

Sonderforschungsbereich 507

Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen
bei neurologischen Erkrankungen

Arbeits- und Ergebnisbericht 1995 – 1998



Humboldt-Universität zu Berlin

Inhaltsverzeichnis

1.	Allgemeiner Teil.....	5
1.1	Mitglieder und Vorstand.....	5
1.2	Wissenschaftliche Entwicklung und Kooperation im SFB sowie Stellung in der Hochschule	6
A	Projektbereich A: Nicht-neuronale Mechanismen bei akuten ZNS-Erkrankungen	11
A.1	Jens Dreier & Ulrich Dirnagl, Neurologische Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, Berlin: Mechanismen der Blutflußveränderung bei Spreading Depression.	15
A.2	Ingolf Blasig, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin: Stickstoffmonoxidradikale und Hypoxie an Zellen der Blut-Hirn-Schranke.....	35
A.3	Karl M. Einhäupl & Jörg, R. Weber, Neurologische Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, Berlin: Gliaktivierung - ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis	49
A.4	Martin Paul, Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin: Untersuchungen der zellulären und molekularen Regulationsmechanismen des Endothelinsystems im Gehirn	61
B	Projektbereich B: Physiologie und Beeinflussung glialer Tumore	73
B.1	Helmut Kettenmann & Stefan Patt, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch: Physiologische Eigenschaften glialer Tumore	75
B.3	Regina Reszka, Friedrich Weber & Wolfgang Walther, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch: Veränderungen von Zell-Zell-Wechselwirkungen glialer Tumore in vitro und in vivo nach retroviralem und liposomalem Zytokingentransfer	85
B.4	Rosemarie Grantyn, Physiologisches Institut der Humboldt-Universität, Berlin: Funktionelle Eigenschaften und manipulierte Differenzierung von Retinoblastomzellen.....	97

Inhaltsverzeichnis

C	Projektbereich C: Funktionen nicht-neuronaler Zellen bei degenerativen und regenerativen Prozessen im zentralen Nervensystem.....	107
C.1	Robert Nitsch, Anatomisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion...	111
C.2	Thomas Ohm, Anatomisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Expression und Regulation von Apolipoprotein E (ApoE) in Gliazellen nach experimenteller und neuropathologischer Läsion (M. Alzheimer)	127
C.3	Claudia Eder & Uwe Heinemann, Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse.....	145
C.4	Wolfgang Müller & Uwe Heinemann, Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration, freier Fettsäuren und des Glutathionspiegels in pathologisch veränderten und normalen Astrozyten	159
D	Veranstaltungen unter Beteiligung des SFB 507.....	167
E	Gäste des SFB 507	185
F	Kongreßbesuche 1997	187

1. Allgemeiner Teil

1.1 Mitglieder und Vorstand

Mitglieder

Blasig, I. PD Dr. rer. nat.

Dirnagl, U. PD Dr.med.

Dreier, J. Dr.med.

Eder Dr. med.

Einhäupl, K. M., Prof. Dr.med.

Grune, T. Dr. med.

Hanisch, UK Dr. rer. nat.

Hass, R. PD Dr. rer. nat.

Heinemann, U. Prof.Dr.med.

Kettenmann, H. Prof. Dr. rer.nat.

Klee, R. Dr. med.

Lindauer, U. Dr. med.vet.

Müller, W. PD Dr. med.

Nitsch, R. Prof. Dr. med.

Ohm, Prof. Dr. med.

§Paul, Prof. Dr. med.

§Reszka, R. Dr. rer.nat.

Stein, C. Prof. Dr. med.

Volk, H.-D. Prof. Dr. med.

Weber, J. R., Dr.med.

Woiciechowsky, C.Dr. med.

Zimmer, C. Dr. med.

§ assoziierte Mitglieder

Sprecher Prof. Dr. Karl M. Einhäupl
Prof. Dr. Helmut Kettenmann (Stellvertreter)

Vorstand Prof. Dr. Karl M. Einhäupl
und die Projektbereichsleiter:
Priv. Doz. Dr. Ulrich Dirnagl
Prof. Dr. Helmut Kettenmann
Prof. Dr. Robert Nitsch

Sekretär Priv. Doz. Dr. Ulrich Dirnagl

1.2 Wissenschaftliche Entwicklung und Kooperation im SFB sowie Stellung in der Hochschule

Die Gründung des Sonderforschungsbereiches 507 in Berlin fiel in eine Phase der politischen Umstrukturierung und des wissenschaftlichen Aufbruchs. Bei der Planung des SFBs haben die Antragsteller große Erwartungen an die strukturierende und motivierende Kraft eines SFBs gestellt. Dies war um so notwendiger, als durch die Neustrukturierung der Universitätslandschaft in Berlin und v. a. durch die Fusion zweier Klinika nahezu alle Institutionen oft über lange Zeiträume zur Disposition standen. Die Gründung des SFBs sollte dabei nicht nur den bereits berufenen Wissenschaftlern Mut machen und eine Perspektive geben, sondern auch für Neurowissenschaftler außerhalb Berlins den Standort attraktiv machen. Ferner war an die Gründung die Hoffnung geknüpft, die in Berlin ansässigen Wissenschaftler von der Abwanderung abzuhalten und Abwerbungen zu vermeiden.

Ein weiteres wichtiges Ziel bestand darin, die in Berlin gerade neu etablierte Grundlagenmedizin mit den ebenfalls neu eingerichteten klinisch neurologischen Bereichen an der Charité zu verbinden und somit die für die Inspiration von Wissenschaft wichtige Synthese dieser beiden Bereiche zu fördern.

Aus der Sicht der Mitglieder des SFBs sind diese Ziele durch den SFB weit über das erwartete Maß hinaus erreicht worden.

Der neurowissenschaftliche Bereich der Charité (also der Sprecheruniversität) ist unstrittig der allgemein akzeptierte und häufig als vorbildlich zitierte (siehe Wissenschaftsrat) Wissenschaftssektor dieser neuen Fakultät. Die durch den SFB in gewissem Umfang geschaffene "Unantastbarkeit" hat die Entwicklung der Neurowissenschaften maßgeblich befördert. In der Neuorientierung der außeruniversitären Institutionen (Max-Delbrück-Centrum, Institut für Molekulare Pharmakologie) hat sich dadurch eine deutliche Aufeinanderzuentwicklung der universitären und extrauniversitären Einrichtungen ergeben, die sich für beide Seiten zunehmend fruchtbar gestaltet. Die mannigfaltigen Kooperationen zwischen den Projekten des SFB, welche sich sowohl auf der Ebene der methodischen Hilfestellung als auch stark inhaltlich orientiert abspielte, hat zu einer Vielzahl gemeinsamer Publikationen geführt. Die insgesamt sehr gute Publikationsleistung des SFB belegt dabei die internationale Anerkennung, welche die Arbeiten der SFB-Gruppen erfahren haben.

Kooperationen erfolgten aber auch vom SFB hin zu anderen Gruppen in Berlin, welche methodisch oder inhaltlich für den SFB interessant waren. In einer Reihe von Fällen hat dies (sowie die Stärkung der Neurowissenschaften durch den SFB insgesamt) dazu geführt, daß neubesetzte Lehrstühle außerhalb des neurowissenschaftlichen Fächerspektrums sich in Teilbereichen zu den Neurowissenschaften hin orientiert haben. Als Beispiel seien die enge Kooperation auf dem Sektor der Inflammationsforschung mit dem Institut für Mikrobiologie und der klinischen Immunologie (siehe Neuantrag) oder die Gewinnung der allgemeinen Radiologie (siehe Neuantrag) für den SFB genannt.

Der SFB konnte auch entscheidend dazu beitragen, daß Abwanderungen praktisch nicht stattgefunden haben. So wurde eine zeitgleiche Berufung des Neuroanatomen zugunsten der Cha-

rité entschieden. Die Abwendung der anstehenden Berufung des Neurophysiologen nach Bonn wird vermutlich ohne den SFB nicht erfolgreich sein. Auf einen Lehrstuhl berufen wurde aus dem SFB Prof. Paul (A4), Herr PD Patt (B1) wurde auf eine C3-Professur berufen. Eine Reihe von Habilitationen und Dissertationen belegt die die vom SFB ausgehende positive Wirkung auf die Nachwuchsförderung sowohl auf Ebene der Nichthabilitierten, als auch auf der Ebene der Studenten. Hier ist es als besonders positiv zu bewerten, daß die in medizinischen Fakultäten zu häufig klinisch orientierten Dissertationen in den am SFB beteiligten Institutionen eine stark grundlagenorientierte Richtung haben. Durch die wissenschaftlichen Aktivitäten des SFBs, durch seine Kolloquien und seine Öffentlichkeitswirkung werden v. a. Studenten mit Interesse an der klinisch orientierten Grundlagenforschung von den im SFB befindlichen Institutionen angezogen. Sowohl die durch den SFB eingeworbenen Drittmittel, als auch die mittelbar akquirierten Stellen erlauben es zumindest einigen der Doktoranden und Diplomanden (Graduiertenkolleg), Perspektiven in den Einrichtungen zu eröffnen. Der SFB ist ein integraler Bestandteil und wurde ein wesentlicher Stimulus neurowissenschaftlicher Aktivitäten an der Charité und in ihrem Umfeld. Diese Atmosphäre findet ihren realen Niederschlag auch in der Bewertung und im Besuch von Lehrveranstaltungen der neurowissenschaftlichen Fächern, die mit zu den am besten besuchten gehören und die in der studentische Beurteilung mit am besten bewertet werden. Das Neurowissenschaftliche Kolloquium in der Charité bildet dabei ein „Forum“ der neurowissenschaftlichen Aktivitäten, wobei die Beteiligung der Gruppen aus dem SFB 507 das Kernstück darstellt. Das Programmkomitee dieser sowohl von Wissenschaftlern als auch von Studenten sehr gut besuchte Veranstaltung wird im wesentlichen aus Vertretern des SFB 507 gebildet. Hier hat der SFB 507 eine wichtige Rolle in der Integration der neu strukturierten Berliner neurowissenschaftlichen Szene.

Einen wesentlichen Beitrag hat der SFB in der Neustrukturierung und Besetzung der Neuro-pathologie geleistet. Während vor Gründung des SFBs die Neuro-pathologie als eigenes Fach nicht vorgesehen war, gelang es in der Fakultät, dieses nicht nur als eigenständiges Institut zu etablieren, sondern sogar dafür eine C4-Position zu bekommen. Die Berufung dieses Lehrstuhles ist derzeit noch nicht abgeschlossen, da - wiederum durch die Leistungen des SFBs - der Versuch unternommen wird, einen wissenschaftlich hochrangigen Bewerber nach Berlin zu holen. Im Falle des Schweizer Bewerbers ist dies durch unübertreffbare Angebote der Schweizer Seite gescheitert, die Fakultät befindet sich derzeit in Verhandlungen mit dem ebenfalls primo loco gelisteten Bewerber aus Bonn. Die Berufung eines Neurowissenschaftlers vom Format des an erster Stelle gelisteten Bewerbers wäre sicherlich ohne die flankierende Hilfestellung eines SFBs nicht möglich gewesen.

Ein durchaus ernst zu nehmendes Defizit im Bereich der Neurowissenschaften der Charité war im Fehlen neuroimmunologischer Kompetenz zu sehen. Wenngleich es nicht gelungen ist, hier einen ähnlichen Schwerpunkt zu setzen wie dies in der Neuro-pathologie stattfinden wird, konnte doch eine Nachwuchsgruppe in der Neuroanatomie hinzugewonnen werden, die einen immunpharmakologischen Hintergrund hat und sich mit den Signalkaskaden in monozytären Zellen befaßt. Darüberhinaus ist durch die intensiven Kooperationen der an inflammatorischen Mechanismen interessierten Gruppen des SFB, durch die zukünftige Einbindung des Institutes für Medizinische Immunologie und durch die für Oktober 1998 geplante Einstellung eines habilitierten Wissenschaftlers mit neuroimmunologischer Expertise ein wichtiger Schritt in diese Richtung erfolgt. Dies reflektiert sich auch in der Etablierung eines Projektbereiches (B), der sich nun spezifisch mit diesen Fragestellungen auseinandersetzt.

Eine Schwächung hat der neurowissenschaftliche Bereich leider dadurch erfahren, daß die bisher selbständige Abteilung einer Neuroradiologie (eigenes Institut) zu einer Abteilung

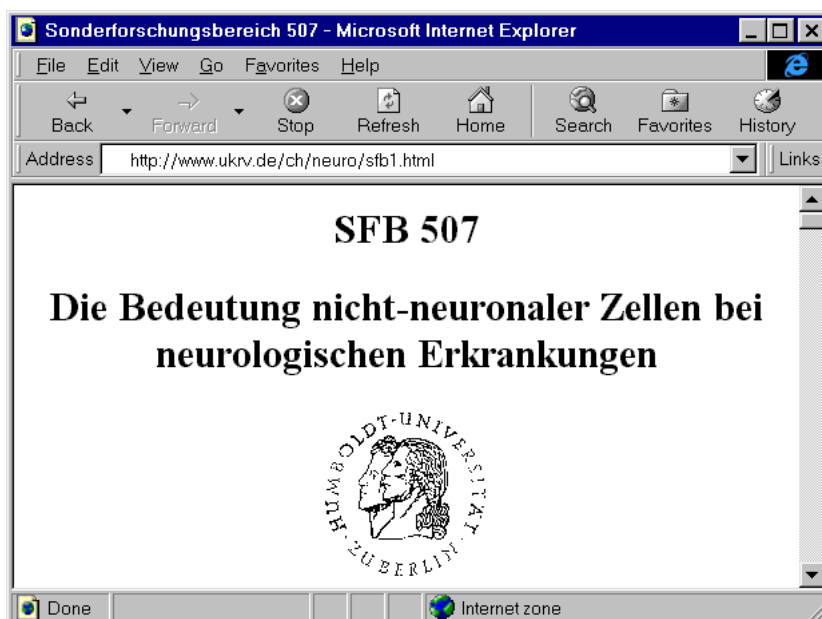
Allgemeiner Teil

gem. BerIHG gemacht wurde, deren Selbständigkeit eingeschränkt ist. Zu bedauern ist auch die Nichtberufung der Neurochirurgie an der Charité (Campus Mitte), die im Rahmen der Fusionsbemühungen nicht mehr durchgesetzt werden konnte. Das wissenschaftliche Profil der vorhandenen Neurochirurgischen Klinik paßt leider nicht in das Spektrum der Forschungen im SFB. Da in 5 Jahren eine Neubesetzung ansteht, ist jedoch zu erwarten, daß Aktivitäten des SFBs maßgeblich Einfluß auf die inhaltliche Ausrichtung des Lehrstuhls nehmen können.

Die bisher nicht erfolgte Berufung des Lehrstuhls für Psychiatrie ist durchaus ein Ausdruck der Stärke und nicht der mangelnden Durchsetzungsfähigkeit des neurowissenschaftlichen Fächerspektrums. Ähnlich wie bei der Neuropathologie wird auch in diesem Bereich versucht, einen erstklassigen Bewerber mit starker Hinwendung zu den grundlagenwissenschaftlichen Fragestellungen zu attraktivieren. Eine von der Kommission und zwischenzeitlich auch von der Fakultät verabschiedete Liste sieht vor, einen humangenetisch orientierten Lehrstuhlinhaber nach Berlin zu holen. Wenngleich fraglich ist, ob er unmittelbar in den SFB integriert werden kann, so wird sicherlich auch das durch den SFB gestärkte Umfeld für einen genetisch orientierten Wissenschaftler einen Anreiz bieten.

In einer Reihe von Veranstaltungen auf regionaler, nationaler und internationaler Ebene konnte sich der SFB erfolgreich nach aussen präsentieren (siehe Verzeichnis am Ende des Berichtsbandes). Besonders hervorzuheben ist hier das gemeinsame Treffen der Berliner Neurowissenschaftlichen SFBs und Graduiertenkollegs, welches nun jährlich stattfinden soll. In 1998 wird dies allerdings nicht durchgeführt, weil im Sommer in Berlin das European Neuroscience Meeting veranstaltet wird. Auch hier ist der SFB organisatorisch und inhaltlich sehr stark vertreten.

Der SFB ist seit seiner Gründung (7/95) im Internet vertreten (<http://www.ukrv.de/ch/neuro/sfb1.html>). An der Zahl der Nachfragen und Kontaktaufnahmen, die sich auf diese Webseiten beziehen, kann man die Effektivität dieser Maßnahme messen. Es konnten so Pressekontakte, inhaltliche bzw. methodische Anfragen von Neurowissenschaftlern, aber auch am SFB interessierte Stipendiaten (z.B. Dr. Linda Iurato, Universita di Palermo Italien; Dr. Drew Walker, Columbia University New York) vermittelt werden.



Allgemeiner Teil

Der SFB 507 wurde vor drei Jahren als vorläufiger SFB eingerichtet. Die dadurch eingeleitete Entwicklung hat zu einer Stärkung der am SFB beteiligten Institutionen, einer Konsolidierung ihrer wissenschaftlichen Programme und zu einer Erweiterung des Spektrums potentieller Interessenten geführt. In einem durchaus schwierigen und vereinzelt schmerzlichen Prozeß wurde im Rahmen der Vorbereitung einer Neuantragstellung eine Konzentration auf Projekte mit hohem wissenschaftlichen Standard erreicht. Es muß aber sicherlich als wichtige Aufgabe des SFBs betrachtet werden, Wissenschaftlern und Arbeitsgruppen im neurowissenschaftlichen Umfeld einen Anreiz zu bieten, im Falle einer positiven Weiterförderung dem SFB beizutreten. Durch die Ausstrahlung des SFBs und den unausgesprochenen Konsens hoher wissenschaftlicher Qualität ist eine weitere Konsolidierung und Qualitätssteigerung für das gesamte neurowissenschaftliche Umfeld zu erwarten.

A Projektbereich A: Nicht-neuronale Mechanismen bei akuten ZNS-Erkrankungen

A1

Jens Dreier & Ulrich Dirnagl, Neurologische Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, Berlin

Mechanismen der Blutflußveränderung bei Spreading Depression

A2

Ingolf Blasig, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin

Stickstoffmonoxidradikale und Hypoxie an Zellen der Blut-Hirn-Schranke

A3

Karl M. Einhäupl & Jörg, R. Weber, Neurologische Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, Berlin

Gliaaktivierung - ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis

A4

Martin Paul, Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin

Untersuchungen der zellulären und molekularen Regulationsmechanismen des Endothelinsystems im Gehirn

ZUSAMMENFASSENDE BERICHT DES PROJEKTBEREICHES

Die in der Projektgruppe A zusammengefassten Einzelprojekte hatten es sich zum Ziel gesetzt, die bisher noch wenig verstandene Interaktion von Endothelzellen, Astrozyten, Mikroglia, und Neuronen in der Akutphase neurologischer Erkrankungen zu untersuchen. Im Zentrum standen hier die Spreading Depression, zerebrale Ischämie und Hypoxie, sowie die bakterielle Meningitis.

Dreier/Dirnagl (A1) (Dr. Back schied nach 1 Jahr aus der Klinik und damit dem Projekt aus) untersuchten *die Interaktion von Glia, Endothel, und zerebralen Blutflußveränderungen bei der Spreading Depression (SD) und bei Perinfarktdepolarisationen (PID)* in tierexperimentellen Ansätzen in vivo. Dabei gelang es zunächst, typische Hämoglobinoxygenierungsmuster bei CSD und bei PID nicht-invasiv mittels Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) zu charakterisieren. Diese Untersuchungen bilden derzeit die Grundlage für eine intensive Suche nach diesen Mustern mit NIRS und funktionellem MR bei akuten Schlaganfallpatienten. In weiterführenden Untersuchungen mit in vivo Chemolumineszenz konnte dann gezeigt werden, daß PID nicht zur Radikalbursts führen, es aber PID unabhängig im Gefolge der Ischämie/Reperfusion zu einem drastischen Anstieg der Radikalproduktion im betroffenen Hirngewebe kommt. Eine zentrale Frage im Zusammenhang mit den putativen Schadensmechanismen der PID war, ob

Projektbereich A

eine PID im Prinzip nichts anderes ist als eine SD ohne Hyperämie. Hierzu versuchten die Antragsteller ein experimentelles Protokoll zu etablieren, das die Hyperämie der SD blockt, um dann zu prüfen ob so das elektrophysiologische, oxygenierungsmäßige Muster einer PID entsteht und das Gewebe schaden trägt. Diese Untersuchungen waren damit auch grundlegende mechanistische Untersuchungen zu den Mechanismen der SD-Hyperämie. Es konnte gezeigt werden, daß das auch in der Migränepathophysiologie relevante trigemiovaskuläre und serotonerge System sowie das parasympathische System mit ihren Mediatoren CGRP, 5HT und ACH an der Mediation der Hyperämie beteiligt sind. Parallel dazu wurde das NO-System und K^+ als mögliche Mediatoren untersucht. Dabei wurden interessante Wechselwirkungen dieser Systeme in der cerebrovasculären Antwort auf SD gefunden, und ein neues Ischämieprinzip, die sog. 'Cortical Spreading Ischemia' entdeckt. Im Gegensatz zum normalen Ablauf einer Ischämie, bei der aus einem zirkulatorischen Problem ein parenchymaler Schaden entsteht, geht hier der Auslöser für die Ischämie vom Hirnparenchym aus und erfaßt sekundär die Zirkulation. Möglicherweise spielt ein Cortical Spreading Ischemia - artiger Mechanismus beim verzögerten Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung oder in der Entstehung von migränösen Infarkten eine Rolle. Dieses Phänomen wird zentraler Gegenstand der weiterführenden Untersuchungen sein. Das Projekt war sehr stark in Kooperationen mit anderen Projekten des SFB involviert, so zum Beispiel dem Projekt A2 (gemeinsame in - vivo BHS Experimente, NO-Messungen), A3 (gemeinsame Experimente mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie), A4 (SD und Ischämieexperimente an ET-transgenen Rattten), B1 (gemeinsame Experimente zur Rolle von Mikroglia beim Schlaganfall), und C3 (optische Untersuchungen bei SD in vitro). Aus dem Projekt selbst und aus den Kooperationen ging eine Reihe von interantional beachteten Publikationen hervor.

