Nolte C, Prinz M, Weber J, Kettenmann H, Kirchhoff F. Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272 (1997): 28853-28860
- Heppner F, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R. Activated microglial cells migrate towards site of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998): 3284-3290
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP. Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* 22 (1998): 180-188
- Herdegen T, Fiallos Estrada C, Schmid W, Bravo R, Zimmermann M. The transcription factor CREB, but not immediate-early gene encoded proteins, is expressed in activated microglia of lumbar spinal cord following sciatic nerve transection in the rat. *Neurosci. Lett.* 142 (1992): 57-61
- Ito Y, Arakawa M, Ishige K, Fukuda H. Comparative study of survival signal withdrawal and 4-hydroxynonenal-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neurosci. Res.* 35 (1999): 321-327
- Keller JN, Hanni KB, Kindy MS. Oxidized high-density lipoprotein induces neuron death. *Exp. Neurol.* 161(2) (2000): 621-630
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. 4-Hydroxynonenal increases neuronal susceptibility to oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* 58 (1999): 823-830
- Keller JN, Mattson MP. Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction, and death in the nervous system. *Rev. Neurosci.* 9 (1998), 105-116
- Kivatiniz SC, Pelsman MA, Alonso AC, Bagatolli L, Quiroga S. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *J. Neurochem.* 69 (1999): 2601-2609
- Kolsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao ML. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 818(1) (1999): 171-175
- Kopec KK, Carroll RT. Phagocytosis is regulated by nitric oxide in murine microglia. *Nitric Oxide* 4(2) (2000): 103-111
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *TINS* 19(8) (1996): 312-318
- Kucukkaya B, Haklar G, Yalcin AS. NMDA excitotoxicity and free radical generation in rat brain homogenates: application of a chemoluminescence assay. *Neurochem. Res.* 21 (1996): 1535-1538
- Lagace TA, Byers DM, Cook HW, Ridgway ND. Chinese hamster ovary cells overexpressing the oxysterol binding protein (OSBP) display enhanced synthesis of sphingomyelin in response to 25-hydroxycholesterol. *J. Lipid. Res.* 40 (1999): 199-116
- Lindenau J, Noack H, Asayama K., Wolf G. Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24 (1998): 252-256

- Liu H, Jan M, Chou C, Chen P, Ke N. Is green fluorescent protein toxic to the living cells ? *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 260 (1999): 712-717
- Lockhart BP, Cressey KC, Lepagnol JM. Suppression of nitric oxide formation by tyrosine kinase inhibitors in murine N9 microglia. *Br. J. Pharmacol.* 123 (1998): 879-889
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999): 7238-7243
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240 (1988): 622-630
- Malecki A, Garrido R, Mattson MP, Hennig B, Toborek M. 4-Hydroxynonenal induces oxidative stress and death of cultured spinal cord neurons. *J. Neurochem.* 74 (2000): 2278-2287
- Maor I, Kaplan M, Hayek T, Vya J, Hoffman A, Aviram M. Oxidized monocyte-derived macrophages in aortic atherosclerotic lesion from apolipoprotein E-deficient mice and from human carotid artery contain lipid peroxides and oxysterols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000): 775-780
- Mattson MP, Barger SW, Begley JG, Mark RJ. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol.* 46 (1995): 187-216
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374 (1995): 647-650
- Mohan PF, Ard MD. Induction of microglial nitric oxide synthesis by very low density lipoprotein. *Glia* 17(3) (1996): 259-262
- Nakajima H, Ishikawa M, Ohkuma K, Kakui N, Hiranuma T, Ohsawa F, Hoshiko S. The automodified poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) is essential for lipopolysaccharide (LPS)-induced glial activation. 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA (2000)
- Newcombe J, Li H, Cuzner ML. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20(2) (1994): 152-162
- Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayama K, Wolf G. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitrenergic stress. *Glia* 23 (1998): 285-297
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SG, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* 262 (1987): 14352-14360
- Reagan LP, Magarinos AM, Yee DK, Swzeda LI, Van Bueren A, McCall AL, McEwen BS. Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Res.* 862 (2000): 292-300
- Ridgway ND, Lagace TA, Cook HW, Byers DM. Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and cholesterol transport on oxysterol-binding protein phosphorylation and Golgi localization.
- Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, Hayn N, Ziegler-Heitbrock HW, Neumeier D, Brand K. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 11611-11618
- Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Selective modulation of BV-2 microglial activation by prostaglandin E(2). Differential effects on endotoxin-stimulated cytokine induction. *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 28823-28827
- Posse de Chaves EI, Vance DE, Campenot RB, Kiss RD, Vance JE. Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 275(26) (2000): 19883-19890
- Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356 (1992): 356-358
- Sevanian A, Seraglia R, Traldi P, Rossato P, Ursini F, Hodis H. Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* 17(5) (1994): 397-409
- Stojkovic T, Colin C, Le-Saux F, Jacque C. Specific pattern of nitric oxide synthase expression in glial cells after hippocampal injury. *Glia* 22(4) (1998): 329-337
- Springer JE, Azbill RD, Mark RJ, Begley JG, Waeg G, Mattson MP. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, rapidly accumulates following traumatic spinal cord injury and inhibits glutamate uptake. *J. Neurochem.* 68(6) (1997): 2469-2476
- Sudo S, Tanaka J, Toku K, Desaki J, Matsuda S, Arai T, Sakanaka M, Maeda N. Neurons induce the activation of microglial cells in vitro. *Exp. Neurol.* 154 (1998): 499-510

- Takeda H, Tomita M, Tanahashi N, Kobari M, Yokoyama M, Takao M, Ito D, Fukuuchi Y. Hydrogen peroxide enhances phagocytic activity of amoeboid microglia. *Neurosci. Lett.* 240 (1998): 5-8
- Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* 20 (1997): 23-37
- Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 2234-2242
- Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Hass R, Grune T. Poly-ADP-ribose-polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999): 6223-6228
- van der Veen RC, Hinton DR, Incardonna F, Hofman FM. Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. *J. Neuroimmunol.* 77 (1997): 1-7
- Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J.* 14 (2000): 532-542
- Wallin C, Weber SG, Sandberg M. Glutathion efflux induced by NMDA and kainate: implications in neurotoxicity? *J. Neurochem.* 73 (1999): 1566-1572.
- Waeg G, Dimsity G, Esterbauer H. Monoclonal antibodies for detection of 4-hydroxynonenal modified proteins. *Free Radic. Res.* 25 (1996): 149-159
- Wang ZQ, Auer B, Stingl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M and Wagner EF. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes & Dev.* 9 (1995): 509-520
- Witting A, Muller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C. Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J. Neurochem.* 75 (2000): 1060-1070
- Yoshino H, Hattori N, Urabe T, Uchida K, Tanaka M, Mizuno Y. Postischemic accumulation of lipid peroxidation products in the brain: immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins. *Brain Res.* 767 (1997): 81-86

3.4 Eigene Vorarbeiten

Die bisherigen Forschungen des Antragstellers befassen sich mit den Mechanismen der zellulären Schädigung durch oxidative Reaktions- und Degradationsprodukte biologischer Makromoleküle im Rahmen inflammatorischer und degenerativer Erkrankungen und mit der Identifikation korrespondierender intrazellulärer protektiver Mechanismen.

Im Rahmen dieser Fragestellungen wurde anfangs ein mitochondrialer Stoffwechselweg aufgeklärt, der für die Detoxifizierung eines Hauptproduktes der Lipidperoxidation, des 4-Hydroxynonenals, verantwortlich ist [1]. In weiteren Studien konnte eine deutliche Hemmung und partielle Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette durch 4-Hydroxynonenal gezeigt werden, die bereits nach dem ersten Detoxifizierungsschritt nicht mehr nachgewiesen konnte [2]. Weitergehende Untersuchungen zu den durch 4-Hydroxynonenal ausgelösten zellulären Schädigungsmechanismen, vor allem im Kontext von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen am Modell von primären Synovialfibroblasten, erbrachten erstmals das Ergebnis einer deutlichen Hemmung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), eines wichtigen regulatorischen Kernproteins der DNA-Reparatur und epigenetischen Transkriptionsregulation, durch dieses endogene Lipiddegradationsprodukt [3]. Insofern kann auch der Metabolismus dieser Produkte als wichtiges antioxidatives Schutzsystem angesehen werden, dessen Beeinträchtigung durchaus klinisch relevante Folgen haben kann [4].

Der nächste Komplex der Untersuchungen fokussierte nun auf die biologischen Konsequenzen und zellulären Abwehrstrategien gegen ein weiteres stabiles Produkt der oxidativen Zellschädigung, die oxidativ geschädigten Proteine. In ausführlichen Untersuchungen zur Regulation des Abbaus oxidativ geschädigter Proteine [6-11, 13, 17], die durch Reaktion mit inflammatorisch freigesetzten Sauerstoffradikalen wie z.B. Hypochlorit [11] entstehen, konnte gezeigt werden, daß Zellen ein nukleäres proteolytisches System aufweisen, das in der Lage ist, oxidativ geschädigte Kernproteine, auch in Bindung an die DNA [8], zu erkennen und spezifisch abzubauen [8-9, 18] und dieses System als das 20S Proteasom identifiziert werden [9]. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, daß das bisherige Konzept

der Stabilität und des sehr langsamem endogenen Turnovers der Histonproteine nur für den wenig physiologischen Fall einer oxidativ völlig unbelasteten Zelle gilt und daß schon geringgradiger oxidativer Streß zu einem deutlich gesteigerten Histonturnover führt [8-9, 20]. Dabei scheint dem Turnover von Histon H1 eine Sonderfunktion zuzukommen [9, 20].

Dieses nukleäre Proteasomsystem wird zum einen über das oxidantienabhängige 20S/26S-Proteasom-Gleichgewicht [7, 13], aber im Zellkern wesentlich durch hochaffine Bindung von ADP-Ribose-Polymeren aus der automodifizierten PARP reguliert [9-10]. Damit erwies sich die PARP als mögliches wichtiges Signalmolekül zur Umsetzung eines zellulären Schadens in eine protektive Antwort.

Da nun gerade phagozytotisch aktive Immunzellen sowohl in der Körperperipherie als auch im ZNS unter entzündlichen Bedingungen eine große Menge an Sauerstoffradikalen freisetzen, deren toxische Wirkung sie aber selbst überleben, lag es nahe, diese Zellen als Modellsystem zum Studium protektiver Mechanismen nach oxidativer Zellschädigung näher zu untersuchen. Dabei wurde die Bedeutung des PARP-Signalings und des Abbaus oxidierter Proteine sowohl in einer Makrophagen-Zelllinie in verschiedenen Differenzierungsstadien [14,18], als auch in einer Mikroglia-Zelllinie [12, 19] als wichtiges antioxidatives Schutzsystem identifiziert. Das in der vergangenen Antragsperiode des SFB507 im Teilprojekt C1 (Nitsch) zur Untersuchung funktioneller Eigenschaften mikroglialer Adhäsionsmoleküle vorgeschlagene Modell der Superkultivierung stabil transfizierter BV-2-Mikrogliazellen auf NMDA-geschädigten organotypischen hippocampalen Schnittkulturen konnte vom Antragsteller etabliert und erfolgreich eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eine Beteiligung des PARP-Signalings an der funktionellen Regulation des Aktivierungsgrades und an der Expression migrationsrelevanter Integrine in Mikrogliazellen nachgewiesen werden [15]. Damit wurde von uns ein mikroglialer oxidantien-abhängiger Signalweg identifiziert, der auf der einen Seite eng mit der Expression immunphänotypischer und biochemischer Merkmale aktivierter Mikroglia gekoppelt ist, auf der anderen Seite aber auch einen protektiven Mechanismus auslöst, der beim Überleben der aktivierten Mikroglia eine wesentliche Rolle spielt.

Interessanterweise konnte durch ein oxidatives Degradationsprodukt des Cholesterols aus den Myelinscheiden bei Patienten mit multipler Sklerose eine starke Mikrogliaaktivierung ausgelöst werden [16], was aufgrund der Lipophilie und des hohen Redoxpotentials dieses Mediators einen nukleären redoxsensitiven mikroglialen Aktivierungsweg möglich erscheinen läßt. Darüberhinaus haben Vorversuche gezeigt, daß exzitotoxisch geschädigte HT22-Zellen (murine hippocampale neuronale Zelllinie) ebenfalls Cholesteroxidationsprodukte freisetzen. Ausgehend von diesen Vorarbeiten, die zum einen die Identifizierung eines ersten neuronal freigesetzten und in den gemessenen Konzentrationen auf Mikrogliazellen aktivierend wirkenden Lipidoxidationsproduktes [16] und zum anderen die Aufdeckung eines für die Migration und Protektion aktivierter Mikrogliazellen wichtigen oxidantien-abhängigen Signalweges [12,15,19] beinhalten, sollen nun die in diesem Projekt beschriebenen Fragestellungen untersucht werden.

Zitierte Vorarbeiten:

- [1] Ullrich O, Grune T, Henke W, Esterbauer H, Siems WG. Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by mitochondria isolated from rat kidney cortex. *FEBS Lett.* 352 (1994): 84-86
- [2] Ullrich O, Grune T, Henke W, Esterbauer H, Siems WG. The effect of the cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and its metabolite 4hydroxynonenic acid on respiration of isolated rat kidney cortex mitochondria. *Free Radical Res.* 24 (1996): 421-427
- [3] Ullrich O, Grune T, Lehmann K, Huser H, Ehrlich W, Siems WG. Inhibition of the poly(ADP-ribose) formation by 4hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Biochem. J.* 315 (1996): 705-708
- [4] Ullrich O, Huser H, Ehrlich W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Free Radical Biol. Med.* 22 (1997): 1153-1157
- [5] Ullrich O, Grune T. Detection of 8-hydroxy-deoxyguanosine in K562 human hematopoietic cells by high performance capillary electrophoresis. *J. Chrom. B* 697 (1997): 243-249
- [6] Sommerburg O, Ullrich O, Sitte N, Siems W, Grune T. Dose- and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light - Selective recognition and degradation by the 20S proteasome. *Free Radical Biol. Med.* 24 (1998): 1369-1374

- [7] Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJA, Grune T. Resistance of the 20S proteasome to oxidative stress - comparison of the activities of the 20S and 26S proteasome. *Biochem. J.* 335 (1998): 637-642
- [8] Ullrich O, Sitte N, Sommerburg O, Sandig V, Grune T. Influence of DNA binding in the degradation of oxidatively damaged histones by the 20S proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 362 (1999): 211-216
- [9] Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Hass R, Grune T. Poly-ADP-ribose-polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999): 6223-6228
- [10] Meyer-Kuckuk P, Ullrich O, Grune T, Ziegler M, Schweiger M. Poly(ADP-ribosyl)transferase interacts with the 20S proteasome in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 259 (1999): 576-581
- [11] Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Grune T. Degradation of hypochlorite damaged glucose-6-phosphate dehydrogenase by the 20S proteasome. *Free Radical Biol. Med.* 27 (1999): 487-492
- [12] Ullrich O, Bechmann I, Diestel A, Homberg M, Grune T, Hass R, Nitsch R. Turnover of oxidatively-damaged proteins in BV-2 microglia cells is proteasome-dependent and linked to its activation state by poly(ADP-ribose) polymerase. *FASEB J (April 16, 2001)*: 10.1096/fj.00-0540.fje
- [13] Reinheckel T, Ullrich O, Sitte N, Grune T. Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 377 (2000): 65-68
- [14] Ullrich O*, Ciftci Ö*, Hass R. Proteasome activation after oxidative stress requires poly-ADP-ribose-polymerase in highly malignant myelomonocytic cells. *Free Radical Biol. Med.* 29 (2000), 995-1004 *both authors contributed equally as "first author"
- [15] Ullrich O*, Diestel A*, Nitsch R. Protecting neurons by microglial PARP-1 inhibition (*submitted, 2001*) *both authors contributed equally as "first author" Publiziert als Abstract: Diestel A, Eyüpoglu I, Nitsch R, Ullrich O. Functional involvement and signalling of poly-ADP-ribose-polymerase in microglia activation and migration towards sites of excitotoxic neuronal injury. *30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA (2000)*
- [16] Ullrich O, Diestel A, Nitsch R, Zipp F. Microglia activation by cholesterol oxides in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. (*submitted*) Publiziert als Abstract: Ullrich O, Diestel A, Nitsch R and Zipp F. Microglia activation by cholesterol oxides in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA (2000)*
- [17] Lasch P, Petras T, Ullrich O, Backmann J, Naumann D, Grune T. Hydrogen peroxide induced alterations of RNase A were studied by FT-IR spectroscopy and degradation by proteasome *J. Biol. Chem.* 276 (2001): 9492-9502
- [18] Ciftci Ö*, Ullrich O*, Schmidt CA, Diestel A, Hass R. Regulation of the nuclear proteasome activity in human leukemia cells after adriamycin-treatment. *Blood (in press) 2001* *both authors contributed equally as "first author"
- [19] Mehlhase J, Gieche J, Ullrich O, Sitte N, Grune T. LPS-induced protein oxidation and proteolysis in BV-2 microglial cells. *IUBMB Life (in press) 2001*
- [20] Ullrich O, Grune T. Proteasomal degradation of endogenous histones in K562 human leukemic cells after oxidative challenge (*submitted, 2001*)

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1. Ziele

Ausgehend von dem Stand der Forschung und der eigenen Vorarbeiten soll in diesem Projekt der Crosstalk zwischen geschädigten Neuronen und Mikrogliazellen über Produkte der oxidativen neuronalen Schädigung, die dadurch ausgelösten mikroglialen Signalwege und deren funktionelle Bedeutung für die Interaktion Mikrogliazelle-Neuron im Sinne einer Neuroprotektion oder Neurodegeneration untersucht werden. Dabei soll auf oxidative Schädigungsprodukte von Lipiden fokussiert werden, da diese einerseits leicht das geschädigte Neuron verlassen können und andererseits bereits nachgewiesene biologische Wirkungen auf Mikrogliazellen aufweisen. Da darüber hinaus die mikrogliale Aufnahme und Degradation solcher Oxidationsprodukte eine wesentliche Voraussetzung für neuroregenerative Vorgänge darzustellen scheint, wohingegen aktivierte Mikroglia potentiell auch neurotoxisch wirken kann,

ermöglichen diese Untersuchungen weitere Einblicke in die pathophysiologische Funktion der Mikroglia unter den Bedingungen einer neuronalen Schädigung. Daher sollen in diesem Projekt folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Welche oxidativ modifizierten und mikrogliaaktivierenden Lipide werden wie und in welchem Umfang unter den Bedingungen neuronaler Schädigung freigesetzt ?

Diese Untersuchungen sollen klären, welche Produkte aus der Substanzklasse der oxidativ modifizierten Lipide nach einem neuronalen Schaden und in welchem Umfang freigesetzt werden. Dabei wird vor allem auf die Gruppe der Cholesteroxidationsprodukte und der aldehydischen Lipidperoxidationsprodukte fokussiert. Es ist in diesen Untersuchungen nicht geplant, den genauen Mechanismus der Freisetzung zu studieren, sondern in erster Linie diejenigen Produkte zu analysieren und zu quantifizieren, die wahrscheinlich von physiologischer Relevanz sind. Daher soll die Analytik hier, ausgehend von einer neuronalen Zelllinie (HT22, hippocampale Neurone aus Maus), sich auf isolierte primäre Neurone (Maus) und organotypische hippocampale Komplexschnittkulturen (Maus) beziehen. Die Analyse mittels GC/MS (Cholesteroxidationsprodukte) oder HPLC (aldehydische Lipidperoxidationsprodukte) erlaubt die Identifikation und Quantifizierung der spezifischen Produkte dieser Substanzklassen, die dann anschließend auf mikroglia-aktivierende Aktivität anhand isolierter primärer Mikroglia aus Maus getestet werden und somit als extrazelluläre Signale eines neuronalen Schadens charakterisiert werden können.

2. Welche mikroglialen Signalwege werden durch die identifizierten oxidativ modifizierten Lipide aktiviert ?

Nachdem bekannt ist, welche oxidativ modifizierten Lipide nach neuronaler Zellschädigung freigesetzt werden und welche davon eine aktivierende Wirkung auf Mikrogliazellen haben, soll untersucht werden, welche aktivierenden intrazellulären mikroglialen Signalwege durch diese Produkte ausgelöst werden. Da es aus der Literatur Hinweise auf entsprechende Signalwege in anderen Zelltypen gibt (s.o.), soll zuerst die Existenz dieser Wege in Mikrogliazellen untersucht werden. Da die Mikrogliaaktivierung eine zwar abgestufte, aber doch ähnliche zelluläre Reaktion auf die verschiedensten exogenen Stimuli darstellt, ist bei Mikroglia-aktivierenden Signalwegen mit einer großen Konvergenz und Signalintegration dieser Wege zu rechnen. Daher soll, ausgehend von der Identifikation der beteiligten Transkriptionsfaktoren als nukleäre Endstrecke, der Signalweg retrograd untersucht werden. Quervernetzungen aktivierender Wege mit den Mechanismen mikroglialer Eigenprotektion gegenüber oxidativem Streß sind dabei möglich. Zusätzlich dienen Versuche mit extrazellulären und intrazellulären Antioxidantien der Beurteilung der Substanzspezifität im Gegensatz zur unspezifischen Redoxsensitivität einzelner Signalwege. Nach Identifizierung der beteiligten Signalwege können diese dann durch Inhibitorexperimente oder der antisense-Technik ausgeschaltet werden. Diese Mikrogliazellen können dann in den folgenden Experimenten zur Untersuchung ihrer funktionellen Bedeutung im organotypischen Gewebeverband eingesetzt werden, als auch untersucht werden, ob die Aufnahme und Degradation der initial aktivierend wirkenden oxidativ modifizierten Lipide ebenfalls gehemmt ist.

3. Bewirken die identifizierten Signalwege Neuroprotektion oder Neurodegeneration ?

Durch Experimente mit Mikrogliazellen, in denen der identifizierte durch oxidativ modifizierte Lipide aktivierende Signalweg spezifisch ausgeschaltet worden ist, soll nun anhand der organotypischen hippocampalen Schnittkultur nach Induktion eines leichten neuronalen Primärschadens untersucht werden, ob diese Signalwege zur mikroglial-vermittelten Neuroprotektion oder zur Neurodegeneration beitragen.

3.5.2. Methoden

Die im folgenden kurz beschriebenen Methoden finden in den verschiedenen Schritten des Arbeitsprogrammes Anwendung und werden deswegen hier zusammenfassend vorab beschrieben:

Präparation und Kultivierung primärer Neurone

Zur Präparation primärer Neurone (Stein et al., 1999) werden 10 Tage alte Mäuse dekapitiert und unter sterilen Bedingungen das Hirn entnommen. Das Gewebe wird mit 0.25% Trypsin dissoziiert, bei 470g für 10 min zentrifugiert, in Neurobasalmedium aufgenommen und auf mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Plates ausplattiert und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Raumluft in befeuchteter Atmosphäre inkubiert. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens werden die auf den Zellrasen adhären den Gliazellen mechanisch abgelöst und die Proliferation der residualen nichtneuronalen Zellpopulation mit 8 µM Cytosin-Arabinosid für 3 Tage gehemmt.

Induktion neuronaler Zellschädigung

Neurone in organotypischer Umgebung (s.u.), primäre isolierte Neurone in Einzelzellkultur (s.o.) und eine neuronale Zelllinie (HT22 mouse hippocampal neurons) werden einer exzitotoxischen Schädigung ausgesetzt. Das Modell einer exzitotoxischen Schädigung ermöglicht eine maximale Neuronenselektivität und ist als wesentliches Schädigungsprinzip bei Ischämie oder neurodegenerativen Erkrankungen (Coyle et al., 1993) klinisch hochrelevant. Zur exzitotoxischen Schädigung werden im Falle der organotypischen Schnittkultur und der neuronalen Einzelzellkultur 50 µM oder 5 µM NMDA (schwerer/leichter Schaden) eingesetzt, zur Schädigung von HT22-Zellen 20 mM Glutamat.

Analytik der oxidativ modifizierten Lipide

Cholesteroxidationsprodukte: Oxidationsprodukte des Cholesterols werden nach der Methode von Sevanian (Sevanian et al., 1994) nach Derivatisierung zu Trimethylsilylethern (TMS-Ethern) und Analyse mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS) detektiert. *Aldehydische Lipidperoxidationsprodukte:* Die aldehydischen Lipidperoxidationsprodukte werden mittels HPLC-Trennung der entsprechenden DNPH-Derivate (Esterbauer et al., 1990) detektiert.

Präparation und Kultivierung von Mikrogliazellen

Zur Präparation von primärer Mikroglia werden neugeborene Mäuse dekapitiert, das Hirn entnommen und bei 4°C im Präparationsmedium (HBSS mit Ca und Mg) von den Meningen befreit. Das Gewebe wird dann in Ca/Mg-freier HBSS mit 4 mg/ml Trypsin und 0,5 mg/ml DNase bei Raumtemperatur enzymatisch und mit Hilfe der Scherung durch ein Pasteur-Pipette mechanisch dissoziiert, zentrifugiert (100g, 10min, 4°C), in Kulturmedium (DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10% FKS, 1% L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) resuspendiert auf in mit Poly-L-Lysin-beschichtete Kulturflaschen gegeben. Diese so erhaltene Astrozyten-/Mikrogliazell-Mischkultur wird bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Raumluft in befeuchteter Atmosphäre kultiviert und die adhären ten Mikrogliazellen nach Ausbildung eines homogenen, konfluenten Astrozyten-Zellrasens vom diesem durch mechanische Alteration abgelöst und durch Aufnahme des Überstandes in eine Einzelzellkultur (DMEM mit 2% FKS, 1% L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin) überführt. Durch regelmäßiges Entfernen nicht-adhären ter Zellen im Überstand wird nach 48h eine Reinheit der Mikroglia-Einzelzellkultur von mehr als 96% erreicht (Heppner et al., 1996).

Obwohl die Untersuchungen zur Mikrogliaaktivierung und Identifikation mikroglialer Signalwege mit primären Mikrogliazellen erfolgen soll, kann für die funktionellen Untersuchungen an der organotypischen hippocampalen Schnittkultur die Herstellung einer stabil transfizierten mikroglialen Zelllinien notwendig werden (s.u.). Dazu würde dann die immortalisierte murine Mikrogliazelllinie BV-2 (Sicherheitsstufe S1) eingesetzt werden, die von Seiten der funktionellen Eigenschaften (aktivierungsabhängige Veränderung morphologischer, immunphänotypischer und biochemischer Parameter) mit primärer Mikroglia gut vergleichbar ist (Bocchini et al., 1992), und als Modell für funktionelle Untersuchungen in der vergangenen Antragsperiode des SFB507 im Projekt C1 (Nitsch) bereits erfolgreich etabliert worden ist. BV-2 Mikrogliazellen werden in DMEM mit 10% FKS und Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Messung von Parametern der Mikrogliaaktivierung

Die quantitative Untersuchung *morphologischer Parameter* der Mikrogliaaktivierung erfolgt nach Fixierung der in den Vertiefungen einer 24-Loch-Kulturschale in Einzelzellkultur gehaltenen Mikrogliazellen mit 4% Paraformaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd und 15% Pikrinsäure und mehrmaligem Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,4) und 1% BSA. Die Zellen werden anschließend in einer 40-fachen Vergrößerung mit einem mit einer Digitalkamera ausgerüsteten Zeiss-Mikroskop aufgenommen und der Formfaktor (FF) und Ramifikationsindex (IR) mittels eines Bildanalyse-Systems ermittelt (Heppner et al., 1998).

Die quantitative Untersuchung *immunphänotypischer Parameter* der Mikrogliaaktivierung (Expression von CD11a, CD11b, CD18, CD54/ICAM-1, MHCI, MHCII) erfolgt mittels der Durchflußzytometrie (FACS). Hierzu werden die in den Vertiefungen einer 24-Loch-Kulturschale in Einzelzellkultur gehaltenen Mikrogliazellen resuspendiert, zentrifugiert und das Pellet mit einer Fixationslösung (4% Paraformaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd, 15% Pikrinsäure) überschichtet, mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,4) und 1% BSA mehrmals gewaschen und mit den entsprechenden fluoreszenzkonjugierten Primärantikörpern inkubiert. Die durch Inkubation mit dem entsprechenden FITC-konjugierten Primärantikörper induzierte Fluoreszenz wird dann im FL1-Kanal eines Durchflußzytometers quantitativ bestimmt und dient als Maß für die Menge des mit dem Primärantikörper markierten Antigens.

Die quantitative Untersuchung *biochemischer Parameter* der Mikrogliaaktivierung erfolgt mittels Nachweis der Expression der induzierbaren NO-Synthetase im Immunoblot (Stoikovic et al., 1998) und der Freisetzung von Superoxidanion-Radikalen im Nitroblue-Tetrazolium-Assay (Czapiga et al., 1999) und von NO durch Nitritdetektion nach Griess (Hanisch et., 1997) und von TNF- α im ELISA (Petrova et al., 1998).

Methoden zur Untersuchungen der beteiligten mikroglialen Signalwege

Bei der Untersuchung der an der Mikrogliaaktivierung durch oxidativ modifizierte Lipide beteiligten Signalwege soll zunächst auf die beteiligten nukleären Faktoren (CREB, fos/jun-Familie/AP-1, NF- κ B) fokussiert werden, zum anderen aber auch nukleäre schädigungsinduzierbare Signalwege wie das Poly-ADP-Ribose-Polymerase-System (PARP) untersucht werden. Diesem Vorgehen liegt die Vermutung zugrunde, daß oxidativ modifizierte Makromolekülen sowohl mit bereits bekannten Signalkaskaden interferieren können, als auch durch ihre potentiell toxischen Eigenschaften eine molekulare "Streßantwort" in der betroffenen Mikrogliazelle auslösen können. Im Anschluß daran werden, ausgehend von den Untersuchungen in anderen Zelltypen, die Beteiligung von MAPK (für die aldehydischen Lipidperoxidationsprodukte) und des zytosolischen OSBP sowie nukleärer Steroidrezeptoren (für die Cholesteroloxide) untersucht. Experimente in Anwesenheit des intrazellulären Antioxidans PBN oder des extrazellulären Antioxidans DMPO dienen der Unterscheidung von "unspezifischen" redox-sensitiven Effekten.

Nachweise von Proteinen und ihrer mRNA: Proteinphosphorylierungen des MAPK-Signalings werden mittels phosphorylierungs- und sequenzabhängigen Antikörpern oder Immunpräzipitation mit nachfolgendem Immunoblot mit phosphorylierungssensitiven Antikörpern (PTyr, PSer, PThr) nachgewiesen, *Kinaseaktivitäten* werden mittels kommerzieller Assaysysteme auf der Grundlage von Substratphosphorylierungen und Immunoblotdetektion bestimmt. *Transkriptionsfaktoren:* Die nukleäre Lokalisation des AP-1-Komplexes (c-Jun, c-Fos) sowie von NF- κ B können im Zellkern mittels Immunoblot-Technik oder der Bindung an ihre DNA-Zielsequenz (EMSA) nachgewiesen werden. *Untersuchung des nukleären PARP-Signalings:* Immunpräzipitationsexperimente dienen zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen der aktivierten PARP mit multiplen Bindungspartnern und Immunoblots gegen Poly-ADP-Ribose der Abschätzung der PARP-Aktivität sowie der Identifizierung potentieller Heteromodifikationen von nukleären Zielproteinen. Die Verwendung hochspezifischer *Inhibitoren* (z.B. Apigenin gegen p44^{MAPK}, BAY gegen die I κ B-Hydrolyse oder Phenanthridinon gegen die PARP) ermöglicht die Intervention in Signalwege und so ein funktionelles Readout (s. Messung von Parametern der Mikrogliaaktivierung). *Anti-sense-Technik:* Da gegen das OSBP bisher keine spezifischen Inhibitoren verfügbar sind, ist hier eine Ausschaltung des Zielproteins mittels transierender (im

Falle von primärer Mikroglia) bzw. stabiler Transfektion (im Falle von BV-2-Zellen) mit einem anti-sense-Vektor gegen die das OSBP codierende mRNA geplant (s.u.).

Klonierung von anti-sense-Vektoren zur Transfektion von Mikrogliazellen

Alle Arbeiten werden im molekularbiologischen Labor der AG Zell- und Neurobiologie des Instituts für Anatomie (Sicherheitsstufe S1, Genehmigung vom 01.02.1996, Geschäftszeichen VC121-928/95) durchgeführt.

Durch Einklonieren einer gegen die mRNA des zu inhibierenden Zielmoleküls gerichteten anti-sense-Sequenz in die Multiple-Cloning-site eines EGFP-, GFP- oder pcDNA3.1-Vektors soll die Expression des Zielproteins durch Behinderung der ribosomalen Translation der codierenden mRNA verhindert werden. Dazu wird die entsprechende Ziel-Sequenz aus der Gesamt-RNA von BV-2-Mikrogliazellen mittels RT-PCR amplifiziert, elektrophoretisch getrennt, aus dem Gel eluiert und in anti-sense-Orientierung in die Multiple-Cloning-Site eines EGFP-, GFP- oder pcDNA3.1-Vektors ligiert. Mit dem erhaltenen anti-sense-Vektor werden kompetente E.coli mittels Elektroporation transformiert, selektiert und aus der klonalen Kolonie das Plasmid isoliert, elektrophoretisch getrennt, eluiert und schließlich in Mikrogliazellen mittels der Lipofectin-Methode transfiziert. Zur transienten Transfektion primärer Mikrogliazellen mit dem EGFP-Vektor soll sowohl die Lipofectin-, als auch die Elektroporation angewendet werden, die beide in Vorversuchen an primären Mikrogliazellen eine gute Transfektionseffizienz gezeigt haben. Als Kontrollen für die anschließenden zellbiologischen und funktionellen Experimente dienen Kontroll-Vektor-transfizierte Mikrogliazellen.

Da entgegen früherer Arbeiten (Alexander et al., 1997) heute gut bekannt ist, daß GFP/EGFP-Proteine eine ausgeprägte Zytotoxizität aufweisen und dabei drastische intrazelluläre Effekte wie z.B. eine deutliche CPP32-Aktivierung auslösen (Liu et al, 1999), ist die Verwendung dieser Vektoren sowohl zur Herstellung transient oder stabil transfizierter Zellen als auch für funktionelle Untersuchungen nicht unproblematisch. Als Alternative zur Verwendung von GFP/EGFP-markierter transient transfizierter primärer Mikroglia kann das im Rahmen des SFB507/C1 etablierte Modell der Suprakultivierung stabil transfizierter BV-2-Mikrogliazellen nach vorheriger MiniRuby-Markierung eingesetzt werden. Im ersteren Fall besteht der Vorteil in der Verwendung primärer Zellen und der Nachteil in der notwendigen Markierung der erfolgreich transient transfizierten Zellen mittels GFP/EGFP, das selbst massive intrazelluläre Effekte auslöst und daher einen hohen Grad an Artefizialität in das primäre Zellsystem einbringen könnte. Im zweiten Fall liegt eine immortalisierte Mikrogliazelllinie vor, die zwar in wesentlichen funktionellen, aber nicht in allen biochemischen Eigenschaften mit primären Mikrogliazellen vollständig übereinstimmt. Dafür kann hier durch Verwendung des nicht-toxischen pcDNA3.1-Vektors eine stabile Zelllinie hergestellt werden, die für die nachfolgenden funktionellen Untersuchungen mit dem ebenfalls nicht-toxischen MiniRuby markiert werden kann.

Für das an der Mikrogliaaktivierung zentral beteiligte nukleäre Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) existieren bereits ein von uns hergestellter anti-sense-Vektor sowie mit diesem und dem Kontroll-Vektor stabil transfizierte BV-2-Mikrogliazelllinien (Ciftci et al., 2001). Darüber hinaus steht uns für diese Experimente auch eine PARP $-/-$ - Maus (Wang et al., 1995) zur Verfügung, so daß in diesem Fall auch die Präparation und Kultivierung PARP-negativer primärer Mikroglia möglich ist.

Kokultur von primären Mikrogliazellen und Neuronen

Kokulturen von primären Mikrogliazellen und Neuronen stellen ein zur Untersuchung der Interaktion zwischen Neuronen und Mikrogliazellen geeignetes Modellsystem dar (Sudo et al., 1998; Witting et al., 2000) und können insbesondere auch zur Beurteilung mikroglialer Neurotoxizität eingesetzt werden (Meda et al., 1995). Dazu werden primäre Neurone wie oben beschrieben isoliert, mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen / cm^2 in Neurobasalmedium kultiviert und mit in DMEM / 2% FKS kultivierten Mikrogliazellen mit einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen / cm^2 überschichtet. Nach 2 h wird das Medium entfernt und durch MEM mit 1 mg/ml BSA und 20 mM HEPES (Protokoll nach Sudo et al., 1998) ersetzt. Nach einer Kokulturzeit von 48h können dann Experimente zur Neurotoxizität der identifizierten mikroglialen Signalwege, wie im Arbeitsprogramm beschrieben, vorgenommen werden.

Organotypische hippocampale Komplexschnittkulturen

Zur Präparation von organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen (Frotscher et al., 1995) werden 10 Tage alte Mäuse (P10) dekapitiert und unter sterilen Bedingungen das Hirn entnommen. Anschließend wird der den Hippocampus enthaltende Hirnanteil nach rostral vom restlichen Neocortex und nach kaudal vom Hirnstamm und Kleinhirn abpräpariert und in eiskaltem Präparationsmedium (MEM mit 1% L-Glutamin, pH=7,35) auf einen Sektionsblock aufgeklebt. Die nach dem Schneiden mit dem Vibratom gewonnenen Koronarschnitte mit einer Schichtdicke von 350µm werden auf Millipore-Filtermembranen (Porengröße 0,1µm) in die Vertiefungen einer 6Loch-Kulturschale gebracht und mit Kulturmedium (MEM:HBSS 2:1, 25% normal horse serum, 2% L-Glutamin, 2,64 mg/ml Glucose und Penicillin/Streptomycin) bei 35°C, 5% CO₂ und 95% Raumluft in einer befeuchteten Atmosphäre inkubiert. Dabei hat das Medium nur von unten direkten Kontakt mit dem hippocampalen Gewebe.

Superkultivierung von vormarkierten Mikrogliazellen auf organotypische hippocampale Komplexschnittkulturen

Vormarkierte Mikrogliazellen (GFP/EGFP-exprimierende primäre Mikroglia oder mit 20 µg/ml Rhodamin-markierten Dextran MiniRuby für 24h inkubierte BV-2-Mikrogliazellen) werden mehrfach mit PBS gewaschen, in einem geringen Volumen Kulturmedium (s.o.) resuspendiert und auf die Oberfläche der hippocampalen Schnittkulturen gebracht. 1,2 und 3 Tage nach NMDA-Läsion wird die Migration der Mikrogliazellen zum Ort der Neurodegeneration zunächst im intakten Schnitt fluoreszenz- und lichtmikroskopisch dokumentiert. Anschließend werden die Schnitte nach Fixierung (4% Formaldehyd, 0,1 % Glutaraldehyd, 15% Pikrinsäure) und Überführung in 0,8 M Saccharose-Lösung im Kryostaten geschnitten, auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und mit Immunomount eingedeckelt. Zur Doppelfärbung der Mikrogliazellen werden die Kryostat-Schnitte mit *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 (IB4)-FITC (1:40 in 0,1 M PB, pH=6,8 und 0,5% Triton X-100) inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch bei Rhodamin- oder FITC-Fluoreszenz untersucht. Die site-spezifische Migration in das Gebiet der Neurodegeneration wird dann statistisch ausgewertet (Heppner et al., 1998).

3.5.3. Arbeitsprogramm

1. Welche oxidativ modifizierten und mikroglia-aktivierenden Lipide werden wie und im welchem Umfang unter den Bedingungen neuronaler Schädigung freigesetzt ?

In diesen Experimenten soll die Freisetzung oxidativ modifizierter Lipide durch geschädigte Neurone mittels instrumenteller Analytik charakterisiert und quantifiziert werden und ihre Wirkung auf Mikrogliazellen untersucht werden.

Welche Lipide werden in welchem Umfang freigesetzt ?

Dabei ist es notwendig, die freigesetzten Lipide zunächst zu detektieren und zu quantifizieren. Dazu wird in HT22 Zellen und primären Neuronen ein exzitotoxischer neuronaler Schaden ausgelöst und zu definierten Zeitpunkten im Verlauf der intrazellulären Schädigung sowohl im Kulturmedium, als auch im Zelllysat die Konzentrationen oxidiertes Cholesterole mittels GC/MS und die von aldehydischen Lipidperoxidationsprodukten mittels HPLC bestimmt. Die Analytik der oxidierten Cholesterole mittels GC/MS ermöglicht die klare Trennung von spezifischen Produkten des neuronalen Cholesterollipidstoffwechsels (z.B. 24-Hydroxycholesterol) von Produkten, die durch oxidative Schädigung entstanden sind (z.B. 7-Ketocholesterol). Die Verwendung der hippocampalen murinen Zelllinie HT22 soll zu Beginn der Analysen aufgrund des unlimitierten Zellmaterials einer weitgehenden methodischen Optimierung der Analysebedingungen hinsichtlich der zu erwartenden Konzentrationsbereiche an Cholesteroolxidations- und Lipidperoxidationsprodukten dienen, um anschließend die Untersuchungen an der primären neuronalen Zellkultur möglichst automatisiert und effizient durchführen zu können. Die GC/MS-Analysen werden im Rahmen einer seit 3 Jahren bestehenden Kooperation mit Herrn Dr. Jörg Rathmann, Institut für Biochemie der Charité, und die HPLC-Analysen im Rahmen einer seit 2 Jahren bestehenden Kooperation mit Herrn PD Dr. Tilman Grune, Neurowissenschaftliches Forschungszentrum

der Charité, in den jeweiligen Einrichtungen durchgeführt. Der Antragsteller beherrscht beide Methoden selbstständig.

Wie schnell werden diese Lipide freigesetzt ?

Da die Freisetzungskinetik von Lipidoxidationsprodukten nach neuronaler Schädigung grundsätzlich einer Vielzahl von komplexen Einflüssen unterliegt (z.B. Reaktionskinetik der Bildung, Interaktion mit intrazellulären Antioxidantien, intrazellulärer Metabolismus, intrazelluläre Kompartimentierung, Membrangängigkeit der Schädigungsprodukte, Kinetik der Ausbildung von diffusionserleichternden Membranschäden), müssen zur validen Detektion und Quantifizierung dieser Produkte mit großer Sorgfalt verschiedene Zeitpunkte nach der neuronalen Initialschädigung untersucht werden. Durch zusätzliche analytische Aufarbeitung verschiedener Kompartimente (Zellkulturüberstand, Zelllysate, isolierte Zellmembranen, Mitochondrien, Zellkerne) können Aussagen zur Kinetik der Produktion, Kompartimentierung und Freisetzung von Cholesteroxidationsprodukten und aldehydischen Lipidperoxidationsprodukten nach exzitotoxischer Schädigung getroffen werden, wozu es bisher noch keinerlei Untersuchungen gibt.

Welche der freigesetzten Lipidoxidationsprodukte wirken aktivierend auf Mikrogliazellen ?

Zur Untersuchung der Wirkung der detektierten und quantifizierten Lipidperoxidationsprodukte auf Mikrogliazellen werden diese in isolierter Form mit primären Mikrogliazellen inkubiert und verschiedene Parameter der Mikroglia-Aktivierung untersucht: Die quantitative Untersuchung *morphologischer Parameter* erfolgt durch Ermittlung des Formfaktors (FF) und Ramifikationsindex (IR), die quantitative Untersuchung *immunphänotypischer Parameter* (Expression von CD11a, CD11b, CD18, CD54/ICAM-1, MHC I, MHC II) erfolgt mittels der Durchflußzytometrie (FACS) und die quantitative Untersuchung *biochemischer Parameter* erfolgt mittels Nachweis der Expression der induzierbaren NO-Synthetase im Immunoblot (Stoikovic et al., 1998), der Freisetzung von Superoxidanion-Radikalen im Nitroblue-Tetrazolium-Assay (Czapiga et al., 1999), von NO durch Nitritdetektion nach Griess (Hanisch et al., 1997) und von TNF- α im ELISA (Petrova et al., 1998). Dadurch sind Aussagen nicht nur zum Ausmaß, sondern auch zu den verschiedenen funktionellen Dimensionen der Mikrogliaaktivierung möglich.

Korrelation mit dem Grad der neuronalen Zellschädigung - Hinweise auf eine Mediation der abgestuften Mikrogliareaktion ?

Darüber hinaus kann über die Korrelation mit Markern des neuronalen Zelltodes (Propidiumiodid-Färbung, MTT-Assay, DNA-Fragmentierung im Agarose-Gel) und bei Anwendung geringerer Konzentrationen des exzitotoxischen Agens auch eine Beurteilung des Spektrums der Oxidationsprodukte bei verschiedenen Graden der neuronalen Schädigung vorgenommen werden. Dadurch könnten sich möglicherweise Hinweise auf eine unterschiedliche Mediation der abgestuften Mikrogliareaktion ergeben, die dann im weiteren experimentellen Vorgehen mechanistisch und funktionell untersucht werden kann.

Untersuchungen an der exzitotoxisch geschädigten hippocampalen Schnittkultur (OHSC) als Annäherung an die organotypische Situation

Da sich im Gewebeverband sowohl durch die Beteiligung interzellulärer Matrixproteine durch chemische Reaktion, als auch durch die mögliche Aufnahme und Metabolisierung durch Gliazellen die Quantität und Zusammensetzung der extrazellulären Lipidoxidationsprodukte von der in der Einzelzellkultur unterscheiden kann, sollen abschließend diese auch in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkulturen nach NMDA-induzierter Neurodegeneration analysiert werden.

Unter den nun identifizierten und quantifizierten Lipidoxidationsprodukten können nun diejenigen ausgewählt werden, die von der neuronalen primären Einzelzellkultur 1.) in ausreichender Menge, 2.) in einem bestimmten Zeitfenster und 3.) von noch vitalen Neuronen freigesetzt werden, 4.) auch in organotypischen Schnittkulturen nachweisbar sind und 5.) eine hohe Mikroglia-aktivierende Potenz besitzen. Diese werden nun im zweiten Teil dieses Projektes näher betrachtet:

2. Welche mikroglialen Signalwege werden durch die identifizierten oxidativ modifizierten Lipide aktiviert ?

Nach Identifikation und Quantifizierung der mikrogliaaktivierenden Oxidationsprodukte sollen die durch diese Produkte ausgelösten Signalwege mittels biochemischer und molekularbiologischer Standardmethoden untersucht werden. Die isolierten Oxidationsprodukte werden mit primären Mikrogliazellen in Einzelzellkultur inkubiert und die ausgelösten Signalwege untersucht:

Cholesterodoxidationsprodukte:

Zuerst soll untersucht werden, ob durch Cholesterodoxidationsprodukte die Bindung von AP-1, NF- κ B oder CREB an ihren spezifischen Bindungssequenzen an der DNA induziert werden. Die Beteiligung des zytosolischen Oxysterol-Bindungsproteins (OSBP) sowie der nukleären Steroidrezeptoren sollen mittels anti-sense-Technik (für das OSBP) bzw. mittels Co-Inkubation mit spezifischen Agonisten und Inhibitoren (für die nukleären Steroidrezeptoren) untersucht werden. Die DNA-Bindung von AP-1, NF- κ B und CREB wird mittels electrophoretic mobility shift assays (EMSA) untersucht.

Aldehydische Lipidperoxidationsprodukte:

Bei den aldehydischen Lipidperoxidationsprodukten ist am Anfang die Untersuchung der beteiligten Transkriptionsfaktoren von Bedeutung, da bisher vorliegende Arbeiten eine AP-1- und CREB, aber nicht NF- κ B-vermittelte Wirkung (Camandola et al., 2000; Uchida et al., 1999; Ito et al., 1999) von aldehydischen Lipidperoxidationsprodukten favorisieren, während die Mikrogliaaktivierung aber auf der anderen Seite wesentlich auch von NF- κ B vermittelt wird. Nach Identifikation des in Mikrogliazellen verantwortlichen Transkriptionsfaktors soll versucht werden, das durch aldehydische Lipidperoxidationsprodukte vermittelte zytosolische Signaling retrograd zu untersuchen, wobei die in anderen Zelltypen schon teilweise bekannte Wirkung auf JNK und p38 (Uchida et al., 1999; Page et al., 1999) einen ersten Ansatz darstellt. Die DNA-Bindung von AP-1, NF- κ B und CREB wird mittels electrophoretic mobility shift assays (EMSA) und das zytosolische Signaling mit Immunoblots mit site-spezifischen phosphorylierungssensitiven Antikörpern, Immunopräzipitationsexperimenten und Kinase-Assays untersucht. Inhibitorexperimente dienen zusätzlich der funktionellen Untersuchung beteiligter Signalwege mit den typischen morphologischen, immunphänotypischen und biochemischen Parametern der Mikrogliaaktivierung als Read-out.

Redox-sensitive Signalwege:

Da durch die zu untersuchenden Oxidationsprodukte von Lipiden aufgrund ihres hohes Redoxpotentials auch "unspezifisch" potentiell redox-sensitive Signalwege ausgelöst werden könnten und die Aktivierbarkeit von Mikrogliazellen durch Oxidantien gut beschrieben ist (Takeda et al., 1998; Heppner et al., 1998), soll auch untersucht werden, inwieweit das durch oxidierte Lipide eingebrachte Redoxpotential mit den untersuchten Signalwegen interferiert. Dazu wird sowohl das membrangängige und für zellphysiologische Untersuchungen weit verbreitete und gut charakterisierte intrazellulär wirkende Antioxidans PBN, als auch das extrazellulär wirkende und daher auf eine mögliche Beteiligung redox-sensitiver Rezeptoren zielende Antioxidans DMPO eingesetzt. Hauptsächlich auf das Redoxpotential ansprechende Signalwege müßten durch diese Behandlung gehemmt werden.

Protektive Signalwege:

Die Mikrogliaaktivierung geht mit einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativen Streß einher, wie am Beispiel der erhöhten Expression der mikroglialen Superoxiddismutase (Noack et al., 1998), Glutathion-Peroxidase (Lindenau et al., 1998) oder der Aktivierung des Proteasoms (Ullrich et al., 1999d) gezeigt ist. Daher ist es von Interesse, ob an der Aktivierung beteiligte und durch Cholesterodoxidationsprodukte oder aldehydische Lipidperoxidationsprodukte ausgelöste Signalwege auch mit einer erhöhten Aktivität antioxidativer Stoffwechselwege (z.B. Expression der Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und -transferasen) einhergehen und so zum Überleben der Mikrogliazelle beitragen. Dabei soll auch auf das nukleäre Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) fokussiert werden, da diesem auf der einen Seite eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur (Satoh et al., 1992) und beim Abbau oxidativ geschädigter Proteine zukommt (Ullrich et al., 1999), es auf der anderen Seite aber an zentraler Stelle in die intrazellulären Mechanismen der Mikrogliaaktivierung involviert ist (Nakajima et al., 2000). Das PARP-Signaling wird mittels PARP-Aktivitätsmessung, Detektion der automodifizierten

PARP im Immunoblot und der möglichen Protein-Protein-Interaktionspartner in Immunopräzipitationsexperimenten untersucht werden.

Herstellung transfizierter Mikrogliazellen zur Vorbereitung der funktionellen Untersuchungen der Signalwege an organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSCs)

Nach Identifizierung der beteiligten Signalwege besteht dann die Aufgabe in der Klonierung eines wirksamen anti-sense-Vektors und der Herstellung von transient oder stabil transfizierten Mikrogliazellen. Da diese Transfektanten für die funktionellen Untersuchungen an dem Modell der exzitotoxisch geschädigten organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur notwendig sind, müssen an dieser Stelle die erfolgreich transient transfizierten primären Mikrogliazellen mittels GFP/EGFP-Expression identifiziert und untersucht werden. Auf die Problematik bei der Verwendung von GFP/EGFP-Vektoren wurde in einem früheren Abschnitt eingegangen. Alternativ kann auf eine immortalisierte mikrogliale Zelllinie zurückgegriffen werden. Die dazu verwendeten murinen BV-2-Zellen weisen viele zentrale funktionellen Eigenschaften primärer Mikroglia auf (Bocchini et al., 1992), insbesondere diejenigen, die in diesem Projekt untersucht werden sollen, wie die Fähigkeit der aktivierungsabhängigen Änderung morphologischer (ramifiziert/amoeboid), immunphänotypischer (ICAM-1 und CD11a-Expression) und biochemischer Merkmale (NF- κ B-Translokation und iNOS-Expression). Außerdem sind diese in der Lage, zum Ort der neuronalen Schädigung zu migrieren (Ullrich et al., 2000c) und sind daher für die geplanten weiteren Experimente optimal geeignet. Im Falle der PARP wurde von uns bereits erfolgreich ein anti-sense-Vektor kloniert und eine stabil transfizierte BV-2-Mikrogliazelllinie etabliert.

3. Bewirken die identifizierten Signalwege Neuroprotektion oder Neurodegeneration ?

Die Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der identifizierten Signalwege für die mikroglial-vermittelte Neuroprotektion oder Neurodegeneration werden im Gewebeverband am Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSC) durchgeführt. Vorhergehende Kokultur-Experimente mit primären Neuronen und Mikrogliazellen dienen aufgrund des deutlich geringeren experimentellen Aufwandes zur gezielten Auswahl der in der OHSC zu testenden mikroglialen Signalwege. Andererseits können somit auch im Gewebeverband der OHSC erhaltene Ergebnisse in der Einzellzellkultur überprüft werden.

Suprakultivierung transient transfizierter primärer Mikrogliazellen

Zur Untersuchung dieser Fragestellung soll versucht werden, primäre Mikrogliazellen mit einem EGFP-Vektor, der in der multiple-cloning-site die entsprechende anti-sense-Sequenz trägt, transient zu transfizieren und auf die Oberfläche organotypischer hippocampaler Schnittkulturen nach leichter NMDA-Schädigung (5 μ M NMDA) zu suprakultivieren. Dabei können die erfolgreich transfizierten Mikrogliazellen aufgrund ihrer EGFP-Fluoreszenz identifiziert und ihr Verhalten in der Schnittkultur untersucht werden.

Suprakultivierung stabil transfizierter anti-sense BV-2-Mikrogliazellen

Zusätzlich zu den Experimenten mit transient transfizierter GFP/EGFP-exprimierender Mikroglia werden stabil transfizierte BV-2-Mikrogliazellen mit einem Rhodamin- oder FITC-gekoppelten Dextranamin (Mini-Ruby/Mini-Green) markiert und auf die Oberfläche einer organotypischen Schnittkultur nach leichter NMDA-Schädigung (5 μ M NMDA) suprakultiviert.

Detektion des neuronalen Zelltods in der Kokultur aus primären Neuronen und Mikrogliazellen

Transient transfizierte EGFP-markierte primäre Mikrogliazellen oder stabil transfizierte BV-2-Mikrogliazellen werden zusammen mit primären Neuronen wie oben beschrieben kultiviert. Nach Induktion eines leichten neuronalen Schadens durch 5 μ M NMDA wird nach 1,2 und 3 Tagen der neuronale Zelltod mittels Doppelfluoreszenz (Propidiumiodid/NeuN) detektiert, quantifiziert und statistisch ausgewertet.

Beurteilung der Mikroglia Invasion und neuronalen Schädigung

1,2 und 3 Tage nach NMDA-Läsion wird die Invasion von Mikrogliazellen zum Ort der Neurodegeneration zunächst im intakten Schnitt fluoreszenz- und lichtmikroskopisch dokumentiert. Anschließend wird die Schnittkultur fixiert, in Saccharose-Lösung eingebettet und gefriergeschnitten. Die Migration der Mikrogliazellen zum Ort der Neurodegeneration wird im Falle der BV-2-Zellen nach Doppelfärbung mit IB₄-FITC fluoreszenzmikroskopisch untersucht, dokumentiert und statistisch ausgewertet. Die neuronale Schädigung wird mittels Propidiumiodidfärbung der Schnittkultur und Anfertigung von Gefrierschnitten zwischen den mit Kontrollvektor-transfizierten BV-2- oder primären Mikrogliazellen, die mit dem entsprechenden anti-sense-Konstrukt transfiziert worden sind, verglichen, dokumentiert und statistisch ausgewertet. Dabei werden die geschädigten Neurone mittels Doppelfluoreszenzfärbung (NeuN/TRITC bei Experimenten mit nicht vormarkierten BV-2-Mikrogliazellen und EGFP-transfizierten primären Mikrogliazellen oder NeuN/FITC bei MR-vormarkierten BV-2-Mikrogliazellen) identifiziert. Der Vergleich des Ausmaßes der neuronalen Schädigung in den verschiedenen experimentellen Gruppen (Suprakultivierung mit Kontroll-Vektor-Mikrogliazellen/anti-sense-Vektor-Mikrogliazellen/ohne Suprakultivierung) ermöglicht eine Beurteilung der neuroprotektiven und -toxischen Wirkungen, wobei durch Vergleich mit der festgestellten mikroglialen Invasion in das Gebiet der Neurodegeneration auch eine Aussage über die Korrelation mit dem Migrationsverhalten möglich ist.