Im Projekt von Blasig (A2) wurde die Frage gestellt, wie die *Hypoxie-induzierte Bildung von Nitric oxide (NO) bzw. von freien Sauerstoffradikalen auf die Funktion der Bluthirnschranke* wirkt. Das Projekt untersuchte damit grundlegende Regulationsmechanismen an der Bluthirnschranke sowie für das Verständnis der Schadenskaskade von zerebraler Ischämie/Hypoxie wichtige Störungen der Bluthirnschrankenfunktion. Es wurden dazu zunächst zwei Zellkulturmodelle der Blut-Hirnschranke unter Verwendung von Ratten-Endothelzellen erarbeitet und extensiv charakterisiert. Mit diesen Systemen zeigten die Antragsteller dann, daß Gehirnendothelzellen über Elemente eines NO/cGMP-abhängigen Signaltransduktionsweges verfügen, der in vivo die Dichtigkeit der Blut-Hirnschranke beeinflußt. Die Kokultivierung von Gehirnendothelzellen mit Astrozyten induzierte antioxidativ wirksame Enzyme, die reaktive Sauerstoffspezies beseitigen, die mit NO reagieren und dadurch den NO-Gehalt vermindern. Außerdem wurde gezeigt, daß Astrozyten eine stärkere Radikalabwehr als Gehirnendothelzellen besitzen. Diese Ergebnisse implizieren, daß durch die Wechselwirkung von Astrozyten und Endothelzellen effektive Schutzmassnahmen gegen Hypoxie/Reoxygenierung induziert werden. Dies wird auch dadurch untermauert, daß eine Induktion von MnSOD durch Hypoxie/Reoxygenierung in Endothelzellen gezeigt werden konnte. Hierdurch ergibt sich auch, daß reversible hypoxische Intervalle die Zellen der Blut-Hirnschranke gegen ischämischen Schaden konditionieren können ('Ischämietoleranz'). Dieser Befund schafft nun Anknüpfungen zu Projekt A5, in dem induzierte Ischämietoleranz Untersuchungsgegenstand ist. Das NO-System erwies sich jedoch auch hier als 'Janus-köpfig' insofern eine Induktion der induzierbaren NOS durch längerdauernde Hypoxie erfolgt, welche hohe, potentiell toxische Mengen des Bioradikals erzeugt. Diese Induktion wird vermutlich über Zytokine vermittelt. Auch hier ergeben sich Anknüpfungspunkte zu Projekt A5, indem ja die inflammatorische Komponente der zerebralen Ischämie untersucht werden soll, aber auch besonders zu dem Projekt B5 (vormals A3), in dem Zytokine aus Astrozyten und Endothelzellen eine Schlüsselrolle spielen.

Zur Durchführung der o.g. NO-Analytik wurden neue Methoden etabliert, dies in Zusammenarbeit mit A1, A4 und B3. Das Projekt hat damit die geforderte Etablierung und Validierung des in vitro Modells der Bluthirnschranke geleistet und konnte bereits wichtige Befunde zu Interaktion von Endothelzellen und Astrozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung erheben wobei es methodisch und inhaltlich stark in den SFB eingebunden war.

Weber und Einhäupl (A3) untersuchten *die Schadenskaskade bei bakterieller Meningitis*, wobei die Leukozyten/Endothelinteraktion und die damit zusammenhängende Freisetzung von Interleukinen aus Astrozyten stark im Vordergrund stand. In Zellkultur-Modellen der bakteriellen Meningitis zeigten die Antragsteller erstmals, daß sowohl TNF- α als auch NO von Astrogliazellen nach Inkubation mit Pneumokokkenzellwandbestandteilen (PCW) zeit- und dosisabhängig produziert werden. NO ist dabei von zwei Gesichtspunkten von Bedeutung, da es einerseits ein sehr potenter Vasodilatator ist, zum anderen aber auch neuronotoxisch ist. Voraussetzung für diesen toxischen Effekt scheint die Aktivierung der mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) zu sein, die im Vergleich zu LPS untersucht wurden. In einer in-vivo Studie untersuchten die Antragsteller daraufhin den Effekt von rekombinanten TNF- α auf rCBF, ICP, Leukozyteninvasion und Hirnödem nach intrazisternaler Verabreichung. Überraschenderweise hat dieses Zytokin nur wenig inflammatorische Aktivität. Erstmals zeigten sie, daß ein proinflammatorisches Zytokin in Kombination mit einer geringen, alleine unwirksamen Konzentration von bakteriellem Material zu einer fulminanten Entzündungsreaktion führt. Zudem ist die rCBF Zunahme nach TNF Injektion intrazisternal wahrscheinlich NO mediiert, da sie durch Aminoguanidin inhibierbar war. In Zusammenarbeit mit Projekt A1 zeigten die Antragsteller dann mittels confokaler Laser scanning Mikroskopie in vivo, daß Eingriffe in die Adhäsionskaskade die Zunahme des rCBF, des ICP und des Hirnödems und erwartungsgemäß die Leukozyteninvasion in den CSF hemmen, und daß die Induktion des Leukozytenrollens Histamin-1 Rezeptor vermittelt ist. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von Mastzellen in der Frühphase der Erkrankung hin. Auf pharmakologischer Ebene konnten dann therapeutisch interessante Interventionen mit der Leukozyten - Endothelinteraktion erfolgreich getestet werden: Heparin, das an Selektine binden und so das Leukozytenrollen behindern kann, verringert drastisch die rCBF-, ICP-Anstieg- und Hirnödementwicklung sowie den Einstrom von Leukozyten in den CSF. Effektiv waren auch Heparansulfat und Fucoidin, das vorwiegend die L-Selektinfunktion inhibiert. Einen erfolgreichen Eingriff auf Ebene des Leukozytenstickens führten Weber/Einhäupl mit einem monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 durch. Interessante Ergebnisse wurden auch bezüglich der Interaktion der Gliaaktivierung mit neuronalen Mechanismen erhoben. So zeigte sich, daß eine chronische Denervierung der pialen Gefäße durch chirurgische Durchtrennung des N. nasociliaris, die zu einer Depletion von SP und CGRP in terminalen C-Fasern führt, die Hyperämie in der Akutphase der Meningitis stark abgeschwächt wird. Dieser Befund spricht für eine Beteiligung von Neuropeptide bei der Blutflußregulation bei bakterieller Meningitis. Dem Projekt ist es damit gelungen, in-vitro Modelle der bakteriellen Meningitis zu etablieren und in vivo zu validieren. In vitro und in vivo wurden dabei interessante Befunde zur Interaktion von Endothelzellen, Astrozyten, Leukozyten, und neuronalen Strukturen bei einer akuten bakteriellen Inflammation erhoben, welche von grundlegenden Aspekten der Signaltransduktion bis zu potentiell klinisch relevanten Therapiestrategien reichen. Intensive Kooperationen und Hilfestellungen ergaben sich mit A1 (Tiermodelle, NO, confokale Mikroskopie), sowie B1/B2 (MAP Kinasen, Qualitätskontrolle Zytokineassays, Mikrogliaaktivierung), und A4 (iNOS qRT-PCR), welche sich in hochwertigen gemeinsamen Publikationen reflektieren.

Projektbereich A

Das Projekt von Paul (A4) befaßte sich mit *der Regulation des Endothelin-Systems unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen* im Gehirn. Dazu wurde zunächst die transkriptionelle Regulation des Endothelin-1 und ECE-Gens in Zellkultur untersucht. Es fand sich dabei keine zellspezifische Regulation des Endothelinsystems auf der Ebene der Transkription. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß die zellspezifische Regulation auf Ebene der Rezeptoren zu finden ist. In darauf folgenden Expressionsstudien in Geweben (Zusammenarbeit mit B1) wurde gezeigt, daß der ETB-Rezeptor der dominante Rezeptor auf Bergmann -Glia Zellen ist und dort eine funktionelle Koppelung zeigt. Die Endothelinpeptide werden in Astrozyten nicht exprimiert. Zusammen mit Projekt A1 suchten die Antragsteller in in-vivo Untersuchungen an ET2- überexprimierenden Tieren nach einer funktionelle Rolle des Endothelinsystems bei Spreading Depression und zerebraler Ischämie. Diese Untersuchungen führten über Umwegen zu dem überraschenden Befund, daß Überexpression von Endothelin-2 im transgenen Rattenmodell zu massiven zellulären Differenzierungs- und Migrationsstörungen während der Hinrentwicklung führt. Dies spricht für eine Rolle von Endothelin-2 in der Embryogenese und wird derzeit weiterverfolgt. Aus diesen Befunden ergab sich auch, daß die verwendeten transgenen Tiere für funktionelle Untersuchungen wegen der ZNS-Entwicklungsstörung wenig geeignet sind. Es wurde deshalb ein virales Carriersystem für die Überexpression von Endothelin in nichtendothelialen Zellen entwickelt werden, um so Endothelin via somatischem Gentransfer in adulte Tiere zu transfizieren. Diese Untersuchungen dauern noch an. Herr Paul scheidet wegen seiner Verpflichtungen als Dekan der Medizinischen Fakultät der Freien Universität mit dem Projekt aus dem SFB aus, bleibt jedoch wegen seiner ausgezeichneten Einbindung in eine Reihe von Kooperationsprojekten (A1: ET und Entwicklungsstörungen, ET und zerebrale Ischämie; B1: ET und Bergmannglia; A2: NO-Analytik, PCR) und der hervorragenden methodischen Expertise assoziiertes Mitglied des SFB.

Zwischen allen Projekten des Projektbereiches gab es einen regen inhaltlichen und methodischen Austausch, der sich in einer Reihe gemeinsamer Publikationen niedergeschlagen hat. Dabei kooperierte der Projektbereich nicht nur mit anderen Arbeitsgruppen im SFB, sondern auch mit Berliner Neurowissenschaftlern, welche auf dem Ischämiesektor arbeiten. Dies und die starke Fokussierung auf die cerebrale Ischämie führten zu einer Verstärkung des Projektbereiches für die neue Antragsphase mit einer Reihe von interessanten Projekten. Das Projekt Weber/Einhäupl, welches sich durch mannigfaltige Kooperationen als sehr zentrales Projekt des SFB's erwiesen hat, wird sich in den Projektbereich B integrieren, dessen Fokus nun auch die Inflammation ist, was dem innerhalb des SFB's gestiegenen Interesse an neuroimmunologischen und inflammatorischen Mechanismen Rechnung trägt.

A.1 Jens Dreier & Ulrich Dirnagl, Neurologische Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, Berlin: Mechanismen der Blutflußveränderung bei Spreading Depression.

A.1.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

Die ‚Cortical Spreading Depression of Leão‘ (CSD) (1944) ist eine langsame Depolarisationswelle, die sich mit einer Geschwindigkeit von 3 bis 5 mm / min über die Hirnrinde ausbreitet. Während einer CSD kommt es zu einer ausgeprägten Veränderung des intra- und extrazellulären Milieus (Kraig und Nicholson, 1978). Die Regeneration dieser Veränderungen erfolgt energieabhängig (Mayevsky et al., 1982). Um die notwendige Energie zu liefern und den Extrazellulärraum von toxischen Produkten zu reinigen, steigt der cerebrale Blutfluß (CBF) bei CSD um mehr als 100 % an (Hansen et al., 1980). Dieser Blutflußanstieg dauert ein bis zwei Minuten und wird als ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ (CSH) bezeichnet. Die CSH wandert gemeinsam mit der CSD über die Hirnrinde. Sie wird gefolgt von einer Oligämie (‚Cortical Spreading Oligemia‘) (Lauritzen et al., 1982). Die Mediatoren zwischen Metabolismus und Blutfluß während CSD sind nicht bekannt.

CSD kann im Tierexperiment durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden und stellt somit eine relativ stereotype, pathologische Reaktion des neuronal-glialen Netzwerks auf unterschiedliche Noxen dar (Somjen et al., 1992). Auf diese Weise besteht eine gewisse Verwandtschaft mit epileptischer Aktivität. Tatsächlich tritt CSD nicht selten gemeinsam mit epileptischer Aktivität in Epilepsiemodellen auf, z.B. bei Absenkung der Magnesiumkonzentration in Hirnschnitten bei der Ratte (Mody et al., 1987; Dreier, 1993) und beim Menschen (Avoli et al., 1991). In pathophysiologischen in vivo-Modellen ist die Endstrecke für die Auslösung von CSD häufig die Freisetzung intrazellulärer Komponenten, z.B. durch Energiestoffwechselstörung oder Zellyse. Insbesondere K^+ und Glutamat führen auch bei alleiniger direkter Applikation auf den Cortex zu CSD.

Beim Menschen wird ein symptomatisches Auftreten von CSD entsprechend bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen diskutiert, z.B. Schädelhirntrauma (Mayevsky et al., 1996), Hirninfarkt (Nedergaard und Astrup, 1986; Back et al., 1994) oder Subarachnoidalblutung (Hansen und Lauritzen, 1984). Die klassische Migräne könnte man in Analogie zur Epilepsieklassifikation möglicherweise als primäre Spreading Depression-assoziierte Erkrankung diskutieren (Leão und Morrison, 1945; Lauritzen, 1994).

Obwohl CSD in vivo ein glial/neuronal/vaskuläres Ereignis ist, ist die zerebrale Zirkulation für die Entstehung von CSD keine notwendige Voraussetzung. Wie bereits erwähnt, kann CSD auch in Hirnschnitten ausgelöst werden. Möglicherweise ist sogar ein rein gliales Netzwerk ausreichend, um den Kernmechanismus der CSD auszulösen (Nedergaard, 1994). Andererseits beeinflusst die zerebrale Zirkulation über die Versorgung mit Energiesubstrat erheblich die energieabhängige Gewebsregeneration nach CSD (Mayevsky et al., 1982; Back et al., 1996; Busch et al., 1996).

Unter Normalbedingungen ist die Regeneration des Gewebes nach CSD vollständig. CSD verursacht bei ungestörter Kopplung zwischen Metabolismus und Blutfluß keinen Gewebeschaden (‚Pathophysiologisches Ereignis ohne Pathologie‘, Nedergaard und Hansen, 1988).

Lediglich eine Aktivierung von Mikrogliazellen wird beobachtet (Gehrmann et al., 1993; Caggiano and Kraig, 1996). Man vermutet aber, daß CSD unter den Bedingungen eines gestörten Energiestoffwechsels über eine zusätzliche metabolische Belastung einen sekundären Gewebsschaden verursachen kann. So führt die artifizielle Auslösung von CSD tierexperimentell in der Penumbra von Hirninfarkten zwar nicht zu einer Zunahme des komplett infarzierten Volumens, aber zu einer Zunahme von Einzelzellnekrosen (Back et al., 1996). Im Diffusions-gewichteten Kernspintomogramm während fokaler Ischämie bei der Ratte führt jeder einzelne CSD-Zyklus zu einer graduellen, partiell irreversiblen Ausbreitung der corticalen Störung (Busch et al., 1996). Diese Befunde könnten für die akute Hirninfarkttherapie beim Menschen relevant sein, wenn, wie im Tierexperiment (Nedergaard und Astrup, 1986), spontane Spreading Depression-Äquivalente in Form von Periinfarktdepolarisationen (PIDs) in der Penumbra auftreten. Pharmakologische Blockade von PIDs vermindert tierexperimentell das Infarktvolumen (Iijima et al., 1992). Die zusätzliche metabolische Belastung der Penumbra durch PIDs zeigt sich unter anderem an einer Abnahme der Sauerstoffspannung trotz konstantem oder sogar leicht gesteigertem Blutfluß (Back et al., 1994).

Uns interessierten in diesem Projekt insbesondere folgende Aspekte der CSD:

- 1 Welchen ‚Fingerabdruck‘ erzeugen CSDs und PIDs in der Nahinfrarotspektroskopie, einer nicht-invasiven Methode zur Messung von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin, die auch beim Menschen angewendet werden kann? Finden sich dabei Hinweise für eine Sauerstoffschuld ausgelöst durch PIDs?
- 2 Führt CSD bei blockierter CBF-Antwort im gesunden Hirn zu Gewebsschaden? Ist damit die Blutflußantwort der wesentliche Unterschied von CSD und PID? Voraussetzung für die Prüfung dieser Hypothese war die Entwicklung eines pharmakologischen Protokolls, durch das die CSD-induzierte ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ blockiert werden kann.
- 3 Gibt es im Gegensatz zu Periinfarktdepolarisationen als Folge von Ischämie auch umgekehrt Ischämien als Folge von CSD?
4. Welchen Effekt haben systemische Parameter wie Sauerstoff und Glukose auf die Blutflußantwort der Spreading Depression?
- 5 Kommt es während Periinfarktdepolarisation bei der Ratte zu einer vermehrten Produktion freier Sauerstoffradikale?

A.1.2 Angewandte Methoden

Spezies, Narkose, Präparation:

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

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

Folgende physiologischen Parameter wurden während des Experiments kontinuierlich gemessen und digital registriert: Endexpiratorischer pCO₂ und Lachgaskonzentration (Heyer Infra-

rot-CO₂ und N₂O-Analysator Artema), arterieller Blutdruck, rektale Körpertemperatur. Arterielle Blutgase (AVL-Blutgasanalysator) und Hämatokrit wurden in geeigneten Abständen ermittelt.

Die kranielle Fenstertechnik

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

Okklusion der A. cerebri media erfolgte durch ein Monofilament, welches über einen Katheter in der rechten A. carotis communis von außen bis in die A. cerebri media reversibel vorgeschoben werden konnte. Mit dieser Methode sind zuverlässig transiente Ischämien induzierbar (Nagasawa und Kogure, 1989; Longa et al., 1989).

Im folgenden werden die Untersuchungstechniken kurz beschrieben:

Laser-Doppler Blutflußmessung (LDF):

Die LDF-Methode wurde von uns für die Messung relativer Veränderungen des lokalen Blutflusses im Rattencortex unter Kontroll- und Ischämiebedingungen validiert (Dirnagl et al., 1989). Sie wurde zusätzlich von uns im Antragszeitraum mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops und elektromagnetischen Flußmessungen validiert (Barfod et al., 1997). Die Methode mißt die mikrozirkulatorische Durchblutung (Produkt aus Blutzellgeschwindigkeit und Volumen) in einem Gewebsvolumen von ca. 1 mm³. Es wurde der BPM² Blutflußmonitor der Firma Vasamedics bzw. der Periflux Master 4000 der Firma Perimed verwendet.

Nahinfrarotspektroskopie (NIRS)

NIRS mißt nicht-invasiv Hämoglobin-Oxygenierung und Redoxzustand der Cytochromoxidase (Villringer et al., 1993; Wolf et al., 1996; 1997a; 1997b). Die Methode beruht auf der guten Penetration von nahinfrarotem Licht (ca. 700 – 1000 nm) in biologische Gewebe und der Existenz charakteristischer Absorptionsspektren zweier biologisch relevanter Chromophoren: Hämoglobin und Cytochrom aa₃ (Cytochromoxidase). Diese beiden Chromophoren haben verschiedene Absorptionsspektren in Abhängigkeit von ihrem Oxygenierungs- und Oxydationsgrad. Insofern kann von drei Chromophoren gesprochen werden: Oxyhämoglobin, Deoxyhämoglobin und oxydierter Cytochromoxidase aa₃. Dagegen weist die reduzierte Cytochromoxidase keine relevante Absorption auf. Aussagen zur Cytochromoxidase waren mit dem NIRO 500 allerdings nur eingeschränkt möglich, da keine Pfadlängenkorrektur des Lichtwegs durchgeführt werden konnte, und nur bei 4 Wellenlängen gemessen wurde.

Chemilumineszenz

in vivo haben wir mit einem gekühlten Photomultiplier (Hamamatsu R943-02) durch das kraniale Fenster durchgeführt. Die Photonen wurden durch einen Hewlett-Packard Universal

Counter (HP 5316 B) verstärkt und gezählt. Die Daten wurden mit Hilfe eines PCs aufgezeichnet. Lucigenin wurde als Standard-Chemilumineszenz-Verstärker eingesetzt. Lucigenin produziert Licht einer Wellenlänge zwischen 450 und 500 nm bei Reaktion mit freien intracellulären Sauerstoffradikalen. Es ist besonders sensitiv für Superoxid-Radikale. Der Vorteil der Chemilumineszenz-Methode gegenüber anderen Methoden ist seine hohe Sensitivität und exzellente zeitliche Auflösung. Auf diese Weise kann die Radikalproduktion bei cerebraler Ischämie on-line verfolgt werden (Dirnagl et al., 1995).

Immunhistochemie

wurde zur Überprüfung der Degeneration trigeminaler perivaskulärer Nervenfasern nach chronischer Durchschneidung des N. nasociliaris durchgeführt. Wir verwendeten eine Methode nach Suzuki et al. (1989). Nach Fixation der Gefäße wurde CGRP durch ein CGRP-Antiserum vom Kaninchen markiert. Der gebundene Antikörper wurde durch einen fluoreszierenden Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht.

A.1.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

A.1.3.1 Messung von Periinfarktdepolarisationen bei der Ratte mit der nicht-invasiven Methode der Nahinfrarotspektroskopie

Mit Hilfe des NIRO 500 von Hamamatsu und einer Kalomelelektrode haben wir die Veränderungen von Oxyhämoglobin, Deoxyhämoglobin und DC-Potential bei Spreading Depression (Wolf et al., 1996) und in der Infarkttrandzone von Hirninfarkten aufgezeichnet (Wolf et al., 1997a). KCl-induzierte CSDs führten zu einem transienten Anstieg des oxygenierten Hämoglobins und zu einem Abfall des deoxygenierten Hämoglobins (Wolf et al., 1996). PIDs nach Okklusion der A. cerebri media waren im Gegensatz zu normalen CSDs assoziiert mit einem leichten initialen Abfall des oxygenierten Hämoglobins, gefolgt von einem Anstieg. Das deoxygenierte Hämoglobin verhielt sich umgekehrt (Wolf et al., 1997a). Daraus ergibt sich einerseits, daß CSDs und PIDs prinzipiell nicht-invasiv mit Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) meß- und unterscheidbar sind. Andererseits zeigt sich, daß bei PIDs im Gegensatz zu normalen CSDs eine initiale Sauerstoffschuld entsteht. Dieser Befund korreliert mit direkten Messungen des Sauerstoffpartialdrucks. Versuche, PIDs beim Menschen mit NIRS und funktioneller Kernspintomographie zu messen, werden zur Zeit an unserer Klinik durchgeführt.

A.1.3.2 Hemmung der ‚Cortical Spreading Hyperemia‘

Um die Frage untersuchen zu können, ob die ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ unter Normalbedingungen einen Gewebsschaden verhindert, haben wir nach einem Protokoll gesucht um die CSH zu blockieren. Deshalb haben wir den Einfluß verschiedener Systeme und Mediatoren auf die CSH untersucht. Dazu gehören die perivaskulären Nervenfasern des Trigemini (Mediatoren: Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), Substanz P, Neurokinin A), perivaskuläre Nerven des Parasympathicus (Mediatoren: Acetylcholin, Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), Neuropeptide Y und NO[•]) und das serotonerge System. Mediatoren, die von vielen unterschiedlichen Quellen entstammen können, sind z.B. K⁺, H⁺ und NO[•].