3.5.4. Zeitplan

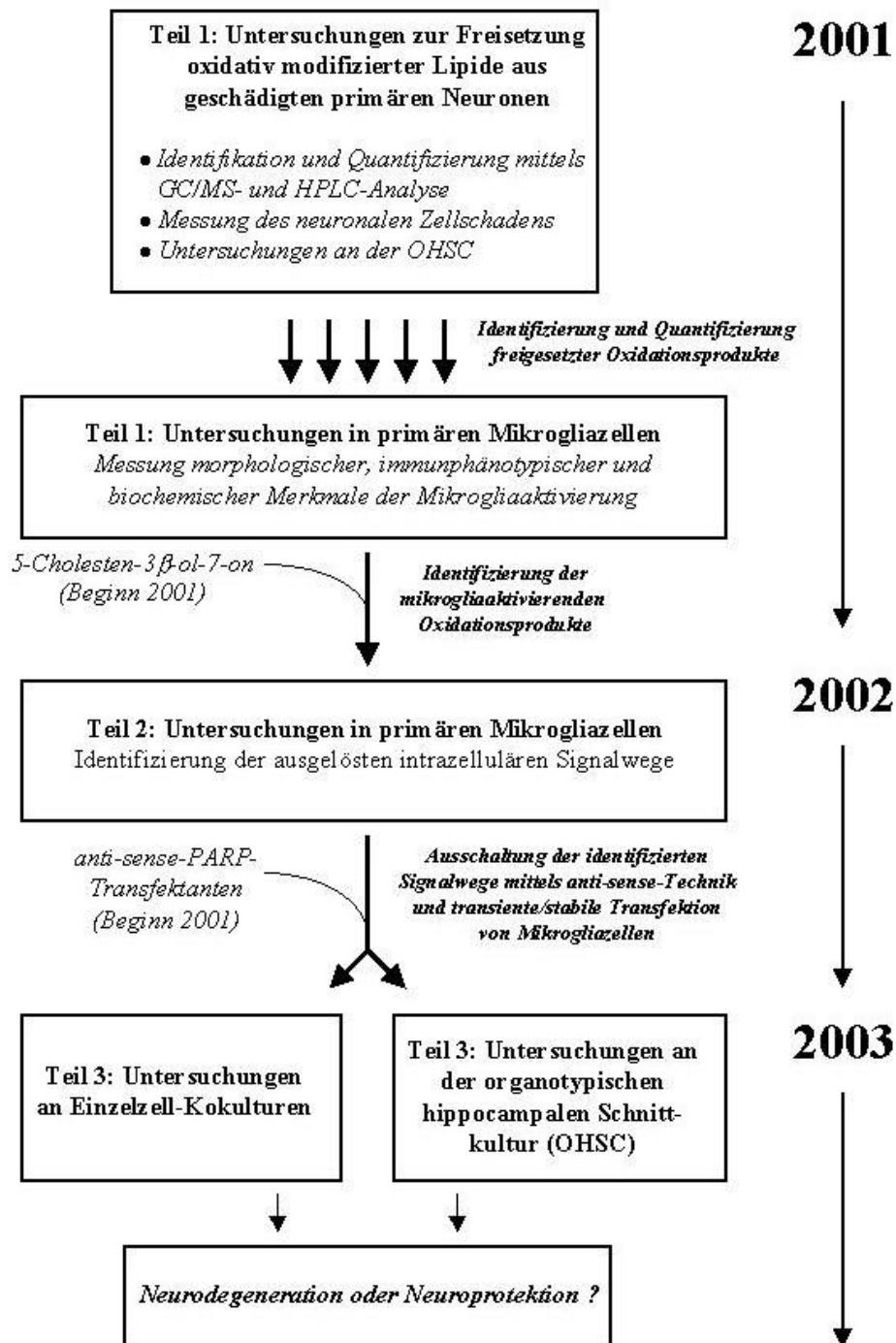
Da für alle drei Hauptschritte dieses Projektes bereits spezifische Vorarbeiten vorliegen, kann sofort mit der Arbeit an allen Stufen des experimentellen Programmes begonnen werden. So ist aus einer umfangreichen Versuchsreihe bekannt, daß bei demyelinisierenden Erkrankungen Cholesteroxidationsprodukte, darunter hauptsächlich das 5-Cholesten-3 β -ol-7-on (7-Ketocholesterol) freigesetzt wird, während Vorversuche mit exzitotoxisch geschädigten HT22-Zellen ebenfalls zur Freisetzung von Cholesteroxidationsprodukten führen. Aus der Literatur ist bekannt, daß aldehydische Lipidperoxidationsprodukte ebenfalls in großen Mengen im Rahmen neuronaler Schädigung entstehen und freigesetzt werden (Yoshino et al., 1997). Daher kann mit Teil 2 (Identifikation der beteiligten mikroglialen Signalwege) bereits begonnen werden, während die Experimente zu Teil 1 die Identifizierung, Kinetik, Verteilung, Zusammensetzung und Quantität der Oxidationsprodukte im Detail untersuchen. Dabei können auf Mikrogliaaktivierung positiv getestete Produkte anschließend in Teil 2 weiter untersucht werden. Aufgrund der Vielzahl möglicher oxidativer Endprodukte des Cholesterols und aldehydischer Endprodukte der ungesättigten Fettsäuren der Membranphospholipide wird die Auswahl der in Teil 1 näher untersuchten Produkte aufgrund der Kriterien der nachgewiesenen Menge und Stärke der Mikrogliaaktivierung in der Einzelzellkultur getroffen werden müssen. Hinsichtlich von Teil 2 liegen wiederum erste Erkenntnisse zur Beteiligung des PARP-Signalings an der Mikrogliaaktivierung vor, während Vorversuche eine Aktivierung der PARP in isolierten Zellkernen aus HT-22-Zellen gezeigt haben. Da hier bereits eine stabil transfizierte BV-2-Zelllinie vorliegt, kann damit bereits auch in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur gearbeitet werden (Teil 3). Zeitversetzt können in Teil 2 erfolgreich identifizierte Signalwege in BV-2-Zellen mittels anti-sense-Technik funktionell stabil ausgeschaltet werden und dann in der Komplexschnittkultur auf ihre funktionelle Bedeutung getestet werden. Aufgrund des geplanten annähernd zeitgleichen Beginns aller Projektteile ist so eine hohe Arbeitsdichte und Effizienz möglich, während neue, in Teil 1 identifizierte Mikroglia-aktivierende Produkte in dem beantragten Förderungszeitraum bis zur funktionellen Charakterisierung in der Komplexschnittkultur gelangen können (Teil 3).

Folgende Seite: Übersicht über den Arbeits- und Zeitplan

Im Falle eines noch unbekanntes und im Teil 1 neu identifizierten und quantifizierten mikrogliaaktivierenden Lipidoxidationsproduktes können die Untersuchungen der ausgelösten mikroglialen Signalwege (Teil 2) sowie die funktionellen Untersuchungen zu Fragen der Neurodegeneration/Neuroprotektion der identifizierten Signalwege (Teil 3) innerhalb des Antragszeitraumes vorgenommen werden (rechte Spalte mit Jahreszahlen).

Aufgrund der vorhandenen Vorarbeiten kann zu Projektbeginn bereits sowohl mit der Untersuchung der durch Cholesteroxidationsprodukte, vor allem 5-Cholesten-3 β -ol-7-on, ausgelösten mikroglialen Signalwege (Teil 2), sowie mit Untersuchungen an der hippocampalen Schnittkultur (Teil 3) mit anti-sense-PARP-transfizierten Mikrogliazellen begonnen werden (linke Spalte in kursiv).

Ein zentrale Entscheidungsstelle in diesem Projekt ist die Testung der identifizierten Lipidoxidationsprodukte in der primären Mikrogliazellkultur (Teil 1), wobei diejenigen Produkte zur weiteren Untersuchung (Teil 2 und 3) ausgewählt werden, die 1.) in ausreichender Menge, 2.) in einem bestimmten Zeitfenster von 3.) noch vitalen Neuronen freigesetzt werden, 4.) auch in organotypischen Schnittkulturen nachweisbar sind und 5.) eine hohe Mikroglia-aktivierende Potenz besitzen.



Übersicht über den Arbeits- und Zeitplan

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Eine Zusammenarbeit ist räumlich und methodisch mit dem Projekt B11 (Nitsch) vorgesehen. Mit Projekt A7 (Grune) besteht eine methodische Zusammenarbeit bei der Nutzung der HPLC. In Fragen der Mikroglia-aktivierenden Signalwege sind die Projekte B9 (Hanisch) und C7 (Eder) für eine inhaltliche Zusammenarbeit prädestiniert, um sowohl auf die vorliegenden großen Erfahrungen in diesen Gruppen aufzubauen, als auch um Synergieeffekte optimal zu nutzen. Aufgrund der zentralen Funktion der PARP in der ischämie-bedingten Neurotoxizität sowie für die Mikrogliaaktivierung bestehen bereits Kooperationsbeziehungen zu dem Projekt Dimagl/Priller (A5). Mit dem Projekt C3 (Heinemann) ist eine Zusammenarbeit bei der Detektion oxidativ geschädigter mitochondrialer Proteine und Lipide vereinbart. Die Arbeitsgruppe von Prof. Kettenmann (Projekt C8) ist bei der Etablierung der Neuronen-Mikroglia-Kokultur behilflich.

3.6 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

3.7

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
				IIa/2	1	42000	IIa/2	1	42000	IIa/2	1	42000
	Zus.:			Zus.:	1	42000	zus.:	1	42000	zus.:	1	42000
SV			Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM		
			522	25000		522	25000		522	52000		
I			Investitionsmittel Insges.			Investitionsmittel insges.			Investitionsmittel Insges.			
			-			-			-			

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig Seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾ (einschl. Hilfskräfte)	Dr.med. Dr.rer.nat. Oliver Ullrich	Neuroanatomie Biochemie	Anatomie	15	-	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾²⁾ (einschl. Hilfskräfte)	N.N.	Biologie oder Biochemie	Anatomie	40	-	IIa-O/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

¹⁾ Bitte durchnummerieren und Aufgabenbeschreibung nachfolgend erläutern

²⁾ Bitte Verfahrensgrundsätze der DFG zur Bezahlung wissenschaftl. Mitarbeiter beachten

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

1. Oliver Ullrich, Dr.med. Dr.rer.nat. Das Projekt wird von Herrn Ullrich geleitet und wissenschaftlich betreut. Das sehr umfangreiche Arbeitsprogramm dieses Projektes kann aufgrund seiner Lehrverpflichtungen im Fach Anatomie, der Leitung und Betreuung weiterer Projekte und der Anleitung von medizinischen und naturwissenschaftlichen Doktoranden des Instituts von ihm nicht völlig alleine bearbeitet werden. Er beherrscht alle im Projekt anzuwendenden Methoden, kann diese technisch und inhaltlich betreuen und wird sich neben der intensiven inhaltlichen und methodischen Betreuung des Doktoranden/der Doktorandin an allen experimentellen Arbeiten beteiligen. Insbesondere Methoden, die eine längere Einarbeitungszeit benötigen (z.B. die instrumentelle Analytik), wird er in der Anfangsphase des Projektes selbst durchführen.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

2. N.N. (BATIIa/2-Stelle) Diese Stelle ist für einen naturwissenschaftlichen Doktoranden (Biochemie/Biologie) vorgesehen, der nach entsprechender Anleitung einen Hauptteil der experimentellen Arbeiten durchführen soll. Die sehr umfangreichen Experimente bei gleichzeitig großer methodischer Breite erfordern ein gutes biochemisches und molekularbiologisches Grundwissen, um diese Arbeiten inhaltlich und methodisch bewältigen zu können. Daher können diese Aufgaben nur von einem naturwissenschaftlichen Doktoranden übernommen werden. Zu den Aufgaben des Doktoranden gehören die Aufrechterhaltung von Permanentzellkulturen, die Präparation und Kultivierung primärer Zellen, die Anwendung biochemischer Standardverfahren wie Immunoblots und Immunopräzipitationen, die Klonierung von anti-sense-Konstrukten und Transfektion in Mikrogliazellen, die Präparation und Kultivierung von organotypischen Komplexschnittkulturen und immunhistochemische Standardverfahren.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	2,000	2,000	2,000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	25,000	25,000	25,000

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben**Kennziffer 522 (Versuchstiere und Verbrauchsmaterial)**

Versuchstiere (neugeborene und P10-Mäuse)	2000,- DM
Zellkultur	
Verbrauchsmaterial	4000,- DM
Medien und Seren	3000,- DM
Antikörper für Proteinanalytik und Immunhistochemie	8000,- DM
Verbrauchsmaterialien und Chemikalien für die Elektrophorese	1500,- DM
Reagenzien für RNA/DNA-Isolierung	1500,- DM
Reagenzien und Enzyme für Klonierungen	2000,- DM
Grundbedarf	
Laborchemikalien	2000,- DM
Verbrauchsmaterial	1000,- DM
Summe	25000,- DM

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

Es werden keine Investitionen über DM 20.000 beantragt.

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt

3.1.1 Thema:

Physiologische Mechanismen der Lysophospholipid-vermittelten Aktivierung von Mikrogliazellen

3.1.2 Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Physiologie

3.1.3 Leiter/in:

PD Dr. rer. nat. Claudia Eder, geb.: 23.09.1965

Institut für Physiologie der Charité

Tucholskystr. 2

10117 Berlin

Tel.: 030-2802-6302

FAX: 030-2802-6669

Email: claudia.eder@charite.de

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

Ja, befristet bis zum: 07.06.2005

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	nein
Klinische Studien im Bereich der somatischen Zell- oder Gentherapie	nein
Tierversuche (Maus)	ja
Gentechnologische Versuche	nein

Eine Tierversuchsgenehmigung zur Durchführung der genannten Untersuchungen liegt vor (T 0391/98).

IV. Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

V.

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
2002	42,0	72,7		120,7
2003	42,0	24,0		72,0
2004	42,0	24,0		72,0

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Akute und chronische Hirnschädigungen sind von einer abgestuften Aktivierung der Mikrogliazellen begleitet. Neben Zytokinen könnten an der Regulation dieser Aktivierungszustände auch Lysophospholipide beteiligt sein, die unter pathologischen Bedingungen im zentralen Nervensystem vermehrt gebildet werden. Aus Untersuchungen an peripherem Gewebe ist bekannt, daß verschiedene Lysophospholipide in der Lage sind, Makrophagen zu aktivieren und die Generierung reaktiver Sauerstoffradikale auszulösen. Die physiologischen Mechanismen, die den Aktivierungsvorgängen der Mikrogliazellen unterliegen, sind bisher weitgehend unbekannt und sollen deshalb innerhalb dieses Projektes untersucht werden. Unter Anwendung von Patch-clamp und Video-Imaging Techniken sollen

die Ionenströme an Mikrogliazellen identifiziert werden, die unmittelbar nach Lysophospholipid-Applikation aktiviert werden. Es soll geklärt werden, ob die durch Lysophospholipide aktivierten Ionenkanäle an funktionellen Veränderungen der Mikrogliazellen beteiligt sind. Es wird untersucht, ob die Produktion freier Sauerstoffradikale Ca^{2+} abhängig ist und welche Rolle die Protonenkanäle für den respiratorischen Burst spielen. Es wird weiterhin überprüft, ob durch eine Blockade der Lysophospholipid-aktivierten Ionenströme Änderungen in den morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften der Mikrogliazellen verhindert werden können. Die Untersuchungen werden zunächst an isolierten kultivierten Mikrogliazellen durchgeführt. Spätere Untersuchungen an organotypischen Hirnschnittkulturen sollen zeigen, ob die aus der Einzelzellkultur gewonnenen Daten in gleicher Weise an Mikrogliazellen im Zellverband beobachtbar sind oder ob eine zusätzliche Modulation der Lysophospholipid-induzierten Mikrogliaantworten durch benachbarte Astrozyten und/oder Neurone auftritt.

3.3 Stand der Forschung

Mikrogliazellen, die ortsständigen immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems, befinden sich im gesunden adulten Gehirn in einem funktionellen Ruhezustand, der morphologisch durch eine starke Ramifizierung gekennzeichnet ist (Streit et al., 1999). Eine rasche Aktivierung der Mikrogliazellen wird durch akute Hirnschädigungen, zum Beispiel durch Infektion, Entzündung oder Ischämie, ausgelöst. Chronische neuroinflammatorische und degenerative Erkrankungen, wie Multiple Sklerose, HIV-assoziierte Demenz, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson u.a., sind ebenso von einer Aktivierung der Mikrogliazellen begleitet (Colton et al., 2000; Raivich et al., 1999; Streit et al., 1999; Stoll and Jander, 1999). Mittlerweile hat sich zunehmend die Vorstellung entwickelt, daß Mikrogliazellen verschiedene Aktivierungszustände einnehmen können (zur Übersicht, siehe Raivich et al., 1999). Charakteristische Merkmale aktivierter Mikrogliazellen sind die amöboide Morphologie, die Expression verschiedener Makrophagen-Oberflächenantigene sowie die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und zur Phagozytose von abgestorbenem Zellmaterial und Krankheitserregern (Raivich et al., 1999; Streit et al., 1999; Stoll and Jander, 1999). Neben den verschiedenen positiven Eigenschaften können Mikrogliazellen im aktivierten Zustand aber auch eine Reihe toxischer Substanzen sezernieren, die das Absterben der Neuronen begünstigen. Ein Beispiel sind die während des respiratorischen Bursts der Mikrogliazellen entstehenden freien Sauerstoffradikale, die eine schädigende Wirkung auf Neurone ausüben können (Colton et al., 2000).

Die Faktoren, die eine Aktivierung der Mikrogliazellen im Gehirn auslösen, sind bisher nicht vollständig identifiziert. Neben proinflammatorischen Zytokinen spielen wahrscheinlich Lysophospholipide eine wesentliche Rolle als Aktivierungsmediatoren. So konnte gezeigt werden, daß Mikroinjektionen von Lysophospholipiden in das Rückenmark von Mäusen eine rasche Immunantwort, einschließlich einer Mikrogliaaktivierung, auslösen (Ousman and David, 2000). In vitro Untersuchungen beweisen außerdem, daß Lysophospholipide in der Lage sind, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale in Makrophagen zu stimulieren (Racke et al., 2000). Im zentralen Nervensystem wurden Konzentrationsanstiege der Lysophospholipide unter pathophysiologischen Bedingungen, zum Beispiel infolge ischämischer Schädigungen oder während epileptischer Aktivität, ermittelt (Kinouchi et al., 1990; Martirosian et al., 1991; Sun et al., 1992). Die Lysophospholipide können im zentralen Nervensystem aus Diacylglycerol oder Phospholipiden infolge einer Aktivierung der Phospholipase A_2 bzw. der Phospholipase D gebildet werden. Darüber hinaus können sie durch aktivierte Blutplättchen und Leukozyten freigesetzt werden (Spiegel and Milstien, 1995; Moolenaar et al., 1997; Goetzl et al., 2000). Im Serum wurden Konzentrationen der Lysophospholipide von über $10 \mu\text{M}$ gemessen (Tokumura et al., 1994). Die Lysophospholipide können ihre Wirkung sowohl als intra- als auch als extrazelluläre Botenstoffe ausüben (Spiegel and Milstien, 1995; Goetzl and An, 1998). Die membranständigen EDG (endothelial differentiation gene) Rezeptoren, d.h. EDG 1-8, zeigen eine hohe Affinität für die Lysophospholipide Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA), wobei beide Stoffe an unterschiedliche Rezeptoren binden. S1P bindet bevorzugt an EDG 1, 3, 5, 6 und 8, wohingegen LPA an EDG 2, 4 und 7 bindet (Goetzl and An, 1998; Lynch and Im, 1999; Racke et al., 2000).

Es wurden vielfältige Änderungen der physiologischen Eigenschaften von Zellen durch Lysophospholipide beschrieben (Moolenaar et al., 1997). So wurden in Astrozyten und Erythrozyten Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in der Gegenwart von LPA gemessen (Manning and Sontheimer, 1997; Yang et al., 2000), in Fibroblasten konnte die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ Kanäle durch Lysophospholipide ausgelöst werden (Repp et al., 1998), und in verschiedenen Zellpräparationen

wurde die Öffnung von Cl Kanälen nach extrazellulärer Applikation von LPA beobachtet (Durieux et al., 1992).

Eine Vielzahl von Hinweisen belegt die Bedeutung von Ionenkanälen für die Realisierung verschiedenster Zellfunktionen. An Immunzellen wurde gezeigt, daß spannungsaktivierte K^+ Kanäle für die Zellproliferation sowie für die Sekretion von Zytokinen notwendig sind (Chandy et al., 1993). Desweiteren ist der Ca^{2+} Einstrom durch Ca^{2+} -freisetzungs-aktivierte Ca^{2+} Kanäle eine Voraussetzung für die erfolgreiche Antigenpräsentation der Immunzellen (Lewis and Cahalan, 1995). In den phagozytisch aktiven Neutrophilen kann die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale durch die Blockade spannungsaktivierter Protonenströme inhibiert werden (Henderson et al., 1988). Neben diesen *in vitro* Befunden zeigen erste *in vivo* Untersuchungen, daß die spezifische Inhibition von Kaliumkanälen zur Immunsuppression führt (Koo et al., 1997) und in einem Modell der Multiplen Sklerose die durch T Lymphozyten ausgelösten Krankheitssymptome verhindert (Beeton et al., 2001). Dies legt einen therapeutischen Nutzen von Ionenkanalinhibitoren für die Behandlung immunologischer Erkrankungen nahe.

Seit etwa 10 Jahren werden die physiologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen untersucht (Kettenmann et al., 1990). Mit Hilfe von Patch-clamp-Experimenten wurde nachgewiesen, daß Mikrogliazellen in der Lage sind, verschiedene Ionenkanäle zu exprimieren, die selektiv K^+ , H^+ , Na^+ , Ca^{2+} oder Cl leiten (zur Übersicht, siehe Eder, 1998). An isolierten kultivierten Mikrogliazellen wie auch an Mikrogliazellen aus Hirnschnittpräparaten wurde beobachtet, daß sich die Kaliumkanal-Expressionsmuster nach Aktivierung der Zellen mit Bakterienwand-Bestandteilen (Nörenberg et al., 1992; Draheim et al., 1999; Prinz et al., 1999), mit proinflammatorischen Zytokinen (Fischer et al., 1995), nach Durchtrennung des Nervus facialis (Boucein et al., 2000) oder infolge einer Ischämie (Lyons et al., 2000) drastisch ändern. Die während der Aktivierung neu exprimierten K^+ Auswärtskanäle spielen offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Proliferation der Mikrogliazellen (Kotecha and Schlichter, 1999).

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß

- **Lysophospholipide offensichtlich eine rasche und abgestufte Aktivierung der Mikrogliazellen auslösen;**
- **Ionenkanäle an den Aktivierungsprozessen der Mikrogliazellen vermutlich eine wichtige Rolle spielen;**
- **eine Modulation der Ionenkanäle zur Unterdrückung der Sauerstoffradikalfreisetzung in Zukunft auch klinische Relevanz erlangen könnte.**

Zitierte Literatur:

- Beeton C, Barbaria J, Giraud P, Devaux J, Benoliel AM, Gola M, Sabatier JM, Bernard D, Crest M, Beraud E (2001) Selective blocking of voltage-gated K^+ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J. Immunol.* 166: 936-944.
- Boucein C, Kettenmann H, Nolte C (2000) Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur. J. Neurosci.* 12: 2049-2058.
- Chandy KG, Gutman GA, Grissmer S (1993) Physiological role, molecular structure and evolutionary relationships of voltage-gated potassium channels in T lymphocytes. *Sem. Neurosci.* 5: 125-134.
- Colton CA, Chernyshev ON, Gilbert DL, Vitek MP (2000) Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899: 292-307.
- Draheim HJ, Prinz M, Weber JR, Weiser T, Kettenmann H, Hanisch UK (1999) Induction of potassium channels in mouse brain microglia: cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* 89: 1379-1390.
- Durieux ME, Salafranca MN, Lynch KR, Moorman JR (1992) Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive Ca^{2+} -activated Cl current in *Xenopus laevis* oocytes. *Am. J. Physiol.* 263: C896-C900.
- Eder C (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am. J. Physiol.* 275: C327-C342.
- Fischer HG, Eder C, Hadding U, Heinemann U (1995) Cytokine-dependent K^+ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 64: 183-191.
- Goetzl E J, An S (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* 12: 1589-1598.

- Goetzl EJ, Kong Y, Voice JK (2000) Cutting edge: differential constitutive expression of functional receptors for lysophosphatidic acid by human blood lymphocytes. *J. Immunol.* 164: 4996-4999.
- Henderson LM, Chappell JB, Jones OTG (1988) Superoxide generation by the electrogenic NADPH oxidase of human neutrophils is limited by the movement of a compensating charge. *Biochem. J.* 255: 285-290.
- Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg G (1990) Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J. Neurosci. Res.* 26: 278-287.
- Kinouchi H, Imaizumi S, Yoshimoto T, Yamamoto H, Motomiya M (1990) Changes of polyphosphoinositides, lysophospholipid, and free fatty acids in transient cerebral ischemia of rat brain. *Mol. Chem. Neuropathol.* 12: 215-228.
- Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotna A, Shah K, Mulvany K, Hora D, Cunningham P, Wunderler DL, McManus OB, Slaughter R, Bugianesi R, Felix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer MS, Feeney W (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* 158: 5120-5128.
- Kotecha SA, Schlichter LC (1999) A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. *J. Neurosci.* 19: 10680-10693.
- Lewis RS, Cahalan MD (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 623-653.
- Lynch K R, Im DS (1999) Life on the Edg. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 473-475.
- Lyons SA, Pastor A, Ohlemeyer C, Kann O, Wiegand F, Prass K, Knapp F, Kettenmann H, Dirnagl U (2000) Distinct physiologic properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20: 1537-1549.
- Manning TJ Jr, Sontheimer H (1997) Bovine serum albumin and lysophosphatidic acid stimulate calcium mobilization and reversal of c-AMP-induced stellation in rat spinal cord astrocytes. *Glia.* 20:163-172.
- Martirosian MA, Ovsepian LM, Sarkisian LV, Khanbabian MV, Karagezian KG (1991) Qualitative and quantitative changes in phospholipid spectra of the brain of rats with corazol-induced epilepsy. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 111: 7-9.
- Moolenaar W H, Kranenburg O, Postma FR, Zondag G (1997) Lysophosphatidic acid: G protein signaling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 168-173.
- Nörenberg W, Gebicke-Haerter PJ, Illes P (1992) Inflammatory stimuli induce a new K⁺ outward current in cultured rat microglia. *Neurosci Lett.* 147: 171-174.
- Ousman SS, David S (2000) Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia.*30: 92-104.
- Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK (1999) Microglial activation by components of gram-positive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58: 1078-1089.
- Racke K, Hammermann R, Juergens UR (2000) Potential role of EDG receptors and lysophospholipids as their endogenous ligands in the respiratory tract. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 13: 99-114.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* 30: 77-105.
- Repp H, Koschinski A, Decker K, Dreyer F (1998) Activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ current in mouse fibroblasts by lysophosphatidic acid requires a pertussis toxin-sensitive G protein and Ras. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358: 509-517.
- Spiegel S, Milstien S (1995) Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *J. Membr. Biol.* 146: 225-237.
- Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.* 58: 233-247.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 57: 563-581.
- Sun GY, Lu FL, Lin SE, Ko MR (1992) Decapitation ischemia-induced release of free fatty acids in mouse brain. Relationship with diacylglycerols and lysophospholipids. *Mol. Chem. Neuropathol.* 17: 39-50.