Das trigemiovaskuläre System

Bei CSD wird der Nucleus caudatus des N. trigeminus aktiviert. Dies zeigt sich durch eine Induktion von c-fos, die durch meningeale Deafferenzierung geblockt wird (Moskowitz et al., 1993). Eine Freisetzung von Transmittern aus perivaskulären Nervenendigungen wird daher angenommen. Die Transmitter dieses Systems wirken im wesentlichen vasodilatatorisch, weshalb eine Rolle des trigeminovaskulären Systems für die CSH von uns postuliert wurde. Die Bedeutung einer Freisetzung trigeminovaskulärer Transmitter für die ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ (CSH) haben wir über einen chirurgischen und einen pharmakologischen Ansatz untersucht (Reuter et al., eingereicht). Der chirurgische Ansatz bestand darin, den N. nasociliaris vor dem Durchtritt durch das Foramen ethmoidale zu durchtrennen, der die trigeminovaskulären Fasern für die Meningen führt. Nach akuter Durchtrennung kam es nicht zu einer Verminderung der CSH. 14 Tage nach Durchtrennung aber, d.h. nach Degeneration der Nervenfasern und Axonterminalen, war die CSH auf der ipsilateralen Seite um 23 % vermindert. Wie oben erwähnt ist CGRP ein wichtiger Transmitter des trigeminovaskulären Systems. Die topische Gabe des CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ bei nicht-durchtrenntem N. nasociliaris reduzierte die CSH signifikant um 49 %. Beide Ergebnisse belegen, daß trigeminovaskuläre Fasern an der CSH beteiligt sind. Die Daten sind insbesondere deshalb interessant, da das trigeminovaskuläre System wahrscheinlich das Schlüsselsystem für die Entstehung des migränösen Kopfschmerzes ist (Moskowitz und MacFarlane, 1993). Sie korrelieren gut mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen in anderen Modellen und Spezies (Colonna et al., 1994; Wahl et al., 1994).

Das parasympathische System

Auch das parasympathische System führt zu einer meningealen Vasodilatation. Die Bedeutung dieses Systems für die ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ wurde bisher noch nicht untersucht. Wir wählten wie bei der Analyse des trigeminovaskulären Systems einen chirurgischen und einen pharmakologischen Ansatz (Reuter et al., eingereicht). Eine kombinierte chronische Durchtrennung des N. nasociliaris und der parasympathischen Fasern vor dem Durchtritt durch das Foramen ethmoidale verursachte (chronisch, nicht jedoch akut) eine signifikant größere Reduktion der CSH um 55 % als die isolierte Durchtrennung des N. nasociliaris. Atropin reduzierte die CSH bei nicht-durchtrenntem Nerven signifikant um 41 %. Somit ist auch der Parasympathicus an der CSH beteiligt.

Das serotonerge System

Das serotonerge System wirkt auf die zerebralen Gefäße strategisch von mehreren Seiten. Zentral liegen serotonerge Neurone im Nucleus dorsalis raphé, die über das mediale Vorderhirnbündel unter anderem den Cortex versorgen. Sie wirken insbesondere auf die Mikrozirkulation. Um die großen Zerebralarterien und die kleinen pialen Gefäße liegen perivaskuläre, serotonerge Nervenfasern, die aus dem Ganglion cervicale superius stammen. Serotonin liegt auch in hohen Konzentrationen in Thrombozyten vor und kann von Endothelzellen gebildet werden.

Serotonin wirkt auf die Gefäße der Mikrozirkulation dilatatorisch über Serotonin₂-Rezeptoren. Diese führen wahrscheinlich zu einer NO-Freisetzung, welche die Vasodilatation vermittelt (Parsons et al., 1992). Andererseits wirkt Serotonin vasokonstriktorisch auf die größeren Gefäße über Serotonin_{1Dβ}-Rezeptoren.

In unseren Experimenten verminderte Ritanserin, ein unspezifischer Serotonin₂-Rezeptor-Antagonist, die CSH um 44 % signifikant (Gold et al., im Druck). Der hochselektive Seroto-

nin_{1D β} -Rezeptorantagonist 311C90 steigerte die CSH signifikant um 38 % (Gold et al., im Druck). Auf diese Weise konnten wir zeigen, daß sowohl die vasokonstriktorische als auch die vasodilatatorische Komponente von Serotonin an der CSD-induzierten Blutflußantwort beteiligt sind. Auch diese Ergebnisse sind besonders interessant im Hinblick auf die Beteiligung des serotonergen Systems bei der Migräne. Z.B. sind die derzeit wirksamsten Medikamente in der Akutbehandlung des Migränekopfschmerzes Serotonin_{1D β} -Agonisten wie Sumatriptan.

NO \cdot , K $^+$ und H $^+$

Es ist extrem unwahrscheinlich, daß H $^+$ als Vasodilatator bei Spreading Depression eine Rolle spielt, da die CO₂-Antwort nach CSD über lange Zeit erloschen ist, die CSH jedoch auch bei Wiederholung von CSDs in kurzen zeitlichen Abständen gleichbleibt (Lauritzen, 1984; Wahl et al., 1987).

K $^+$ ist ein cerebraler Vasodilatator in extrazellulären Konzentrationen bis 20 mM und ein Vasokonstriktor in Konzentrationen über 20 mM. Während CSD steigt die extrazelluläre K $^+$ -Konzentration auf 60 mM im Cortex an (Kraig und Nicholson, 1978). Der direkte K $^+$ -Effekt müßte daher zumindest im Cortex während CSD vasokonstriktorisch sein.

K $^+$ besitzt eine komplizierte Wechselwirkung mit dem Vasodilatator NO \cdot . So konnten wir zeigen, daß NO \cdot einen permissiven Effekt auf die K $^+$ -induzierte Blutflußsteigerung besitzt (Dreier et al., 1995), d.h. nur in Anwesenheit von NO \cdot führt K $^+$ im mäßig erhöhten Konzentrationsbereich zu einer deutlichen Blutflußsteigerung. Andererseits ist NO \cdot ein effizienter Antagonist gegen Vasokonstriktion als Folge hoher K $^+$ -Konzentrationen (Minato et al., 1995).

NO \cdot wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet (Moncada et al., 1991). Die konstitutive NOS wird durch intrazelluläre Calciumerhöhung aktiviert, so daß eine Steigerung der NO-Produktion aufgrund des intrazellulären Calciumanstiegs während CSD sehr wahrscheinlich ist. Die Bedeutung von NO \cdot für die CSH wird allerdings kontrovers gesehen. Bei fast allen bisherigen Studien zu diesem Thema wurde der NO \cdot -Effekt indirekt entweder durch eine systemische oder topische Hemmung der NOS durch Nitro-L-Arginin-Analoga untersucht. Duckrow (1993) berichtete dabei eine Modulation der Blutflußantwort auf CSD bei der wachen Ratte mit einer kurzen initialen Hypoperfusion und einer nicht-signifikanten Reduktion der CSH. Fabricius et al. (1995) bestätigten die kurze initiale Hypoperfusion, fanden aber keinen Effekt auf die CSH. Colonna et al. (1997) zeigten eine Reduktion der CSH beim anästhetisierten Kaninchen. Goadsby et al. (1992) konnten die CSH bei der anästhetisierten Katze sogar vollständig blockieren. Eine initiale Hypoperfusion wurde von diesen Autoren aber nicht gesehen. Wahl et al. (1994) fanden eine signifikante Reduktion der CSD-induzierten pialen Vasodilatation bei der anästhetisierten Katze und Colonna et al. (1994) beim anästhetisierten Kaninchen. Dagegen beobachteten Zhang et al. (1994) keinen Effekt bei der anästhetisierten Ratte. Wir haben zwei Studien durchgeführt (Wolf et al., 1996; Dreier et al., im Druck). In der ersten Studie (Wolf et al., 1996) mit systemischer NOS-Inhibition an der anästhetisierten Ratte fanden wir keinen Effekt, vergleichbar den Ergebnissen von Zhang et al. (1994). In der zweiten Studie mit topischer NOS-Inhibition entdeckten wir eine Reduktion der CSH um 34 % und eine initiale kurze Hypoperfusion ähnlich den Ergebnissen von Duckrow (1993). Der Effekt des NO-Scavengers Hämoglobin war ähnlich (Reduktion der CSH um 46 %, Dreier et al., im Druck). Da die Inhibition der NO-Synthase nach topischer NOS-Inhibition höher ist (Dreier et al., im Druck) als bei systemischer NOS-Inhibition (Zhang et al., 1994), könnten die unterschiedlichen Effekte möglicherweise auf einen Schwelleneffekt von NO \cdot bei der CSD hinweisen. Ein solcher Schwelleneffekt wäre gut vereinbar mit einem permissiven Effekt von NO \cdot für andere Vasodilatoren bei der CSH. Ein permissiver Effekt

von NO⁻ wurde bereits für verschiedene Vasodilatoren beschrieben, neben K⁺ z.B. für H⁺ und α_2 -Adrenozeptoren (Iadecola et al., 1994; Iadecola und Zhang, 1996; Bryan et al., 1995; Dreier et al., 1995). Die Befunde sprechen nicht für eine dominierende Rolle einer Agonisten-induzierten NOS-Aktivierung.

Zusammengefaßt,

war es nicht möglich, die CSH durch ein experimentelles Protokoll vollständig zu blockieren. Daher konnte die Frage nicht untersucht werden, ob CSD ohne Blutflußantwort unter normalen Bedingungen zu einem neuronalen Schaden führt. Unsere bisherigen Ergebnisse und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen auch, warum dies kaum möglich sein wird. Zur CSD-induzierten ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ tragen die unterschiedlichsten vasodilatatorischen Systeme synergistisch bei, so daß die Ausschaltung eines Vasodilators wahrscheinlich immer kompensiert werden kann. Nichtdestoweniger ist die Charakterisierung dieser Systeme ein insbesondere für die Migränerforschung relevanter Beitrag.

Zusätzlich haben wir bei den Untersuchungen zur physiologischen Wechselwirkung zwischen NO⁻ und K⁺ in der zerebralen Zirkulation (Dreier et al., 1995) spontane Ischämien als Folge von NOS-Inhibition und erhöhter subarachnoidaler K⁺-Konzentration entdeckt, welche im weiteren Fortgang des Projektes näher untersucht werden sollen (siehe Fortsetzungsantrag Dreier/Dirnagl). Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, daß diesen spontane CSDs mit umgekehrter Kopplung zwischen cerebralem Metabolismus und Blutfluß, d.h. CSD-induzierte transiente zerebrale Ischämien zugrundeliegen (Dreier et al., im Druck). Wahrscheinlich ist für dieses Phänomen die Potenzierung eines CSD-induzierten Vasokonstriktors verantwortlich, der alle gemeinsam beteiligten vasodilatatorischen Systeme außer Kraft setzt. Dieses Phänomen ist qualitativ von der Ausgangsfragestellung soweit entfernt, daß wir es getrennt behandeln wollen. Denn im Gegensatz zu Perinfarktdepolarisationen, die Folge einer Ischämie sind, ist bei der CSD-induzierten Ischämie die glial/neuronale Depolarisation Ursache der Ischämie. Die CSD-induzierte Ischämie wird im folgenden Abschnitt besprochen.

A.1.3.3 ‚Cortical Spreading Ischemia‘: ein neues, zerebrales Ischämieprinzip

Durch eine subarachnoidale Applikation des NO⁻-Scavengers Hämoglobin kombiniert mit Kaliumerhöhung auf 35 mM wurden akute, spontane, transiente ischämische Ereignisse hervorgerufen (Dreier et al., im Druck). Dabei wurde der Blutfluß auf $14 \pm 7\%$ im Vergleich zur Baseline (= 100 %) reduziert. Die ischämischen Ereignisse dauerten 53 ± 17 Minuten und waren assoziiert mit einer Negativierung des subarachnoidalen DC-Potentials um maximal -7.3 ± 0.6 mV, die 49 ± 12 Minuten andauerte. Wurde in unserem experimentellen Protokoll Hämoglobin durch NOS-Inhibition ersetzt, ereigneten sich die gleichen spontanen Ischämien. Auslösung von CSD in einer Entfernung von 5 mm induzierte mit Verzögerung eine typische ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ und ein negatives DC-Potential im kraniellen Fenster, wenn eine physiologische artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) superfundiert wurde. CSD induzierte eine langdauernde transiente Ischämie, wenn eine Superfusion mit erhöhter subarachnoidaler Kaliumkonzentration auf 20 mM kombiniert entweder mit Hämoglobin oder NO⁻-Synthase-Inhibitor erfolgte. Die transiente Ischämie breitete sich mit einer ähnlichen Geschwindigkeit von 3 - 4 mm / min aus wie die ‚Cortical Spreading Hyperemia‘ unter Normal-

bedingungen. Aufgrund der Ausbreitungscharakteristik läßt sich die CSD-induzierte Ischämie daher am besten als ‚Cortical Spreading Ischemia‘ (CSI) beschreiben.

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

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

Damit ist die CSI ein qualitativ neues Phänomen der cerebralen Zirkulation. Es handelt sich um ein vollkommen neues Ischämieprinzip, daß auf einer gestörten Kopplung zwischen cerebralem Metabolismus und Blutfluß beruht. Die Induktion der Ischämie erfolgt dabei nicht durch ein primär vaskuläres, sondern durch ein glial/neuronales Ereignis. Dagegen werden konventionelle Ischämien immer durch primär vaskuläre Ereignisse ausgelöst (Embolie, Thrombose, experimentelle Applikation eines Vasokonstriktors). Das Parenchym ist bei den konventionellen Ischämien nur ‚Opfer‘, nicht aber Verursacher der Ischämie.

Auf der Basis der ‚Spreading Depression-Theorie‘ der Migräne haben wir die Hypothese aufgestellt, daß die CSI eine pathophysiologische Rolle bei bestimmten Formen migränöser Infarkte spielen könnte. Migränöse Infarkte beginnen mit einer migränösen Aura, deren pathophysiologisches Korrelat wahrscheinlich eine Spreading Depression ist (Leão und Morrison, 1945; Lauritzen, 1994), münden aber im Gegensatz zur normalen Migräneaura in einen Infarkt (Broderick et al., 1997).

Eine andere hypothetische pathophysiologische Bedeutung der CSI ergibt sich aus der Auslösung spontaner CSIs durch subarachnoidale Applikation des NO-Scavengers Hämoglobin in Kombination mit subarachnoidaler K⁺-Erhöhung. Hämoglobin und K⁺ sind die beiden wichtigsten intrazellulären Faktoren des Erythrozyten. Nach Subarachnoidalblutung kommt es in Korrelation mit der Menge des subarachnoidalen Blutes (Fisher et al., 1980) und zeitlicher Korrelation mit der Hämolyse (MacDonald und Weir, 1991) zu den sogenannten verzögerten ischämischen Defiziten. Bisher ist der pathophysiologische Mechanismus dieser im wesentlichen corticalen (Stoltenburg-Didinger und Schwarz, 1987; Stoltenburg-Didinger, 1997; Neil-Dwyer et al., 1994) ischämischen Ereignisse noch nicht bekannt. Wir vermuten, daß CSI der pathophysiologische Mechanismus der verzögerten ischämischen Defizite nach Subarachnoidalblutung sein könnte (Dreier et al., im Druck). Dafür spricht auch die Nimodipin-Sensitivität der CSI. Nimodipin ist das einzige bekannte Medikament, das einen gesicherten Effekt gegen die verzögerten ischämischen Defizite besitzt.

A.1.3.4 Einfluß systemischer Parameter wie Sauerstoff und Glukose auf die CSD-induzierte Blutflußantwort

Kürzlich wurde eine neue elementare Funktion des Hämoglobins beschrieben. Danach könnte eine Sauerstoff-abhängige NO-Bindung und -Freisetzung von Hämoglobin an der Kopplung zwischen cerebralem Metabolismus und Blutfluß beteiligt sein. Hämoglobin bindet NO mit einer 1500fach höheren Affinität als Sauerstoff (Gibson and Roughton, 1957). Die Bindung erfolgt an seiner Hämgruppe und der reaktiven Sulfhydryl-Gruppen an Cystein⁹³. Deoxygenierung verursacht einen Übergang von S-nitroso-Hämoglobin von der R(oxygeniert)- in die T(deoxygeniert)-Struktur. S-nitroso-Hämoglobin kontrahiert Blutgefäße in der R-Struktur, während es sie in der T-Struktur relaxiert. Die Vasodilatation in der T-Struktur ist abhängig von Glutathion und auf eine NO-Freisetzung an Cystein⁹³ zurückzuführen (Stamler et al., 1997; Jia et al., 1996). Demnach würde ein vermehrter Sauerstoffverbrauch durch das Gewe-

be direkt zu einer Blutflußsteigerung durch Freisetzung von NO[•] aus Hämoglobin führen. Wenn diese Sauerstoff-geregelte NO[•]-Bindung und -Freisetzung tatsächlich maßgeblich an der physiologischen Kopplung beteiligt ist, sollte eine starke Hyperoxie die Blutflußsteigerung durch aktivierten Metabolismus hemmen. Wir konnten aber weder für die CSD-induzierte Blutflußantwort noch für die Whiskerstimulations-induzierte Antwort eine Beeinflussung durch Hyperoxie feststellen (Wolf et al., 1997b). Der beschriebene Regelkreis spielt daher bei physiologischen und erhöhten Sauerstoffspannungen eher keine Rolle, könnte aber bei Hypoxie und Ischämie relevant sein. Wir testeten auch den Effekt einer Hyperglykämie, die ebenfalls keinen Einfluß in unserem Modell hatte. Damit haben wir starke Hinweise erhalten, daß die Blutflußantwort nicht über einen Substratsensor-Mechanismus reguliert wird.

A.1.3.5 Korreliert die freie Sauerstoff-Radikalproduktion mit der Entstehung von Periinfarktdepolarisationen?

Die freie Sauerstoffradikalproduktion wurde mit Hilfe der Lucigenin-induzierten Chemilumineszenz gemessen. Permanente Okklusion der A. cerebri media führte zu einem stetigen Anstieg der freien Sauerstoffradikalproduktion, während Reperfusion nach Mediaokklusion einen Radikalburst induzierte. In beiden Modellen kam es nicht zu einem Radikalanstieg in Korrelation mit Periinfarktdepolarisationen (PIDs) (Peters et al., im Druck). Diese Befunde sprechen gegen einen Sauerstoffradikal-induzierten neuronalen Schaden durch PIDs. Die fehlende Veränderung der freien Sauerstoffradikalproduktion während PIDs zeigt damit eine Übereinstimmung mit dem Befund normaler CSDs. Davon eindeutig abzugrenzen ist wiederum das Radikalproduktionsmuster der ‚Cortical Spreading Ischemia‘. Bei der CSI kommt es wie bei Mediaokklusion zu dem typischen Muster der transienten Ischämie mit einem initialen Abfall gefolgt von einem Radikalburst (Dreier et al., im Druck).

Zitierte Literatur

- 1 Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, Villemure JG (1991) Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol* 30(4):589-596
- 2 Back T, Kohno K, Hossmann KA (1994) Cortical negative DC-deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: Effect on blood flow, tissue oxygenation, and encephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:12-19
- 3 Back T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD (1996) Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(2):202-213
- 4 Barfod C, Akgören N, Fabricius M, Dirnagl U, Lauritzen M (1997) Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation. *Acta Physiol Scand* 160(2):123-132
- 5 Broderick JP (1997) Stroke and migraine. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B eds. *Primer on Cerebrovascular Diseases*, Academic Press, pp 333-335
- 6 Bryan RM, Steenberg ML, Eichler MY, Johnson TD, Swafford MW, Suresh MS (1995) Permissive role of NO in alpha 2-adrenoceptor-mediated dilations in rat cerebral arteries. *Am J Physiol* 269:H1171-H1174

- 7 Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA (1996) Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(6):1090-1099
- 8 Caggiano AO, Kraig RP (1996) Eicosanoids and nitric oxide influence induction of reactive gliosis from spreading depression in microglia but not astrocytes. *J Comp Neurol* 369(1):93-108
- 9 Colonna DM, Meng W, Deal DD, Busija DW (1994) Nitric oxide promotes arteriolar dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke* 25:2463-2470
- 10 Colonna DM, Meng W, Deal DD, Gowda M, Busija DW (1997) Neuronal NO promotes cerebral cortical hyperemia during cortical spreading depression in rabbits. *Am J Physiol* 272:H1315-H1322
- 11 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
- 12 Dirnagl U, Villringer A, Gebhardt R, Haberl RL, Einhüpl KM (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain microcirculation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:353-360
- 13 Dirnagl U, Thoren P, Villringer A, Sixt G, Them A, Einhüpl KM (1993) Global forebrain ischemia in the rat: controlled reduction of cerebral blood flow by hypobaric hypotension and two vessel occlusion. *Neurol Res* 15:128-130
- 14 Dirnagl U, Lindauer U, Them A, Schreiber S, Pfister H-W, Koedel U, Reszka R, Freyer D, Villringer A (1995) Global cerebral ischemia in the rat: Online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:929-940
- 15 Dreier JP (1993) Physiologische und pharmakologische Eigenschaften der Niedrig-Magnesium-Epilepsie im Temporallappenpräparat der Ratte. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
- 16 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
- 17 Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1997) Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induce cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* im Druck
- 18 Duckrow RB (1993) A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. *Brain Res* 618:190-195
- 19 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
- 20 Fisher CM, Kistler JP, Davis JM (1980) Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6:1-9

- 21 Gehrman J, Mies G, Bonnekoh P, Banati R, Iijima T, Kreutzberg GW, Hossmann KA (1993) Microglial reaction in the rat cerebral cortex induced by cortical spreading depression. *Brain Pathol* 3(1):11-17
- 22 Gibson QH, Roughton FJW (1957) The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *J Physiol (London)* 136:507-526
- 23 Goadsby PJ, Kaube H, Hoskin KL (1992) Nitric oxide synthesis couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Res* 595:167-170
- 24 Gold L, Reuter U, Back T, Arnold G, Dreier J, Dirnagl U (1997) Cortical spreading depression associated hyperemia in rats: involvement of serotonin. *Brain Res im Druck*
- 25 Hansen AJ, Lauritzen M (1984) The role of spreading depression in acute brain disorders. *An Acad Bras Cienc* 56(4):457-479
- 26 Hansen AJ, Quistorff B, Gjedde A (1980) Relationship between local changes in cortical blood flow and extracellular K⁺ during spreading depression. *Acta Physiol Scand* 109:1-6
- 27 Iadecola C, Zhang F, Xu X (1994) SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors. *Am J Physiol* 267:R228-R235
- 28 Iadecola C, Zhang F (1996) Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol* 271:R990-R1001
- 29 Iijima T, Mies G, Hossmann KA (1992) Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: Effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:727-733
- 30 Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380:221-226
- 31 Kraig RP, Nicholson C (1978) Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 3:1045-1059
- 32 Lauritzen M (1984) Long-lasting reduction of cortical blood flow of the rat brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:546-554
- 33 Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura The spreading depression theory. *Brain* 117:199-210
- 34 Lauritzen M, Balslev Jørgensen M, Diemer NH, Gjedde A, Hansen AJ (1982) Persistent oligemia of rat cerebral cortex in the wake of spreading depression. *Ann Neurol* 12:469-474
- 35 Leão AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390
- 36 Leão AAP, Morison RS (1945) Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 8:33-45
- 37 Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1993) Characterization of CBF response to somatosensory stimulation: model and influence of anesthetics. *Am J Physiol* 33:H1223-1228
- 38 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91