- Tokumura A, Iimori M, Nishioka Y, Kitahara M, Sakashita M, Tanaka S (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am. J. Physiol.* 267: C204-C210.
- Yang L, Andrews DA, Low PS (2000) Lysophosphatidic acid opens a Ca^{++} channel in human erythrocytes. *Blood* 95: 2420-2425.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Etablierung eines *in vitro* Modells isolierter deaktivierter Mikrogliazellen

Da sich unbehandelte kultivierte Mikrogliazellen bereits in einem partiell aktivierten Zustand befinden, ist dieses Modell ungeeignet zur Untersuchung von Aktivierungsprozessen der Mikroglia. Wir etablierten deshalb zunächst ein *in vitro* Modell für isolierte Mikrogliazellen, die Charakteristika ruhender Mikrogliazellen *in vivo* besitzen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Nitsch konnten wir zeigen, daß die Behandlung mit astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) zur Deaktivierung der Mikroglia führt. Diese Deaktivierungsprozesse beinhalten unter anderem den Übergang von der amöboiden in die ramifizierte Zellmorphologie sowie die Herunterregulation verschiedener Makrophagen-Oberflächenantigene, einschließlich der MHC Klasse II Moleküle und der Adhäsionsmoleküle Leukozyten-Funktionsantigen-1 (LFA-1) und interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) (Eder et al., 1997a; 1999). Es gelang uns ebenfalls, die löslichen astrozytären Faktoren zu identifizieren, die eine solche Deaktivierung der Mikrogliazellen bewirken (Schilling, Nitsch, Heinemann, Haas, Eder, in Vorbereitung). Unter Anwendung von neutralisierenden Antikörpern, die gegen verschiedene Zytokine gerichtet waren, fanden wir heraus, daß die nach ACM-Applikation beobachteten morphologischen Veränderungen, d.h. die Ramifizierung, der Mikroglia durch die gemeinsame Wirkung der Zytokine Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (M-CSF), Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) und transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β) ausgelöst wurden. Die MHC Klasse II Moleküle wurden durch die von Astrozyten sezernierten Zytokine TGF- β und M-CSF herunterreguliert, wohingegen GM-CSF keinen Einfluß auf die Expression der MHC Moleküle hatte.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß sich nach der Applikation von astrozyten-konditioniertem Medium oder durch die gemeinsame Gabe der Zytokine M-CSF, GM-CSF und TGF-b die Möglichkeit ergibt, isolierte deaktivierte Mikrogliazellen in Zellkultur zu untersuchen.

Charakterisierung der Ionenkanäle in Mikrogliazellen

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit mehreren Jahren mit den physiologischen Eigenschaften kultivierter Mikrogliazellen. Dabei war bisher von besonderem Interesse, welche Ionenkanäle in Mikrogliazellen exprimiert werden, ob sich die Expression bestimmter Kanäle mit dem funktionellen Stadium der Zellen verändert, und welche funktionelle Bedeutung die verschiedenen Ionenkanäle der Mikrogliazellen besitzen.

Unter Anwendung von Patch-clamp-Untersuchungen konnten wir zeigen, daß aktivierte und deaktiverte kultivierte Mikrogliazellen durch einen unterschiedlichen Ionenkanalbesatz charakterisiert sind, sowie daß sich die Expressionsniveaus einiger Ionenkanäle im Verlauf der Aktivierungs- und Deaktivierungsprozesse der Mikrogliazellen ändern. Mikrogliazellen, die durch die Kultivierung mit den Wachstumsfaktoren M-CSF oder GM-CSF in verschiedene immunologische Funktionszustände gebracht wurden, zeigten wesentliche Unterschiede in der Expression der K^+ Kanäle: Die mit M-CSF kultivierten ruhenden Mikrogliazellen exprimierten einen ausgeprägten einwärtsgerichteten K^+ Kanal, jedoch keinen spannungsaktivierten Kalium-Auswärtskanal (Eder et al., 1995a; Fischer et al., 1995). Im Gegensatz dazu, wurde in den zur Antigenpräsentation fähigen GM-CSF-aktivierten Mikrogliazellen ein auswärtsgerichteter K^+ Kanal exprimiert, während der einwärtsgerichtete K^+ Kanal nur selten nachgewiesen werden konnte (Eder et al., 1995b; Fischer et al., 1995).

Interessanterweise wurde ein K^+ Auswärtskanal, der die gleichen Eigenschaften wie der entsprechende Kanal in GM-CSF-aktivierten Mikrogliazellen aufwies, während der Deaktivierung der Mikrogliazellen mit astrozyten-konditioniertem Medium transient hochreguliert (Eder et al., 1997a,

1999). Die Expression des Auswärtskaliumkanals in ACM-behandelten Mikrogliazellen wurde durch das von Astrozyten sezernierte antiinflammatorische Zytokin TGF- β ausgelöst (Schilling, Nitsch, Heinemann, Haas, Eder, in Vorbereitung). Um eine genaue Identifikation der Kanäle zu ermöglichen, wurden die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der Ionenströme in Mikrogliazellen detailliert beschrieben (Eder et al., 1995a, 1995b, 1996; 1997b; Eder and Heinemann, 1996; Schilling et al., 2000). Die K^+ Kanäle wurden zusätzlich auf molekularer Ebene identifiziert, und es zeigte sich, daß der einwärtsgerichtete K^+ Kanal durch das Gen Kir2.1 und der auswärtsgerichtete K^+ Kanal durch das Gen Kv1.3 kodiert ist (Schilling et al., 2000).

Parallel zur Hochregulation der Kv1.3 K^+ Kanäle wurde nach Behandlung der Mikrogliazellen mit ACM eine Herunterregulation der spannungsabhängigen Protonenkanäle beobachtet (Klee et al., 1999). Die verringerte Expression der Protonenkanäle in deaktivierten Mikrogliazellen ist auf Membranumbauprozesse zurückzuführen. Verringerte H^+ -Stromdichten begleitet von einer verlangsamten Aktivierungskinetik der H^+ Ströme wurden ebenfalls in Mikrogliazellen nach Zerstörung des Zytoskeletts durch Cytochalasin B oder Kolchizin beobachtet (Klee et al., 1998).

Neben der Identifizierung und Charakterisierung von K^+ , H^+ und Cl Kanälen kultivierter Mikrogliazellen (zur Übersicht, siehe Eder, 1998, 2001; Eder and DeCoursey, 2001) konnten wir außerdem erste Erkenntnisse zur funktionellen Bedeutung von Ionenkanälen in Mikrogliazellen gewinnen. Es zeigte sich, daß die Ramifizierung der Mikrogliazellen durch das astrozyten-konditionierte Medium während einer Blockade von dehnungsaktivierten Cl Kanälen nicht induziert werden konnte, was auf eine Beteiligung der Cl Kanäle an morphologischen Umbauprozessen der Zellen schließen läßt (Eder et al., 1998).

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die gewonnenen Erkenntnisse über die Expressionsmuster der Ionenkanäle zu bestimmten Funktionszuständen der Mikrogliazellen uns nun ermöglichen, den Fragen nachzugehen,

- **welche der exprimierten Ionenkanäle unmittelbar infolge einer Stimulation der Mikrogliazellen funktionell aktiv werden;**
- **welche funktionelle Rolle die Ionenkanäle während der Aktivierungsprozesse der Mikrogliazellen spielen;**
- **inwieweit eine Inhibition der Ionenkanalaktivität das Verhalten der Mikrogliazellen verändert.**

Vorarbeiten zur Wirkung von Lysophosphatidsäure und Sphingosin-1-phosphat auf Mikrogliazellen

Erste Vorarbeiten zur Wirkung von Lysophospholipiden auf die elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen wurden durchgeführt. Es zeigte sich, daß die extrazelluläre Applikation der Lysophospholipide Sphingosin-1-phosphat und Lysophosphatidsäure bereits in nanomolaren, d.h. physiologisch relevanten, Konzentrationen komplexe Änderungen des Ruhemembranpotentials der Mikrogliazellen auslöst. In Voltage-clamp-Experimenten wurde die Aktivierung eines noch nicht genau identifizierten Ionenstroms nach LPA- oder S1P-Applikation beobachtet. Diese Veränderungen konnten mit Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration korreliert werden. Zusätzlich konnte eine Deramifizierung, d.h. der Übergang von der ramifizierten in die amöboide Morphologie, der Mikrogliazellen in Gegenwart der Lysophospholipide festgestellt werden.

Zitierte Literatur:

- Eder C (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). Am. J. Physiol. (Cell Physiol.) 275: C327-C342.
- Eder C (2001) Microglial ion channels. In: Microglia in the degenerating and regenerating CNS. (Ed.: Streit W.J.), Springer-Verlag, New York, in press.
- Eder C, DeCoursey TE (2001) Voltage-gated proton channels in microglia. Prog. Neurobiol., in press.
- Eder C, Fischer HG, Hadding U, Heinemann U (1995a) Properties of voltage-gated currents of microglia developed using macrophage colony-stimulating factor. Pflügers Arch. 430: 526-533.

- Eder C, Fischer HG, Hadding U, Heinemann U (1995b) Properties of voltage-gated potassium currents of microglia differentiated with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Membr. Biol.* 147: 137-146.
- Eder C, Heinemann U (1996) Proton modulation of outward K^+ currents in interferon- γ -activated microglia. *Neurosci. Lett.* 206: 101-104.
- Eder C, Klee R, Heinemann U (1996) Blockade of voltage-gated outward K^+ currents of ramified microglia by scorpion peptide toxins. *Neurosci. Lett.* 219: 29-32.
- Eder C, Klee R, Heinemann U (1997a) Distinct soluble factors induce expression of outward K^+ currents and ramification of brain macrophages. *Neurosci Lett.* 226: 147-150.
- Eder C, Klee R, Heinemann U (1997b) 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 (1998) Involvement of stretch-activated Cl^- channels in ramification of murine microglia. *J. Neurosci.* 18: 7127-7137.
- Eder C, Schilling T, Heinemann U, Haas D, Hailer N, Nitsch R (1999) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 11: 4251-4261.
- Fischer HG, Eder C, Hadding U, Heinemann U (1995) Cytokine-dependent K^+ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 64: 183-191.
- Klee R, Heinemann U, Eder C (1998) Changes in proton currents in murine microglia induced by cytoskeletal disruptive agents. *Neurosci. Lett.* 247: 191-194.
- Klee R, Heinemann U, Eder C (1999) Voltage-gated proton currents in microglia of distinct morphology and functional state. *Neuroscience* 91: 1415-1424.
- Schilling T, Quandt FN, Cherny VV, Zhou W, Heinemann U, DeCoursey TE, Eder C (2000) Upregulation of $Kv1.3$ channels in microglia deactivated by $TGF-\beta$. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 279: C1123-C1134.

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Das Ziel des vorliegenden Antrages ist die Aufklärung der funktionellen Bedeutung der Ionenkanäle für Aktivierungsprozesse der Mikrogliazellen nach Stimulation mit Lysophospholipiden. Dabei sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- (1) Welche Aktivierungszustände durchlaufen die Mikrogliazellen infolge einer Stimulation mit den Lysophospholipiden Sphingosin-1-phosphat und Lysophosphatidsäure, d.h. sind die Mikrogliazellen nach Stimulation mit den Lysophospholipiden in der Lage, reaktive Sauerstoffradikale zu generieren, Makrophagen-Oberflächenantigene verstärkt zu exprimieren und die amöboide Zellmorphologie einzunehmen?
- (2) Welche Ionenströme werden unmittelbar durch eine Applikation von Lysophospholipiden in den Mikrogliazellen aktiviert? Gibt es nach der Lysophospholipidgabe Unterschiede im Öffnungsverhalten der Ionenkanäle zwischen den unstimulierten deaktivierten Mikrogliazellen und den mit Interferon- γ -vorbehandelten aktivierten Mikrogliazellen?
- (3) Über welche Rezeptoren werden die Lysophospholipid-induzierten Änderungen im Aktivierungsverhalten der Ionenkanäle vermittelt?
- (4) Können die unter Punkt (1) genannten Aktivierungszustände der Mikrogliazellen durch Ionenkanalinhibition bzw. -modulation beeinflusst werden?
- (5) Inwieweit lassen sich die aus der Einzelzellkultur gewonnenen Daten auf Mikrogliazellen im Gewebeverband der organotypischen Hirnschnittkultur übertragen?

3.5.2 Methoden

Präparate:

Einzelzellkultur von Mikrogliazellen

Einzelzellkulturen von Mikrogliazellen aus NMRI-Mäusen werden in unserem Labor seit vielen Jahren routinemäßig angelegt. Dazu werden primäre Gehirnzellkulturen von neonatalen (P1-P4) NMRI Mäusen

zunächst kultiviert. Als exogener Wachstumsfaktor für die Mikrogliazellen wird der Makrophagenkoloniestimulierende Faktor verwendet. Nach etwa 10-14-tägiger Kultivierung in Primärkultur werden die Mikrogliazellen vom Astrozytenrasen abgelöst und anschließend in Sekundärkultur gebracht. Dazu werden die aus der Primärkultur gewonnenen Zellen in 24-well-Platten zu jeweils 3×10^4 Zellen auf Glasplättchen kultiviert. Die Kulturüberstände von Astrozytenkulturen werden gesammelt und als Astrozyten-konditioniertes Medium (ACM) zur Induzierung der Deaktivierung kultivierter Mikrogliazellen verwendet. In einem Teil der Untersuchungen werden die Mikrogliazellen in einen immunologisch aktivierten Zustand durch eine 24-48-stündige Behandlung mit Interferon- γ überführt.

Organotypische Hirnschnittkulturen

Organotypische Kulturen des Hippokampus und des entorhinalen Kortex-Hippokampuskomplexes werden routinemäßig in unserem Labor angefertigt. Für die Kulturen werden die Hirnschnittpräparate von juvenilen Tieren (NMRI-Mäuse; P7-P9) auf permeable Membranen ($0.4 \mu\text{m}$ Porengröße) ausgebreitet. Die Membranen werden in 6-well-Inkubationskammern gestellt und mit Kulturmedium unterschichtet, so daß die Schnitte von unten durch die Membran ernährt und von oben aus der Gasphase mit Sauerstoff versorgt werden. Die organotypischen Hirnschnittkulturen werden bis zu 6 Wochen in Kultur gehalten.

Meßmethoden:

Patch-clamp-Ableitungen

Die Messungen der Ionenströme und des Ruhemembranpotentials der Mikrogliazellen erfolgen mit Hilfe der Perforated-patch-clamp-Technik, wobei Nystatin oder Amphotericin B zur Poren-Bildung in die Zellmembranen benutzt werden. Diese Methode ist im Labor etabliert und wurde bereits für Ionenstrommessungen an Neuronen, Lymphozyten und Mikrogliazellen angewendet. Das Ruhemembranpotential der Zellen wird im Current-clamp-Modus bestimmt, während die Messungen der Ionenströme im Voltage-clamp-Modus durchgeführt werden.

Alle Messungen werden mit Hilfe eines EPC-9 Verstärkers durchgeführt, der über einen PC gesteuert ist. Die Meßdaten werden on-line digitalisiert und nachfolgend mit dem Programm Pulse/PulseFit analysiert. Es werden Patchpipetten aus Borosilikatglas verwendet. Die Patchelektroden werden mit einem vertikalen Elektrodenziehgerät angefertigt und unmittelbar vor den Messungen feuerpoliert.

Zur genaueren Charakterisierung der Ionenströme der Mikrogliazellen wird die Wirkung verschiedener Pharmaka untersucht. Diese Pharmaka werden extrazellulär über eine Superfusionspipette appliziert, die mit Hilfe eines zweiten Mikromanipulators in einer Entfernung von wenigen μm zur untersuchten Zelle positioniert wird. Somit wird ein rascher Lösungswechsel der die Zelle umgebenden Badlösung gewährleistet. Zur Ionenkanalinhibition werden folgende Pharmaka verwendet: Kaliotoxin und Noxiustoxin zur Blockade der K^+ -Auswärtskanäle; Ba^{2+} und Cs^+ zur Blockade der K^+ -Einwärtskanäle; Charybdotoxin und Iberiotoxin zur Blockade der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle; Gd^{3+} und La^{3+} zur Blockade der Ca^{2+} -freisetzungs-aktivierten Ca^{2+} -Kanäle; Zn^{2+} und Cd^{2+} zur Blockade der H^+ -Kanäle sowie DIDS, SITS, NPPB und Flufenaminsäure zur Blockade der Cl^- -Kanäle (Eder, 1998).

Imaging Experimente

Zur Messung der Sauerstoffradikal-Freisetzung sowie zur Bestimmung des intrazellulären pH Wertes oder der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) der Mikrogliazellen werden Imaging-Verfahren verwendet. Für die Einzelwellenlängen- und ratiometrischen Fluoreszenz-Messungen stellt uns Herr Heinemann einen Imaging-Meßplatz sowie seine methodische Expertise zur Verfügung. Die Sauerstoffradikalproduktion wird mit Hilfe der Farbstoffe Dichlorofluoreszeindiacetate (DCFDA) und Dihydrorhodamin-123 gemessen. Für die Bestimmung des intrazellulären pH Wertes werden die Farbstoffe BCECF oder SNARF verwendet und die Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden mit den Farbstoffen FURA2-AM oder Fluo-3 gemessen. Es ist vorgesehen, einen Teil dieser Messungen am Dual-Photon-Mikroskop durchzuführen.

Während der Imaging-Experimente wird der extrazelluläre pH kontrolliert. Zur Kontrolle des extrazellulären pH Wertes werden pH-sensitive Mikroelektroden verwendet. Die Sauerstoffradikalproduktion wird zusätzlich mit Hilfe von biochemischen Verfahren verifiziert. Diese Experimente werden in Kooperation mit Herrn Grune und Herrn Ullrich erfolgen.

Lysophospholipid-Behandlung:

Bei den Patch-clamp- und Imaging-Experimenten werden die Lysophospholipide Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) extrazellulär entweder durch eine Bolusapplikation oder über die Superfusionspipette im Konzentrationsbereich von 0.01-10 μM appliziert, um deren direkte Wirkungen auf das Öffnungsverhalten der Ionenkanäle und die Sauerstoffradikal-Freisetzung von Mikrogliazellen zu untersuchen. Zur Bestimmung der Effekte von Lysophospholipiden auf die morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften werden die Mikrogliazellen den Lysophospholipiden S1P oder LPA in gleichen Konzentrationen für eine Dauer von 10 min - 24 h ausgesetzt.

Bestimmung der EDG-Rezeptoren der Mikrogliazellen:

Die auf Mikrogliazellen exprimierten EDG-Rezeptoren werden mit Hilfe von RT-PCR Untersuchungen und Western Blot Analysen nachgewiesen. Diese Experimente werden im Rahmen einer seit mehreren Jahren bestehenden engen Kooperation mit Prof. T.E. DeCoursey am Rush Medical Center in Chicago durchgeführt. Zur Aufklärung der Frage, über welche Rezeptoren die Lysophospholipide S1P und LPA ihre Wirkungen erzielen, werden monoklonale Antikörper gegen die jeweils exprimierten EDG-Rezeptoren der Mikrogliazellen in Patch-clamp- und Imaging-Experimenten zur Anwendung kommen.

Charakterisierung morphologischer und immunzytochemischer Eigenschaften:

Alle Experimente zur Charakterisierung der morphologischen und immunzytochemischen Eigenschaften der Mikrogliazellen werden in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Nitsch im Institut für Anatomie durchgeführt. Der Ramifikationsindex wird nach der von Herrn Nitsch und Kollegen entwickelten Methode bestimmt und bietet ein Maß für den Grad der Ramifizierung der Mikrogliazellen. Dazu wird zunächst die Fläche der Mikrogliazelle ermittelt und durch die konvexe Fläche geteilt, die nach Verbindung aller Ausläufer der Zelle entsteht (Eder et al., 1999). Die immunzytochemischen Untersuchungen werden an fixierten Mikrogliazellen 8-48 Stunden nach Lysophospholipidbehandlung durchgeführt. Es werden die Färbeintensitäten der Mikrogliazellen für das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), das leukozytenfunktionsassoziierte Antigen-1 (LFA-1) und Haupthistokompatibilitäts-Moleküle (MHC Moleküle) der Klasse II ermittelt (Eder et al., 1999).

3.5.3 Arbeitsprogramm**(1) Aktivierung der Mikrogliazellen durch Lysophospholipide**

In dieser Studie soll geklärt werden, in welchem Maße Lysophospholipide verschiedene Aktivierungszustände der Mikrogliazellen auslösen. Folgende Aktivierungszustände werden analysiert: die Fähigkeit der Zellen zur Generierung des respiratorischen Bursts, der Übergang von der ramifizierten in die amöboide Zellmorphologie sowie die Hochregulation der Makrophagen-Oberflächenantigene LFA-1, ICAM-1 und MHC Klasse II Moleküle.

In Imaging-Experimenten wird unter Anwendung der Farbstoffe DCFDA oder Dihydrorhodamin-123 untersucht, ob kultivierte Mikrogliazellen nach der Stimulation mit Lysophospholipiden einen respiratorischen Burst generieren, d.h. reaktive Sauerstoffradikale freisetzen. Diese Messungen werden zunächst an unstimulierten ramifizierten Mikrogliazellen durchgeführt. Da es bekannt ist, daß die Sauerstoffradikal-Freisetzung in Mikrogliazellen durch Vorbehandlung mit proinflammatorischen Zytokinen erhöht sein kann, wird in weiteren Experimenten geklärt, ob die Mikrogliazellen nach einer bereits erfolgten Aktivierung reaktive Sauerstoffradikale verstärkt nach Stimulation mit Lysophospholipiden freisetzen. Dazu werden die kultivierten Mikrogliazellen 24-48 h vor den Imaging-Messungen mit Interferon- γ aktiviert. Sowohl für die unstimulierten als auch für die Interferon- γ -aktivierten Mikrogliazellen werden die minimalen Konzentrationen der Lysophospholipide S1P und LPA bestimmt, die eine Freisetzung von Sauerstoffradikalen auslösen. Es wird ebenfalls untersucht, ob das Ausmaß der Radikalproduktion nach Lysophospholipid-Stimulation konzentrationsabhängig zunimmt. Die Lysophospholipide werden in physiologisch relevanten Konzentrationen zwischen 0.01 und 10 μM appliziert.

Desweiteren wird in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Nitsch der Ramifizierungsgrad der Mikrogliazellen durch Bestimmung des Ramifikationsindex vor und zu bestimmten Zeiten (10 min - 48 h) nach der Applikation von S1P oder LPA beurteilt. Es sollen Aussagen getroffen werden, ob und in welchem Zeitrahmen die ramifizierten Mikrogliazellen durch

Lysophospholipid-Stimulation in den amöboiden Zustand übergehen. Zur Bestimmung des Aktivierungsgrades der Mikrogliazellen werden zusätzlich die Expressionsniveaus der Oberflächenantigene LFA-1, ICAM-1 und MHC Klasse II Moleküle bestimmt. Die zu erwartende verstärkte Expression dieser Makrophagen-Oberflächenantigene nach S1P- und LPA-Stimulation gilt als weiterer Beweis für die erfolgte Mikrogliaaktivierung. In diesen Experimenten werden die Färbintensitäten für die entsprechenden Adhäsions- und MHC Moleküle 8 - 48 h nach Lysophospholipid-Behandlung der Zellen bestimmt und mit den Farbintensitätswerten der unbehandelten Mikrogliazellen verglichen. Die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von S1P und LPA auf die morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften der Mikrogliazellen soll ebenfalls untersucht werden. Auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Wirkung der beiden Lysophospholipide S1P und LPA wird bei allen Untersuchungen geachtet.

(2) Veränderungen der physiologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen durch Lysophospholipide

Ziel dieser Studie ist die Identifikation der Ionenströme, die unmittelbar nach Lysophospholipid-Applikation aktiviert werden. Über Änderungen im Öffnungsverhalten von Ionenkanälen, die infolge einer Mikroglia-Aktivierung ausgelöst werden, gibt es bisher wenig Erkenntnisse. Unter Anwendung der Perforated-patch-clamp-Technik, bei der das intrazelluläre Milieu im wesentlichen unverändert bleibt, wird das Ruhemembranpotential der Mikrogliazellen im Current-clamp-Modus bestimmt. Es wird untersucht, ob sich das Ruhemembranpotential der Mikrogliazellen ändert infolge einer Behandlung mit Lysophospholipiden in den entsprechenden Konzentrationen, die den respiratorischen Burst bzw. die Veränderungen der morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften der Mikroglia auslösen. Eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials in hyperpolarisierende oder depolarisierende Richtung gibt erste Hinweise auf eine wahrscheinliche Aktivierung bestimmter Ionenkanäle nach S1P- oder LPA-Applikation. Mit Hilfe von Voltage-clamp-Messungen werden anschließend die durch die Lysophospholipide aktivierten Ionenkanäle anhand der kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der Ionenströme identifiziert. Um eine erfolgreiche Bearbeitung der Punkte (4) und (5) des Arbeitsprogrammes zu gewährleisten, ist es außerdem wichtig, für die jeweiligen durch S1P oder LPA aktivierten Ionenkanäle geeignete Inhibitoren zu finden, die möglichst hochselektiv nur einen Ionenkanaltyp blockieren. Zur Inhibition der spannungsabhängigen K^+ -Auswärtskanäle werden Kaliotoxin oder Noxiustoxin verwendet; die K^+ -Einwärtskanäle werden mit Ba^{2+} oder Cs^+ inhibiert; Charybdotoxin oder Iberiotoxin dienen zur Blockade der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle; mit Hilfe von Gd^{3+} oder La^{3+} können Ca^{2+} -freisetzungsaktivierte Ca^{2+} (CRAC) Kanäle blockiert werden; die spannungsabhängigen H^+ -Kanäle werden durch nano- bis mikromolare Konzentrationen von Zn^{2+} oder Cd^{2+} inhibiert; und DIDS, SITS, NPPB oder Flufenaminsäure eignen sich zur Blockade der Cl^- -Kanäle.

Zusätzlich wird in kombinierten Perforated-patch-clamp- und Imaging-Experimenten untersucht, welche Ionenströme während der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen aktiviert werden. Besonderes Augenmerk wird auf die Aktivierung von spannungsabhängigen Protonenströmen gesetzt. Während der Freisetzung der reaktiven Sauerstoffradikale kommt es aufgrund der Aktivität der NADPH Oxidase zur Ansäuerung des intrazellulären Milieus. Es ist deshalb zu vermuten, daß die Protonenkanäle während der Generierung des respiratorischen Bursts aktiviert werden und damit zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH und des Ruhemembranpotentials beitragen. Die Veränderungen des intrazellulären pH Wertes während der Generierung des respiratorischen Bursts werden durch pH Imaging-Experimente unter Anwendung des Farbstoffes BCECF verfolgt oder anhand des Umkehrpotentials der Protonenströme ermittelt. Mit Hilfe von Ca^{2+} Imaging Experimenten wird untersucht, ob die Sauerstoffradikalfreisetzung ein Ca^{2+} -abhängiger Prozeß ist. Es wird geklärt, ob Lysophospholipid-induzierte Erhöhungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} Speicher oder/und durch einen Ca^{2+} -Einstrom durch CRAC Kanäle aus dem extrazellulärem Milieu entstehen.

Die Messungen des Ruhemembranpotentials werden nach Lysophospholipid-Stimulation über einen langen Zeitraum verfolgt, da möglicherweise die physiologischen Prozesse zur Induktion der morphologischen und immunphänotypischen Veränderungen der Mikrogliazellen langsam verlaufen. Da dehnungsaktivierte Cl^- Kanäle bei der Ramifizierung der Mikrogliazellen eine wesentliche Rolle spielen, ist eine Aktivität dieser Cl^- Kanäle auch während der De-Ramifizierung, d.h. während des Überganges der Mikrogliazellen von der ramifizierten in die amöboide Morphologie, zu erwarten.