- 39 MacDonald RL, Weir BKA (1991) A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22:971-982
- 40 Mayevsky A, Zarchin N, Friedli CM (1982) Factors affecting the oxygen balance in the awake cerebral cortex exposed to spreading depression. *Brain Res* 236:93-105
- 41 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
- 42 Minato H, Hashizume M, Masuda Y, Hosoki K (1995) Modulation of extraluminally induced vasoconstrictions by endothelium-derived nitric oxide in the canine basilar artery. *Arzneimittelforschung* 45:675-678
- 43 Mody I, Lambert JD, Heinemann U (1987) Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 57:869-888
- 44 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142
- 45 Moskowitz MA, Macfarlane R (1993) Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5:159-177
- 46 Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP (1993) Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci* 13:1167-1177
- 47 Nagasawa H, Kogure K (1989) Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 20:1037-1043
- 48 Nedergaard M (1994) Direct signalling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771
- 49 Nedergaard M, Astrup J (1986) Infarct rim: Effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:607-615
- 50 Nedergaard M, Hansen AJ (1988) Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449(1-2):395-398
- 51 Neil-Dwyer G, Lang DA, Doshi B, Gerber ChJ, Smith PWF (1994) Delayed cerebral ischaemia: the pathological substrate. *Acta Neurochir (Wien)* 131:137-145
- 52 Parsons AA, Schilling L, Wahl M (1992) Nitric oxide as a modulator of 5-hydroxytryptamine-induced responses in rat pial arterioles in situ. In: Olesen J, Saxena PR eds. *5-hydroxytryptamine mechanisms in primary headaches*, New York, Raven Press, pp 157-162
- 53 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* 18:196-205
- 54 Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U () Locally triggered release of neurotransmitters from perivascular nerves contributes to cortical spreading depression associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* (im Druck)

- 55 Schreiber SJ, Megow D, Raupach A, Victorov IV, Dirnagl U (1995) Age-related changes of oxygen free radical production in the rat brain slice after hypoxia: on-line measurement using enhanced chemiluminescence. *Brain Res* 703:227-230
- 56 Somjen GG, Aitken PG, Czéh GL, Herreras O, Jing J, Young JN (1992) Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can J Physiol Pharmacol* 70:248-254
- 57 Stamler JS, Jia L, Eu P, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276:2034-2037
- 58 Suzuki N, Hardebo JE, Owman C (1989) Origins and pathways of cerebrovascular nerves storing substance P and calcitonin gene-related peptide in rat. *Neuroscience* 31:427-438
- 59 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
- 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
- 61 Villringer A, Planck J, Hock C, Schleinkofer L, Dirnagl U (1993) Near infrared spectroscopy (NIRS): A new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults. *Neurosci Lett* 154:101-104
- 62 Wahl M, Lauritzen M, Schilling L (1987) Change of cerebrovascular reactivity after cortical spreading depression in cats and rats. *Brain Res* 411:72-80
- 63 Wahl M, Schilling L, Parsons AA, Kaumann A (1994) Involvement of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and nitric oxide (NO) in the pial artery dilatation elicited by cortical spreading depression. *Brain Res* 637:204-210
- 64 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
- 65 Wolf T, Lindauer U, Reuter U, Back T, Villringer A, Einhüpl K, Dirnagl U (1997a) Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during peri-infarct depolarizations in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:950-954
- 66 Wolf T, Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1997b) Excessive oxygen or glucose supply does not alter the blood flow responses to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res* 761:290-299
- 67 Zhang ZG, Chopp M, Maynard KI, Moskowitz MA (1994) Cerebral blood flow changes during cortical spreading depression are not altered by inhibition of nitric oxide synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:939-943

A.1.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftliche Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Im Rahmen des momentanen weltweiten Interesses an bildgebenden Verfahren in der Neurologie (insbesondere fMRI) haben besonders unsere Untersuchungen Aufsehen erregt, in denen Hämoglobinoxygenierungsmuster für CSD und Perinfarktdepolarisationen charakterisiert wurden. Diese bilden nun mit die Grundlage für die internationale Suche nach diesen Veränderungen bei Migräne und Schlaganfall mittels optischer und kernspintomographischer Methoden. Auch die Untersuchungen zur Rolle des trigeminalen und serotonergen Systemes bei der SD-Hyperperfusion sind sehr gut angenommen worden und konnten die Diskussion um die Beziehung von SD und Migräne weiter beleben. Überraschend war für uns auch, daß die Gutachter zu der Arbeit, in der wir die CSI vorstellen, uns ermunterten, die Beziehungen zu migränösen Infarkten und verzögertem Vasospasmus herzustellen. Insofern sich hier eine ganz neue Hypothese auftut, und ein komplett neuer Ischämie-mechanismus beschrieben wurde kann aber ein Vergleich mit anderen Arbeiten noch nicht angestellt werden.

A.1.5 Offene Fragen

Die ‚Cortical Spreading Ischemia‘ ist ein neues Forschungsgebiet und zahlreiche Fragen sind bisher unbeantwortet. Führt CSI z.B. tatsächlich zu Hirninfarkten? Wie sehen diese Hirninfarkte aus?

Wir wollen auch eine umfassende phänomenologische und pharmakologische Charakterisierung durchführen. Unterscheidet sich z.B. die Wanderung der Blutflußantwort bei CSI und CSH? Liegt der initialen Hypoperfusion bei CSI der Verlust eines permissiven Effekts von NO. für andere Vasodilatoren zugrunde, oder ist die Blockade eines CSD-induzierten NO.-Konzentrationsanstiegs entscheidend? Warum wird die CSI durch Nimodipin blockiert? Welchen Effekt haben andere Vasodilatoren? Liegt der CSI ein serotonerger Mechanismus zugrunde? Wie sehen die Potential- und Ionenänderungen bei CSI in vivo im Cortex und an der pialen Oberfläche aus? Kommt es im Hirnschnitt durch das pharmakologische Protokoll der CSI nicht zu Veränderungen von DC-Potential und extrazellulärem K⁺ (Perfusionsabhängigkeit)? Kann man die Blutflußantwort auch in anderen Kopplungsmodellen wie z.B. der Whisker-Stimulation oder bei epileptischen Anfällen umkehren? Welche weiteren Unterschiede und Gemeinsamkeiten gibt es zwischen CSH, CSI und Periinfarktdepolarisationen z.B. in der Nahinfrarotspektroskopie?

A.1.6 Literatur

Eigene Originalarbeiten in peer review Journalen mit direktem Bezug zum Teilprojekt (ISI Impactfactor in Klammer)

Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, et al. Locally triggered release of neurotransmitters from perivascular nerves contributes to cortical spreading depression associated hyperemia in rats. *Am J Physiol* 1998; (IF=3,244) in press

- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, et al. Increased formation of reactive oxygen species following permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* (1998) 18:196-205; (IF=6,555)
- Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T et al. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induce cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998 (IF=6,555) in press
- Gold, L., Back, T., Arnold, G., Dreier J., Einhüpl, K.M., Reuter, U., Dirnagl, U. (1998) Cortical spreading depression associated hyperemia in rats: Involvement of serotonin. *Brain Res* (in press) (IF=2,687)
- Wolf T, Lindauer U, Reuter U, Back T, Dirnagl U. Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cerebral blood oxygenation changes during periinfarct depolarizations in focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* (1997) 17:950-954 (IF=6,555)
- Wolf T, Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U. Excessive oxygen or glucose supply do not alter the blood flow response to somatosensory stimulation or spreading depression in rats. *Brain Res* (1997) 761(2):290-299 (IF=2,687)
- Back T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD. Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (2): 202-213 (1996) (IF=6,555)
- Alexis NE, Back T, Zhao W, Dietrich WD, Watson BD, Ginsberg MD. Neurobehavioral consequences of induced spreading depression following photothrombotic middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 706: 273-282 (1996) (IF=2,687)
- Wolf, T., Obrig, H., Dreier, J., Back, T., Villringer, A., and Dirnagl, U. Systemic nitric oxide synthase (NOS) inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression (CSD) in rats: A non-invasive near infrared spectroscopy (NIRS) and laser Doppler flowmetry (LDF) study. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (1996):1100-1107 (IF=6,555)
- Dreier J., Körner, K., Görner, A., Weih, M., Villringer, A., Dirnagl, U. Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium *J Cereb Blood Flow Metab* 15:914-191, 1995 (IF=6,555)
- Weikert, S., Freyer, D., Weih, M., Isaev, N., Busch, C., Schultze, J., Megow, D., and Dirnagl, U. Rapid, Ca^{2+} -dependent NO-production from CNS-cells in culture measured by NO-nitrite/ozone chemoluminescence. *Brain Res.* 748:1-11, 1997 (IF=2,687)
- Liste der sonstigen Veröffentlichungen der Mitarbeiter des Projektes, die in den vergangenen 3 Jahren erschienen sind, also 1995/96/97 (nicht unmittelbar Projekt-assoziiert).
- Schulz J., Megow D., Reszka R., Villringer A., Einhüpl K.M., Dirnagl U. Evidence that glypican is a receptor mediating β -amyloid neurotoxicity in PC12 cells *Eur J Neurosci* (in press) (IF=4.9)
- Weih M., Weikert S., Freyer D., Dirnagl U. Chemiluminescence detection of Nitric Oxide production from cerebral microvascular endothelial cells in culture. *Brain Res Protocols* (in press) (IF=n.a.)

- Kohl M., Lindauer U., Dirnagl U., Villringer A. Separation of changes in light scattering and chromophore concentrations during cortical spreading depression. *Opt. Lett.* (in press) (IF=2.6)
- Dov Malonek, U. Dirnagl, U. Lindauer, Katsuya Yamada, Iwao Kanno, and Amiram Grinvald. Vascular Imprints of Neuronal Activity: Relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation and volume changes following sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94:14826-31. (IF=10,5)
- Fabricius M, Akgören M, Dirnagl U, Lauritzen M (1997) Laminar analysis of cerebral blood flow in cortex of rats by laser-Doppler flowmetry. A pilot study. *J Cereb Blood Flow Metab* (1997) 17:1326-36 (IF=6,555)
- Hock C, Villringer K, Muller Spahn F, Hoffmann M, Schuh-Hofer S, Heekeren H, Wenzel R, Dirnagl U, Villringer A. (1996) Near infrared spectroscopy in the diagnosis of Alzheimers's disease. *Ann NY Acad Sci* 777: 22-29 (IF=0,868)
- Bruer, U., Isaev, N.K., Weih, M., Ruscher, K., Bergk, A., Wiegand, F., Meisel, A., Victorov, I.V., and Dirnagl, U. (1997) Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons: hypoxic versus pharmacologic preconditioning. *FEBS Lettters* 414:117-121 (IF=3,842)
- Hock C, Villringer K, Müller-Spahn F, Wenzel R, Heekeren HR, Schuh-Hofer S, Hofmann M, Minoshima S, Schwaiger M, Dirnagl U, Villringer A (1997). Decrease in parietal cerebral hemoglobin oxygenation during performance of a verbal fluency task in patients with Alzheimer`s disease monitored by means of near infrared spectroscopy (NIRS) - correlation with simultaneous rCBF-PET measurements, *Brain Res* 755:293-303 (1997) (IF=2,687)
- Riepe, M., Nakase, H., Esclaire, F., Kaschischke, K., Schreiber, S., Ludolph, A.C., Dirnagl, U., Hugon, J., and Kempfski, O. Chemical preconditioning: neuroprotection by chemical inhibition of oxidative phosphorylation. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 1997, 17: 257-264 (IF=6,555)
- Hirth, C., Obrig, H., Villringer, K., Tiel, A., Bernarding, J., Mühlnickel, W., Flohr, H., Dirnagl, U., Villringer, A. Mapping of the human motor cortex using near-infrared spectroscopy. *Neuroreport* 1996; 7 (12) : 1977-1981 (IF=2,570)
- Obrig, H., Hirth, C., Junge-Hülsing, J., Döge, C., Wolf, T., Dirnagl, U., and Villringer, A. Cerebral oxygenation changes in response to motor stimulation. *J Appl Physiol* 1996; 81 (3): 1174-1183. (IF=1,947)
- Barfod, C., Akgören, N., Fabricius, M., Dirnagl, U., and Lauritzen, M. Erythrocyte recruitment during hypo- and hypercapnia and locally evoked increases of cerebral blood flow. *Acta Physiol Scand* (1997) 160:123-132. (IF=1,496)
- Wenzel R, Obrig H, Rubens J, Villringer K, Hirth Ch, Dirnagl U, Villringer A (1996), Near-infrared spectroscopy during visual stimulation. *J Biomedical Optics*, 1: 399-404 (IF=n.a.)
- Kleinschmidt, A., Obrig, H., Requardt, M., Merboldt, K.D., Dirnagl, U., Villringer, A., Frahm, J. Simultaneous recording of cerebral oxygenation changes during human brain activation by magnetic resonance imaging and near - infrared spectroscopy. *J. Cereb Blood Flow Metab* 16: 817-827 (1996). (IF=6,555)

- Schreiber,S., Megow,D., Raupach,A., Victorov,I.,Dirnagl,U.Age related changes of oxygen free radical production in the rat brain slice after hypoxia: on-line measurements using enhanced chemiluminescence. *Brain Res* (1995) 703:337-230 (IF=2,687)
- Villringer, A. and Dirnagl, U. Coupling of brain activity and cerebral blood flow - basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* (1995) 7:240-276 (IF=4,083)
- Hock, C. , Müller-Spahn, F. , Klages, U. , Schuh-Hofer, S. , Schleinkofer, L. , Dirnagl, U., and Villringer, A. Noninvasive monitoring of local cerebral blood volume and tissue oxygenation during cognitive tasks in patients with Alzheimers' disease using near infrared spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:1103-1108,1995. (IF=6,555)
- Back T, Stoltenburg-Didinger G, Ploner CJ, Meisel H, Zschenderlein R A new variant of progressive encephalomyelitis with rigidity associated with cerebellar ataxia and dementia: correlation of MRI and histopathological changes. A case report. *Neurol Res* 1997 Apr;19(2):187-91 (IF 0,8)
- Yamashita K, Vogel P, Fritze K, Back T, Hossmann KA, Wiessner C Monitoring the temporal and spatial activation pattern of astrocytes in focal cerebral ischemia using in situ hybridization to GFAP mRNA: comparison with sgp-2 and hsp70 mRNA and the effect of glutamate receptor antagonists. *Brain Res* 1996 Oct 7;735:285-97 (IF = 2,7)
- Ginsberg MD, Back T, Zhao W Three-dimensional metabolic and hemodynamic imaging of the normal and ischemic rat brain. *Acta Neurochir (Wien)* 1996;66:44-9 (IF =0,7)
- Hoehn-Berlage M, Eis M, Back T, Kohno K, Yamashita K Changes of relaxation times (T1, T2) and apparent diffusion coefficient after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat: temporal evolution, regional extent, and comparison with histology. *Magn Reson Med* 1995 34:824-34 (IF 3,4)
- Gyngell ML, Busch E ,Schmitz B, Kohno K, Back T, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA Evolution of acute focal cerebral ischaemia in rats observed by localized 1H MRS, diffusion-weighted MRI, and electrophysiological monitoring. *NMR Biomed* 1995 ;8:206-14 (IF= 3)
- Back T, Zhao W, Ginsberg MD Three-dimensional image analysis of brain glucose metabolism-blood flow uncoupling and its electrophysiological correlates in the acute ischemic penumbra following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:566-77 (IF=6,5)
- Wiessner C, Neumann-Haefelin T, Vogel P, Back T, Hossmann KA Transient forebrain ischemia induces an immediate-early gene encoding the mitogen-activated protein kinase phosphatase 3CH134 in the adult rat brain. *Neuroscience* 1995;64:959-66 (IF =4.3)
- Kohno K, Hoehn-Berlage M, Mies G, Back T, Hossmann KA Relationship between diffusion-weighted MR images, cerebral blood flow, and energy state in experimental brain infarction. *Magn Reson Imaging* 1995;13:73-80 (IF = 1,7)
- Kohno K, Back T, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA A modified rat model of middle cerebral artery thread occlusion under electrophysiological control for magnetic resonance investigations *Magn Reson Imaging* 1995;13:65-71 (IF = 1,7)

Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (noch nicht oben aufgeführt)

- Schulz J., Megow D., Reszka R., Villringer A., Einhüpl K.M., Dirnagl U. Evidence that glypican is a receptor mediating β -amyloid neurotoxicity in PC12 cells *Eur J Neurosci* (in press) (IF=4.9)
- K. Angstwurm, D. Freyer, U. Dirnagl, U. Hanisch, R. Schumann, K. M. Einhüpl, and J. R. Weber. Tumour necrosis factor alpha induces only minor inflammatory changes in the CNS, but augments experimental meningitis. *Neuroscience* (in press) 1997.
- Weber J, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Freyer D, Bürger W, Busch C, Einhüpl KM, Dirnagl U. Heparin inhibits leukocyte rolling in pial vessels and attenuates inflammatory changes in a rat model of experimental bacterial meningitis *J Cereb Blood Flow Metab* (1997) in press (IF=6,555)
- Weber, J. R., Angstwurm, K., Bove, G. M., Bürger, W., Einhüpl, K. M., Dirnagl, U., and Moskowitz, M. A. The trigeminal nerve augments regional cerebral blood flow during experimental bacterial meningitis. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 16 (1996):1319-1325 (IF=6,555)
- Lindauer, U., Dreier, J., Angstwurm, K., Villringer, A., Einhüpl, K. M., and Dirnagl, U. Role of nitric oxide synthase inhibition in leukocyte- endothelium interaction in the rat pial microvasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 (1996):1143-1153. (IF=6,555)
- Lindauer, U., Megow, D., Schultze, J., Weber, J.R., and Dirnagl, U. Nitric oxide synthase inhibition does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci.Lett.* 216:1-4, 1996. (IF=2,318)
- Weber, J., Angstwurm.K., Bürger,W. Einhüpl, K.M., Dirnagl, U. Anti ICAM-1 monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J.Neuroimmunol.* (1995) 63: 63-68 (IF=3,639)
- Freyer, D., Weih,M., Weber, J., Manz R, Ziegenhorn, A., Angstwurm,K., Bürger,W., Dirnagl U. Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF α in astroglial enriched cultures. *Glia* (1996) 16:1-6 (IF=4,809)
- Angstwurm,C,Weber,J.,Segert,A.,Bürger,W.,Weih,M.,Freyer,D., Einhüpl K.M.,Dirnagl, U. Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rat. *Neurosci Lett* 190:1-4,1995 (IF=2,318)
- Dirnagl U., Lindauer U., Them A., Schreiber S., Pfister H.W., Koedel U., Reszka R., Freyer D., Villringer A. Global cerebral ischemia in the rat: Online monitoring of oxygen free radical production using chemoluminescence in vivo (1995) *J Cereb Blood Flow and Metab* 15:929-940,1995 (IF=6,555)
- Weber JR, Rosenkranz T, Angstwurm W, Lindauer U, Freyer D, Bürger W, Einhüpl K, Dirnagl U. Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis. *Neurosci Lett* 226(1), 17-20 (1997) (IF=2,318)
- Zhang CL, Dreier JP, Heinemann U Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anti-convulsants.*Epilepsy Res* 1995 Feb; 20:105-111
- Dreier JP, Zhang C-L, Heinemann U Early low magnesium induced epileptiform activity in the rat entorhinal cortex but not in the hippocampus is sensitive to phenytoin, carbamazepine, midazolam and phenobarbital. *Acta Neurol Scand* eingereicht

Sonstige eigene, projektassoziierte Originalarbeiten

Buchbeiträge

- Wolf, T., Arnold, G., Dreier, J.P., Back, T., Villringer, A., and Dirnagl, U. Noninvasive detection of hemoglobin oxygenation changes during cortical spreading depression in the rat brain. In: *Experimental headache models*, edited by Olesen, J. and Moskowitz, M.A., Raven Press Ltd.:New York, 1995,p. 107-112.
- Dirnagl U., Dreier J. Regulation of cerebral blood flow by ions. In: Primer on cerebrovascular disease, Eds. Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B. Academic Press San Diego (1997) p.75-77
- Wolf, T. , Arnold, G. , Dreier, J. , Back, T. , Villringer, A. , and Dirnagl, U. Non invasive detection of haemoglobin oxygenation changes during cortical spreading depression in the rat brain. *Adv Exp Med Biol* (in press) 1997 (IF=n.a.)
- Wolf, T., Lindauer, U., Obrig, H., Villringer, A., and Dirnagl, U. Extra- and intracellular oxygen supply during cortical spreading depression in the rat. *Adv Med Biol* 388 (1996) 299-304. (IF=n.a.)

Publizierte, projektassoziierte Abstracts:

- Back, T., Peters, O., Lindauer, U. and Dirnagl, U. The increased formation of reactive oxygen species following middle cerebral artery occlusion (MCAO) is unrelated to periinfarct depolarizations, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17(Suppl.1) (1997) S93(Abstract)
- Gold, L., Reuter, U., Arnold, G., Back, T. and Dirnagl, U. A possible role for serotonin in the modulation of the hyperperfusion during cortical spreading depression in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17(Suppl.1) (1997) S536(Abstract)
- Reuter, U., Gold, L., Weber, J.R., Arnold, G., Wolf, T., Lindauer, U. and Dirnagl, U. Cortical spreading depression associated hyperperfusion in rats: role of the trigeminal and parasympathetic systems, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17(Suppl.1) (1997) S537(Abstract)
- U. Reuter, L. Gold, G. Arnold, T. Wolf, and U. Dirnagl. A pharmacological approach to attenuate cortical spreading depression associated hyperperfusion in the rat. *Cephalalgia* 17 (1997); 3:349.
- Dreier, J.P., Ebert, N., Reuter, U., Wolf, T., Leistner, S., Villringer, A. and Dirnagl, U. Pharmacological transformation of spreading depression (SD) related hyperperfusion to an acute and longlasting hypoperfusion by NOS-inhibitor and ouabain, *Soc. Neurosci. Abstr.* 23 (1997) p. 1309 (Abstract)
- Dreier JP, Körner K, Görner A, Back T, Lindauer U, Villringer A, Dirnagl U (1996): The spreading depression related ischemic event is partially abolished by vasodilators. *Soc Neurosci Abstr* 22: 1102.
- Reuter U, Arnold G, Wiegand F, Lindauer U, Liefeldt L, Paul M, Dirnagl U (1996) Endothelin (ET) 2 overexpressing rats are resistant to the elicitation of cortical

spreading depression (CSD) whereas they produce normal periinfarct polarisations (PID). *Soc Neurosci Abstr* 22: 1102.