(3) Bestimmung der in Mikroglia exprimierten EDG Rezeptoren

Es ist das Ziel dieser Untersuchungen herauszufinden, über welche extrazellulären Rezeptoren die Lysophospholipide ihre Wirkungen vermitteln. In Kooperation mit Prof. DeCoursey werden zunächst mit Hilfe der RT-PCR Methode die mRNAs bestimmt, die für EDG Rezeptoren kodieren. In nachfolgenden Western Blot Analysen werden die entsprechenden EDG-Rezeptor-Proteine der Mikrogliazellen nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse soll nachfolgend herausgefunden werden, über welche EDG Rezeptoren die Lysophospholipide Änderungen der physiologischen Eigenschaften von Mikrogliazellen auslösen. Es werden die unter Punkt (2) beschriebenen elektrophysiologischen Experimente zur Bestimmung des Ruhemembranpotentials und der Ionenstromaktivierung sowie die Ca^{2+} und pH Imaging-Experimente in Gegenwart von Antikörpern, die gegen die jeweiligen in Mikroglia exprimierten EDG Rezeptoren gerichtet sind, durchgeführt und die entsprechenden Effekte nach Lysophospholipid-Applikation verfolgt.

(4) Funktionelle Bedeutung der Ionenkanäle für die durch Lysophospholipide ausgelösten Aktivierungszustände der Mikrogliazellen

In den folgenden Experimenten soll überprüft werden, ob eine Blockade der durch Lysophospholipide aktivierten Ionenkanäle die funktionellen Zustände der Mikrogliazellen verändert. In dieser Studie sollen die Hypothesen überprüft werden, daß funktionell aktive Protonenkanäle für die Sauerstoffradikalfreisetzung der Mikrogliazellen notwendig sind und daß funktionelle Cl^- Kanäle am Übergang der Zellen von der ramifizierten in die amöboide Morphologie beteiligt sind. Es soll außerdem geklärt werden, ob weitere Ionenkanäle eine wesentliche Rolle für die durch Lysophospholipide ausgelösten Aktivierungsprozesse spielen.

Es werden die unter Punkt (1) beschriebenen Imaging- Messungen zur Generierung des respiratorischen Bursts der Mikrogliazellen durchgeführt, wobei sich im extrazellulären Medium Inhibitoren der Ionenkanäle befinden, die während der Sauerstoffradikalproduktion der Mikrogliazellen aktiviert wurden (die Ionenkanalinhibitoren sind unter Punkt (2) aufgelistet). Es wird die Hypothese überprüft, daß eine Inhibition spannungsaktivierter Protonenkanäle die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale verhindert. Es soll auch überprüft werden, ob die Generierung der reaktiven Sauerstoffradikale durch Änderungen des Membranpotentials oder des intrazellulären pH Wertes der Zellen moduliert werden kann.

Durch Zugabe von Ionenkanalblockern zum extrazellulären Medium soll weiterhin ermittelt werden, ob der Übergang von der ramifizierten in die amöboide Morphologie der Mikrogliazellen infolge der Stimulation mit Lysophospholipiden aufgehalten werden kann. Es wird die Hypothese verfolgt, daß eine Blockade der dehnungsaktivierten Cl^- Kanäle die Deramifizierung der Mikrogliazellen verhindert. Es wird außerdem untersucht, ob die durch Lysophospholipide ausgelöste Expression von Makrophagen-Oberflächenantigenen in der Gegenwart von Ionenkanalblockern nicht erfolgen kann. Es wird weiterhin überprüft, ob durch eine Inhibition der Sauerstoffradikal-Freisetzung auch die nachfolgenden Lysophospholipid-induzierten Aktivierungsprozesse der Mikrogliazellen, d.h. die Änderungen der morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften, inhibiert werden.

(5) Untersuchung der Wirkung von Lysophospholipiden auf Mikrogliazellen in organotypischen Hirnschnittkulturen

In dieser Studie ist die Untersuchung der Wirkung von Lysophospholipiden auf Mikrogliazellen unter *in situ* Bedingungen geplant. Diese Experimente sollen zeigen, ob die aus der Einzelzellkultur gewonnenen Daten in gleicher Weise an Mikrogliazellen im Zellverband beobachtbar sind oder ob eine zusätzliche Modulation der Lysophospholipid-induzierten Mikrogliaantworten durch benachbarte Astrozyten und/oder Neurone auftritt. Es soll herausgefunden werden, ob die Mikrogliazellen in organotypischen Hirnschnitten infolge der Stimulation mit Lysophospholipiden Sauerstoffradikale freisetzen, in die amöboide Morphologie übergehen und Makrophagen-Oberflächenantigene exprimieren. Es wird außerdem untersucht, welche Ionenkanäle an diesen Prozessen der Mikroglia-Aktivierung beteiligt sind.

In organotypischen Hirnschnittkulturen sollen zunächst nach der von Herrn Nitsch und Kollegen etablierten Methode Mini-Ruby-vormarkierte Mikrogliazellen einwandern und in den Ruhezustand gelangen. An diesen vormarkierten Mikrogliazellen werden Patch-clamp-Untersuchungen durchgeführt,

wobei wiederum ermittelt werden soll, welche Ionenströme infolge einer Stimulation mit Lysophospholipiden direkt aktiviert werden. Falls erforderlich, werden diese Untersuchungen mit Hilfe des Dual-Photon-Mikroskopes durchgeführt, anderenfalls an Meßplätzen, die eine visuelle Kontrolle der Patch-clamp-Ableitungen ermöglichen. Die Freisetzung der reaktiven Sauerstoffradikale durch vormarkierte Mikrogliazellen wird in den organotypischen Hirnschnittkulturen mit Hilfe von Imaging-Experimenten unter Verwendung des Dual-Photon-Mikroskopes visualisiert. Gleichzeitige Perforated-patch-clamp-Ableitungen ermöglichen es, das Aktivierungsverhalten von Ionenkanälen während der Generierung des respiratorischen Bursts in Hirnschnitten zu untersuchen. Es wird weiterhin überprüft, ob eine Behandlung von organotypischen Hirnschnittkulturen mit den Lysophospholipiden S1P oder LPA Änderungen der morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften der Mikrogliazellen auslösen. Desweiteren wird untersucht (analog zu den unter Punkt (4) beschriebenen Experimenten), inwieweit die durch Lysophospholipide ausgelösten Aktivierungszustände der Mikrogliazellen durch eine entsprechende Ionenkanalblockade inhibierbar sind.

3.5.4 Zeitplan

In der ersten Hälfte des Antragszeitraumes wird die Wirkung der Lysophospholipide auf isolierte kultivierte Mikrogliazellen unter Anwendung der Patch-clamp- und Imaging-Techniken untersucht. Die Arbeiten zur Untersuchung des Einflusses der Lysophospholipide auf die morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften der Mikrogliazellen werden parallel zu den elektrophysiologischen und den Imaging-Experimenten durchgeführt. Die Untersuchungen an den isolierten kultivierten Mikrogliazellen werden die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen zur Wirkung von Lysophospholipiden auf Mikrogliazellen in organotypischen Hirnschnittkulturen bilden. Die Untersuchungen an den organotypischen Hirnschnittkulturen werden voraussichtlich in der zweiten Hälfte der Antragsperiode durchgeführt.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Zur Bearbeitung dieses Projektes ist eine sehr enge Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Herrn Heinemann und Herrn Nitsch erforderlich. Die bereits bestehenden intensiven Kooperationen mit beiden Arbeitsgruppen sollen auch weiterhin sowohl methodisch als auch inhaltlich erfolgen. Möglichkeiten für eine Zusammenarbeit ergeben sich auch mit Herrn Grune und Herrn Ullrich bei der Aufklärung von Prozessen der Sauerstoffradikal-Freisetzung. Desweiteren werden uns die Erfahrungen von Herrn Kettenmann zu den Patch-clamp-Untersuchungen von Mikrogliazellen an Hirnschnittpräparaten zugute kommen.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
				BAT IIa/2	1	42.000	BAT IIa/2	1	42.000	BAT IIa/2	1	42.000
	zus.:			zus.:	1	42.000	zus.:	1	42.000	zus.:	1	42.000
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	
				522	24.000	522	24.000	522	24.000			
				515	48.700	-	-	-	-			
				zus.:	72.700	zus.:	24.000	zus.:	24.000			
I				Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel Insges.		Investitionsmittel insges.				
				-		-		-				

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Eder, Claudia, Dr. rer. nat., wissenschaftl. Assistentin	Physiologie	Institut für Physiologie	20		C1
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	Latta, Sieglinde, MTA		Institut für Physiologie	20		BAT IVa
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	N.N., Doktorand (X)	Physiologie	Institut für Physiologie	20		BAT IIa/2
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter ¹⁾						

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Dr. Claudia Eder übernimmt die Planung und Leitung der Arbeiten des Teilprojektes. Sie ist an der Durchführung von Versuchen beteiligt, wird die Einarbeitung und Betreuung des Doktoranden übernehmen und erstellt die Publikationen.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Frau Sieglinde Latta, medizinisch-technische Assistentin, hilft bei der Herstellung der primären und sekundären Mikrogliaulturen sowie der organotypischen Hirnschnittkulturen.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

NN, naturwissenschaftliche/r Doktorand/in (BATIIa/2)

Es wird die Stelle eines wissenschaftlichen Doktoranden beantragt. Der Doktorand soll die vorgesehenen Patch-clamp- und Imaging-Experimente durchführen. Im Rahmen der Kooperation mit Prof. Nitsch, wird sich der Doktorand außerdem an der Durchführung der Arbeiten zur morphologischen und immunphänotypischen Charakterisierung der Mikrogliazellen beteiligen.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

-entfällt-

3.7.2 Aufteilung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsaufgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	6.000.-	6.000.-	6000.-
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausrüstung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausrüstung	72.700.-	24.000.-	24.000.-

(Alle Angaben in DM)

Ergänzungsausrüstung

Kennziffer 515 – Kleingeräte bis 20.000,00 DM (brutto)

1. EPC-9 Verstärker	DM 19.500.-
2. Tectronics Oszilloskop TDS 210	DM 2.700.-
3. Narishige-Mikromanipulator MHW-103	DM 12.500.-
4. Narishige-Elektrodenziehgerät	DM 5.500.-
5. Newport-schwingungsgedämpfter Tisch	DM 8.500.-

In dem beantragten Projekt ist geplant, Patch-clamp- und Imaging-Experimente an einem Meßplatz parallel durchzuführen. Zur Ermöglichung einer gleichzeitigen Durchführung dieser Experimente

C7 Eder

muß der uns zur Verfügung stehende Imaging-Meßplatz für Patch-clamp-Ableitungen mit einem EPC-9 Meßverstärker und einem Oszilloskop ausgerüstet werden. Der Mikromanipulator dient der Halterung und Manipulation der Patch-pipetten. Die Patch-pipetten sollen unmittelbar vor den Messungen mit einem vertikalen zweistufigen Elektrodenziehgerät angefertigt werden. Der schwingungsfreie Tisch ist für die Patch-clamp-Experimente erforderlich.

	Gesamt:	DM 48.700.-
Versuchstiere (NMRI-Mäuse, Charles River)		DM 2000.-
Kennziffer 522 – Verbrauchsmittel		
1. Verbrauchsmaterial für die Zellkultur (Einmal-Plastikmaterial, Medien, Seren, Millipore-Membranen, Glasbehälter, Pipetten, etc.)		DM 4500.-
2. Farbstoffe für Imaging-Experimente (BCECF, DCFDA, Dihydrorhodamin-123, FURA2-AM, etc.)		DM 3200.-
3. Ionenkanal-Inhibitoren (CTX, KTX, NTX, IBX, DIDS, SITS, NPPB, etc.)		DM 2800.-
4. Chemikalien (Chemikalien für Messlösungen, Zytokine)		DM 2000.-
5. Elektrodenglas (Patch-Elektroden; Silberdraht, Thetaglas, Ionenaustauscher für pH-sensitive Elektroden)		DM 1000.-
6. Substanzen für Immunzytochemie (primäre und sekundäre Antikörper)		DM 2500.-
7. Gase (CO ₂ , Carbogen für Zellkultur und Hirnschnittexperimente)		DM 3000.-
8. Optische und mechanische Bauteile (Filter, Manipulatorteile, etc.)		DM 2000.-
9. Dokumentation		DM 1000.-
	Gesamt:	DM 24.000.-

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

-entfällt-

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C 8

3.1.1 Thema:

Physiologische Eigenschaften glialer Tumore

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung: Neurowissenschaften

Zelluläre Neurowissenschaften

3.1.3 Leiter/in:

Prof. Dr. Helmut Kettenmann
Forschungsgruppe Zelluläre Neurowissenschaften
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Robert-Rössle-Str. 10
D-13092 Berlin-Buch
Telefon: 030 9406 3325
Fax: 030 9406 3819
eMail: hketten@mdc-berlin.de

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

Nein.

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

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

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

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
1995	57 900	14 900	-	72 800
1996	115 800	29 800	-	145 600
1997	115 800	29 800	-	145 600
1998	124 800	25 000	-	149 800
1999	129 600	25 000	-	154 600
2000	132 600	25 000	-	157 600
2001	136 800	25 000	-	161 800
Zwischen-summe	813 300	174 500		987 800
2002	136.800	25 000		161 800
2003	136 800	25 000		161 800
2004	136 800	25 000		161 800

3.2 Zusammenfassung

Das Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es herauszufinden, wie sich Tumorzellen in Interaktion mit Hirnzellen verändern. Ein Schwerpunkt wird sein, zwischen Zellen zu unterscheiden, die im Tumorzentrum verbleiben und denen, die solitär über große Distanzen im Hirngewebe wandern. Dieses Projekt untergliedert sich in folgende Teilbereiche:

1. Die Entwicklung eines Kulturmodells, in dem die Interaktion zwischen Tumorzellen und Hirngewebe unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersucht werden kann.
2. Die Bedeutung der Expression von GABA-Rezeptoren für das Verhalten der Tumorzellen und die Identifizierung der neuronalen Signale, die die Rezeptorexpression induzieren.
3. Untersuchungen zur funktionellen Expression von GABA Transportern.
4. Suche nach Kandidatengen, die das Migrationsverhalten der Tumorzellen kontrollieren. Dieser Projektteil wird in enger Interaktion mit der Arbeitsgruppe von Deimling durchgeführt.
5. Untersuchungen zu GABA Rezeptoren und zum Transkriptionsfaktor ETS-1 als Kandidaten für Migrationskontrolle.

3.3 Stand der Forschung

Gliome sind bei weitem die häufigsten Tumore des Zentralen Nervensystems. Wie der Begriff andeutet, geht man davon aus, dass sie von Gliazellen abstammen. Dabei unterscheidet man zwischen Astrozytomen, Oligodendrogliomen, Glioblastomen und Ependymomen. Letztere stellen die wohl aggressivste Form des Glioms dar. Während die intrinsischen Hirntumore praktisch nicht metastasieren, das heisst in andere Organe einwandern, begründet sich ihre Aggressivität jedoch auf ihr invasives Verhalten innerhalb des Hirnparenchyms. Daher ist das größte klinische Problem die diffuse Infiltration des Gehirns. Als Konsequenz ergibt sich, dass die Grenzen zwischen Tumor und gesundem Gewebe fließend sind und es daher für den Neurochirurgen unmöglich ist, alle Gliomzellen zu entfernen. Ähnliche Probleme wirft die Bestrahlung auf, da die Tumorzellen weite Bereiche des gesunden Gewebes infiltrieren und die Grenze dieser Infiltration unscharf definiert ist. Als Konsequenz liegt die Überlebensrate der Patienten nach der Operation in der Größenordnung von 1/2 Jahr. Über die Kontrollfaktoren, die die Invasion von Gliomzellen in das Hirnparenchym steuern, ist bisher wenig bekannt. Neue Ansätze wie die Kokultivierung von Hirnschnitten mit Tumorsphäroiden (Matsumura et al., 2000) oder der Einsatz transfizierter, veränderter Gliomzellen (Senner et al., 2000) geben neue Möglichkeiten, diese Fragen anzugehen. Das Ziel unseres Antrages ist daher zu verstehen, wie sich

Tumorzellen in der Gehirnumgebung verändern und welche Faktoren das starke infiltrative Verhalten kontrollieren.

Wir untersuchen in diesem Antrag zwei Moleküle, von denen wir Hinweise haben, daß sie das Tumorverhalten beeinflussen. GABA Rezeptoren als Kandidaten für Proliferationskontrollfaktoren ergaben sich aus unserer Arbeit. GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS von Vertebraten; darüberhinaus gibt es immer mehr Hinweise, daß GABA auch als Differenzierungs- und Proliferationskontrollfaktor wirken kann. Die Differenzierung von monoaminergen Neuronen wird durch GABA beschleunigt und dieser Effekt wird über GABA_A Rezeptoren vermittelt (Liu et al., 1997). Aktivierung von GABA_A Rezeptoren kann den proliferativen Effekt von bFGF bei kortikalen Vorläuferzellen inhibieren, und dies führt zu einer erhöhten Anzahl differenzierter Neurone. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, daß bFGF die Zellproliferation stimuliert und GABA die Zellproduktion reguliert, indem es als Feedback Signal die Zellteilung stoppt (Antonopoulos et al., 1997). Ein direkter Effekt auf Zellproliferation wurde auch beschrieben. GABA_A Rezeptor-Aktivierung kann die Proliferation von Astrozyten stimulieren, und diese proliferative Aktivität kann durch Benzodiazepine wie Diazepam oder DMCM moduliert werden (Gandolfo et al., 1999). Die Arbeitsgruppe von Sontheimer hat einen Chloridkanal beschrieben, der spezifisch von Gliomzellen exprimiert wird. Die Expression des Kanals ist an den proliferativen Status der Zellen gekoppelt: Die Aktivität der Kanäle änderte sich mit dem Übergang in die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (Ullrich and Sontheimer, 1997; Ullrich et al., 1998). Dies deutet darauf hin, daß der Ionenfluss durch spannungs- und ligandengesteuerte Chloridkanäle die Eigenschaften von Tumorzellen beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist wichtig, daß Chloridkanäle auch in einem erheblichen Maße permeabel für Bikarbonat sind und daß Bikarbonatströme zu erheblichen intrazellulären pH Verschiebungen führen (Kaila et al., 1993).

Der Transkriptionsfaktor ETS-1 steht in Zusammenhang mit Tumorinvasion und Angiogenese und wird mit der Migrationkontrolle bei verschiedenen Zellen in Verbindung gebracht (Dittmer et al., 1998). In einer Studie an menschlichem Tumormaterial zeigte sich eine Korrelation zwischen der Malignität von Astrozytomen und der Expression des Transkriptionsfaktors (Kitange et al., 1999). Dieser Zusammenhang findet sich auch in anderen Tumoren (z. B. Pande et al., 1999; Nakano et al., 2000).

Literatur

- Anatonopoulos J, Pappas I, Parnavelas J. Activation of the GABAA receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. (1997) *Eur. J. Neurosci.*: 9:291-298.
- Dittmer J. et al. Ets transcription factors and human disease. (1998) *Bioch. et Biophys. Acta* 1377. F1-F11.
- Gandolfo P, Patte C, Thoumas J, Leprince J, Vaudry H, Tonon M. (1999) The endozepine ODN stimulates [3H]thymidine incorporation in cultured rat. *Neuropharmacology*. 38:725-732.
- Kaila K, Voipio J, Paalasmaa P, Pasternack M, Deisz R. A. (1993) The role of bicarbonate in GABA_A receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones. *J. Physiol.* 464: 273-89.
- Kitange G, Kishikawa M, Nakayama T, Naito S, Iseki M, Shibata S (1999) Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors. *Mod. Pathol.* 12: 618-626
- Liu J, Morrow A, Devaud L, Grayson D, Lauder J. (1997) GABAA receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons *J. Neurosci.* 17:2420-2428.
- Matsumura H; Ohnishi T; Kanemura Y; Maruno M; Yoshimine T (2000), Quantitative analysis of glioma cell invasion by confocal laser scanning microscopy in a novel brain slice model, *Biochem-Biophys-Res-Commun.* Mar 16; 269(2): 513-20.
- Nakano T, Abe M, Tanaka K, Shineha R, Satomi S, Sato Y. (2000) Angiogenesis inhibition by transdominant mutant Ets-1. *J. Cell Physiol.*: 184: 255-262.
- Pande P, Mathur M, Shukla N. K, Ralhan R. (1999) Ets-1: a plausible marker of invasive potential and lymph node metastasis in human oral squamous cell carcinomas. *J. Pathol.*: 189: 40-45.
- Senner V; Sturm A; Hoess N; Wassmann H; Paulus W. (2000) In vivo glioma model enabling regulated gene expression. *Acta Neuropathol.*: 99: 603-608.
- Ullrich N, Bordey A, Gillespie G. Y., Sontheimer H. (1998) Expression of voltage-activated chloride currents in acute slices of human gliomas. *Neurosci.* 83: 161-173.
- Ullrich N, Sontheimer H. (1997) Cell cycle-dependent expression of a glioma-specific chloride current: proposed link to cytoskeletal changes. *Am. J. Physiol.* 273: C1290-1297.

3.4 Eigene Vorarbeiten

siehe Arbeitsbericht

Eigene Arbeiten zum Antragsthema:

- Labrakakis C., Patt S., Hartmann J. and Kettenmann H. (1998) Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. *Eur. J. Neurosci.* 10:2153-2162.
- Labrakakis C., Patt S., Hartmann J. and Kettenmann H. (1998) Functional GABA_A receptors on human glioma cells. *Eur. J. Neurosci.* 10:231-238.
- Fleige G., Ch. Nolte, M. Synowitz, F. Seeberger, H. Kettenmann and C. Zimmer, MR Imaging of activated microglia in experimental gliomas
- Synowitz M., Matyash M., Hofmann B., Zimmer C., Kirchhoff F., Kiwit J.C. and Kettenmann H., Glioma cells acquire functional GABA_A receptors after injection into the rat brain, zur Publikation eingereicht.

Publikationen, die aus der Interaktion im SFB entstanden sind:

- Schmidt-Ott K.M., Tuschick S., Kirchhoff F., Verkhratsky A., Liefeldt L., Kettenmann H. and Paul M. (1998): Single-cell characterization of endothelin system gene expression in the cerebellum in situ. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31(S1): S363-S366.
- Draheim H. J., Prinz M., Weber J.R., Weiser T., Kettenmann H. and Hanisch U.-K. (1999) Induction of K⁺ channels in mouse brain microglia: cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neurosci.* 89:1379-1390
- Prinz M., Kann O., Draheim H., Schumann R., Kettenmann H., Weber J. and U.-K. Hanisch (1999) Microglial activation by components of Gram-positive and -negative bacteria: Distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J. Neuropath. and Experimental Neurology*, 58:1078 –1089.
- Lyons, S. A., A. Pastor, O. Kann, C. Ohlemeyer, F. Wiegand, K. Prass, F. Knapp, H. Kettenmann and U. Dirnagl (2000) Distinct physiological properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion., *J. Cer. Blood Flow Met.*, 20:1537-1549.
- Stohwasser R., Giesebrecht J., Kraft R., Müller E.-C., Häusler K. G., Kettenmann H., Hanisch U.-K. and Kloetzel P.-M. (2000) Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon- γ and lipopolysaccharides. *Glia*, 29:355 - 365.
- Prinz M., Kann O., Draheim H. J., Schumann R. R., Kettenmann H., Weber J. R. and Hanisch U.-K. (2000) Activation of microglia by cell wall components of gram-positive bacteria: cytokine release, induction of membrane currents and and serum-dependence. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* in press
- Schmidt-Ott, K.-M., A. D. Xu, S. Tuschick, L. Liefeldt, W. Kresse, A. Verkhratsky, H. Kettenmann and M. Paul, Endothelin mimicks the hypoxia-induced morphological response in cultured astrocytes, *FASEB J.* in press

Weitere Publikationen mit Bezug auf das Antragsthema:

- Lyons S. A. and Kettenmann H. (1998) Oligodendroglia and microglia are particularly susceptible to combined hypoxia/hypoglycemia injury in vitro. *J. Cerbr. Blood Flow Metabolism*, 18:521-530.
- Pastor A., Kremer M., Kettenmann H. and Dermietzel R. (1998) Dye-coupling between spinal cord oligodendrocytes: Differences in coupling efficiency between gray and white matter. *Glia*, 24: 108-120.
- Prinz M., Hanisch U.-K., Kettenmann H. and Kirchhoff F. (1998): Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5. *Mol. Brain Res.* 63: 155-62.
- Toescu E., Möller T., Kettenmann H. and Verkhratsky A. (1998) Long-term activation of capacitive Ca²⁺ entry in mouse microglial cells. *Neurosci.* 86:925-935.
- Grosche J., Matyash V., Möller T., Verkhratsky A., Reichenbach A. and Kettenmann H. (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neurosci.* 2: 139-43.

- Kirischuk S., Kirchhoff F., Matyash V., Kettenmann H. and Verkhratsky A. (1999) Glutamate-triggered Ca^{2+} signals in Bergmann glial cells *in situ* are dominated by the metabotropic glutamate receptors MgluR1 and MgluR5. *Neurosci.* 92: 1051-1059.
- Schmidt K., Eulitz D., Veh R. W., Kettenmann H. and Kirchhoff F. (1999) Heterogenous expression of voltage-gated potassium channels of the shaker family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res.* 843:145-160.
- Möller T., Kann O., Verkhratsky A. and Kettenmann H. (2000) Activation of mouse microglial cells affects P2 receptor signaling. *Brain Res.* 853:49 – 59.
- Boucsein C., H. Kettenmann and Nolte, C. (2000) Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur. J. Neurosci.*, 12:2049-2058.
- Minelli A., S. Lyons., C. Nolte, A. Verkhratsky and H. Kettenmann (2000) Ammonium triggers calcium elevation in cultured mouse microglial cells by initiating Ca^{2+} release from thapsigargin-sensitive stores. *Pflügers Archiv*, 439: 370-377.
- Möller T., Kann O., Verkhratsky A. and Kettenmann H. (2000) Activation of mouse microglial cells affects P2 receptor signaling. *Brain Res.* 853:49 – 59.
- Reuss B., Leung D. S. Y., Kettenmann H. and Unsicker K. (2000) Regionally distinct regulation of astroglial neurotransmitter receptors by fibroblast growth factor-2. *MCN*, 16:42-58.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, P., Schipke, C., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.-K., Kirchhoff, F. and H. Kettenmann (2001) GFAP promotor controlled EGFP expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue, *GLIA* 33:72 – 86.
- Witting A., Müller P., Herrmann A., Kettenmann H. and Nolte C. (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages *in vitro*: involvement of carbohydrate, lectin and phosphatidylserine mediated recognition. *J. Neurochem.* 75:1060-1070.
- Mertsch, K., U. K. Hanisch, H. Kettenmann and J. Schnitzer, Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system, *J. Comp. Neurol.*, in press.
- Schipke C., Ohlemeyer C., Matyash M., Möller T., Nolte C., Kettenmann H. and Kirchhoff F. Astrocytes of the mouse cortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors, *FASEB J.*, in press.

3.5 Arbeitsprogramm

3.5 Ziele, Methoden, Arbeitsprogramm und Zeitplan

3.5.1 Ziele

Das Ziel dieses Forschungsvorhabens ist es herauszufinden, wie sich Tumorzellen in Interaktion mit Hirnzellen verändern. Ein Schwerpunkt wird sein, zwischen Zellen zu unterscheiden, die im Tumorzentrum verbleiben und denen, die solitär über große Distanzen im Hirngewebe wandern. Dieses Projekt gliedert sich in folgende Teilbereiche:

Schnittmodell zur Untersuchung von Tumorinfiltration

Wir haben bisher als Modelle akut isolierte humane Hirngewebe, das experimentelle Rattengliommodell und die Gliomzelllinien untersucht. Um einen besseren experimentellen Zugang zu den oben genannten Fragen zu erhalten, haben wir begonnen, ein neues Modellsystem einzusetzen, indem die Interaktion von Tumorzellen mit Hirnzellen und ihr Wanderungsverhalten besser untersucht werden kann. Wir lassen dazu Gliomzellen in Schnittkulturen einwandern und analysieren dann Veränderungen in ihrem Verhalten. Im ersten Schritt werden wir das Modell etablieren und die Bedingungen (1) für gutes Infiltrationsverhalten und (2) für eine nachfolgende Isolierung und Reinigung der infiltrierenden Zellen zu optimieren. Zur Isolierung mittels cell sorter hilft uns die stabile Fluoreszenzmarkierung der Gliomzellen mit EGFP. Als zweites Modell werden wir die Infiltration humaner Gliomzellen in immundefizienten Mäusen studieren.