- Wolf, T., Lindauer, U., Reuter, U., Back, T., and Dirnagl, U. Noninvasive near infrared spectroscopy monitoring of regional cortical regional blood oxygenation changes during periinfarct depolarizations in experimental focal cerebral ischemia in the rat. *Cerebrovasc.Dis.* 6(Suppl.2):26[152]-26[152], 1996.
- Dirnagl, U. , Back, T. , White, C. A., Wolf, T. , Villringer, A. , and Dreier, J. Oxygen free radical production (OFR) measured online during cortical spreading depression (CSD): spreading hyperemia vs. spreading ischemia. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25:224, 1995
- Dreier, J. , Körner, K. , Back, T. , Wolf, T. , Görner, A. , Lindauer, U. , Villringer, A. , and Dirnagl, U. Cortical spreading ischemia (CSI): a novel phenomenon induced by cortical spreading depression (CSD), NOS inhibition and elevated extracellular potassium. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25:225, 1995
- Görner, A. , Dirnagl, U. , Körner, K. , Back, T. , Müller, W. , and Dreier, J. The cerebral blood flow (CBF) response to increased extra-cellular potassium is strongly impaired in spontaneously hypertensive rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25:218, 1995
- Lindauer, U. , Wolf, T. , Villringer, A. , and Dirnagl, U. Hyperglycemia does not alter regional cerebral blood flow (rCBF) or regional cerebral blood oxygenation (rCBO) changes in cortical spreading depression (CSD) in rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25:1668, 1995
- Wolf, T. , Dirnagl, U. , Back, T. , Lindauer, U. , Borasio, G. D., Dreier, J. , and Villringer, A. Noninvasive near infrared spectroscopy (NIRS) monitoring of spontaneous cortical blood oxygenation changes (boc) after experimental focal cerebral ischemia. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25:224, 1995

A.1.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Blasig (A2) Methodische Zusammenarbeit (NO-Analytik, Zellkultur), Inhaltliche Kooperation (in vivo Bluthirnschranken-Untersuchungen)

Dr. Weber (A3) Intensive inhaltliche und methodische Zusammenarbeit, Vielzahl gemeinsamer Publikationen (s.o.)

Prof.Kettenmann (B1) Rolle der Mikroglia bei fokaler cerebraler Ischämie (Publikation in Vorbereitung: Lyons et al.)

Dr. Reszka (B3), Methodische Hilfestellung (Liposomen etc.; diverse gemeinsame Publikationen, s.o.)

Prof. Heinemann (C3,C4) und Dr.Müller (C3) Methodisch: Imaging, Inhaltlich: Spreading Depression (gemeinsame Publikationen s.o., weitere in Vorbereitung: Busch et al.)

Prof.Nitsch (C1) Methodische Hilfestellung: Mikrogliakultur, Gewebepfusion, Mikroskopie

A.2 Ingolf Blasig, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin: Stickstoffmonoxidradikale und Hypoxie an Zellen der Blut-Hirn-Schranke

A.2.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

Es lagen Hinweise vor, die die Annahme rechtfertigten, daß freie Radikale an der Verursachung hypoxiebedingter Schäden der Blut-Hirnschranke (BHS) beteiligt sind. Dabei war unklar, welche Radikale durch welche Zellen im Bereich der BHS und in welchem Umfang bei hypoxischen Störungen gebildet werden. Außerdem war unklar, welche Schäden bzw. welche protektiven Effekte durch freie Radikale hervorgerufen oder vermittelt werden. Es gab erste Hinweise, daß NO bei reversiblen hypoxischen Zellschäden eine protektive Rolle haben könnte. Zu folgenden Problemen soll in diesem Bericht Stellung genommen werden:

- 1.1. Etablierung des im Antrag beschriebenen Zellkulturmodells der Blut-Hirnschranke (Ratte)
- 1.2. NO-vermittelte Signaltransduktion in Gehirnkapillarendothelzellen
- 1.3. Hypoxie/Reoxygenierung von Gehirnkapillarendothelzellen (EZ) und Astrozyten (AZ): Effekt auf antioxidative Schutzsysteme
- 1.4. Wirkung von NO auf Zellen der Blut-Hirnschranke und auf deren Barrierefunktion unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen
- 1.5. Erkenntnisse des in vitro-Modells für die in vivo-Verhältnisse der Blut-Hirnschranke

(Anmerkung: Entsprechend der Festlegung bei Bewilligung des SFB 507 vom 20.6.1995 wurde im Juni 1997 ein Zwischenbericht vorgelegt)

A.2.2 Angewandte Methoden

Gehirnkapillarendothelzellen

der Ratte wurden entsprechend der Methode von Weikert et al. (Brain Res 748:1-11, 1997) isoliert (Zusammenarbeit mit Projekt A1, Dirnagl). Die Zellen wurden in kollagenbeschichtete Kulturgefäße eingesät. Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet. Darüber hinaus wurden 1,2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin (Biochrom, Berlin), 100 µg/ml Heparin, 110 µg/ml Na-Pyruvat (Sigma, Deisenhofen), 10 µg/ml ECGF (endothelial cell growth factor, Boehringer Mannheim) und fötales Kälberserum (FBS; Biochrom; 20% für Primärzellen) zugesetzt.

Immortalisierung:

Rattengehirnkapillarendothelzellen wurden mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode (Pharmacia-Kit, Uppsala, Schweden) am dritten Tag (1. Passage) mit den in Tab. 1 genannten Vektoren transfiziert. Mock-Vektor- (pCMVL ohne immortalisierende/

transformierende Eigenschaften) und nichttransfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet (Blasig et al., 1998a).

Gehirnkapillarendothelzellklon (RBE4):

RBE4-Zellen (durch Prof. Couraud, Paris, zur Verfügung gestellt) wurden in HAM's F10/ α -medium (1:1), 10 % FBS in Gegenwart von 2 mM Glutamin, 1 ng Rinderfibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und 300 μ g/ml geneticin (Boehringer Mannheim) kultiviert (Mertsch et al., 1997).

Astrozyten:

Von zwei Tage alten Ratten wurde das Großhirn entnommen, die Meningen entfernt, die Gehirne zerkleinert, durch ein Sieb (100 μ m) gegeben und das Homogenat ausgesät. Bevor die Zellen konfluent wurden, wurde dem Medium (DMEM, FBS, Glutamin) Cytosin-Arabinosid für 48 h zugesetzt, für die letzten 2 h zusätzlich L-Leucinmethylester. Bei Konfluenz wurden die Kulturen geschüttelt (17-20 h 130 rpm), gewaschen und konserviert. Aus 10 Gehirnen werden 8 bis 9 Kulturflaschen (75 cm²) gewonnen. Für Monokulturen wurden die Zellen so ausgesät, daß sie nach etwa 10 Tagen konfluent waren. AZ-konditioniertes Medium: Von konfluenten Kulturen der 1. Subkultur wurde das Medium nach 48 h entnommen, zentrifugiert und sofort verwendet (Giese et al., 1995). Astrozytomazellen wurden in Kooperation mit dem Projekt B3 (Reszka) bearbeitet; weitere gliale Zellen (Oligodendrozyten, Mikroglia) wurden vom Projekt B1 (Kettenmann) erhalten.

Kokultivierung von Endothelzellen und Astrozyten:

Für Permeationsuntersuchungen wurden auf der Unterseite von Millicell-CM Filtern (0,4 μ m Porengröße; Rattenschwanzkollagen-beschichtet) AZ (1. Subkultur) ausgesät; nach 3-5 Tagen erfolgte die Aussaat der EZ auf der Oberseite (Giese et al., 1995). Bevor die EZ (am 7.-10. Kulturtag) konfluent wurden, wurde dem Medium ein membranpermeables cAMP-Derivat und ein Phosphodiesterasehemmer beigelegt. Zur Abschätzung der Dichtheit der EZ-Barriere wurde der transendotheliale elektrische Widerstand herangezogen. Nach etwa 10 Tagen wurden die Permeationsuntersuchungen oder alternativ die biochemischen Messungen durchgeführt.

Permeationsuntersuchungen:

Dazu wurden in das obere Mediumreservoir (Donorkammer) niedermolekulare Verbindungen gegeben. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben aus der Donor- und aus der unteren Akzeptorkammer entnommen und Clearance bzw. Permeationskoeffizient bestimmt. Folgende Substanzen wurden eingesetzt: Na-Fluorescein bzw. radioaktiv markierte Saccharose (nicht-permeierender Marker) und radioaktiv markierte ³H-O-Methyl-Glucose (aktiver Transport). Darüber hinaus wurden auch transendothelialer elektrischer Widerstand und Albuminpermeation zur Barrierecharakterisierung herangezogen (Giese et al., 1995).

Hypoxie/Reoxygenierung:

Die Experimente wurden an konfluenten Mono- bzw. Kokulturen von EZ und AZ in PBS durchgeführt (ca. 10. Kulturtag der EZ). Zur Hypoxiemodellierung wurden die Zellen unter

Sauerstoffabschluß inkubiert (Begasung mit 95% N₂/5% CO₂) und anschließend reoxygeniert (Carbogen, 95% O₂/5% CO₂). Für die normoxische Kontrolle wurde Carbogen verwendet (Mertsch et al., 1995).

NO

wurde bei Anwendung der ozonvermittelten Chemilumineszenz direkt im Inkubationsmedium bzw. in der darüber befindlichen Gasphase bestimmt. Für kontinuierliche Messungen wurde das Gas fortlaufend durch Unterdruck in die Meßapparatur transportiert (Haseloff et al., 1996). Darüber hinaus wurde die Reduktion von Nitronylnitroxiden zu Iminonitroxiden zum Nachweis von NO eingesetzt (Haseloff et al., 1997a).

NO/cGMP-Signaltransduktionselemente:

die cGMP-Bildung (als Maß für die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase) wurde mittels RIA bestimmt (Messung in Medium und Zellen). Zur Abschätzung der NOS-Expression wurde in Zusammenarbeit mit dem Projekt A4 (Paul) das Enzym auf mRNA-Ebene untersucht (RT-PCR-Assay). cGMP-abhängige Proteinkinasen wurden in Kooperation mit Prof. F. Hofmann (München) sowie das cGMP-abhängige phosphorylierbare Zytoskelettprotein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) gemeinsam mit Prof. U. Walter (Würzburg) untersucht (Sporbert et al., 1998).

Sauerstoffradikale

wurden mittels ESR-Spintrap-Technik nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen mit geeigneten Spintrapverbindungen inkubiert und anschließend die Bildung von Radikal-Spintrap-Addukten ESR-spektroskopisch bestimmt; in diesem Zusammenhang wurden neuartige Spintrapverbindungen umfassend hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten (Haseloff et al., 1997b) sowie (im Vergleich mit herkömmlichen Verbindungen) hinsichtlich ihrer Zytotoxizität (Haseloff et al., 1997c) charakterisiert. Die radikalinduzierte Lipidperoxidation wurde durch Messung von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (z.B. Malondialdehyd) mittels HPLC erfaßt (Mertsch et al., 1997).

A.2.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

A.2.3.1 Etablierung des im Antrag beschriebenen homologen Modells der Blut-Hirnschranke

Es wurden zwei neue homologe Zellkulturmodelle der Blut-Hirnschranke unter Verwendung von Rattenendothelzellen und -astrozyten erarbeitet. Dazu wurden Rattengehirnkapillarendothelzellen mit immortalisierenden bzw. transformierenden Genen transfiziert (vgl. Tab. 1). Die dabei erhaltenen sechs Zelllinien wurden im Vergleich zu Primärzellen intensiv hinsichtlich BHS-Eigenschaften sowie hinsichtlich des Radikalstoffwechsels charakterisiert. Zwei Linien zeigten immortalisierte Eigenschaften und waren besonders für Blut-Hirnschranken-Untersuchungen geeignet. Sie bewahrten differenzierte Eigenschaften, insbesondere bezüglich des Stoffwechsels von NO sowie Sauerstoffradikalen und ließen sich mindestens bis zur 60.

Passage gut kultivieren. Die BHS-Eigenschaften wurden durch Kokultivierung mit AZ verstärkt (Blasig et al., 1998a). Gegenwärtig werden die Linien 4 und 6 kloniert. Damit liegt das geforderte homologe System vor. Die Arbeiten wurden u.a. in Kooperation mit anderen Teilprojekten durchgeführt: A1 (NO-Messungen, Zellpräparation; U. Dirnagl), A3 (Zytokinanalytik; F. Weber), A4 (PCR von NO-Synthase; M. Paul), B3 (Beeinflussung der NO-Liberation; R. Reszka).

Andererseits wurde ein Klon von Gehirndothelzellen der Ratte beschafft (von Prof. Couraud, Paris), der durch Kokultur mit Astrozyten ebenfalls sehr gute Blut-Hirnschranken-Eigenschaften entwickelte und für pharmakologische Untersuchungen gut geeignet ist (Mertsch et al., 1997). Gegenwärtig wird der Klon intensiv bezüglich NO-Stoffwechsel und Hypoxie charakterisiert. Damit können je nach Fragestellung und Zelleigenschaften Primärzellen, verschiedene Linien bzw. der Klon für das Projekt genutzt werden.

Table 1. New lines of rat brain capillary endothelial cells (rBCEC) developed without and with transfection of different vectors

Cell line:	Transfected vector:		properties
	name	responsible gene	
rBCEC1	-	-	-
rBCEC2	pCMVL	luciferase reporter gene	mock-transfection
rBCEC3	pCMVLTd123	modified large T antigen of polyoma virus	immortalizing
rBCEC4	pCMVLT2	large T antigen of polyoma virus	immortalizing
rBCEC5	pCMVMTd18	middle T antigen of polyoma virus	transforming
rBCEC6	pK1	large T and small t antigen of SV40	immortalizing/ transforming

A.2.3.2 NO-vermittelte Signaltransduktion in Gehirnkapillarendothelzellen

Untersuchungen zum NO-Signaltransduktionssystem in Gehirnkapillarendothelzellen (Verwendung verschiedener Rattenkulturen) zeigten das Vorhandensein folgender Elemente (Blasig et al., 1998a; Sporbert et al., 1998):

- NO-Synthasen (NOS): konstitutive endotheliale NO-Synthase (ecNOS); induzierbare NO-Synthase (iNOS) nach Inkubation mit Zytokinen, die bei Hypoxie gebildet werden; (das Vorhandensein neuronaler NOS kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden)
- NO: moderate NO-Freisetzung durch das Ca^{2+} -Ionophor A23187 (Ca^{2+} aktiviert ecNOS); starke NO-Freisetzung durch Zytokine
- Guanylatcyclasen (GC): lösliche GC (NO-stimulierbar), partikuläre GC (NO-unabhängig)
- cGMP: verstärkte Bildung nach NOS-Aktivitätszunahme (sehr starke Bildung nach Stimulation der partikulären GC)
- cGMP-abhängige Proteinkinase I, jedoch nicht cGMP-abhängige Proteinkinase II (Kooperation F. Hofmann, München)
- cGMP-abhängiges phosphorylierbares Zytoskelettprotein (VASP), dessen Phosphorylierung die Dichtigkeit von Endothelzellbarrieren erhöht (Kooperation U. Walter/Würzburg)
- erste Untersuchungen mit atrionatriuretischem Peptid (Stimulator der partikulären Guanylatcyclase) und dem NO-Liberator (Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazan-1-ium-1,2-diolat weisen auf eine Zunahme der Dichtigkeit des BHS-Modells (rBCEC4) hin; dagegen führt die Applikation von SIN-1 (gleichzeitige Freisetzung von NO und O_2^- , damit Bildung von ONOO^-) zur Permeationszunahme

Diese Ergebnisse zeigen, daß Gehirnendothelzellen über Elemente eines NO/cGMP-abhängigen Signaltransduktionsweges verfügen, der die Permeabilität der Blut-Hirnschranke in vivo beeinflusst. Die Experimente lassen den Schluß zu, daß unter Kontrollbedingungen kleine NO/cGMP-Mengen die Dichtigkeit der BHS erhöhen.

A.2.3.3 Hypoxie/Reoxygenierung von Gehirnkapillarendothelzellen und Astrozyten: Effekt auf antioxidative Schutzsysteme

Die Kokultivierung von EZ mit AZ induzierte in beiden Zelltypen antioxidativ wirksame Enzyme (bes. SOD, Glutathionperoxidase), die reaktive Sauerstoffspezies, z.B. O_2^- , beseitigen, das mit NO reagiert und dadurch den NO-Gehalt vermindert. Außerdem besitzen AZ eine stärkere Radikalabwehr als EZ (Abb. 1, Schroeter et al., 1998). Durch die morphologische Situation ist in vivo im Gehirnendothel ebenfalls die Expression einer relativ starken Radikalabwehr zu erwarten, darüber hinaus wird das Endothel in vivo zusätzlich durch das höhere Abwehrpotential der benachbarten AZ vor reaktiven Sauerstoffspezies geschützt, so daß NO in der BHS relativ leicht zur Wirkung kommen kann, ohne durch O_2^- abgebaut zu werden. Bei zerebralen Durchblutungsstörungen, die durch eine erhöhte Freisetzung von Sauerstoffradikalen gekennzeichnet sind, sollte dieser Effekt besonders von Bedeutung sein und gleichzeitig dazu beitragen, die Integrität des ZNS in solchen Situationen zu erhalten.

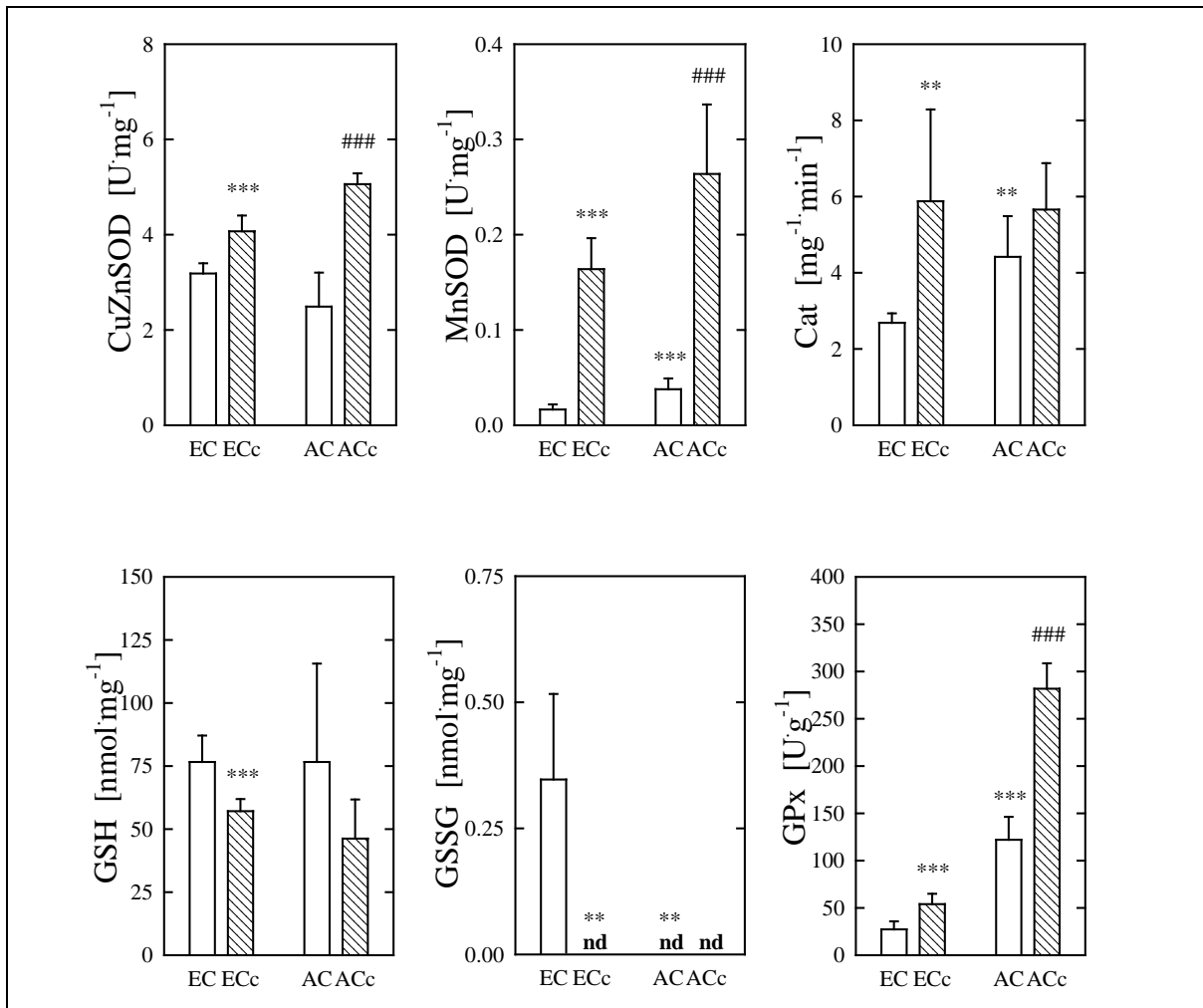


Abb.1. Aktivität von Katalase, Glutathionperoxidase (GPx) und Superoxiddismutasen (CuZnSOD, MnSOD) in Rattengehirnkapillarendothelzellen (RBE4) und Astrozyten (AC) in Monokultur sowie in Kokultur (c).

Weitere Versuche zeigten eine Induktion von MnSOD durch Hypoxie/Reoxygenierung in Endothelzellen, wodurch sich das antioxidativ wirksame Schutzpotential im mitochondrialen Kompartiment erhöht. Unter diesen Bedingungen betrug die Zellvitalität 80%. Eine Erhöhung der Aktivität von SOD durch Zugabe von SOD-mimetischen Verbindungen führt darüber hinaus auch zu einer Erhöhung der Menge von bioverfügbarem NO (Zöllner et al., 1997).

Außerdem induzierten AZ (Kokultur-Modell) in EZ BHS-Eigenschaften, wie Erhöhung der endothelialen Dichtigkeit, stärkere Expression von γ -Glutamyltranspeptidase oder alkalischer Phosphatase (Blasig et al., 1998a). Daraus kann geschlossen werden, daß zur Aufrechterhaltung der BHS-Funktion in vivo der ständige Einfluß von Astrozyten benötigt wird. Eine Ausschaltung bestimmter Astrozyteneffekte könnte daher zu einer spezifischen Öffnung der BHS führen.

Die daraus abgeleitete Annahme, daß reversible hypoxische Intervalle die Zellen der BHS gegen Schäden konditionieren, die durch hypoxiebedingte Generierung von Sauerstoffradikalen verursacht werden, soll in der verbleibenden Projektzeit an Zellkulturen und zusätzlich am Ischämiemodell der Ratte überprüft werden. Dazu werden mehrere kurze Ischämieinter-

valle (reversible Störung) vor einer längerdauernden Ischämie (unbehandelt Infarktbildung verursachend) durchgeführt („preconditioning“). Die dafür notwendigen experimentellen Voraussetzungen sind innerhalb des SFB gegeben (Kooperation Projekt A1/U. Dirnagl).