Untersuchungen zur Bedeutung der GABA-Rezeptor-Expression für die Eigenschaften der Tumorzellen

Wir haben in der letzten Antragsperiode herausgefunden, dass der Kontakt zu Neuronen bei Tumorzellen die Expression funktioneller GABA_A-Rezeptoren induziert und diese Expression das Proliferationsverhalten beeinflusst. Durch Transfektion der Tumorzellen mit GABA Rezeptor-message wollen wir den Rezeptor in den Tumorzellen induzieren und dann das Verhalten der Zellen untersuchen.

In einem zweiten Ansatz wollen wir herausfinden, über welchen Mechanismus die Expression induziert wird. Dazu wenden wir das Schnittmodell an, von dem wir aus unseren vorläufigen Ergebnissen wissen, daß der Rezeptor nach Infiltration bei den Gliomzellen eingeschaltet wird. Da neuronaler Kontakt für die Induktion des Rezeptorsignals essentiell ist, planen wir knock-out Mäuse neuronale Zelladhäsionsmoleküle einzusetzen. Über eine Zusammenarbeit mit Prof. Schachner, Hamburg und Prof. Rathjen aus unserem Nachbarlabor haben wir Zugang zu diesen Tieren. Bei experimentellen Hirntumoren werden nicht in allen, sondern nur in einer Subpopulation von Gliomzellen GABA Rezeptoren induziert. Wir wollen nun herausfinden, ob diese Expression auch etwas mit dem Wanderungsverhalten der Tumorzellen zu tun hat. In einem Experiment mit Rattengliommodellen wollen wir überprüfen, ob sich ein signifikanter Unterschied zwischen im Tumor verbleibenden Zellen und migrierenden Zellen bezüglich der Expression dieses Rezeptors ergibt.

Untersuchung zur Expression von GABA Transportern

Die Konzentration von GABA im extrazellulären Raum des ZNS wird durch die Aktivität von GABA Transportern kontrolliert, die sowohl von Astrozyten als auch von Neuronen exprimiert werden. Bisher ist die Expression von GABA Transportern in Tumorzellen noch nicht untersucht worden, und wir wollen daher prüfen, ob Gliomzellen funktionelle GABA Transportsysteme exprimieren und ob diese Expression von der Hirnumgebung reguliert wird.

Untersuchung zu Kontrollfaktoren der Migration

Um neue Kandidatengene zu finden, die das Migrationsverhalten der Gliomzellen kontrollieren, planen wir eine enge Interaktion mit der Arbeitsgruppe von Deimling. Wir werden in dem Schnittmodell und im experimentellen Tumormodell migrierende und nicht-migrierende Tumorzellen isolieren und können diese mit denen vergleichen, die keinen Kontakt zu Hirngewebe haben. Die Arbeitsgruppe von Deimling wird diese Zellen molekularbiologisch bzgl. ihres veränderten Genmusters charakterisieren und differentiell exprimierte Gene charakterisieren. Wir werden dann aus diesen Kandidaten wie Rezeptoren oder Transkriptionsfaktoren auswählen und mit unseren physiologischen Methoden auf Funktionalität in den Hirnschnitten untersuchen. Parallel werden wir diese Untersuchungen auf das humane, frisch isolierte Gewebe und das experimentelle Rattengliommodell erweitern. Im letzteren können wir sehr klar zwischen den Zellen unterscheiden, die an der Injektionsstelle verblieben und solche, die über lange Distanzen gewandert sind.

Die beiden ersten von uns untersuchten Kandidatengene sind GABA Rezeptoren und der Transkriptionsfaktor ETS-1. Zu beiden Molekülen haben wir schon Vorarbeiten und damit Hinweise, daß sie von Tumorzellen exprimiert werden und daß ein Zusammenhang zu den zellbiologischen Eigenschaften von Tumoren besteht (siehe eigene Vorarbeiten). Für ETS-1 gibt es Hinweise, daß dieser Transkriptionsfaktor in anderen Tumoren die Wanderung von Zellen kontrolliert. Wir planen durch Ausschalten bzw. Überexpression des Transkriptionsfaktors herauszufinden, ob dieses Molekül ein Kontrollfaktor für die Wanderungen der Tumorzellen ist. Die Aktivität der GABA Rezeptoren können wir pharmakologisch blockieren bzw. aktivieren.

3.5.2 Methoden

Alle für diese Untersuchungen notwendigen Methoden stehen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Wir haben ein molekularbiologisches Labor, in dem wir die Vektoren herstellen und Zellen entsprechend transfizieren können. Die physiologischen Techniken sind bei uns seit langem etabliert. Das experimentelle Ratten-Gliom-Modell ist eingeführt, und die Injektionen werden routinemässig gemacht. Die Zellkultureinrichtungen für die Schnittkulturen wie auch zur Kultivierung der humanen bzw. tierischen Tumorzellen sind vorhanden. Der Einsatz aller dieser Techniken ist inzwischen ausreichend durch Publikationen aus der Arbeitsgruppe dokumentiert. Bezüglich der molekularbiologischen Charakterisierung werden wir eng mit der Gruppe von Deimling zusammenarbeiten.

3.5.3 Arbeitsprogramm

Schnittmodell zur Untersuchung von Tumorinfiltration

Wir planen ein neues Modell zu etablieren, in dem wir die Infiltration von Gliomzellen im Hirngewebe untersuchen können. Die zu Grunde liegende Idee besteht darin, einen Gewebeschnitt auf einen Monolayer von Gliomzellen aus einer Linie wie C6 und F98 aufzulegen. Wir werden dann zu bestimmten Zeitpunkten beobachten, wie die Zellen aus dem Monolayer in den Gewebeschnitt einwandern. Unsere

ersten Vorversuche zeigen, dass Kokultivierung von Rattencortexschnitten mit C6 Gliomzellen zu einer Einwanderung führt. Diese Einwanderung kann man entweder am lebenden Schnitt beobachten, oder die Schnitte zu definierten Zeitpunkten fixieren und dann auswerten. Zur Lebendbeobachtung wollen wir die 2-Photonentechnik einsetzen.

Zur Etablierung des Modells wollen wir in folgenden Schritten vorgehen:

1. Quantifizierung der Infiltration. Wir wollen die Zeitpunkte bestimmen, unter denen eine ausreichende Anzahl von Gliomzellen in den Schnitt einwandert, um eine gute statistische Analyse zu ermöglichen. Für die Auswertung soll der Schnitt wieder von dem Monolayer getrennt und im konfokalen Mikroskop analysiert werden.
2. Etablierung dieses Schnittmodells in der Maus. Da wir in Zukunft planen, transgene und knockout Tiere einzusetzen, müssen wir ein Mausmodell etablieren. Wir können zum einen die kommerziell erhältliche Zelllinie GL-261 (National Cancer Institute, Frederick, Maryland) einsetzen, die bei C57BL-6 Mäusen genutzt werden können. Darüberhinaus haben wir auch Kontakt aufgenommen mit Prof. Pilkington in London, der eine Mauszelllinie aus VMDk-Mäusen etabliert hat und sie uns schicken wird. Die Infiltration von Maustumorzellen scheint nicht den selben Bedingungen wie bei Ratten zu gehorchen, da bisher kaum experimentelle Maus-Tumor-Modelle beschrieben sind.
3. Variation des Hirngebietes. Wir werden uns die Frage stellen, in welche Hirngebiete Gliomzellen besser bzw. schlechter einwandern. Ein grober Vergleich wäre weisse Substanz gegen graue Substanz.
4. Wenn wir die Bedingungen gut etabliert haben, unter denen die Gliomzellen in die Schnitte infiltrieren, werden wir sie optimieren, um aus den Schnitten Einzelzellsuspensionen herzustellen und mittels cell sorter zu sortieren. Diesbezüglich haben wir schon Erfahrungen mit der Sortierung von Astrozyten aus Einzelzellsuspensionen. Wir werden daher ähnlich vorgehen und eine reine Population von Tumorzellen herstellen, die migratorisch aktiv waren. Dies ist Voraussetzung für unsere Interaktion mit der Gruppe von Deimling, die an diesen Modellen differentiell exprimierte Gene identifizieren wird.
5. Das Gliom-Nacktmaus-Modell ermöglicht die Untersuchung biologischer Eigenschaften humaner Gliomzellen unterschiedlicher Histologie, bei Erhalt tumorspezifischer Merkmale wie der Gliominvasion. Das U373_{EGFP}-Nacktmaus-Modell ermöglicht dabei das erste Mal die in-vivo-Charakterisierung humaner Gliomzellen, die weit in das gesunde Hirnparenchym vorgedrungen sind und sich dadurch der histologischen Untersuchung am toten Material entziehen. Die Untersuchung des Expressionsmusters von Oberflächenrezeptoren auf invadierenden Tumorzellen soll Aufschlüsse über die - für die Migration und Invasion wichtigen - Membraneigenschaften dieser Tumorzellen geben.

Untersuchungen zur Bedeutung der GABA-Rezeptor-Expression für die Eigenschaften der Tumorzellen
Wie im Arbeitsbericht beschrieben haben wir Hinweise auf den Einfluss der GABA_A Rezeptor- Aktivität und das Proliferationsverhalten. Wir wollen uns in diesem Antragsteil die Frage stellen, (1) ob rekombinante Expression von GABA Rezeptoren die Eigenschaften der Tumorzellen beeinflusst und (2) über welche Mechanismen neuronaler Kontakt die Expression des GABA Rezeptors induziert.

Wir planen dazu das Schnittmodell einzusetzen (siehe oben) und uns die Frage zu stellen, ob neuronale Zelladhäsionsmoleküle ein wichtiger Faktor sind. Durch Kokultivierung der Gliomzellen mit Schnitten aus knockout Tieren wollen wir bestimmen, ob die Expression in Abwesenheit von NCAM oder L1 eingeschaltet wird. Die Messung der funktionellen GABA_A Rezeptoren werden wir über Patch Clamp Technik durchführen, denn es ist gut möglich, einzelne Zellen in den Schnitten bezüglich ihrer GABA-induzierten Ströme zu charakterisieren. Alternativ zu Patch-Clamp-Untersuchungen in den Hirnschnitten können wir nach GABA-induzierten Strömen auch in akut isolierten Zellen suchen.

In einem zweiten Ansatz wollen wir durch Transfektion der Tumorzellen mit cDNA, die für GABA Rezeptoren kodiert sind, diese künstlich zur Expression bringen. Wir werden daher ein Plasmid einsetzen, das die α - und β -Untereinheiten des GABA_A Rezeptors enthält. Dieses Plasmid soll unter der Kontrolle des CMV-Promotors zur Expression gebracht werden. Wir hoffen durch Selektion eine stabile Transfektion der Tumorzellen zu erreichen, und somit haben wir die Möglichkeit zu untersuchen, ob diese Zellen ein anderes Proliferationsverhalten oder ein anderes Infiltrationsverhalten aufweisen. Um letzteres zu überprüfen, werden wir zum einen die transfizierten Gliomzellen im experimentellen Tiermodell einsetzen, das heisst die Zellen in den Cortex injizieren und das Tumorwachstum im Vergleich zu Kontrolltieren beobachten. In einem zweiten Schritt werden wir die Zellen mit den

Schnitten kokultivieren und uns die Frage stellen, ob die Zellen transfiziert mit dem GABA_A Rezeptor besser den Tumor infiltrieren.

GABA_A Rezeptoren und Glyzinrezeptoren sind beides Chlorid-Kanäle. Wir planen parallel zu der Transfektion der GABA_A Rezeptoren in einem zweiten Ansatz Glyzinrezeptoren zu transfizieren, um die Frage zu beantworten, ob es die Anwesenheit des Chloridkanals ist, die das Verhalten der Tumorzellen beeinflusst.

Untersuchung zur Expression von GABA Transportern

In einem ersten Schritt werden wir mit spezifischen Antikörpern gegen GAT 1-3 prüfen, ob man die Transporter immunzytochemisch nachweisen kann. Wir werden zum einen die C6 und F98 Linie prüfen, aber auch humanes Material aus unserer Kollaboration mit der Neurochirurgie in Berlin-Buch (Prof. Kiwit). Wir werden uns dabei auch die Frage stellen, ob es einen ähnlichen Regulationsmechanismus für die Transporter wie die Rezeptoren für GABA gibt, d.h. ob die Expression der Rezeptoren auf niedermaligne Tumore und Tumorzellen in Kontakt mit Neuronen beschränkt bleibt. Falls wir aus der Immunzytochemie Hinweise auf Rezeptoren finden, werden wir die Transporter mit physiologischen Methoden nachweisen. Da für Müllergliazellen beschrieben wurde, daß die Transporter elektrogen sind, d. h. daß man nach Aktivierung der Transporter einen Strom messen kann, werden wir die GABA- und Muscimol-Antworten mit der Patch-Clamp Technik in An- bzw. Abwesenheit von GABA Transporterblockern (wie z.B. β -Alanin, Nipecotic Acid) messen. Eine weitere Option besteht in der Registrierung der Na⁺ Konzentration mit Hilfe von bildgebenden Verfahren und dem Einsatz des Na⁺-sensitiven Farbstoffes SBFI, eine Technik, die schon in der Arbeitsgruppe eingesetzt wurde.

Untersuchung zu Kontrollfaktoren der Migration – GABA und ETS-1

Wie oben beschrieben, werden wir Kokulturen zwischen Gliomzellen und Hirnschnitten herstellen und das Wanderungsverhalten der GFP-markierten Zellen studieren. Wir können dazu in einer geheizten Kammer die Zellen über Stunden beobachten oder/und zu definierten Zeitpunkten fixieren und auswerten. Die Rolle von GABA bzgl. Migrationskontrolle überprüfen wir, indem wir die Schnitte mit einem Agonisten und Antagonisten für den GABA_A-Rezeptor, Muscimol und Bicuculline, inkubieren. Einen potentiellen Einfluß der GABA Transporter können wir überprüfen, indem wir GABA als Substrat in An- bzw. Abwesenheit von Transporterblockern wie β -Alanin und Nipecotic Acid einsetzen.

Den Einfluß von ETS-1 auf das Wanderungsverhalten prüfen wir durch den Einsatz von Sense und Antisense Konstrukten. Dazu werden Tumorzellen stabil mit dem Sense und Antisense Konstrukt transfiziert. Dabei werden diese Konstrukte jeweils mit einer grünen bzw. roten Variante des GFP markiert. Die Anwesenheit des Farbstoffes zeigt somit die Expression des Sense bzw. Antisense-Konstruktes an, und wir haben somit (grüne) Zellen, die ETS-1 überexprimieren und (rote) Zellen, bei denen die konstitutive Expression reduziert ist. Ein Gemisch dieser roten und grünen Zellen wird nun mit den Schnitten kokultiviert und die Invasion der Tumorzellen ausgewertet.

Untersuchung zu Kontrollfaktoren der Migration – neue Kandidaten

In Interaktion mit der Arbeitsgruppe von Deimling suchen wir nach weiteren Kontrollgenen und –faktoren für die Wanderung. Wir werden dazu die Fluoreszenz-markierten Zellen aus den Kokulturen über cell sorter reinigen und die Arbeitsgruppe von Deimling wird nach Genmustern suchen, die Unterschiede zwischen den migrierenden und stationären Zellen aufzeigen. Wir werden auch nach Unterschieden in den experimentellen Gliom-Modellen suchen. Wir können einzelne Zellen mit der Patch-Pipette aussaugen, die entweder sehr nahe an der Injektionsstelle sind oder über eine weite Distanz von der Injektionsstelle weggewandert sind. Es ist möglich, jeweils ca. 20 Zellen auszusaugen und zu sammeln. Alternativ können wir Zellen aus dem zentralen und dem peripheren Tumorbereich im cell sorter trennen. Auch dieses Material können wir der Arbeitsgruppe von Deimling zur Verfügung stellen. Falls Kandidatengene gefunden werden, werden wir ähnlich wie oben für ETS-1 beschrieben, diese auf ihre Bedeutung für die Wanderungskontrolle untersuchen.

3.5.4 Zeitplan

Wir werden als erstes das Schnittmodell zur Bestimmung der Interaktion zwischen Tumor- und Hirnzellen etablieren. Diese Untersuchungen werden ca. 6 Monate in Anspruch nehmen. Parallel dazu werden wir schon beginnen, die Expression der GABA Transporter nachzuweisen. Sobald das Modell etabliert ist, werden wir Zellen für die Kollaboration mit von Deimling herstellen. Danach werden wir die

Untersuchungen zu der Bedeutung der GABA Rezeptoren und des Transkriptionsfaktors ETS-1 durchführen.

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. Es wird darüber hinaus nur Tumorgewebe von Patienten verwendet, die präoperativ ihr Einverständnis dafür erteilt haben. 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 Untersuchungen an Tieren

Der Tierversuchsantrag zum experimentellen Ratten-Gliom-Modell ist genehmigt (G0252/98) Die Genehmigung zur Herstellung von Maustumoren wird beantragt. Die Vorversuch wurden im Rahmen einer Kollaboration mit Dr. I : Fichtner, MDC durchgeführt.

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Wir haben in der Vergangenheit intensive Kooperationen mit Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches durchgeführt. Mit Jörg Weber haben wir die Reaktionen der Mikrogliazellen auf bakterielle Infektion untersucht. Diese Zusammenarbeit resultierte in mehreren gemeinsamen Publikationen. Mit der Gruppe von Uli Dirnagl haben wir die Reaktion der Mikrogliazellen im MCAO-Modell untersucht (Lyons et al., 2000). In Zusammenarbeit mit Robert Nitsch haben wir das Verhalten von Mikrogliazellen nach enthorhinaler Läsion charakterisiert. Die Arbeit ist noch nicht abgeschlossen. Die Zusammenarbeit mit Uli Dirnagl mit unserem EGFP/GFP transgenen Tier wird zur Veröffentlichung eingereicht. Mit der Arbeitsgruppe von Deinling haben wir gerade während des Entstehungsprozesses des Antrages eine enge Kollaboration vereinbart. Dies wird auch aus beiden Anträgen ersichtlich werden. Mit der Arbeitsgruppe Woiciechowsky untersuchen wir die Entwicklung von Zellaggregaten von Tumorzellen und ihre Interaktion mit Mikrogliazellen. Neben diesen sehr konkreten Interaktionen profitieren wir sehr von dem Umfeld des SFBs zum einen bezüglich der klinischen Anbindung und zum anderen auch durch Interaktion mit den physiologischen Arbeitsgruppen. Mit der Arbeitsgruppe Heinemann bieten wir regelmässig einen gemeinsamen Methodenkurs zum Thema *Anwendung von Imaging und Patch-Clamp in den zellulären Neurowissenschaften* an.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
	IIa	1	94800	IIa	1	94800	IIa	1	94800	IIa	1	94800
	IIa/2	1	42000	IIa/2	1	42000	IIa/2	1	42000	IIa/2	1	42000
	zus.:		136 800	zus.:		136 800	zus.:		136 800	zus.:		136 800
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	
				522 Sachmittel	25 000		25 000		25 000		25 000	
I				Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	
				0	0	0	0	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 Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Stunden pro Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	derzeitige Einstufung in BAT ...
Grundausrüstung	1. Kettenmann, Helmut Prof. Dr.	Neurobiologie	MDC	8	7/95	C4
3.7.1.1 wissenschaftliche Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)						
3.7.1.2 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter	Horst Kagelmaker Brigitte Gerlach Gerda Müller		MDC MDC MDC	3 3 15		BAT IVa BAT IVa BAT IVb
Ergänzungsausstattung	Susanne Kuhn Agnes Ellinghaus	Neurobiologie Neurobiologie	MDC MDC	40 20		BAT IIa BAT IIa/2
3.7.1.3 wissenschaftliche Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)						
3.7.1.4 nichtwissenschaftliche Mitarbeiter						

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

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 zur Publikation einbringen. Wichtig ist in diesem Projekt auch, die vielfältigen Interaktionen mit den Klinikern (Bereitstellung des menschlichen Tumormaterials) zu koordinieren.

3.7.1.2 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Herr Horst Kagelmaker ist für die gesamte Abteilung für Gerätetechnik, -wartung und -service zuständig. Er wartet ständig die elektrophysiologischen und Imaging-Meßstände, ist aber auch in allen anderen Bereichen für mechanische und elektronische Probleme zuständig. Im Schnitt bringt er sich in der Woche mit 3 Stunden in dieses Projekt ein.

Die Zellkulturversorgung wird von zwei Mitarbeiterinnen für die Abteilung gewährleistet, die eine MDC-Anstellung haben, Brigitte Gerlach und Gerda Müller. Sie bringen zusammen zwei Tage pro Woche in das Projekt ein.

3.7.1.3 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung

Susanne Kuhn ist seit dem 1. Dezember auf der Projektstelle. Sie hat zuvor ein Jahr neben ihrer klinischen Arbeit in unserer Forschungsgruppe mitgearbeitet und hat sich in dieser Phase alle Techniken angeeignet. Sie wird 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, insbesondere im Umgang mit humanem Material und den Tierexperimenten. Die Doktorandenstelle ist von Agnes Ellinghaus besetzt. Sie kümmert sich um die Etablierung des Kokulturmodells, Gliomzellen und Hirnschnitte.

3.7.1.4 Nichtwissenschaftliche Mitarbeiter der Ergänzungsausrüstung
entfällt**3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)**

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	5000	5000	5000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausrüstung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausrüstung</u>	25 000	25 000	25 000

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausrüstung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Verbrauchsmaterial	DM/Jahr
Chemikalien	4 000
Zellkultur-Materialien (Pipetten, Kulturflaschen, Multiboxen)	7 000
Zellkulturmedien	4 500
Molekularbiologische Reagenzien, Antikörper,	
Reagenzien für die Immunhistochemie	7 000
Versuchstiere	2 500

Summe

25 000

Begründung für den Sachmittelbedarf

In diesem Projekt sind viele Zellkulturexperimente notwendig. Daneben stellen auch die molekularbiologischen Experimente einen nicht unerheblichen Kostenfaktor dar.

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

entfällt

3.1 Allgemeine Angaben zum Teilprojekt C9 (früher B10)

3.1.1 Thema: Molekulare Mechanismen der Invasion von Gliomzellen

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung: Neuropathologie, Molekulare Neuroonkologie, Molekulargenetik

3.1.3 Leiter/in:

von Deimling, Andreas, 20.11.1959
Institut für Neuropathologie
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität
Charité CVK
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

Telefon: 030-450-536041
Telefax: 030-450-536940
E-Mail: andreas.von_deimling@charite.de

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

Nein.

Das Projekt wird nicht in einem anderen Verfahren der DFG gefördert

3.1.5 In dem Teilprojekt sind vorgesehen: (Bitte die folgenden Fragen in jedem Fall beantworten)

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (Ergänzungsausstattung)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
1999	148,5	23		171,5
2000	164,4	25		189,4
2001	168	25		193
Zwischen-summe	480,9	73		553,9
2002	168	24	0	192
2003	168	20	0	188
2004	168	20	0	188

(Beträge in TDM)

3.2 Zusammenfassung

Das Projekt sollen sich dem Problem der Invasion von Glioblastomzellen zuwenden. Das wesentliche klinische Problem glialer Gehirntumoren ist die diffuse Invasion der Tumorzellen in angrenzende Gehirnanteile. Diese Eigenschaft ist die Ursache für die fast obligat auftretenden Tumorrezidive und die unbefriedigenden Therapieerfolge. Die Invasion wird durch Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix (EZM) der Zellen des infiltrierten Gewebe wesentlich beeinflusst. Kenntnis über diese Interaktion könnte eine Beeinflussung der Tumorzellinvasion erlauben und damit eine Grundlage für neue therapeutische Ansätze bereiten. Die dargelegten Arbeiten stellen, unter Anwendung etablierter Methoden, ein vollständig neu entwickeltes Projekt dar, zu dem in dieser oder ähnlicher Form bisher keine Daten publiziert worden sind. Es sollen Gene identifiziert werden, welche der Invasion migrierender Tumorzellen zugrunde liegen. Von der Arbeitsgruppe Kettenmann (C8) erhalten wir gereinigte Populationen von Gliomzellen die unterschiedlichen Stimuli ausgesetzt waren. An diesem Material sollen zwei experimentelle Ansätze bearbeitet werden.

- Identifikation von differentiell exprimierten Genen in stationären und migrierenden Tumorzellen.
- Identifikation von differentiell exprimierten Genen in Tumorzellen vor und nach Kontakt/Interaktion mit Gehirngewebe

Das experimentelle Modell für beide Studien sieht den Kontakt bzw. die Interaktion von GFP (green-fluorescent-protein) exprimierende F98 Gliomzellen (Ratte) mit organotypischen Gewebekulturen vor.

Mittels SSH (Subtraktive Suppressive Hybridisierung) werden einmal Tumorzellen, die auf den Gewebeschnitten am Applikationsort verblieben sind mit solchen, die eine definierte Migrationsstrecke zurückgelegt haben, verglichen. Im anderen Ansatz wird eine Fraktion Tumorzellen, die nicht auf Gewebeschnitte aufgebracht wurde mit einer Fraktion, die in den Gewebeschnitt eingewandert ist, verglichen.

Nach Bestimmung der unterschiedlich exprimierten Kandidatengene werden diese mittels in-situ Hybridisierung und/oder quantitativer rtPCR und/oder immunhistochemischem Nachweis überprüft. Die ermittelten Kandidatengene sollen dann sowohl auf ihre Bedeutung bei humanen Gliomen als auch auf funktionelle Zusammenhänge untersucht werden. Mit homologen humanen Sequenzen der in F98 differentiell exprimierten Gene sollen in-situ Hybridisierungen an humanen Tumorproben durchgeführt werden. Hiermit kann die Relevanz dieser Gene für die Invasion in menschlichen Gliomen ermittelt werden. Für den Fall, daß für Interaktionspartner der differentiell exprimierten Gene bereits "knockout" Mäuse existieren, sollen die F98 Zellen auf "slices" von diesen Tieren aufgebracht werden und auf ein unterschiedliches Invasionsverhalten überprüft werden. Die Option, F98 Zellen auf organotypischen Kulturen vom Gehirn der Maus zu untersuchen, ermöglicht die Verwendung dieser Tiere. Damit kann gezielt die Interaktion der Tumorzellen mit definierten Proteinen des "Wirtsgewebes" untersucht werden. Dieses Modell läßt auch über "transgene" oder "knockout" Mäuse als Spender für die organotypischen Kulturen Modifikationen einzelner Komponenten der EZM zu.

Die Experimente an organotypischen Kulturen werden zunächst von Mitarbeitern des Teilprojekts C8 durchgeführt. In enger Kooperation mit diesem Teilprojekt werden neu identifizierte, geeignete Kandidatengene auf funktionelle Aspekte überprüft. Zukünftige Perspektiven (nächste Förderperiode) für

dieses Projekt beinhalten die Umstellung auf ein Modell mit einer Maustumorzelllinie (SMA-560). Wir erwarten von diesen Versuchen wesentliche, neue Erkenntnisse zur Genregulation in invadierenden Glioblastomzellen.

3.3 Stand der Forschung

Invasion von Gliomzellen

klinisches Problem

Die diffuse Invasion von Glioblastomzellen in angrenzende Gehirnstrukturen ist das größte Problem bei der Behandlung von Patienten. Eine operative Entfernung des Glioblastoms im Gesunden ist wegen der betroffenen oder angrenzenden Gehirnstrukturen nicht möglich. Dasselbe gilt für eine lokalisierte Strahlentherapie, die auswandernde Tumorzellen nicht ausreichend erfassen kann (Berens and Giese, 1999).

Glioblastomzellen werden in Entfernungen bis zu mehreren Zentimetern vom soliden Tumoranteil aufgefunden. Dabei migrieren sie bevorzugt entlang der großen weißen Bahnen. Klassisch hierfür ist das sogenannte Schmetterlingsgliom, bei dem, von einer Hemisphäre ausgehend die Glioblastomzellen entlang dem Balken migrieren und in der kontralateralen Hemisphäre einen zweiten Tumorherd ausbilden. Extrembeispiele für das Invasionspotential von Glioblastomzellen sind die multifokalen Glioblastome und die Gliomatosis cerebri.