A.2.3.4 Wirkung von NO auf Zellen der Blut-Hirnschranke und auf deren Barrierenfunktion unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen

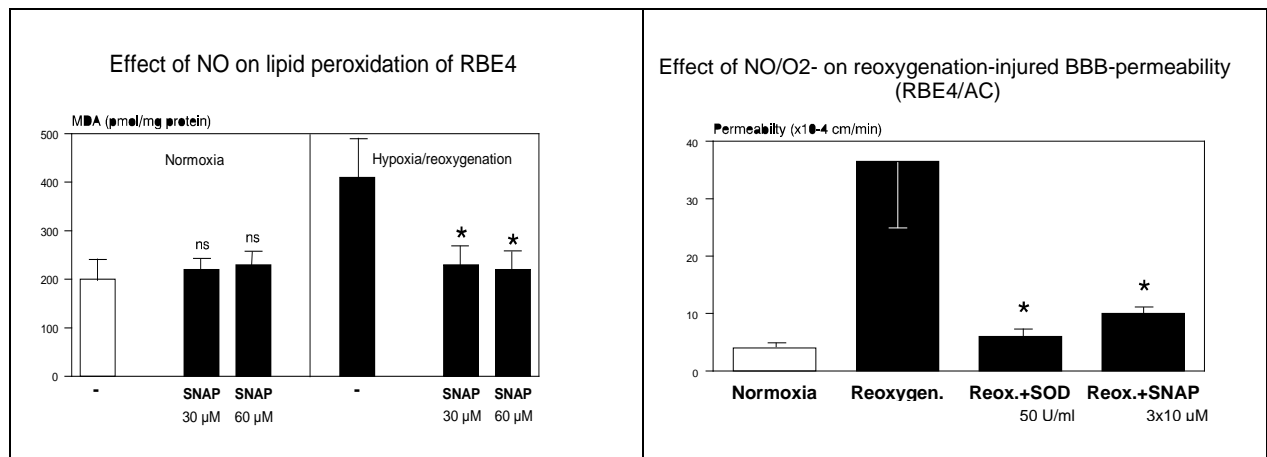


Abb. 2. Effekt des NO-Liberators S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) auf Membranschädigung (Lipidperoxidation) und Permeabilität (Kokultur auf Filtern mit Astrozyten, AC) von Gehirndothelzellen der Ratte (RBE4) bei Hypoxie/Reoxygenierung

Die Untersuchungen zur Wirkung von NO auf RBE4 zeigten, daß akute Hypoxie/Reoxygenierung bei gleichzeitigem Substratmangel zu Schäden an Endothelzellmembranen führt (radikalinduzierte Peroxidation von Membranphospholipiden; Abb. 2, links), wie sie in vivo nicht erfassbar sind (schnelle Endothelzellisolierung nicht möglich, Vermischung mit Fremdzellen). Außerdem wurde die Endothelzell-Permeabilität erhöht, wie dies in vivo bei Ischämie unter ähnlichen Bedingungen ebenfalls gefunden wird. Membranschädigung und Öffnung der Blut-Hirnschranke (Zellkulturmodell) wurden in Gegenwart einer NO-liberierenden Verbindung (SNAP) während der Reoxygenierung verhindert (Abb. 2). Dieser Effekt wurde auch bei der Verwendung von authentischen NO-Lösungen beobachtet. Die hohe protektive Wirksamkeit von SOD weist darauf hin, daß Superoxidradikale an der Schädigung der Barrierenfunktion beteiligt sind; angesichts der hohen Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von NO mit O₂⁻ erklärt dies auch den protektiven Effekt von NO. In diesem Zusammenhang könnte auch die nach in ersten Untersuchungen nach 24 h Hypoxie beobachtete Induktion von iNOS eine protektive Wirkung hervorrufen. Gegenwärtig wird geprüft, ob die iNOS-Induktion über Zytokine (Kooperation A4, Weber und B3, Reszka) vermittelt wird und ob gleichzeitig Zellschäden auftreten. Insgesamt sind diese Ergebnisse ein Indiz dafür, daß in der Literatur beschriebene akute zerebroprotektive Wirkungen von NO durch protektive Effekte an der BHS bedingt bzw. mitbedingt sein können. Andererseits muß darauf verwiesen werden, daß höhere Konzentrationen von NO ($c_{\text{SNAP}} > 100 \mu\text{M}$) die Permeabilität der Endothelzellbarriere erhöhten (Utepbergenov et al., 1998).

Hinsichtlich der durch posthypoxische Reoxygenierung induzierten Lipidperoxidation wurden an AZ-Monokulturen ähnliche Ergebnisse wie an EZ gefunden (Blasig et al., 1997). Nach 2 h Hypoxie und 1 h Reoxygenierung wurde eine signifikante Erhöhung der Menge von Lipidperoxidationsprodukten beobachtet, die jedoch geringer als der bei EZ gefundene Anstieg war. Dies kann auf die höhere Aktivität antioxidativ wirksamer Enzyme in AZ zurückgeführt werden. Auch die Inkubation von AZ mit TNF- α /Interleukin-1 β führte zu einer verstärkten Lipidperoxidation (Abb. 3a). Andererseits konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von SNAP (30 μ M, 60 μ M) während der Reoxygenierungsphase zu einer Verringerung der Bildung von Lipidperoxidationsprodukten führt (Abb. 3b).

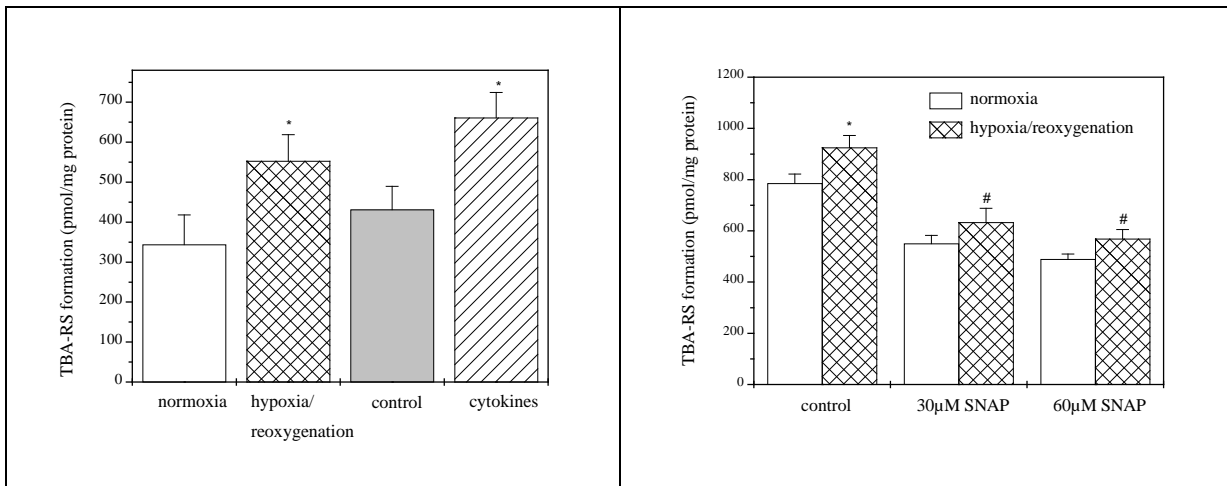


Abb. 3a: Lipidperoxidation in Astrozyten (gemessen als Menge thiobarbitursäurereaktiver Substanzen, TBA-RS) nach Normoxie (3 h PBS im Inkubator) und nach Hypoxie (2 h 95% N₂/5% CO₂ in PBS) und Reoxygenierung (1 h 95% O₂/5% CO₂ in PBS) sowie nach Inkubation von Astrozyten mit Zytokinen (IL-1 β /TNF- α , 200 U/ml, 4 h) im Vergleich zur Kontrolle (Zellkulturmedium ohne Effektoren). Daten \pm SEM, n=6, * p<0.05 vs. Normoxie oder Kontrolle.

Abb. 3b: Lipidperoxidation in Astrozyten nach Hypoxie/Reoxygenierung (2 h/1 h) und Effekt der Zugabe von 30 μ M und 60 μ M S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin während der Reoxygenierung. Daten \pm SEM, n=6, * p<0.05 vs. Normoxie, # p<0.05 vs. Hypoxie/Reoxygenierung ohne Effektor.

Es ist daher festzustellen, daß unter Bedingungen von Hypoxie/Reoxygenierung nicht nur EZ, sondern auch AZ geschädigt werden. Andererseits wurde in AZ bereits unter basalen Bedingungen eine geringe Expression von iNOS gefunden, die durch Hypoxie verstärkt wird. Die damit verbundene NO-Freisetzung kann nicht nur einen protektiven Effekt auf die Astrozyten bewirken, sondern (wegen der relativ unbehinderten Diffusion von NO) in Kokultur auch zum Schutz der Endothelzellen beitragen.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Freisetzung von NO durch Endothelzellkulturen wurden eine Vielzahl von Experimenten zur NO-Analytik und zu Effektoren, die die NO-Homöostase beeinflussen, durchgeführt. Diese führten zu einer Reihe von neuen Erkenntnissen, z.B. zu methodischen Weiterentwicklungen der NO-Chemilumineszenz (Haseloff et al., 1996), neuen Anwendungen von Nitronylnitroxiden (Haseloff et al., 1997a) und anderen, SOD-mimetischen Nitroxidverbindungen (Zöllner et al., 1997) sowie zur Aufklärung des Mechanismus

der NO-Freisetzung durch neuartige NO-Liberatoren (Kirilyuk et al., 1998). Die dabei gesammelten Erfahrungen wurden z.T. schon auf die neuen Zelllinien angewandt. Die Arbeiten wurden u.a. in Zusammenarbeit mit Teilprojekt B3, Reszka durchgeführt.

Eine Anregung aus der Vorbegutachtung des SFB war es, hypoxiebedingte Schäden am Zellkulturmodell der Blut-Hirnschranke zu modellieren und seine Eignung für pharmakologische Untersuchungen zu demonstrieren und zu publizieren. Das ist inzwischen erfolgt (Giese et al., 1995 und 1996, Mertsch et al., 1997). Außerdem wurden weitergehende Untersuchungen zur Bedeutung von Radikalstoffwechselveränderungen an Endothelzellen durchgeführt (Blasig et al., 1996; Giese et al., 1996; Kunstmann et al., 1996). Die Arbeiten zeigten eine besondere Bedeutung der sauerstoffradikalinduzierten Lipidperoxidation für den Schädigungsprozeß. Abb. 2 und 3 deuten darüber hinaus an, daß NO auch eine antioxidative Wirkkomponente besitzen kann (wahrscheinlich Reaktion mit O_2^- /Peroxyradikalen). Außerdem konnte gezeigt werden, daß mikrovaskuläre Gehirndothelzellen im Vergleich zu makrovaskulären Aortaendothelzellen über ein sehr viel höheres antioxidatives Potential verfügen und so z.B. zytotoxische Lipidperoxidationsmetabolite extrem schnell abbauen (Kunstmann et al., 1996).

A.2.3.5 Erkenntnisse des in vitro-Modells für die in vivo-Verhältnisse der Blut-Hirnschranke

Es wurde bereits an verschiedenen Stellen auf Schlußfolgerungen aus den durchgeführten in vitro-Untersuchungen für die in vivo-Situation eingegangen. Grundsätzlich muß darauf verwiesen werden, daß eine Reihe der dargestellten Ergebnisse nur durch Untersuchungen an Zellkulturen erhalten werden können, da sich praktisch nur auf diese Weise der Einfluß anderer Zelltypen ausschließen läßt. Andererseits liefern die in vitro-Untersuchungen wichtige Hinweise für die Durchführung gezielter in vivo-Experimente. So unterstützen die unter 3.4. dargestellten Befunde die Annahme, daß NO bei akuter Ischämie und in kleinen Konzentrationen protektiv wirkt. NO könnte jedoch in höheren Konzentrationen bzw. bei gleichzeitiger Anwesenheit von Superoxid (Bildung von Peroxynitrit) auch in die Induktion nachfolgender Schäden involviert sein kann. Dies sollte insbesondere in solchen Situationen von Bedeutung sein, in denen durch eine starke Expression von iNOS (z.B. akute Entzündungsprozesse, Durchblutungsstörungen) ggf. größere Mengen von NO gebildet werden. Deshalb wurden Untersuchungen am Ischämiemodell der Ratte konzipiert (Verminderung ischämisch-bedingter akuter Gehirnschäden durch Applikation kleiner NO-Dosen; Reduktion nachfolgender Infarktschäden mit Inhibitoren von iNOS zur Begrenzung der Generierung von NO), um die in vitro erhaltene Annahme zu überprüfen (Kooperation Projekt A1/Dirnagl/Lindauer). Darüber hinaus wurden auch retrospektive Studien zu Störungen der BHS-Funktion bei Herzoperationen begonnen (Kooperation H. Abdul-Khaliq, Dt. Herzzentrum)

A.2.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftliche Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die bei Tagungen vorgestellten wissenschaftlichen Ergebnisse stießen auf ein breites Interesse und bewirkten eine Reihe von Kooperationsangeboten (z.B. G.M. Rubanyi, Berlex Biosciences, USA; D. Janigro, University of Washington, Seattle, USA; N.J. Abbott, King's College, London, UK; F. Roux, Paris). Der Vortrag während des Neuroscience-Meetings

1997 wurde sowohl im Plenum als auch in kleinem Kreis lebhaft diskutiert und führte zu mehreren Vortragseinladungen (z.B. King's College, London; Boehringer Ingelheim), die in weitere Kooperationsbeziehungen einmünden werden. Eine beachtliche Zahl auf dem Gebiet der BHS-Forschung bekannter Wissenschaftler bekundete Interesse, an dem im Sommer 1998 von uns geplanten internationalen Symposium („Signal transduction pathways in blood-brain barrier“) teilzunehmen. Zur Überprüfung der in vitro-Ergebnisse an der Ratte liegt eine Einladung von P.A. Fraser, London, UK zu einem Arbeitsaufenthalt vor. Die im Rahmen des Projektes erarbeiteten homologen BHS-Modelle werden gegenwärtig von den Arbeitsgruppen N.J. Abbott, London und F. Roux, Paris übernommen. Von mehreren Gruppen liegen Anfragen bezüglich der Überlassung der neuen immortalisierten Zelllinien vor (z.B. J.W. Beetsch, St.Louis, USA; N.Y. Calingasan, White Plains, USA; A. Erroi, Milano, Italien).

A.2.5 Offene Fragen

Die Untersuchungen zur Überprüfung der an Zellkulturen erhaltenen Ergebnisse durch in vivo-Experimente sind noch nicht abgeschlossen. Der sich aus den in vitro-Untersuchungen andeutende „preconditioning“ - Effekt soll am Ischämiemodell der Ratte überprüft werden. Dazu werden mehrere kurze Ischämieintervalle (reversible Störung) vor einer längerdauernden Ischämie (unbehandelte Infarktbildung) eingesetzt. Auußerdem soll der Effekt von NO bzw. cGMP auf BHS-Funktionen in vivo unter Kontroll- und ischämischen Bedingungen untersucht werden. Diese Experimente werden in Kooperation mit dem Teilprojekt A1 (Dirnagl/Lindauer) durchgeführt.

Darüber hinaus wurde (in Kooperation mit dem Deutschen Herzzentrum Berlin, Kinderkardiologie, H. Abdul-Khaliq) begonnen, zerebrale Störungen bei Herzoperationen mit extrakorporaler Blutversorgung (nicht-pulsatiler kardiopulmonaler Bypass) zu untersuchen. Dabei zeigt sich, daß nach Wiedereröffnung der Aorta und nach Abschalten der Herz-Lungenmaschine eine Öffnung der BHS zu beobachten ist, der schwere zerebrale Störungen folgen können. Die BHS-Öffnung läß sich durch das Austreten des Gliazellproteins S-100 in das Plasma verfolgen, wo es unter Kontrollbedingungen nicht nachweisbar ist. Diese Protein-freisetzung geht mit erhöhten Serumwerten von Produkten der radikalinduzierten Lipidperoxidation einher. Gegenwärtig wird geprüft, wie sich routinemäßig verabreichte Medikamente, die reaktive Spezies freisetzen (z.B. Nitrokörper, Catecholamine) bzw. mit reaktiven Spezies reagieren, auf die Veränderungen auswirken.

Literaturdaten und erste eigene Befunde deuten auf eine besondere Bedeutung von Phosphorylierungsprozessen für die Aufrechterhaltung der Integrität der BHS hin. Es wurden daher Untersuchungen zur Phosphataseaktivität sowie zu Proteinkinasen begonnen, die im neu zu beantragenden Projekt weitergeführt werden sollen.

Darüber hinaus werden derzeit die notwendigen Voruntersuchungen durchgeführt sowie die experimentellen Voraussetzungen (differential display PCR, 2D-Elektrophorese) komplettiert, um im Nachfolgeprojekt untersuchen zu können, in welcher Weise Astrozyten die Funktion der Endothelzellbarriere beeinflussen. Dazu sind Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene geplant, mit denen geklärt werden soll, inwieweit Astrozyten in Endothelzellen qualitative oder quantitative Veränderungen auf dieser Ebene induzieren.

A.2.6 Literatur

A Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug zum Teilprojekt

- Blasig, I.E., B.F. Dickens, W.B. Weglicki, J.H. Kramer, Uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation alters lipid peroxidation-derived free radical production but not recovery of post-ischemic rat hearts and post-hypoxic endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 160/161 (1996) 167-177
- Blasig, I.E., A. Sporberr, D.I. Utepbergenov, M.L. Schroeter, K. Mertsch, R. F. Haseloff (1997) Cytokine- and Hypoxia-Induced Lipid Peroxidation in Astrocytes. *Int. J. Clin. Pharmakol. Ther.* 35 (*in the press*)
- Blasig, I.E., H. Giese, M. Schroeter, A. Sporberr, K. Mertsch, I.B. Buchwalow, K. Neubert, G. Schönfelder, I. Schimke, W.-E. Siems, M. Paul, R.F. Haseloff, R. Blasig (1998a) NO and oxy-radical metabolism in new cell lines of brain capillary endothelial cells forming blood-brain barrier. *J. Neurosci.*, *eingereicht*
- Blasig, I.E., T. Grune, S. Kunstmann, B. Wiesner, A.M. Ladhoff, R.F. Haseloff, W.G. Siems, K. Mertsch (1998b) Protective effects of thiophosphate WR 2721 and lazaroïd U83836E on lipid peroxidation in endothelial cells during hypoxia/reoxygenation. *Biochem. Pharmacol.*, *eingereicht*
- Giese, H., K. Mertsch, I.E. Blasig (1995) Effect of Mk-801 and U83836E on a porcine brain capillary endothelial cell barrier during hypoxia. *Neurosci. Lett.* 191: 169-172
- Grune, T., K. Müller, S. Zöllner, R.F. Haseloff, I.E. Blasig, H. David, W. Siems (1997) Evaluation of purine nucleotide loss, lipid peroxidation and ultrastructural alterations in post-hypoxic hepatocytes. *J. Physiol.-London* 498: 511-22
- Grune, T., I.E. Blasig, N. Sitte, R.F. Haseloff, K.J.A. Davies (1998). Peroxynitrite, but not nitric oxide, enhances susceptibility to proteolytic degradation - Degradation of aconitase by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.*, *eingereicht*
- Haseloff, R.F., S. Zöllner, I.A. Kirilyuk, I.E. Grigor'ev, R. Reszka, R. Bernhardt, K. Mertsch, B. Roloff, I.E. Blasig (1997a) Superoxide-mediated reduction of the nitroxide group can prevent detection of nitric oxide by nitronyl nitroxides. *Free Radical Res.* 26: 7-17
- Haseloff, R.F., I.A. Kirilyuk, S.I. Dikalov, V.V. Khramtsov, D.I. Utepbergenov, I.E. Blasig, I.A. Grigor'ev (1997b) Synthesis and spin trapping applications of 2,2-dimethyl-*d*₆-methyl-2H-imidazole-1-oxide-1-¹⁵N. *Free Radical Res.*, 26:159-168
- Haseloff, R.F., K. Mertsch, E. Rohde, I. Baeger, I.A. Grigor'ev, I.E. Blasig (1997c) Cytotoxicity of Spin Trapping Compounds. *FEBS-Lett.* 418: 73-75
- Kirilyuk, I.A., D.I. Utepbergenov, D.G. Mazhukin, K. Fechner, K. Mertsch, V.V. Khramtsov, I.E. Blasig, R.F. Haseloff (1998) Thiol-Induced NO Release from 3-Halogeno-3,4-dihydrodiazete 1,2-Dioxides. *J. Med. Chem.* (*in the press*)
- Krauss, G.-J., M. Pissarek, I.E. Blasig, (1997) HPLC of nucleic acid components with volatile mobile phases. II. Separations on polymeric supports. *J. High Res. Chromatogr.* (*in the press*)

- Kunstmann, S., K. Mertsch, I.E. Blasig, T. Grune (1996) High metabolic rates of 4-hydroxynonenal in brain capillary endothelial cells during anoxia/reoxygenation. *Brain Res.* 740: 353-55
- Mertsch, K., T. Grune, A. Ladhoff, N. Saupe, W.G. Siems, I.E. Blasig (1995) Hypoxia and reoxygenation of brain endothelial cells in vitro: a comparison of biochemical and morphological response. *Cell Mol. Biol.* 41: 243-253
- Schroeter, M.L., K. Mertsch, H. Giese, I.E. Blasig (1998) Astrocytes support antioxidative defence in brain capillary endothelial cells, constituting the blood-brain-barrier. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, *eingereicht*
- Sporbert, A., K. Mertsch, H. Giese, M. Paul, A. Smolenski, U. Walter, F. Hofmann, P. Ruth, I.E. Blasig (1998) Comparison of nitric oxide release and nitric oxide-dependent signal transduction in brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Neurochem.*, *eingereicht*
- Utepergenov, D., K. Mertsch, A. Sporbert, K. Tenz, R.F. Haseloff, M. Paul, I.E. Blasig (1998) NO protects blood-brain barrier in vitro from damage induced by hypoxia/reoxygenation. *FEBS Letters*, *eingereicht*
- Zöllner, S., R.F. Haseloff, I.A. Kirilyuk, I.E. Blasig, G.M. Rubanyi (1997) Nitroxides increase the detectable amount of nitric oxide released from endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 23076-80

C Sonstige Arbeiten

- Pissarek, M., F. Jänichen, I.E. Blasig, R.F. Haseloff, T. Keller, E. Tapp, E.-G. Krause. Cardioprotective potency of the radical scavenger S-2-(3 aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid in the post-ischaemic rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 145 (1995) 121-129
- 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. Phys.* 269 (1995) H14-H22
- Wallukat, G., I.E. Blasig, R. Morwinski, H.-J. Herrmann, E. Rohde. The sera of spontaneously hypertensive rats contain agonistic autoantibodies against the β_1 -adrenoceptor. *J. Hypertension* 13 (1995) 1031-1036
- Vrbjar, N., S. Zöllner, R.F. Haseloff, M. Pissarek, I.E. Blasig, PBN spin trapping of free radicals in the reperfusion-injured heart. Limitations for pharmacological investigations. *Mol. Cell. Biochem.* (*in the press*)

D Buchbeiträge

- Giese, H., K. Mertsch, R.F. Haseloff, H. Härtel, I. E. Blasig. Hypoxia and reoxygenation of a cellular barrier consisting of brain capillary endothelial cells and astrocytes, pharmacological interventions. In: P. O. Couraud, D. Scherman (Eds.), *Biology and Physiology of the Blood Brain Barrier: Transport, Cellular Interactions, and Brain Pathologies*, *Advances in Behavioral Biology* 46: 313-318, Plenum Press, New York (1996)

Haseloff, R.F., S. Zöllner, K. Mertsch, I.E. Blasig, Simultaneous Generation of Nitric Oxide and Superoxide by Endothelial Cells. ESR and Ozone-Mediated $\cdot\text{NO}$ Chemiluminescence Experiments. In: The Biology of Nitric Oxide Part 5, J.S. Stamler, S.S. Gross, S. Moncada, E.A. Higgs, *eds.*, Portland Press, London and Chapel Hill, p. 91 (1996)

Mertsch, K., R.F. Haseloff, I. E. Blasig, Investigations of radical scavengers by using an in vitro model of blood-brain barrier. In: L.F.M. van Zutphen, M. Balls (Eds.), Animal Alternatives, Welfare and Ethics, 881-886, Elsevier Science B.V., Netherlands (1997)

A.2.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

- A1 (Dirnagl): Isolierung von Primärzellen, in vivo Versuche an der BHS
- A3 (Weber): Zytokinbestimmungen
- A4 (Paul): methodische Aspekte der mRNA- und Proteinanalytik von NOS
- B1 (Kettenmann): Wirkung von Mikroglia und Oligodendrozyten auf Permeation im BBB-Modell
- B3 (Reszka): Freisetzung reaktiver Spezies durch Astrozytomazellen, Lipidperoxidation in verschiedenen AZ-Linien
- C4 (Heinemann): Lipidperoxidation und Radikalbildung bei Hypoxie

A.3 **Karl M. Einhäupl & Jörg, R. Weber, Neurologische Klinik, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität, Charité, Berlin: Gliaaktivierung - ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis**

A.3.1 **Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen**

In den letzten 40 Jahren hat sich weder die hohe Mortalität von 30% noch die Morbidität (Pfister et al., 1993; Dodge et al., 1984) der bakteriellen Meningitis des Erwachsenen (Durand et al., 1993) geändert. Diese akut auftretende, relativ häufige Entzündung des zentralen Nervensystems wird vorwiegend durch den Gram-positiven Erreger *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufen. Die klinischen Komplikationen (Pfister et al., 1993), die für die schlechte Prognose verantwortlich gemacht werden, sind Hirnödeme, Erhöhung des intrakraniellen Druckes und zerebrovaskuläre Veränderungen (Pfister et al., 1992). Im deutlichen Gegensatz zur hohen Mortalität steht die rasche Entwicklung wirksamer Antibiotika, die innerhalb weniger Stunden alle Bakterien in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) abtöten. Obwohl die eigentliche Krankheitsursache erfolgreich behandelt wurde, lösen durch Bakteriolyse freigesetzte Zellwandbestandteile eine Schadenskaskade (Quagliarello and Scheld 1992) aus. Bei der Antragstellung war von der folgend geschilderten, teilweise hypothetischen Kaskade auszugehen:

- Eindringen der Bakterien in den Subarachnoidalraum.
- Bakterienvermehrung und Bakteriolyse.
- Auftreten hoher Konzentrationen von Zellwänden abgetöteter Bakterien. Begünstigt wird diese Entwicklung durch vorwiegend bakteriolytische wirkende Antibiotika.
- Diese stimulieren Astrozyten und Mikroglia zur Produktion von TNF- α , Il-1 β und Il-6. Il-1 β , Il-6 und Il-8 werden möglicherweise von Endothelzellen produziert.
- TNF- α und Il-1 β induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen.
- Aktivierte Leukozyten rollen, haften an und wandern durch das Endothel in den SA.
- Diese aktivierten Leukozyten setzen im SA bzw. am Wege in den SA freie Radikale, NO, andere Vasodilatoren etc. frei und tragen zu zytotoxischen wie vasogenen Hirnödemen bei.
- Leukozytenakkumulation in der CSF führt zur Liquorzirkulations- und -resorptionsstörung.
- Erhöhter Intrakranieller Druck (ICP), Blutflußveränderungen und Autoregulationsverlust führen zu neuronalen und vaskulären Schäden und damit zu permanenten neurologischen Ausfällen oder den Tod des Patienten.

A.3.1.1 **Bakterielle Meningitis und Astroglia**

Am Anfang der Schadenskaskade werden Astrozyten und Mikroglia durch lebende Bakterien, durch deren Stoffwechselprodukte und durch Lyse auftretende Bestandteilen aktiviert.

Haemophilus influenzae Lipopolysaccharide (Mustafa et al., 1989) und lebende *Listeria monocytogenes* Bakterien (Leist et al., 1988) induzieren die Produktion von TNF- α im Liquor von Versuchstieren bereits nach 45 Minuten (Mustafa et al., 1989). LPS stimuliert in

Astrozytenkulturen einen deutlichen Anstieg von TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Sharif et al., 1993). In vivo kann durch die Verabreichung von monoklonalen TNF- α und/oder IL-1 β Antikörpern ein wesentlicher Teil der nachfolgenden Bluthirnschrankenveränderungen verhindert werden. Unbestritten ist daher, daß den vorwiegend durch Astrozyten und Mikroglia, sekundär auch durch Endothel und meningealen Makrophagen freigesetzten inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β eine Schlüsselrolle zukommt.

Die experimentellen Beobachtungen korrelieren gut zu TNF- α Messungen im Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis. Auf Grund der vorliegenden Befunde wird heute die Hypothese formuliert, daß unterschiedlichste Bakterien bzw. Bestandteile der Zellwände, wie Peptidoglykane und Teichonsäuren von Gram-positiven, bzw. Lipopolysaccharide von Gram-negative Erregern, Astroglia zur Produktion von TNF- α als entscheidendes inflammatorisches Zytokin anregen. Diese Vorstellung ist von höchster klinischer Relevanz, da hohe Konzentrationen von Bakterienzellwänden eine Folge erfolgreicher antibiotischer Behandlung sind. Tatsächlich führt tierexperimentell eine antibiotische Therapie zu erhöhten TNF- α Spiegeln (Saez Llorens et al., 1991) im Liquor in Vergleich zur unbehandelten Gruppe.

Ein wesentlicher Mangel dieser Hypothese besteht darin, daß diese Beobachtungen nach LPS bzw. Listerieninjektion in die Cisterna magna gemacht wurden und die klinischen Daten entweder bei heterogenen Patientengruppen oder bei Meningokokkenerkrankungen erhoben wurden. Der Gram-positive Krankheitserreger der häufigsten Meningitis des Erwachsenenalters bzw. dessen Zellwandbestandteile wurden in Bezug auf Stimulation von Astroglia bis heute in vitro nicht und in vivo nur unzureichend untersucht.

A.3.1.2 Bakterielle Meningitis und Leukozyten-Endothelinteraktion

Einer der wichtigsten Schritte in der Entzündungsreaktion, die Migration von Leukozyten durch die Blut-Hirnschranke in das Gewebe und in den Subarachnoidalraum, wird durch Zytokine vermittelt. TNF- α und IL-1 β induzieren eine zeit- und dosisabhängige Adhärenz und transendotheliale Passage von Leukozyten. Dieser Mechanismus wird durch spezifische Glykoproteine (Springer 1990), die am Endothel (P- und E-Selektin, ICAM-1, ICAM-2 etc.) exprimiert werden, und durch Rezeptoren auf Leukozyten (Integrine, L-Selektin) vermittelt. Der erste Schritt, das Leukozytenrollen, wird nach heutiger Kenntnis durch Selektine getragen; das Leukozytensticken durch das Binden von Integrinen (ICAMs) des Endothels und korrespondierender Moleküle der Immunglobulinfamilie der Leukozyten.

P- und E-Selektin werden nach TNF- α Gabe in vitro am Endothel exprimiert (Bevilacqua et al., 1994). P- und E-Selektin können auch bei unterschiedlichen ZNS Erkrankungen im Hirngewebe von Patienten nachgewiesen werden. Granert et al. (1994) konnten kürzlich zeigen, daß Fucoidin im Kaninchenmodell der bakteriellen Meningitis die Migration von Leukozyten in den SA und die Zunahme von Albumin signifikant vermindert. Fucoidin, ein Polysaccharide und L-Selektin Blocker, inhibiert Rolling als ersten Schritt der Adhäsion von Leukozyten.

Die zur Immunglobulinfamilie gehörenden Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 spielen im zweiten Schritt der Adhäsionskaskade eine Schlüsselrolle. ICAM-1 wird in vivo nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β sowie LPS bereits nach 4 Stunden (Hess et al., 1994) maximal exprimiert. Eine Zunahme der Expression über 24 h wird nicht festgestellt. ICAM-1 konnte auch bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS im Autopsiematerial gesichert werden. Im Kaninchenmodell der bakteriellen Meningitis werden die entzündlichen Veränderungen durch Blockade der vorwiegend auf Leukozyten exprimierten CD 18 Integrine, den Hauptliganden von ICAM-1, verringert (Tuomanen et al., 1989 und Saez Llorens et al., 1991). Durch die zusätzliche Verabreichung von Prednisolon wurde ein verstärkender Effekt

erreicht, der durch Verminderung der Zytokinproduktion (TNF- α) erklärt werden könnte (Saez Llorens et al., 1991). Diese Ergebnisse führen zu der Vorstellung, daß die Leukozyten-Endothelinteraktion als zentraler Schritt der Schadenskaskade an die Existenz inflammatorischer, von Astroglia gebildeter Zytokine abhängt.

A.3.1.3 Die Rolle der Interaktion Gliaktivierung - neuronale Mechanismen bei bakterieller Meningitis

Die Zunahme des rCBF in der Frühphase der bakteriellen Meningitis, ausgelöst durch *Streptococcus pneumoniae*, ist unverstanden (Pfister et al., 1990). Verschiedene Faktoren werden als Ursache diskutiert: freie Radikale, NO, Cyclooxygenase Abkömmlinge, PAF etc. Täuber et al. (1993) beschreiben Neuropeptid Y im Hirnstamm und in Nervenfasern um Gehirngefäße im Kaninchenmodell der bakteriellen Meningitis und interpretierten diese Befunde als Hinweis für neuronale Mechanismen.

Diese Vorstellung liegt nahe, da die entzündliche Infiltration der Meningen im Vordergrund der morphologischen Veränderung steht und diese sensorisch von nicht myelinisierten C-Fasern des N. trigeminus versorgt werden. Heftiger Kopfschmerz ist zudem ein klinisches Leit- und Frühsymptom der bakteriellen Meningitis. TNF- α , möglicherweise auch freie Radikale von Gliazellen und Leukozyten könnten die Nervenendigungen des N. trigeminus meningeal und in der Adventitia von kortikalen Blutgefäßen stimulieren und einen pathophysiologischen Mechanismus, die sogenannte neurogene Inflammation auslösen. Diese würde einem heute in der Pathophysiologie der Migräne gut untersuchten Mechanismus (Moskowitz and MacFarlane 1993) entsprechen. Danach werden aus den Nervenendigungen vasoaktive Neurotransmitter wie Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Calcitonin gene-related peptide (CGRP) freigesetzt. SP und NKA bewirken Vasodilatation (Moskowitz and MacFarlane 1993). CGRP induziert neuerlich Vasodilatation über glatte Muskelzellen. Zudem wird ein Reflexbogen aktiviert, der zusätzlich verstärkend eingreifen könnte. Diese symbiotisch als Folge glialer Aktivierung in Gang gesetzten Mechanismen würden das rasche Entstehen des vasogenen Hirnödems und den Autoregulationsverlust begünstigen und teilweise erklären.

A.3.2 Angewandte Methoden

A.3.2.1 Tierexperimentelles Modell der bakteriellen Meningitis

Die vorgelegten Untersuchungen wurden an 250-300g schweren *Wistar Ratten* durchgeführt. Diese Spezies eignete sich hierfür aus folgenden Gründen besonders: gut charakterisierte Anatomie, Histologie, Immunologie. Das von uns modifizierte Modell in der Ratte ist international in führenden Labors etabliert. Es ist auf Grund des exakten physiologischen Monitorings eines der am besten validierten Modelle in der Meningitisforschung. Narkose: Pentobarbital (Trapanal[®], 100mg/kg i.p. bei Bedarf ca. alle 2h Nachinjektion von 20 mg/kg). Lokalanästhesie vor chirurgischen Maßnahmen mit Lidocain (Xylocain[®] 1%). Einflüsse der Narkose auf Entzündungsreaktionen sind nicht bekannt. Präparation: Lagerung auf einem Heizkissen (Temperatur 37,5°-38,5° C). Darstellung der Trachea, Tracheotomie, Intubation und Beatmung (Effenberger Kleintierrespirator). Darstellung und Kanülierung der V. femoralis und der A. femoralis. Blutgasbestimmung. Wenden und fixieren des Tieres in einem stereotaktischen Rahmen. Kopfpräparation - Ausdünnung des Knochens über dem parietalen Kortex ca. 2x3 mm oder Anlegen eines kraniellen Fensters. Anlegen einer Bohrung

(maximale Ausdünnung) okzipital zur Punction der Zisterna magna. Punction mit einer 1,5 cm langen 22G Nadel mit Mandrin und dauerhafte Fixierung mit Dentalacryl. Physiologische Parameter: kontinuierliche Messung und digitale Registrierung von endexpiratorischem pCO₂ (Heyer Infrarot CO₂ Monitor), arteriellem Blutdruck und rektaler Körpertemperatur. Arterielle Blutgase werden alle 2h ermittelt (AVL Compact 1 Blutgasanalysator). Hämatokrit, Leukozytenzahl im Blut und Liquor werden am Beginn und Ende des Experiments bestimmt. Am Versuchsende Bestimmung des Gehirnwassergehaltes als Maß des Hirnödems: Entnahme des Gehirns, Trocknung über 16h bei 140° C. Berechnung mit der Formel:
Wassergehalt [%] = (Gewicht_{Naß} - Gewicht_{Trocken}) / Gewicht_{Naß} x 100

Laser-Doppler Blutflußmessung (LDF):

Die LDF-Methode wurde von uns für die Messung relativer Veränderungen des rCBF des Rattenkortex unter Kontroll- und Ischämiebedingungen sowie bei bakterieller Meningitis validiert (Dirnagl et al., 1989). Die Methode mißt die mikrozirkulatorische Durchblutung (Produkt aus Blutzellgeschwindigkeit und Volumen) in einem Gewebsvolumen von ca. 1 mm³ (Perimed Periflux 4001 Master). Aufsetzen der Laser-Doppler-Sonde auf ausgedünnten Knochen über dem parietalen Kortex. Die Messung beginnt nach Registrierung einer stabilen Baseline über 30 Minuten. Die Ergebnisse werden in % des Baselinewertes ausgedrückt.

Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM):

Der Einsatz der CLSM in vivo am Gehirn wurde von uns erstmals beschrieben (Dirnagl et al., 1992; Dirnagl et al., 1991). Die CLSM (MRC 600 Bio Rad, Zeiss Jena Wasserimmersionsobjektiv 40x) erlaubt in vivo die dynamische Untersuchung zerebraler corticaler Kapillaren. Durch mit Rhodamin 6G intravital gefärbte Leukozyten können Adhärenz und Extravasation dargestellt und verglichen werden (Dirnagl et al., 1994; Villringer et al., 1991). Nach Entfernung eines 4x5 mm großen Knochenstückes über dem parietalen Kortex wird bei erhaltener Dura ein Wall aus Knochenwachs aufgebaut und das Fenster mit einem Deckglas verschlossen. Kontinuierliche Superfusion von künstlichem Liquor (ionale Zusammensetzung und Gasspannung wie normaler Liquor). Unterschiedliche 100 µm lange kapilläre Segmente werden in bestimmten Zeitintervallen jeweils für eine Minute untersucht und nachträglich anhand der kontinuierlichen Videoaufzeichnung ausgewertet.

Durchtrennung des N. nasociliaris (NCN)

NARKOSE: Chloralhydrat (200 mg/kg Körpergewicht i.p.). Darstellung des Foramen ethmoidale mit den dort austretenden Strukturen (NCN, A. und V. ethmoidales anteriores, parasympatische Fasern aus dem Ganglion sphenopalatinum). Durchtrennung des NCN.

A.3.2.2 Zellkultursysteme von Zelltypen mit besonderer Relevanz bei bakterieller Meningitis

Ergänzt wurde der in vivo Ansatz durch primäre Zellkultursysteme (Astrozyten, Endothelzellen und Neuronen) aus der selben Spezies, um parallel laufende in vitro Ansätze zu verfolgen.

Als primäre Zellkulturen werden unter standardisierten Bedingungen folgende Zelltypen regelmäßig präpariert: Kortikale Kapillarendothelzellen stellen ein wichtiges morphologisches Substrat der Bluthirnschranke dar. Astrozyten sind weiterer wesentlicher Bestandteil der BHS sowie eine der immunkompetenten Zellen im ZNS. Des Weiteren sind neuronale Primärkulturen aus Septum, Hippocampus und Kortex in serumfreien Systemen mit < 10% Astrozyten und < 0,1% Mikroglia, sowie 50 - 70% Astrozyten und 1% Mikroglia etabliert. Alle Zellkulturen werden regelmäßig mittels immunocytochemischer Färbetechniken auf ihre Zusammensetzung überprüft. Für die Etablierung und Charakterisierung verschiedener Arbeitsmethoden steht die hippocampal-neuronale Zelllinie HT 22 zur Verfügung. Vergleichbare Zellkultursysteme der Maus und der entsprechenden Knock out Tiere sind für Astrozyten bereits verfügbar, für Mikroglia im Aufbau.

Life/Death - Assays

Zur Beurteilung von Zellschaden in den Zellkulturen werden nachfolgend genannte Methoden angewendet: die Quantifizierung des aus toten Zellen freigesetzten zytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH). Die Quantifizierung der lebenden Zellen anhand der Bestimmung ihrer metabolischen Aktivität mittels Umsetzung von MTT. Die Zählung toter und lebender Zellen nach Trypanblaufärbung bzw. Fluorescindiaceat / Propidiumiodid - Färbung. Um einen Zelluntergang durch Apoptose nachzuweisen, werden die dabei entstehenden DNA-Fragmente über gelelektrophoretisches „Laddering“ dargestellt. Derzeit wird eine nichtradioaktive Methode zur quantitativen Beurteilung des „Ladderings“ erarbeitet.

A.3.2.3 *In vitro* und *in vivo* verwendete Untersuchungstechniken:

Zytokinmessung

Mittels der etablierten Bioassays (TNF, IL-6) können freie, biologisch aktive Interleukine in Zellkulturüberständen, Blutserum sowie im Liquor quantitativ bestimmt werden. Ergänzt werden diese Methoden durch kommerziell verfügbare ELISAs für TNF, IL-1, IL-6 und IL-10, MIP-1 und MIP-2 (Biosource) und quantitative RT-PCR für TNF, IL-1, IL-6 und IL-10, MIP-1 und MIP-2.

NO/Nitrit und iNOS

Das gasförmige Radikal NO wird in Flüssigkeiten (Zellkulturüberständen) zu Nitrit oxidiert und dort als stabiles Endprodukt akkumuliert. Eine konzentrationsabhängige Farbreaktion mit dem Griess-Reagenz erlaubt über die Messung der optischen Dichte eine Quantifizierung der freigesetzten NO-Menge. Zusammen mit der Arbeitsgruppe von Herrn Paul wurde auch eine RT-PCR für iNOS etabliert.

A.3.2.4 Präparation der Pneumokokkenzellwandbestandteile (PCW)

Die Präparation wird in Zusammenarbeit mit PD Dr. W. Bürger des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene der Charité durchgeführt. Unbekapselter Stamm von *Streptococcus pneumoniae* (PnR-527, Jena). Kultivierung. Hitzeinaktivierung. Desintegration durch Ultraschall. Reinigung durch Zentrifugieren und Waschen. Resuspension in pyrogenfreier physiologischer Kochsalzlösung. Die eingestellte optische Dichte von 0,66 bei 620 nm entspricht einer Bakte-

riendichte von 10^7 CFU/ml. Die "rohe" Zellwandpräparation enthält keine nachweisbaren Mengen an bakterieller DNA/RNA, bakteriellem Protein, LPS sowie < 1 % intakte Zellen. Meningitis-Tiere erhalten 75 µl PCW intracisternal, Nicht-Meningitis-Tieren 75 µl physiologische Kochsalzlösung.

A.3.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

A.3.3.1 Bakterielle Meningitis und Astroglia

TNF- α als auch NO werden von Astrogliazellen nach Inkubation mit PCW zeit- und dosisabhängig produziert. Wir konnten erstmals diesen Effekt für den relevantesten Krankheitserreger der bakteriellen Meningitis belegen. NO ist dabei von zwei Gesichtspunkten von Bedeutung, da es einerseits ein sehr potenter Vasodilatator ist, zum anderen aber auch neuronotoxisch ist (Freyer et al., 1996).

Voraussetzung dafür scheint die Aktivierung der mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) zu sein, die im Vergleich zu LPS untersucht wurden. Partiiell scheint die Aktivierung der MAPK auch bei Pneumokokken von löslichen CD 14 abhängig zu sein (Schumann et al., Glia 1997).

In einer in vivo Studie untersuchten wir den Effekt von rekombinanten TNF- α auf rCBF, ICP, Leukozyteninvasion und Hirnödemen nach intrazisternaler Verabreichung. Überraschenderweise hat dieses Zytokin nur wenig inflammatorische Aktivität. Erstmals zeigten wir daß ein proinflammatorisches Zytokin in Kombination mit einer geringen, alleine unwirksamen Konzentration von bakteriellem Material zu einer fulminanten Entzündungsreaktion führt. Zudem ist die rCBF Zunahme nach TNF Injektion intrazisternal wahrscheinlich NO mediiert, da sie durch Aminoguanidin inhibierbar ist (Angstwurm et al., 1998).

A.3.3.2 Bakterielle Meningitis und Leukozyten-Endothelinteraktion

In vivo konnten wir zeigen, daß Eingriffe in die Adhäsionskaskade die Zunahme des rCBF, des ICP und des Hirnödems und erwartungsgemäß der Leukozyteninvasion in den CSF hemmten.