Mechanismen bei der Invasion von Glioblastomzellen

Von besonderer Bedeutung für die Invasion ist die Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix (EZM) (Giese et al., 1996). Diese läuft zum Teil über Bindung von EZM Bestandteilen an Rezeptoren der Tumorzellen. Ein bekanntes Beispiel für solche Rezeptoren sind die Integrine, die Zelladhäsion und Migration vermitteln können. Ein wichtiger Aspekt ist, daß sowohl Änderungen an Oberflächenmolekülen der Tumorzelle, als auch Änderungen an der EZM die Invasion maßgeblich steuern können. Die Tumorzellen selbst sind auch in der Lage Modifikationen an der EZM vorzunehmen. Zum Beispiel kann durch proteolytische Enzyme, prominente Beispiele hierfür sind die Metalloproteinasen, die EZM modifiziert werden. Das bedeutet, Tumorzellen können die Bedingungen für Invasion ihrer Umgebung durch aktive Modulation der EZM beeinflussen. Daher soll für die vorgestellten Arbeiten ein experimentelles System verwendet werden, das sowohl Änderungen an den Tumorzellen (z. B. durch Transfektion) als auch an der EZM der Umgebung (z.B. durch Verwendung von "transgenen" oder "knockout" Mäusen für die organotypischen Kulturen) ermöglicht.

Invasion/Expression in Gliomen im Tiermodell und in Kultur

in-vivo Tiermodell:

Tiermodelle haben sich in einzelnen Fällen als geeignet erwiesen, invasionsassoziierte Genprodukte zu charakterisieren. Die meisten Studien stützen sich auf Untersuchungen mit der chemisch induzierten Ratten-Gliomzelllinie C6 (Benda et al., 1968). Das Muster der Einwanderung von C6 Zellen im Rattengehirn (Pedersen et al., 1995) entspricht in etwa demjenigen, das in Patienten mit Glioblastomen beobachtet wird, i.e. diffuse Infiltration mit besonderem Tropismus zu den großen weißen Bahnen (Burger et al., 1988). Unter anderem konnten mit solchen Modellen die Rolle von Metalloproteinasen (Belien et al., 1999) und CD24 für die Migration von C6 Zellen nachgewiesen werden (Senner et al., 1999). Die Zelllinie F98 (ebenfalls Ratte) weist gegenüber C6 eine stärkere Invasion angrenzender Strukturen auf (Beobachtung des Teilprojekts C8) (Tzeng et al., 1991). Daher soll bei den beantragten Arbeiten zunächst mit F98 Zellen gearbeitet werden. Ein bisher wenig bearbeitetes Tiermodell beruht auf der Induktion von Gehirntumoren in Mäusen durch intrazerebrale Applikation der Maus Linie SMA-560 (SMA = spontaneous murine astrocytoma). Diese Zelllinie wurde bereits 1980 etabliert und zeichnet sich durch ein hohes infiltratives Wachstum aus (Serano et al., 1980). Intrazerebrale Inokulation von 5×10^3 Zellen führt innerhalb von 30 Tagen zum Tode des Empfängers. In diesem Modell konnte gezeigt werden, daß Transfektion von IL-2, IL-4 und TNF α , zu einer vierfach längeren Überlebenszeit führt (Sampson et al., 1997).

in-vitro Modelle:

Zellkulturexperimente konnten erste Einblicke in die Rolle invasionsmediierender Mechanismen vermitteln. Auch hier stellte sich eine wichtige Rolle der Metalloproteinasen heraus (Amberger et al.,

1998, Hensel et al., 1998), deren erhöhte Aktivität die inhibitorische Wirkung zentralen Myelins aufhob. Untersuchungen an humanen Zelllinien wiesen auf eine inhibitorische Wirkung von TNF α auf die Expression von MMP-2 hin (Qin et al., 1998). Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass TNF α Expression in tumornahen Arealen einer Invasion entgegenwirken könnte (Roessler et al., 1995). BCL-2 ist ein anderes Gen, das die MMP-2 Expression hochreguliert und somit der Tumorzellinvasion Vorschub leisten kann (Wick et al., 1998). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass BCL-2 einen stark anti-apoptotischen Effekt aufweist und in humanen Gliomen oft hochreguliert ist und somit auch das Überleben von Tumorzellen unterstützt (Alderson et al., 1995). Auch TGF- β_1 und TGF- β_2 sind in der Lage MMP-2 und MMP-9 in malignen Gliomzellen hochzugeregulieren (reviewed by Platten et al., 2001). Als weitere migrationsassoziierte Genprodukte haben sich unter anderem G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) herausgestellt, die beide Proliferation und Migration von Gliomzellen stimulieren können (Mueller et al., 1999). Allerdings müssen viele dieser Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da das Proliferations- und Migrationsverhalten von etablierten Zellkulturen sich von demjenigen primärer Glioblastomkulturen unterscheidet und keine ausreichenden Vergleiche zwischen dem Expressionsverhalten dieser beiden Systeme vorliegen.

organotypische Kulturen:

Kürzlich wurde ein interessantes Invasionsmodell für Gliomzellen vorgestellt (Matsumura et al., 2000, Ohnishi et al., 1998). Die Gliomzellen C6 (Ratte) und T98G (Mensch) wurden in Sphäroiden auf organotypische Kulturen aufgebracht. Nach 24 Stunden begannen die Tumorzellen auszuwandern. Interessanterweise war kein wesentlicher Unterschied zwischen der Auswanderung humaner und C6 Tumorzellen auf den murinen organotypischen Kulturen zu beobachten (Matsumura, Ohnishi, 2000). In diesen Modellen wurden Migrationsstrecken von über 100 μ m gesehen. Es zeigte sich eine differentielle Expression von Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) in migrierenden und stationären Tumorzellen. Die auswandernden Zellen zeichneten sich durch eine wesentlich stärkere Expression dieser Proteine aus.

Vor- und Nachteile der Modelle

in-vivo Tiermodell:

Ein in-vivo Tiermodell stellt die Invasion von Glioblastomzellen im menschlichen Gehirn am besten nach. Ein wesentlicher Vorteil dieses Systems ist die Integrität des Gehirngewebes. Modelle dieser Art sind in der Ratte bestens beschrieben. Bisher wurden nur sehr wenige Modelle für die Maus vorgestellt (Holland et al., 2000, Serano, Pegram, 1980). Ein Mausmodell hat große Vorteile, weil "transgene" bzw. "knockout" Mäuse mit Manipulation potentiell invasionsrelevanter Gene als Empfänger für Tumorzellen verwendet werden können (Daher soll ein Protokoll zur Verwendung der SMA-560 Mauslinie auf organotypischen Kulturen im Rahmen dieser Studie etabliert werden. Eine Zusage für diese Linie liegt bei). Das kürzlich vorgestellte Modell zur Induktion von Glioblastomen beruhte auf gewebespezifischer, kombinierter Aktivierung von Ras und Akt in transgenen Mäusen. Eine Rückfrage bei den Autoren ergab, daß bisher noch keine Zelllinien von diesen Tumoren etabliert sind (Holland, Celestino, 2000). Allerdings wurden uns die Zelllinien, sobald verfügbar, in Aussicht gestellt. Bei Xenotransplantaten von F98 Zellen in die Maus sind Abstoßungsprobleme und damit eine eingeschränkte Tumorzellinfiltration zu erwarten. Wesentliche Nachteile dieses Systems sind ein verhältnismäßig hoher Aufwand mit intrakranieller operativer Applikation der Tumorzellen und die Immunkompetenz der Versuchstiere.

in-vitro Modelle:

Zellkultur Untersuchungen haben eine Vielzahl von Einzelbefunden zur Gliominvasion erbracht. Alle in-vitro Modelle beinhalten das Problem der fehlenden oder sehr eingeschränkten Interaktion der Tumorzellen mit dem "Wirtsgewebe". Dieses liegt vor allem an der nicht vorhandenen EZM. Daher wurde in letzter Zeit ein Modell verwendet, das eine synthetische EZM aus einer Mischung aus Laminin, Kollagen IV, Heparinsulfatproteoglycanen, Entacin und Nidogen beinhaltet (Matrigel®). Allerdings kann auch dieses Modell nicht die Komplexität der EZM simulieren. Etablierte Gliomlinien unterscheiden sich zum Teil deutlich von Glioblastomen. Zum Beispiel lassen sich Primärkulturen durch Retinoide hemmen, etablierte Glioblastomlinien jedoch stellten sich als unempfindlich heraus (Bouterfa et al., 2000). Diese Befunde weisen auf das Problem einer möglicherweise eingeschränkten Abhängigkeit etablierter Zelllinien von Interaktionen mit dem "Wirtsgewebe" hin, und sind einer der Gründe, warum zu einem späteren

Zeitpunkt die Experimente zur differentiellen Expression in migrierenden und stationären Zellen auch an humanen Operationspräparaten durchgeführt werden sollen.

organotypische Kulturen:

Die organotypischen Gewebekulturen stellen einen interessanten Kompromiß zwischen "in-vivo" und "in-vitro" Modellen dar, das Tumorzellinvasion in einem "Wirtsgewebe" erlaubt. Die Kulturen können bis zu mehreren Wochen am Leben gehalten werden, was der Gliomzellinvasion ausreichend Zeit zur Verfügung stellt. Die organotypische Gewebekultur ermöglicht problemlos die Verwendung xenologischer Tumorzellen, da keine Abstoßungsreaktionen auftreten. Die Option, F98 Zellen auf organotypischen Kulturen vom Gehirn der Maus zu untersuchen, ermöglicht die Verwendung von "transgenen" oder "knockout" Tieren. Mit diesen Tieren kann gezielt die Interaktion der Tumorzellen mit definierten Proteinen des "Wirtsgewebes" untersucht werden. Ein weiterer interessanter Aspekt des Ansatzes mit organotypischen Gewebekulturen ist, daß in das Medium abgegebene Proteine mittels ratten- oder mausspezifischer Antikörper im ELISA den F98 Zellen bzw. dem Wirtsgewebe zugeordnet werden können.

Im vorliegenden Antrag sollen die Experimente am organotypischen Kulturmodell durchgeführt werden. Zusammengefaßt vereint dieses Modell die folgenden Vorteile zum Studium der Invasion:

- Die organotypische Kultur erlaubt eine Tumorzell - Wirtsgewebe Interaktion, da die Zellen in vitales Gewebe infiltrieren.
- In der organotypischen Kultur treten aufgrund des Fehlens von T-Zellen keine Abstoßungsreaktionen auf. Nicht syngene Tumorzell - Wirtsgewebe Paarungen sind problemlos möglich.
- In diesem System können Gewebe von "transgenen" oder "knockout" Mäusen verwendet werden.
- Tumorzellen können jederzeit visuell überprüft werden. Das ist besonders einfach bei GFP markierten Zellen.

Literatur zu 3.3

- Alderson LM, Castleberg RL, Harsh GR, Louis DN, Henson JW (1995) Human gliomas with wild type p53 express bcl-2. *Cancer Research* 55: 999-1001
- Amberger VR, Hensel T, Ogata N, Schwab ME (1998) Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity. *Cancer Res* 58: 149-58
- Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME (1999) Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J Cell Biol* 144: 373-84
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-1
- Berens ME, Giese A (1999) "...those left behind." Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia* 1: 208-19
- Bouterfa H, Picht T, Kess D, Herbold C, Noll E, Black PM, Roosen K, Tonn JC (2000) Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines. *Neurosurgery* 46: 419-30
- Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P (1988) Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 68: 698-704
- Giese A, Kluwe L, Laube B, Meissner H, Berens ME, Westphal M (1996) Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38: 755-64
- Hensel T, Amberger VR, Schwab ME (1998) A metalloprotease activity from C6 glioma cells inactivates the myelin-associated neurite growth inhibitors and can be neutralized by antibodies. *Br J Cancer* 78: 1564-72
- Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN (2000) Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 25: 55-7
- Matsumura H, Ohnishi T, Kanemura Y, Maruno M, Yoshimine T (2000) Quantitative analysis of glioma cell invasion by confocal laser scanning microscopy in a novel brain slice model. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 513-20

- Mueller MM, Herold-Mende CC, Riede D, Lange M, Steiner HH, Fusenig NE (1999) Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression. *Am J Pathol* 155: 1557-67
- Ohnishi T, Matsumura H, Izumoto S, Hiraga S, Hayakawa T (1998) A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res* 58: 2935-40
- Pedersen PH, Edvardsen K, Garcia-Cabrera I, Mahesparan R, Thorsen J, Mathisen B, Rosenblum ML, Bjerkvig R (1995) Migratory patterns of lac-z transfected human glioma cells in the rat brain. *Int J Cancer* 62: 767-71
- Platten M, Wick W, Weller M (2001) Malignant glioma biology: Role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* 52: 401-410.
- Qin H, Moellinger JD, Wells A, Windsor LJ, Sun Y, Benveniste EN (1998) Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression in human astrogloma cells by TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 161: 6664-73.
- Roessler K, Suchanek G, Breitschopf H, Kitz K, Matula C, Lassmann H, Koos WT (1995) Detection of tumor necrosis factor-alpha protein and messenger RNA in human glial brain tumors: comparison of immunohistochemistry with in situ hybridization using molecular probes. *J Neurosurg* 83: 291-7.
- Sampson JH, Ashley DM, Archer GE, Fuchs HE, Dranoff G, Hale LP, Bigner DD (1997) Characterization of a spontaneous murine astrocytoma and abrogation of its tumorigenicity by cytokine secretion. *Neurosurgery* 41: 1365-72; discussion 1372-3
- Senner V, Sturm A, Baur I, Schrell UH, Distel L, Paulus W (1999) CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 795-802
- Serano RD, Pegram CN, Bigner DD (1980) Tumorigenic cell culture lines from a spontaneous VM/Dk murine astrocytoma (SMA). *Acta Neuropathol (Berl)* 51: 53-64
- Tzeng JJ, Barth RF, Orosz CG, James SM (1991) Phenotype and functional activity of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from immunogenic and nonimmunogenic rat brain tumors. *Cancer Res* 51: 2373-8
- Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M (1998) BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 440: 419-24.

3.4 Eigene Vorarbeiten

Vorversuche in-vivo und an organotypischen Kulturen

Diese Experimente werden von der Forschungsgruppe für zelluläre Neurowissenschaften durchgeführt und sind im Teilprojekt C8 detailliert beschrieben.

SSH

Seit Mai 2000 wird im Institut für Neuropathologie ein Projekt (differentielle Gen-Expression in Neurofibromen und Neurofibrosarkomen von den selben Patienten - Identifikation progressionsassoziiierter Gene) durchgeführt dessen experimentelles Design auf der SSH fußt. Die ersten experimentellen Daten liegen bereits vor. Die Analyse der differentiell exprimierten Kandidatensequenzen wird zur Zeit durchgeführt. Die Amplifikation eines in beiden Tumoren exprimierten "housekeeping-gene", GAPDH, zeigte eine effiziente Reduzierung nach SSH. Unsere eigenen Vorarbeiten und die dabei gewonnene Erfahrung, sowie die Kooperation mit Herrn Prof. R. Schäfer aus der Abteilung für experimentelle Pathologie der Charité sprechen mit großer Wahrscheinlichkeit für die erfolgreiche Durchführung der vorgestellten Versuche.

Zur Zeit laufen die ersten SSH Experimente zum Vergleich GFP markierter F98 Tumorzellen. Hierbei wurde RNA von 3x10⁵ F98 Zellen vor Kontakt mit einem Gewebeschnitt und RNA von 3x10⁵ F98 Zellen nach Kontakt mit und Invasion in einem Gewebeschnitt extrahiert. Die Zellen der Kontakt/Invasion Gruppe wurden wie folgt gewonnen. Nach Aussaat von etwa 10⁶ Zellen unter auf einen Gewebeschnitt wurde dieser nach 7 Tagen Inkubation entnommen und durch mehrfaches Waschen vom Medium und von adhärennten Zellen befreit. Der Gewebeschnitt wurde dissoziiert und die markierten Zellen mittels "cell sorter" isoliert.

3.5 Arbeitsprogramm (Ziele, Methoden, Zeitplan)

3.5.1 Ziele

- Welche Gene werden in migrierenden und stationären Gliomzellen differentiell exprimiert?

Hypothese: Mit dem vorgestellten experimentellen Ansatz (Ratte und Maus) lassen sich Gene identifizieren, die differentiell exprimiert und an der Tumorzellinvasion beteiligt sind.

- Führt der Kontakt von Tumorzellen mit nicht tumorösen Zellen und der extrazellulären Matrix des umgebenden Gehirngewebes zur Modifikation der Genexpression in den Tumorzellen (thematische Zusammenarbeit mit C8)?

Hypothese: Mit diesem Ansatz lassen sich Gene identifizieren, welche als Antwort auf Kontakt mit Gehirngewebe exprimiert werden und das Invasionsverhalten der Tumorzellen beeinflussen.

- Können die migrierenden Tumorzellen durch Modifikation der Tumorzell-Wirtszell Interaktion unter Verwendung organotypischer Kulturen von "transgenen" oder "knockout" Mäusen beeinflusst werden?

Hypothese: Die Tumorzell-Wirtszell Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion und kann durch "transgene" oder "knockout" Wirtszellen modifiziert werden.

- Kann die ektopische Expression von Kandidatengenen, die in migrierenden Tumorzellen unterexprimiert sind, das Invasionsverhalten beeinflussen? Kann durch ektopische Expression von Antisenseoligonukleotiden gegen in Tumorzellen überexprimierten Kandidatengenen das Invasionsverhalten beeinflussen?

Hypothese: Die Transfektion von Genen, die in migrierenden Tumorzellen unterexprimiert sind, hat einen invasionshemmenden Einfluß.

- Lassen sich in geeigneten differentiell exprimierten Kandidatengenen (z.B. Ionenkanäle, Rezeptoren etc.) physiologisch unterschiedliche Eigenschaften zwischen migrierenden und stationären Gliomzellen feststellen?

Hypothese: Mit dieser Kooperation von Teilprojekten C9 und C8 lassen sich invasionsassoziierte Gene funktionell überprüfen.

3.5.2 Methoden

Tierversuchsgenehmigungen sind für die geplanten Untersuchungen nicht erforderlich, da keine Manipulationen an lebenden Tieren vorgenommen werden. Die Experimente erfordern Tötungsanzeigen für die Mäuse. Die Labore der Neuropathologie haben die Genehmigung zur Betreibung einer Anlage der Sicherheitsstufe S1 laut GenTG. Projektleiter ist Prof. A. von Deimling.

Modell: GFP markierte F98 Zellen auf organotypischen Gewebekulturen

Dieses Modell wird von der Forschungsgruppe für zelluläre Neurowissenschaften bereitgestellt und ist im Teilprojekt C8 detailliert beschrieben.

Isolierung GFP markierter Zellen

Zwei Zellpopulationen müssen isoliert werden: Zellen, die im Bereich des Applikationsortes verblieben sind und Zellen die eine Strecke von etwa 100µm vom Applikationsort zurückgelegt haben. Die Invasionsstrecke der GFP exprimierenden Zellen läßt sich am Modell täglich kontrollieren. Die jeweiligen Zellen werden mittels der im Institut für zelluläre Neurowissenschaften, MDC Berlin, zur Verfügung stehenden Mikromanipulatoren isoliert. Im Rahmen der Kooperation mit dem Institut für zelluläre Neurowissenschaften werden diese Zellen auch auf elektrophysiologische Eigenschaften untersucht. Die physiologisch gewonnenen Daten sollen nach Abschluß der Experimente mit dem Expressionsmuster der jeweiligen Zellpopulationen verglichen werden.

Für Isolierungen mit dem Ziel in nur RNA der von migrierenden und stationären Tumorzellen zu gewinnen, werden Bereiche aus den organotypischen Kulturen mit definierten Abständen vom Applikationsort entfernt und die GFP markierten Zellen mittels Zellsorter (FACS) isoliert.

Für Isolierungen an initial elektrophysiologisch untersuchten Tumorzellen werden nach dem "patchen" die entsprechenden Zellen ausgesaugt.

SMART

Von den zwei Zellpopulationen soll zunächst mit der SMART[®] Technologie ausreichend cDNA für die nachfolgende SSH transkribiert werden. Ausgehend von etwa 3×10^5 Zellen (nach FACS) pro

Zellpopulation wird entsprechend den Angaben des Herstellers (Clontech) mit einem ersten modifizierten oligo(dT) Primer eine cDNA-Synthese durchgeführt. Durch die terminale Transferase-Aktivität werden an diese cDNA Stränge einige Desoxycytosine (dC) angehängt. Daran kann ein zweites Oligonukleotid mit einer poly-G Sequenz binden. Die reverse Transkriptase wechselt dann den "template" Strang und repliziert das zweite Oligonukleotid ("SMART anchor"). Als Folge kann mittels der ersten modifizierten Oligo(dT) Sequenz und des "SMART anchor" als Bindungsstelle für Primer der gesamte RNA "pool" amplifiziert werden.

SSH

Danach wird eine Anreicherung differentiell exprimierter Gene mittels SSH durchgeführt werden. Die Methode basiert auf der Hybridisierung zweier zu vergleichender cDNA-Pools, "tester" und "driver", in zwei unabhängigen Ansätzen A und B. Das experimentelle Design verlangt, daß in der "tester" cDNA Sequenzen enthalten sind, die in der "driver" cDNA unterrepräsentiert oder abwesend sind. Die RsaI geschnittene "tester" cDNA der beiden Ansätze wird mit zwei verschiedenen Adaptern versehen (Adapter A und Adapter B). Die RsaI geschnittene "driver" cDNA für beide Ansätze ist identisch und liegt gegenüber der "tester" cDNA im 30-fachen Überschuß vor. Nach Denaturierung werden die beiden "tester" cDNAs getrennt jeweils mit der denaturierten "driver" cDNA hybridisiert. In beiden Ansätzen reichern sich einzelsträngige, mit Adaptern versehene, cDNA Sequenzen an, die im "driver" unterrepräsentiert bzw. abwesend sind, und die im "tester" in einer niedrigen Konzentration vorliegen. Der Grund hierfür ist die mit geringerer Kopienanzahl abnehmende Wahrscheinlichkeit einen Hybridisierungspartner zu finden. Hiermit steigt die Wahrscheinlichkeit des betreffenden cDNA Fragments der Hybridisierung als Einzelstrang zu "entkommen". Die beiden Ansätze A und B werden ohne einen vorgeschalteten Denaturierungsschritt vereint unter nochmaliger Zugabe denaturierten "drivers". Jetzt können Einzelstränge aus Ansatz A mit solchen aus Ansatz B hybridisieren und Doppelstränge mit Adapter A am einen und Adapter B am anderen Ende ausbilden. Nach Auffüllen der überstehenden Enden können nur diese Hybride mittels einem Adapter-A und einem Adapter-B spezifischen Primer amplifiziert werden. Das Ergebnis ist ein Pool amplifizierter cDNA-Stränge mit Anreicherung der im "tester" überrepräsentierten Sequenzen. Dieser Ansatz wird zweimal durchgeführt - am konkreten Beispiel erstens mit migrierenden Tumorzellen als "tester" und mit stationären Tumorzellen als "driver", und zweitens mit migrierenden Tumorzellen als "driver" und mit stationären Tumorzellen als "tester". Die SSH ist seit Mai 2000 im Institut für Neuropathologie etabliert. Als Kooperationspartner steht uns weiterhin Prof. Dr. rer. nat. R. Schäfer (Experimentelle Pathologie, Charité, CCM) zur Seite. Seine Arbeitsgruppe hat mit großem Erfolg SSH Analysen an transformierten Zellen publiziert (Tchernitsa et al., 1999, Zuber et al., 2000).

Untersuchung der differentiell exprimierten cDNAs

Die amplifizierten DNA "pools" werden in Plasmide eingebracht. Mit diesen werden kompetente Bakterien transformiert. Die Bakterien werden auf Nährmedium ausplattiert. Die Klone werden entnommen und zunächst in Mikrotiterplatten überführt und nochmals vermehrt. Nach Anlegen von Kopien ("masterplates") werden die Original Mikrotiterplatten unter Kryoschutz eingefroren. Die Klone der kopierten Mikrotiterplatten werden mittels "primern", die an die "adapter" binden können amplifiziert, und anschließend im reversen Northern Blot auf differentielle Expression überprüft. Danach werden die amplifizierten "inserts" (cDNAs) der Plasmide beider experimenteller Reihen elektrophoretisch aufgetrennt und "geblottet". Als Sonde werden jeweils die differentiell angereicherten cDNA "libraries" beider Reihen verwendet. Mit diesem Vorgehen können diejenigen Klone eliminiert werden, die in beiden reversen Northern Blots gleich stark repräsentiert sind. Die Klone, die nach Hybridisierung mit nur einer der "libraries" Signale zeigen sind die Kandidaten, die (an)sequenziert werden. Hierfür kommen Standard-Protokolle und unser Sequenziergerät (ABI model 377) zur Anwendung. Die genaue Anzahl der zu untersuchenden Klone hängt von der Menge der nach reversen Northern Blot als differentiell exprimiert eingestuft Sequenzen ab. Die identifizierten Sequenzen werden daraufhin auf Homologien mit den abgelegten Sequenzdaten von Gendatenbanken verglichen.

Verifizierung von Kandidatengenens mittels quantitativer PCR

Die Analyse der Expression individueller Klone in beiden Zellpopulationen wird mittels quantitativer PCR durchgeführt. Wir planen zur quantitativen PCR den LightCycler (Roche) einzusetzen. Von den für dieses Gerät grundsätzlich zwei zur Verfügung stehenden Nachweismethoden für Amplifikationsprodukte

ist für unsere Anwendung der Einsatz des SYBR Green 1 Farbstoffs besser geeignet. Mit dem nur nach Bindung an doppelsträngige DNA fluoreszierenden SYBR Green 1 kann die Zunahme der Amplifikationsprodukte über alle Zyklen einer PCR "online" gemessen werden. Die Sequenzdaten aus der Analyse individueller Klone sowie die Daten der Genbanken werden zur Ermittlung günstiger "primer" hinzugezogen.

Verifizierung von Kandidatengenens mittels in-situ Hybridisierung

cDNA-Sonden werden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) komplementär zu den ausgewählten Kandidatengenens hergestellt. Die Primersequenzen können mit einem öffentlich zugänglichen Software-Programm (z.B. Primer3; <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) zusammengestellt werden. Sollten RNA-Sonden verwendet werden, beinhaltet der "upstream-Primer" an seinem 5'-Ende ein Startsignal für die T3-RNA-Polymerase. Dem korrespondierenden "downstream-Primer" ist eine Erkennungssequenz für die T7-RNA-Polymerase angeheftet, um eine in-vitro Transkription zu ermöglichen. Während der PCR werden digoxigenierte Nukleotide eingebaut, um einen nicht-radioaktiven Nachweis mittels Antikörper-gebundener alkalischer Phosphatase und entsprechenden chromogenen Substraten zu erlauben.

Verifizierung von Kandidatengenens mittels Immunhistochemie

Kandidatengene, die für Proteine kodieren, gegen welche bereits Antikörper erhältlich sind, können effizient mittels immunhistochemische Analyse untersucht werden. Die erforderlichen Expertisen, Methoden und Geräte sind im Routinelabor des Instituts für Neuropathologie vorhanden.

Funktionelle Untersuchung von verifizierten Kandidatengenens

Diese Untersuchungen werden erst in der nächsten Förderperiode durchführbar sein. Die geplanten Arbeiten werden im Antrag dafür ausführlich dargestellt und deshalb hier nur kurz skizziert.

Kandidatengene, die sich in migrierenden Tumorzellen als deutlich über- oder unterexprimiert herausgestellt haben (im Vergleich zu stationären Tumorzellen) sollen auf Interaktion ihrer jeweiligen Genprodukte mit dem Wirtsgewebe überprüft werden. Hierzu werden "transgene" oder "knockout" Mäuse (sofern verfügbar) mit Modifikationen in diesen Genen, oder mit solchen, die mit ihnen in einer Funktionskette in Verbindung stehen, hinzugezogen. Wenn sich bei Experimenten auf organotypischen Kulturen dieser "transgenen" oder "knockout" Mäuse ein verändertes Infiltrationsverhalten der Tumorzellen zeigt, ist ein Zusammenhang der Regulation der betreffenden Gene bzw. Funktionsketten mit Tumorzellinvasion naheliegend.

Die Expression von Kandidatengenens, die sich in migrierenden Tumorzellen als deutlich unterexprimiert herausgestellt hat (im Vergleich zu stationären Tumorzellen), soll mittels ektopter Expression rekonstituiert werden. Wenn nach Transfektion der Tumorzellen mit Konstrukten, welche die Expression dieser Gene treiben, ein verändertes Infiltrationsverhalten vorliegt, ist ein Zusammenhang der Regulation der betreffenden Gene bzw. Funktionsketten mit Tumorzellinvasion anzunehmen.

Kandidatengene, die einer elektrophysiologischen und bildgebenden (Kalzium-Imaging) Untersuchung zugänglich sind, werden in Kooperation mit Teilprojekt C8 im Institut für zelluläre Neurowissenschaften untersucht. Das auch solche Kandidatengene von Bedeutung sind, zeigt eine Studie, welche die Hemmung der Migration von Gliomzellen mittels Chlorid-Kanal blockierenden Substanzen (Chlorotoxin, Tetraethylammoniumchlorid) beschrieb (Soroceanu et al., 1999). Die Fähigkeit von Glioblastomzellen, Aktionspotentiale zu generieren, wurde in Arbeiten des Teilprojekts C8 mehrfach gezeigt (Labrakakis et al., 1998, Labrakakis et al., 1998, Labrakakis et al., 1997).

3.5.3 Arbeitsprogramm

Entwicklung eines Invasionsmodells an organotypischen Gewebekulturen

Diese Arbeitsschritte werden von der Arbeitsgruppe Kettenmann durchgeführt und sind im Teilprojekt C8 beschrieben.

Funktionelle Untersuchungen mit elektrophysiologischen und bildgebenden Verfahren

An geeigneten Kandidaten (z.B. Membranproteine mit Kanal- oder Transporterfunktion) werden im Rahmen des SFB Teilprojekts C8 an den selben Präparaten funktionelle Untersuchungen mit

elektrophysiologischen und bildgebenden (Kalzium Imaging) Verfahren durchgeführt. Die geplanten Arbeiten werden dort dargestellt.

Differentielle Expression in stationären und migrierenden Gliomzellen

Nach "sampling" der GFP markierten Zellen vom ursprünglichen Applikationsort (stationär) und in einer Entfernung von etwa 100µm (migrierend) wird von beiden Zellpopulationen RNA extrahiert, präamplifiziert (SMART) und der SSH unterworfen. Nach Transformation kompetenter Bakterien mit den in Plasmiden einligierten differentiell exprimierten Sequenzen werden bis zu 300 Kolonien ausgewählt und in Mikrotiterplatten angezüchtet. Es werden genaue Kopien der Original-Mikrotiterplatte erzeugt, mit welchen dann weiter gearbeitet wird. Daraufhin werden reverse Northern Blots durchgeführt. Die differentiell exprimierten Klone werden (an)sequenziert. Nach Vergleich mit Gen Datenbanken werden die Sequenzen bereits bekannten Genen zugeordnet. Für den Fall, daß Sequenzen aufgefunden werden, die bisher nicht bekannt sind, werden diese nach der Verifizierung einer differentiellen Expression in migrierenden und stationären Tumorzellen weiter untersucht (Hybridisierung an cDNA Bank, Sequenzierung des ganzen Gens, Ermittlung von Homologien etc.).

Wir erwarten, daß sich bei unseren Versuchen einige bereits bekannte Gene als differentiell exprimiert herausstellen. Kandidaten hierfür sind unter anderem die MT1-MMP (Belien, Paganetti, 1999), BCL-2 (Wick et al., 1998), SPARC (Rempel et al., 1998, Vajkoczy et al., 2000) und CD44 (Radotra and McCormick, 1997, Radotra et al., 1994) Gene. Diese Kandidaten ermöglichen auch eine Kontrolle zur Effizienz der SSH. Nach Ausplattieren der transformierten Bakterien können "lifts" von den Platten genommen werden. Die Membranen können nach alkalischer Lyse mit den diesen Kandidatengenen entsprechenden Sonden hybridisiert werden. Bei effizienter SSH müssen die beiden Versuchsansätze (mit Vertauschung von "tester" und "driver") deutlich unterschiedliche Anzahlen positiver Kolonien aufweisen.

Verifizierung und funktionelle Untersuchung der Kandidatengene

Bei der Verifizierung der Kandidatengene sollen zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden - quantitative PCR (nach vorgeschalteter SMART Amplifikation von mRNA eines neuen "pools" infiltrierender und stationärer Tumorzellen) und in-situ Hybridisierung. Klone, die in beiden Verfahren differentiell exprimiert werden, sind exzellente Kandidaten für invasionsassoziierte Expression. Diese Klone sollen (erst in der nächsten Förderperiode möglich) funktionell untersucht werden. Das experimentelle Design ist auf zwei unterschiedliche Ansätze ausgerichtet. (1) Hinzuziehen von "transgenen" oder "knockout" Mäusen mit Modifikationen in Genen, die sich entweder als differentiell exprimiert herausgestellt haben oder mit solchen Genen in einer Funktionskette in Verbindung stehen. (2) Transfektion der Tumorzellen mit Genen, die sich durch eine fehlende Expression ausgewiesen haben. Alle Kandidatengene, die einer elektrophysiologischen und bildgebenden (Kalzium Imaging) Untersuchung zugänglich sind, werden im Institut für zelluläre Neurowissenschaften untersucht.

3.5.4 Zeitplan

Die Experimente zur Gewinnung von stationären und migrierenden Tumorzellen werden in kurzer Zeit durchführbar sein. Die ersten Experimente zum Vergleich von F98 Tumorzellen vor und nach Kontakt mit Gehirngewebe werden bereits durchgeführt. Die SSH Experimente nehmen ebenfalls nur wenige Monate in Anspruch. Die längste Zeit wird die Rücktestung und Verifizierung der Kandidatengene benötigen. Der Beginn gezielter Analysen von verifizierten Kandidaten mittels "transgenen" oder "knockout" Tieren wird noch in die Antragsperiode fallen, vermutlich jedoch im Rahmen der Förderperiode 2002-2005 nicht abzuschließen sein.

2002-2003

Durchführung der Invasionsexperimente zur Gewinnung von RNA für die SSH (durch Teilprojekt C8). Durchführung der SSH Experimente und Rücktestung der Kandidaten.

2002-2003

Rücktestung der Kandidaten mittels quantitativer PCR und/oder in-situ Hybridisierung und/oder Immunhistochemie.

2003-2004

Experimente zur funktionellen Analyse verifizierter Kandidaten mittels "transgenen" oder "knockout" Tieren. Zellphysiologische Untersuchungen an verifizierten Kandidaten (durch Teilprojekt B1).

Literatur zu 3.5

- Belien AT, Paganetti PA, Schwab ME (1999) Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J Cell Biol* 144: 373-84
- Labrakakis C, Patt S, Hartmann J, Kettenmann H (1998) Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur J Neurosci* 10: 231-8
- Labrakakis C, Patt S, Hartmann J, Kettenmann H (1998) Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. *Eur J Neurosci* 10: 2153-62
- Labrakakis C, Patt S, Weydt P, Cervos-Navarro J, Meyer R, Kettenmann H (1997) Action potential-generating cells in human glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 243-54
- Radotra B, McCormick D (1997) Glioma invasion in vitro is mediated by CD44-hyaluronan interactions. *J Pathol* 181: 434-8
- Radotra B, McCormick D, Crockard A (1994) CD44 plays a role in adhesive interactions between glioma cells and extracellular matrix components. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 399-405
- Rempel SA, Golembieski WA, Ge S, Lemke N, Elisevich K, Mikkelsen T, Gutierrez JA (1998) SPARC: a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1112-21
- Soroceanu L, Manning TJ, Jr., Sontheimer H (1999) Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers. *J Neurosci* 19: 5942-54
- Tchernitsa OI, Zuber J, Sers C, Brinckmann R, Britsch SK, Adams V, Schafer R (1999) Gene expression profiling of fibroblasts resistant toward oncogene-mediated transformation reveals preferential transcription of negative growth regulators. *Oncogene* 18: 5448-54
- Vajkoczy P, Menger MD, Goldbrunner R, Ge S, Fong TA, Vollmar B, Schilling L, Ullrich A, Hirth KP, Tonn JC, Schmiedek P, Rempel SA (2000) Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC. *Int J Cancer* 87: 261-8
- Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M (1998) BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 440: 419-24.
- Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schafer R (2000) A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 24: 144-52

3.6 Stellung innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Innerhalb des SFB 507 haben sich Kontakte zu den Teilprojekten A5, C8, C2 und C3 entwickelt. Die geplanten Untersuchungen zur Gliomzellinfiltration bauen auf eine enge Kooperation mit dem Teilprojekt B1. Diese bestehen zum erheblichen Teil aus gemeinsam durchgeführten Experimenten. Im beantragten Projekt sollen die experimentellen Expertisen der beiden Arbeitsgruppen (C8 – Tiermodell und funktionelle Untersuchungen, C9 - molekulargenetische Expertise) eng verknüpft werden. Da das Anlegen organotypischer Gewebekulturen im Institut für zelluläre Neurowissenschaften am MDC bestens etabliert ist, sollen diese Experimente zunächst dort durchgeführt werden. Dort erfolgen auch die physiologischen Untersuchungen. Die molekularen Experimente und Analysen werden im Institut für Neuropathologie durchgeführt. Das Institut für Neuropathologie führt auch die zusätzlichen in-situ Hybridisierungen durch, welche für das Teilprojekt B1 von Interesse sind. Das Projektdesign sieht auch eine gemeinsame Auswertung der am selben Modell erhobenen "molekularen" und "physiologischen" Daten vor. Zusätzlich konnten in einer anderen Studie für das Teilprojekt B1 einige molekulare Untersuchungen durchgeführt werden. Hierbei handelte es sich um die genetische Integrität (Amplifikations-Status) bezüglich des EGF-Rezeptors von Glioblastomzellen, die im Teilprojekt B1 physiologisch untersucht wurden.

Eine interessante Zusammenarbeit entstand mit der Arbeitsgruppe Dirnagl (A5). Zur Zeit werden mittels 2D Gelelektrophorese Expressionsmuster von ischämisch geschädigtem Gehirn (Modell Ratte) und (hypoxisch) präkonditionierten Zellkulturen untersucht. Die Tier- und Zellkulturexperimente finden hierbei im Rahmen des Teilprojekts A5 statt, die 2D Elektrophoresen werden im Institut für Neuropathologie durchgeführt.

Den Teilprojekten C2 und C3 stellen wir kontinuierlich histologisches Material bzw. Ergebnisse unserer diagnostischen Untersuchungen zur Verfügung.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

PK: Personalbedarf und -kosten (Begründung vgl. 3.7.1)

SV: Sächliche Verwaltungsausgaben (Begründung vgl. 3.7.2)

I: Investitionen (Geräte über DM 20.000,- brutto; Begründung vgl. 3.7.3)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.- Gr.	Anz.	Betrag DM
	IIa	1	106.80 0	IIa	1	106.80 0	IIa	1	106.80 0	IIa	1	106.80 0
	VIb	1	61.200	VIb	1	61.200	VIb	1	61.200	VIb	1	61.200
	zus.:			zus.:	2		zus.:	2		zus.:		
SV				Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten- kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	
				522	20000	522	20000	522	20000			
				515	4000							
I				Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.		Investitionsmittel insges.				
				0		0		0				

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausstattung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	von Deimling A. Prof. Dr. med. Institutsdirektor	Neuropathologie	Institut für Neuropathologie	10 (B)	01.02.1999	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter						
Ergänzungsausstattung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	1 Holtkamp, N. Dr. rer. nat.		Institut für Neuropathologie	38,5	15.08.2000	BAT II a
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	2 Yenilmez, M. BTA		Institut für Neuropathologie	38,5	01.03.1999	BAT VIb

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Grundausrüstung

Andreas von Deimling, Prof. Dr. med. (Projektleiter)

Planung und Leitung der Arbeiten, Einarbeitung von Mitarbeitern in die molekularen experimentellen Techniken, Koordinierung der Zusammenarbeit mit den anderen SFB Projekten, insbesondere, C8 und mit auswärtigen Institutionen.

Aufgabenbeschreibung von Mitarbeitern der Ergänzungsausstattung

1 Nikola Holtkamp, Dr. rer. nat.

RNA Extraktion aus den in Zusammenarbeit mit C8 isolierten Tumorzellfraktionen, SMART Amplifikation, SSH, Rücktestung der Kandidaten, Sequenzierung der Kandidaten, Analyse der DNA Sequenzen mit Datenbankvergleich, Verifizierung der Kandidaten, funktionelle Untersuchungen. Frau Dr. Holtkamp wird ausschließlich für das beantragte Projekt arbeiten.

2 Metin Yenilmez, BTA

Herstellen von Plasmid-Präparationen, Beteiligung an der Sequenzierung der Kandidaten, In-situ Hybridisierungen an Präparaten aus den organotypischen Gewebekulturen. Herr Yenilmez wird ausschließlich für das beantragte Projekt arbeiten.

3.7.2 Aufgliederung und Begründung der Sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	10000	10000	10000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausstattung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur <u>Ergänzungsausstattung</u>	24000	20000	20000

(Alle Angaben in DM)

Begründung Kleingeräte

Pipettensatz	DM	1500
Multichannel Pipette	DM	1000
Elektrophorese Kammer	DM	1500
Gesamtsumme Kleingeräte	DM	4000

Das Labor des Instituts ist gut ausgestattet. Zur Durchführung der vorgestellten Arbeiten sind zusätzlich ein Pipettensatz (Für die umfangreichen RNA Arbeiten), eine Multikanalpipette (für effektives Arbeiten mit der großen Anzahl der zu erwartenden Kandidaten) und eine Elektrophorese Kammer (zur Analyse der in großem Umfang anfallenden PCR Produkte) erforderlich.

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Extraktion von Nukleinsäuren (RNA Extraktion, mRNA Isolierung)	DM	1500
cDNA Aufreinigung	DM	1000
Präamplifikation (SMART) und SSH	DM	3500

Polymerase (advantage cDNA Polymerase MIX)	DM	1500
Klonierung (Topo TA Cloning)	DM	1500
reverse Northern Blotting (Membranen, DIG, Antikörper, Substrate, Filme)	DM	2000
Sequenzierung	DM	3500
in-situ Hybridisierung	DM	2000
Agruose/Acrylamidgele und Reagenzien für Nachweis der DNA Fragmente	DM	2500
Plastikwaren	DM	2000
Gesamtsumme Verbrauchsmaterialien	DM	20000

Zur Durchführung der vorgestellten Arbeiten sind, zusätzlich zu den 10000 DM aus der Grundausrüstung, 20000 DM Ergänzungsausstattung (laut Liste) erforderlich.

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

<p>PROJEKTBEREICH Z (Projektbereichsleiter: Prof.Dr.K.Einhäupl)</p>

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 karl.einhaeupl@charite.de

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

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
1995	23,1	43	-	66,1
1996	48,3	70	-	118,3
1997	48,3	116,4	-	164,7
bis 1998	49,2	150,8	-	200
1999	49,2	190,2	-	239,4
2000	49,2	196,2	-	245,4
2001	49,2	181,2	-	230,4
Zwischen-summe	316,5	947,8		1264,3
2002	63	201	-	264
2003	63	190	-	253
2004	63	175	-	238

(Beträge in TDM)

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)

Bewilligung 2001			2002			2003			2004			
PK	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM	Verg.-Gr.	Anz.	Betrag DM
	VIb-O	1	49200	VIb-O	1	54000	VIb-O	1	54000	VIb-O	1	54000
				Stud. Hk-O	1/2	9000	Stud. Hk-O	1/2	9000	Stud. Hk-O	1/2	9000
	zus.:	1	49200	zus.:	1 1/2	63000	zus.:	1 1/2	63000	zus.:	1 1/2	63000
SV			Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM	Kosten-kategorie oder Kennziff.	Betrag DM
			522	17000	522	17000	522	17000	522	17000	522	17000
			527	76500	527	76500	527	76500	527	76500	527	76500
			534	76500	534	76500	534	76500	534	76500	534	76500
			532	22000	533	5000	533	5000	533	5000	533	5000
			535	9000	535	15000						
I			Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.	Investitionsmittel insges.
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbeiters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	Mitarbeit im Teilprojekt in Std. /Woche (beratend: B)	auf dieser Stelle im SFB tätig seit	beantragte Einstufung in BAT
Grundausrüstung						
3.7.1.1 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Prof.Dr.Karl Einhäupl Prof.Dr.Ulrich Dirnagl	Neurologie Exp.Neurologie	Neurologische Klinik Neurologische Klinik	2 5	1995 1995	
3.7.1.2 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter						
Ergänzungsausrüstung						
3.7.1.3 wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Studentische Hilfskraft N.N.			8,5	-	Stud.Hk-O
3.7.1.4 nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	Hannelore Reinkober		Neurologische Klinik	40	1998	Vib-O

(Stellen, für die Mittel neu beantragt werden, sind mit **X** gekennzeichnet)

3.7.1.1 Wissenschaftliche Mitarbeiter der Grundausrüstung

Prof.Dr.K.M.Einhäupl (Sprecher)

Prof.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 Hannelore Reinkober (BAT VIb-O)

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. Von grosser Bedeutung ist auch die Koordination der Mittelflüsse innerhalb der Charite und der Beteiligten ausseruniversitären Institute. Dies wird mit SAP, eingebunden in die Drittmittelverwaltung der Charite, von der beantragten Kraft eigenständig durchgeführt.

Für die Bewältigung dieser Aufgaben ist flexibles, eigenverantwortliches und engagiertes Organisieren Voraussetzung, Erfahrung mit SAP, 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.

Frau Reinkober arbeitet seit über 2 Jahren auf dieser Stelle und erfüllt alle oben angegebenen Kriterien in hervorragender Weise.

3.7.2 Aufteilung und Begründung der sächlichen Verwaltungsausgaben (nach Haushaltsjahren)

	2002	2003	2004
Für Sächliche Verwaltungsausgaben stehen als Grundausrüstung voraussichtlich zur Verfügung:	5000	5000	5000
Für Sächliche Verwaltungsausgaben werden als Ergänzungsausrüstung beantragt (entspricht den Gesamtsummen "Sächliche Verwaltungsausgaben" in Übersicht 3.7): Begründung zur Ergänzungsausrüstung	201000	190000	175000

(Alle Angaben in DM)

Begründung zur Ergänzungsausstattung der Sächlichen Verwaltungsausgaben

Verbrauchsmaterial (Titel 522)

Büromaterial, Computerzubehör pro Jahr

DM 12.000,--

Reisekosten (Titel 527) und Symposien/Kolloquien (535)

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 Aussenpräsentation im Berliner Raum. Insofern die Projektbereiche neu strukturiert wurden, und eine Reihe neuer Projekte dazugekommen sind, planen wir für das Frühjahr 2002 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 2002 (3.000 DM pro Projektbereich zur Einladung von 4-5 Wissenschaftlern). Im Frühjahr 2003 wollen wir 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 2003 15.000 DM.

Es werden also folgende Reisemittel und Symposienmittel beantragt

2002

76.500 DM Reisemittel für Wissenschaftler des SFB

9.000 DM für Projektbereichssymposien

2003

76.500 DM Reisemittel für Wissenschaftler des SFB

15.000 DM für internationales SFB Symposium

2004

76.500 DM Reisemittel für Wissenschaftler des SFB

Mittel zur Finanzierung von Gastwissenschaftlern (Titel 534)

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 den bisherigen Antragsperioden 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 532)

Drucken und Binden des Finanzierungsantrages (2002-2004)	DM 10.000,--
Drucken und Binden des Ergebnisberichtes (2002-2004)	DM 7.000,--

Mittel zur Öffentlichkeitsarbeit des SFB

"Wissenschaft kann nur bestehen, wenn sie die große Herausforderung annimmt, ihre Methoden und Ziele in aller Öffentlichkeit und Offenheit darzulegen"
Prof.Dr. Ernst-Ludwig Winnacker, DFG-Magazin ,forschung'

Die Initiative Wissenschaft im Dialog, mitbegründet durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, hat es sich zum Ziel gesetzt, den Diskurs zwischen Wissenschaftlern und der Öffentlichkeit zu fördern. Der Sonderforschungsbereich 507 ist der Meinung, dass die von uns behandelten Themen, nämlich Erkrankungen des zentralen Nervensystems und deren molekulare und zelluläre Ursachen, von breitem gesellschaftlichen Interesse sind und dass wir unser Forschungsgebiet mit der Öffentlichkeit diskutieren wollen.

Der SFB hat sich mit einem grossen Stand am Tag der offenen Tür der Charité 1998 präsentiert, hier wurden die Probleme einer solchen Aktion deutlich: Ein professioneller Auftritt (und nur ein solcher spricht an und ist daher sinnvoll) ist sehr aufwendig, und es ist sehr schwer ohne zusätzliche Mittel Mitarbeiter zur aktiven Teilnahme zu bewegen. Zudem fehlen den Wissenschaftlern in diesem Bereich die technischen Mittel (z.B. zur Herstellung von Videopräsentationen oder interaktiven, webbasierten Präsentationen) und die Expertise. Bei der Begutachtung werden wir das von uns für diesen Zweck produzierte Video demonstrieren. Nur durch die Spende eines Patienten war es uns möglich, dieses zu erstellen.

Um unsere Öffentlichkeitsarbeit zu intensivieren und zu professionalisieren, beantragen wir Mittel für drei Maßnahmen:

1. Lehrerweiterbildung
2. Die Teilnahme an der jährlichen Science Street des Forschungsmarktes Berlin
3. Patenschaften für Schulen.

Lehrerweiterbildung

Im naturwissenschaftlichen Bereich zeigte es sich in den letzten Jahren, dass junge Leute immer weniger Interesse an naturwissenschaftlicher Grundausbildung und Promotion haben. Wir müssen daher Abiturienten und Oberschüler an die wichtigen Themen der Naturwissenschaften gezielt heranführen, und die Neurowissenschaften sind mit ihren vielen gesellschaftlichen Bezügen ein für junge Leute attraktives Feld. Wir wollen die jungen Leute über die Schulen erreichen und dabei sind Gymnasiallehrer wichtige Multiplikatoren. Wir haben bisher gute Erfahrungen im Rahmen der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft mit Weiterbildungsveranstaltungen für Gymnasiallehrer gemacht. Wir wollen einmal im Jahr eine solche Weiterbildungs-Veranstaltung durchführen. Die erste bislang mit Beteiligung des SFB im April 2001 durchgeführte Veranstaltung zum Thema 'von den Grundlagen in die Klinik- Was ermöglichen die Fortschritte in den Neurowissenschaften' zeitigte einen großen Erfolg. Ungefähr 50 Biologielehrer aus Berlin und Brandenburg haben an der Veranstaltung am MDC teilgenommen.

Science Street des Forschungsmarktes Berlin

Im Rahmen der Science Street präsentiert sich die Berliner Forschungslandschaft. Es zeigte sich jedoch in diesem Jahr, dass es sehr schwierig ist, Wissenschaftler zu gewinnen, die über den gesamten Zeitraum von einer Woche den Messestand betreuen. Der SFB wird daher in 2001 nicht an dieser Initiative teilnehmen können. Die Science Street soll jährlich stattfinden, und wir wollen in den

nächsten Jahren diese ausgezeichnete Gelegenheit nutzen, unsere Themen der Öffentlichkeit zu präsentieren. Wir brauchen daher sowohl bei der Vorbereitung des Ausstellungsstandes als auch bei der Betreuung wissenschaftliche Hilfskräfte, die man entsprechend im Vorfeld schulen muss. Gerade auch bei der Präsentation des wissenschaftlichen Gebietes ist eine gute Vorbereitung des Ausstellungsstandes notwendig, um die Besucher zu interessieren. Wir wollen dazu mit studentischen Hilfskräften Power Point Präsentationen entwickeln, und wir benötigen auch professionelle Beratung bei der Umsetzung dieser Konzepte.

Patenschaften für Schulen

Um sehr früh interessierte Schüler mit Laborarbeit vertraut zu machen, wollen wir für sie Praktika und nachfolgende Laborarbeiten anbieten, die sich über einen längeren Zeitraum erstrecken. Wir wollen dazu nach einer freiwilligen Periode die Schüler über einen längeren Zeitraum regelmässig mit Aufgaben im Labor beauftragen und diese betreuen. Einige Labore (z.B. Dirnagl mit dem Friedrich-Schiller Gymnasium in Königswusterhausen) haben in einer Pilotphase schon Erfahrung mit diesem Konzept sammeln können, die insgesamt positiv ausgefallen sind. In einem geringen Maße soll die Arbeit auch vergütet werden. Gute Erfahrungen haben wir bisher auch in der Entwicklung von Computerprogrammen, in der Betreuung von Computersoftware und bei einfachen Laborarbeiten. Begleitet wird dieses Programm von regelmässigen Vorträgen junger Wissenschaftler in den Schulen, die innerhalb dieser Patenschaften mit uns verbunden sind.

Es werden deshalb folgende Mittel beantragt

2002 - 2004

pro Jahr		19.000 DM
für die Bezahlung von:		
- studentischen Hilfskraft (halbe)		9000 DM
- Graphikmaterial und Services (Drucken von Postern etc.)	(Titel 532)	5000 DM
- Erstellung von Videos und anderem Demomaterial	(Titel 522)	5000 DM

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

Es werden keine Investitionen beantragt.

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 karl.einhaeupl@charite.de

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

3.1.6 Bisherige und beantragte Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs

(jeweils Ergänzungsausstattung; Beträge in DM 1.000.-)

Haushalts-jahr	Personalkosten	Sächl. Verw.-ausgaben	Investitionen	gesamt
bis 1998	-	-	400	400
1999	-	-	-	-
2000	-	-	-	-
2001	-	-	-	-
Zwischen-summe			400	400
2002	-	-	-	-
2003	-	-	-	-
2004	-	-	-	-

(Beträge in TDM)

Es werden in dieser Förderperiode keine Mittel beantragt.

3.2. Zusammenfassung

Nach langen und intensiven Diskussionen mit verschiedenen Anbietern wurde Ende 1998 der Auftrag zur Beschaffung eines Leica Multiphotonen Konfokalen Mikroskops erteilt. Nach etlichen Problemen, welche im Wesentlichen in Liefer- und Konfigurationsschwierigkeiten der Fa. Leica bestanden, sowie einem Umzug in das besser geeignete und für alle Arbeitsgruppen zentralere Neurowissenschaftliche Zentrum (von der Physiologie) ist das Gerät nun seit Mitte 2000 voll arbeitsfähig und wird von mehreren Gruppen des SFB sowie von externen, kollaborierenden Gruppen intensiv genutzt.

Neben den Mitteln der DFG und der Fakultät sind erhebliche zusätzliche Mittel von den beteiligten Instituten für die Ausstattung der Arbeitsplätze (Elektrophysiologische Messplätze, Infrarotbeleuchtung, kompletter in vivo Aufbau, zusätzliche Laser etc.) von den beteiligten Gruppen, insbesondere von Prof. Heinemann und Prof. Dirnagl, eingebracht worden.

Es werden in dieser Förderperiode keine weiteren Mittel innerhalb des SFBs für das Projekt Z2 beantragt.

3.7 Ergänzungsausstattung für das Teilprojekt

Es werden keine Mittel beantragt.

3.7.1 Begründung des Personalbedarfs

Es werden keine Personalmittel beantragt.

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.

Prof. 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 als Leiter des Neurowissenschaftlichen Zentrums 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)

Es werden keine Investitionen beantragt.

Eine Aufrüstung des Gerätes mit mehreren zusätzlichen Dioden-Lasern und 6-fach AOTF wird derzeit von Prof.Dr.Ulrich Dirnagl mit Mitteln der Hermann und Lilly Schilling Stiftung durchgeführt.

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.

(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 Grundausstattung 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 kollegialen 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 2001

Redaktion: U. Dirnagl, J. Dreier, T. Wolf

Drucklegung am 25.04.2001

gedruckt und gebunden bei

Schmohl & Partner

Berlin - Weißensee