Unter Verwendung der konfokalen Laserscanning Mikroskopie ist es gelungen, Leukozytenrollen in vivo erstmals quantitativ in einem Modell einer entzündlichen Erkrankung darzustellen und pharmakologisch zu inhibieren (Weber et al., 1997a). Zudem konnten wir einen über den Histamin-1 Rezeptor vermittelten Pathway in der Induktion des Leukozytenrollens finden (Weber et al., 1997b), die auf eine mögliche Rolle von Mastzellen in der Frühphase der Erkrankung hindeutet.

Heparin, das an Selektine binden und so das Leukozytenrollen behindern kann, verringert drastisch die rCBF-, ICP-Anstieg- und Hirnödementwicklung sowie den Einstrom von Leukozyten in den CSF nicht nur bei einer zeitgleich mit der Meningitisinduktion durchgeführten Behandlung, sondern auch noch bei Behandlung nach 2 und teilweise auch noch nach 4 Stunden. Effektiv waren auch Heparansulfat und Fucoidin, das vorwiegend die L-Selektinfunktion inhibiert (Weber et al., 1997a, Angstwurm et al., 1995). Heparin inhibiert Leukozytenrollen in pialen Gefäßen und die nachfolgende feste Adhäsion.

Einen Eingriff auf Ebene des Leukozytenstickens führten wir mit einem monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 durch (Weber et al., 1995), wobei wir eine ca. 60% Reduktion

des rCBF Anstiegs und der Leukozyteninvasion beobachten konnten. Dies weist auf die wichtige Rolle dieses Adhäsionsmolekül in der Frühphase der bakteriellen Meningitis hin. Die Blockade des Leukozytenrollens ist effektiver als die des Leukozytenstickens und zeigt die Bedeutung des Rollens als Voraussetzung für die folgende feste Adhäsion und Migration.

A.3.3.3 Interaktion Gliaaktivierung durch neuronale Mechanismen

Die Zunahme des rCBF in der Frühphase der bakteriellen Meningitis ist unklar. Eine chronische Denervierung durch chirurgische Durchtrennung des N. nasociliaris führt zur Depletion von SP und CGRP in terminalen C-Fasern. Im Seitenvergleich ist der Blutflußanstieg nach chronischer Denervierung signifikant vermindert. Eine unmittelbar nach Durchtrennung des Nervs induzierte Meningitis führt allerdings zu einem unveränderten Anstieg des rCBF (Weber et al., 1996). Dieser Befund spricht für eine Beteiligung der erwähnten Neuropeptide bei der Blutflußregulation bei bakterieller Meningitis und gegen einen afferenten neurogenen Mechanismus.

A.3.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsberichts und Reaktionen der wissenschaftliche Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die Arbeitsgruppe um Pfister in München hat NO als wichtigen Mediator des Schadens bei der bakteriellen Meningitis postuliert und durch unspezifische iNOS Inhibition eine Reduktion von rCBF- und ICP Zunahme und auch Hirnödemen erreicht (Koedel et al., 1995). Zudem zeigten sie die NO Freisetzung in Endothelzellen nach Inkubation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken. Die Arbeit wird durch die Ergebnisse von Täuber und Mitarbeitern in San Francisco kontrovers diskutiert, da dort gezeigt wurde, daß die iNOS Inhibition zur Zunahme der Apoptose in neuronalen Strukturen führt (Leib et al., 1996b; Leib et al., 1996b). Die Rolle dieser Beobachtungen in der Pathophysiologie sind jedoch unklar. Paul aus der Münchener Arbeitsgruppe, zeigte daß in der rCBF Regulation auch nNOS und damit neuronale Strukturen regulatorisch wirken (Paul et al., 1997) und weisen auf die auch von uns gezeigte enge Interaktion von neuronaler und nichtneuronaler Mechanismen bei diesem komplexen Vorgang hin.

A.3.5 Offene Fragen

Wesentliche offene Fragen sind, ob die genetische, und damit komplette, Ausschaltung von Zytokinen (TNF - Rezeptoren, IL-6 etc.) einen positiven Effekt auf die Entwicklung der klinisch relevanten Parameter wie Hirndruck und rCBF haben, oder ob damit auch andere Regulationsmechanismen wie die Produktion antiinflammatorischer Zytokine inhibiert werden.

Eine zentrale Frage in der Zukunft wird sein, ob der möglichst gezielte Eingriff in das Signaling eine differenzierte Regulation des Entzündungsprozesses erlaubt, z.B. Verminderung der überschießende proinflammatorischen Zytokine bei normaler Produktion von IL-10 und TGF β als antiinflammatorische Botenstoffe.

Interessant ist auch die Frage der Rolle der Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen. Bei akuten inflammatorischen Prozessen könnte diesen Mechanismus ein überaus wichtiger regulatorische Rolle zukommen wie z. B. der Mikrogliaaktivität, aber auch des Leukozyten und Monozyten Turnovers im Parenchym und Liquor.

A.3.6 Literatur

Zitierte Literatur

- Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G and Cecconi O (1994) Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 45:361-378
- Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M and Pulsinelli W (1989) Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:589-596
- Dirnagl U, Villringer A, Gebhardt R, Haberl RL and Einhäupl KM (1991) Three-dimensional reconstruction of the rat brain cortical microcirculation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:353-360
- Dirnagl U, Villringer A and Einhäupl KM (1992) In-vivo confocal laser scanning microscopy of the cerebral microcirculation. *J Microscopy* 165:147-158
- Dirnagl U, Niwa K, Sixt G and Villringer A (1994) Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in the rat is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 25:1028-1038
- Dodge PR, Davis H, Feigin RD, Holmes SJ, Kaplan SL, Jubelirer DP, Stechenberg BW and Hirsh SK (1984) Prospective evaluation of hearing impairment as a sequela of acute bacterial meningitis. *N Engl J Med* 311:869-874
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr. and Swartz MN (1993) Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 328:21-28
- Granert C, Raud J, Xie X, Lindquist L and Lindbom L (1994) Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *J Clin Invest* 93:929-936
- Hess DC, Bhutwala T, Sheppard JC, Zhao W and Smith J (1994) ICAM-1 expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 168:201-204
- Koedel U, Bernatowitz A, Paul R, Frei K, Fontana A and Pfister HW (1995) Experimental pneumococcal meningitis: Cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol* 37:313-323
- Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA and Tauber MG (1996a) Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* 98:2632-2639
- Leib SL, Kim YS, Black SM, Ferriero DM and Tauber MG (1996b) Detrimental effect of nitric oxide inhibition in experimental bacterial meningitis. *Ann Neurol* 39:555-556
- Leist TP, Frei K, Kam Hansen S, Zinkernagel RM and Fontana A (1988) Tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during bacterial, but not viral, meningitis. Evaluation in murine model infections and in patients. *J Exp Med* 167:1743-1748
- Moskowitz MA and MacFarlane R (1993) Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5:159-177

- Mustafa MM, Ramilo O, Olsen KD, Franklin PS, Hansen EJ, Beutler B and McCracken GHJ (1989) Tumor necrosis factor in mediating experimental *Haemophilus influenzae* type B meningitis. *J Clin Invest* 84:1253-1259
- Paul R, Koedel U and Pfister HW (1997) 7-Nitroindazole inhibits pial arteriolar vasodilation in a rat model of pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:985-991
- Pfister HW, Koedel U, Haberl RL, Dirnagl U, Feiden W, Ruckdeschel G and Einhäupl KM (1990) Microvascular changes during the early phase of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:914-922
- Pfister HW, Borasio GD, Dirnagl U, Bauer M and Einhäupl KM (1992) Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. *Neurology* 42:1497-1504
- Quagliarello V and Scheld WM (1992) Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 327:864-872
- Saez Llorens X, Jafari HS, Severien C, Parras F, Olsen KD, Hansen EJ, Singer II and McCracken GHJ (1991) Enhanced attenuation of meningeal inflammation and brain edema by concomitant administration of anti-CD18 monoclonal antibodies and dexamethasone in experimental *Haemophilus meningitis*. *J Clin Invest* 88:2003-2011
- Sharif SF, Hariri RJ, Chang VA, Barie PS, Wang RS and Ghajar JB (1993) Human astrocyte production of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 following exposure to lipopolysaccharide endotoxin. *Neurol Res* 15:109-112
- Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434
- Tauber MG, Ferriero D, Kennedy SL, Sheldon RA and Guerra-Romero L (1993) Brain levels of neuropeptide Y in experimental pneumococcal meningitis. *Mol Cell Biochem* 18:15-26
- Tuomanen EI, Saukkonen K, Sande S, Cioffe C and Wright SD (1989) Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of leukocytes. *J Exp Med* 170:959-969
- Villringer A, Dirnagl U, Them A, Schürer L, Krombach F and Einhäupl KM (1991) Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc Res* 42:305-315

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug zum Teilprojekt

- Angstwurm K, Freyer D, Dirnagl U, Hanisch UK, Schumann RR, Einhäupl KM, Weber JR (1998) Tumour Necrosis factor- α induces only minor inflammatory changes in the CNS, but augments bacterial meningitis. *Neuroscience*:in press
- Angstwurm K, Weber JR, Segert A, Bürger W, Weih M, Freyer D, Einhäupl KM and Dirnagl U (1995) Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. *Neurosci Lett* 191:1-4
- Freyer D, Weih M, Weber JR, Bürger W, Scholz P, Manz R, Ziegenhorn A, Angstwurm K and Dirnagl U (1996) Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF- α in astroglial enriched cultures. *Glia* 16:1-6

- Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Bürger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB and Weber JR (1997) Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2 and p38 in astrocytes. *Glia*:in press
- Weber JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Freyer D, Bürger W, Busch C, EINHÄUPL KM, and Dirnagl U (1997) Heparin inhibits leukocyte rolling in pial vessels and attenuates inflammatory changes in a rat model of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:in press
- Weber JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Bürger W, EINHÄUPL KM and Dirnagl U (1997) Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis in rats. *Neurosci Lett* 226:17-20
- Weber JR, Angstwurm K, Bove GM, Bürger W, EINHÄUPL KM, Dirnagl U and Moskowitz MA (1996) The trigeminal nerve and augmentation of cerebral blood flow during experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1319-1324
- Weber JR, Angstwurm K, Bürger W, EINHÄUPL KM and Dirnagl U (1995) Anti ICAM-1 (CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 63:63-68

Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (noch nicht oben aufgeführt)

- Hanisch UK, Lyons S, Nolte C, Prinz M, Weber JR, 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
- Lindauer U, Megow D, Schultze J, Weber JR and Dirnagl U (1996) Nitric oxide synthase inhibition does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 216:207-210

Sonstige eigene Originalarbeiten

- Schumann RR, Belka C, Reuter D, Lamping N, Kirschning CJ, Weber JR, Pfeil D (1998) Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukine-1 converting enzyme, ICE) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood: in press*
- Valdúeza JM, Weber JR, Harms L and Bock A (1996) Severe tick borne encephalomyelitis after tick bite and passive immunisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:593-594

Buchbeiträge

- Lautenschlager M, Arnswald A, Freyer D, Weber JR Hörtnagl H (1997) the AF64 A model of cholinergic hypofunction: Role of nitric oxide in AF64A-mediated neurodegeneration. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases*. Eds Fisher, Yoshida, Hanin. Plenum Publishing Corporation New York: in press
- Mashur F, Weber JR, Einhäupl KM (1997) Ticlopidin und Clopidogrel in der Prävention des Schlaganfalles. *Ticlopidin und Clopidogrel im kardiovaskulären System*. Eds Schrör, Breddin. Birkhäuser, Basel Boston Berlin: in press
- Weber JR (1997) Chronische Meningoencephalitis bei Patienten mit Bruton-Typ Agammaglobulinämie (X-linked). Chancen der IG Therapie? Casereport und Literaturübersicht. *Immunregulation mit i.v. Immunglobulinen bei Autoimmunerkrankungen und Infektionen*. Eds Sibrowski, Marzusch. pmi Verlagsgruppe Frankfurt:242-245
- Weber JR, Einhäupl KM (1997) Neurologische Defektsyndrome. Neurologische Syndrome in der Intensivmedizin. Eds Stöhr, Brandt, Einhäupl. Kohlhammerverlag Stuttgart:pp111-119
- Weber JR (1997) Septische Enzephalopathie. Neurologische Syndrome in der Intensivmedizin. Eds Stöhr, Brandt, Einhäupl. Kohlhammerverlag Stuttgart:pp110-111

A.3.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Bisher wurden mit dem Projekten Hanisch und Kettenmann Signalkaskaden für IL-15 sowie Mikrogliaaktivierung nach LPS und PCW Stimulation untersucht. Diese Zusammenarbeit wird intensiv fortgeführt.

Enge methodische Kooperationen bestehen zusätzlich mit den Projekten Paul, Dirnagl und Blasig.

Dokumentation sonstiger Aktivitäten

Zudem besteht eine langjährige Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité (Direktor: Prof. Dr. U. Göbel) mit der Arbeitsgruppe PD Dr. Bürger und neuerdings auch im Bereich Signaling und der Auswirkung von Sepsis auf das Gehirn mit PD Dr. R. Schumann.

International besteht eine langjährige Kooperation mit M. Moskowitz in Boston mit Schwerpunkt neurogener Inflammation als Mechanismus der Gliaaktivierung.

A.4 Martin Paul, Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin: Untersuchungen der zellulären und molekularen Regulationsmechanismen des Endothelinsystems im Gehirn

A.4.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

Der Antrag ging von der Frage aus, welche funktionelle Rolle das Endothelinsystem im Gehirn und insbesondere in den nichtneuronalen Zellen des ZNS spielt. Vor Antragstellung war bekannt, daß einerseits die Komponenten des in nichtneuronalen Zellen des Gehirns auf Proteinebene exprimiert wurden, und daß andererseits Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zur Verfügung standen, die in experimentellen Modellen bei cerebraler Ischämie einen therapeutischen Effekt hatten. Daher wurde postuliert, daß dem Endothelinsystem im Gehirn, insbesondere bei ischämischen Prozessen und bei Störungen der Blut-Hirnschranke eine pathophysiologische Rolle zukommt. Eine Untersuchung des Endothelinsystems in diesem Zusammenhang ist insbesondere deswegen interessant, da es sowohl in Endothelzellen und in Astrozyten exprimiert wird und die Frage gestellt wurde, inwieweit das System hier einer differentiellen zellspezifischen Regulation unterliegt. Darüber hinaus wurde die mögliche funktionelle Bedeutung des Endothelinsystems bei Erkrankungen wie M. Alzheimer, viralen Infektionen des Gehirns und der Epilepsie diskutiert. Zum Zeitpunkt der Antragstellung waren zugrundeliegende Mechanismen der Endothelinregulation und deren pathophysiologische Rolle im Gehirn nur unzureichend bekannt. Insbesondere gab es nur lückenhafte Informationen über die Genregulation des Endothelinsystems in nichtneuronalen Zellen. Aus diesem Sachverhalt ergaben sich zum Zeitpunkt der Antragstellung folgende Fragen, die beantwortet werden sollten:

A.4.1.1 Was sind die molekularen Mechanismen der Endothelinregulation und gibt es hierbei Unterschiede zwischen der Regulation in Endothelzellen und Astrozyten?

Da Endothelin vor allem auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, wurde in diesem Versuchsansatz der Endothelinpromotor untersucht, der in Endothelzellen und Astrozyten transkribiert wurde. Im Rahmen dieser Versuche sollten die cis-/trans-Interaktionen des Promotors als Antwort auf typische Stimuli auf das Endothelinsystem untersucht werden. Hierzu wurden modellhaft Calcium-freisetzende Stimuli und Angiotensin II untersucht, da von diesen Faktoren bekannt war, daß Sie die Endothelinsekretion aus peripheren Endothelzellen erhöhen. Im Folgenden wurde die Regulation der Komponenten des Endothelinsystems auf diese Stimuli in Endothelzellen und Astrozyten verglichen und im Folgenden deren Einfluß auf die transkriptionelle Regulation des Endothelin-1-Gens und anderer Komponenten des Endothelinsystems charakterisiert. Weiterhin sollte die Regulation des Endothelinsystems auf mRNA-Ebene untersucht werden.

A.4.1.2 Was ist der Einfluß einer Überexpression von Endothelin im Gehirn?

Dieser experimentelle Ansatz widmete sich der Frage, ob eine Überexpression von Endothelin in nichtneuronalen Zellen des Gehirns pathophysiologisch bedeutsam ist. Zu diesem Zweck sollte ein transgenes Rattenmodell entwickelt werden, das zellspezifisch das Endothelin-1 Gen unter Kontrolle des GFAP (*glial acidic fibrillary protein*) in Astrozyten exprimiert. Im Anschluß sollte die phänotypische Konsequenz dieser Überexpression charakterisiert werden. Parallel zur Herstellung transgener Tiere sollten transgene Ratten charakterisiert werden, die ein humanes Endothelin-2-Gen überexprimieren. Diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Antragstellung bereits etabliert und zeigten neben der Expression des Transgens in der Niere vor allem eine hohe Expression im Gehirn.

A.4.1.3 Wie äußern sich pathophysiologische Stimuli auf die Regulation des Endothelinsystems im Gehirn von transgenen Ratten?

Nach der initialen Charakterisierung der transgenen Modelle sollte *in vivo* überprüft werden, ob die Veränderung in der Expression der Endotheline im Gehirn Einfluß auf die akute Blutflußveränderung hat. Hierbei sollten in Zusammenarbeit mit dem Projekt A1 Modelle der *spreading depression*, der globalen und cerebralen Ischämie in den transgenen Tieren eingesetzt werden mit der Frage, inwieweit diese Interventionen zu unterschiedlichen pathophysiologischen Reaktionen bei transgenen und nicht-transgenen Tieren führen.

A.4.2 Angewandte Methoden

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden Primärkulturen von Endothelzellen (Rind und Ratte) und Astrozyten der Ratte eingesetzt. Expressionskonstrukte wurden hergestellt, die die Luciferase cDNA unter Kontrolle des Ratten-Endothelin-1 Promotors (ca. 1300 Basenpaare) aber auch anderer Promotoren des Endothelinsystems exprimierten. Zusätzlich wurden Deletionsmutanten verwendet, bei denen die Promotorsequenz in 200- Basen-Schritten konsekutiv verkürzt wurde. Nach Transfektion dieser Konstrukte wurde die basale Luciferase-Aktivität gemessen. Nach Charakterisierung dieser basalen Parameter wurden spezifische Stimulationsversuche mittels Calciumstimulatoren und ANG II durchgeführt.

Für die *in vivo* Versuche wurden transgene Linien etabliert und diese hinsichtlich der Expression des Transgens sowie der Komponenten des Endothelin-Systems untersucht. Nach Messung der basalen Expression (mRNA und Proteienebene) wurden pathophysiologische Stimuli (*spreading depression*) induziert und morphologische sowie funktionelle Analysen (z.B. Messung des kortikalen Blutflusses) vorgenommen.

Expressionsstudien in Geweben

Zunächst wurde mittels Immunhistochemie und in situ-Hybridisierung untersucht, inwieweit eine Aktivierung des Endothelinsystems in krankhaft veränderten Gefäßen vorliegt. Hierzu wurden atherosklerotische Blutgefäße aus verschiedenen Organen untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Korrelation des Endothelin-Signals mit dem Ausmaß der atherosklerotischen Gefäßwandveränderung, die auf eine pathophysiologische Rolle des lokalen Endothelinsystems in der Gefäßwand schließen läßt (2). Weiterhin wurden RT-PCR-Assays zur Untersuchung der Endothelinexpression eingesetzt (7).

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Expression von Komponenten des Endothelinsystems im Gehirn auf mRNA Ebene untersucht und mit funktionellen Antworten auf Signaltransduktionsebene korreliert. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Projekt B1 (Kettenmann/Patt) durchgeführt. In diesem Ansatz wurden frische Schnittpräparate des Cerebellums von 20-28 Tage alten Mäusen (8) eingesetzt. In diesen Präparaten wurden die o.g. Parameter in einzelnen Purkinje Neuronen und Bergmann Glia-Zellen untersucht. Die Zellen wurden sowohl morphologisch als auch elektrophysiologisch charakterisiert und der Zellinhalt wurde durch die Patch-Pipette aspiriert. Im Anschluß daran wurde unmittelbar zur Generation von cDNA-Spezies im Zellinhalt eine Reaktion mit Reverser Transkriptase durchgeführt. Nach dieser Reaktion wurden die so behandelten Proben in eine Multiplex-PCR-Reaktion eingebracht, in der spezifische Primer für die Endotheline 1, 2 und 3, sowie die beiden ET-Rezeptoren (A und B) und die beiden Endothelin-Converting Enzyme eingebracht. Die resultierenden PCR-Produkte wurden in einer zweiten spezifischen PCR-Reaktion mit „genesteten“ Primern eingebracht, um die Spezifität zu überprüfen. Von 25 verschiedenen Purkinje-Neuronen zeigten 84% ein Signal für ECE-1 und 68% ein Signal für ECE-2. Nur eine Zelle war positiv für den ETB-Rezeptor. In Bergmann Glia-Zellen (n=25) zeigten 68% der Zellen ein Signal für den ETB-Rezeptor, 16% ein Signal für den ETA-Rezeptor, 8% für ECE-1 und 12% für ECE-2. Wiederum konnte kein Signal für die Endotheline selbst gefunden werden. Die Untersuchungen wurden durch elektrophysiologische Untersuchungen komplimentiert, in denen die Calciumantwort in fura-2 geladenen Zellen untersucht wurde. Diese Untersuchungen (5) wurden in Bergmann Glia- Zellen und in Purkinje-Neuronen in der Gegenwart von spezifischen Blockern des ETA- (BQ123) und des ETB-Rezeptors (BQ788) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigte, daß nur Bergmann Glia-Zellen funktionelle ETB-Rezeptoren exprimieren, während keine Funktion für den ETA-Rezeptor in nachgewiesen werden konnte. Diese Befunde zeigen, daß der ETB-Rezeptor auf Gliazellen der funktionell relevante Rezeptor des Endothelinsystems im Cerebellum ist.

Fazit: Der ETB-Rezeptor ist der dominante Rezeptor auf Bergmann Glia Zellen und zeigt dort eine funktionelle Koppeleung. Die Endothelinpeptide werden in Astrozyten nicht exprimiert.

A.4.3.2 in vivo Untersuchungen

Untersuchungen an transgenen Tieren:

In einem weiteren Versuchsansatz zur Aufklärung der Funktion des Endothelinsystems in vivo wurden transgene Methoden. In den hergestellten transgenen Tieren können sowohl die Regulation des Endothelinsystems als auch die möglichen phänotypischen Auswirkungen einer Überexpression untersucht werden. Zur Herstellung transgener Ratten wurde ein genomisches Konstrukt des humanen ET-2-Gens unter Kontrolle des endogenen Promotors eingesetzt. Untersuchungen der transgenen Ratten zeigten eine deutliche Überexpression des

Transgens in Niere, Lunge, Gastrointestinaltrakt und dem Gehirn, während nur geringe Expressionsspiegel im Gefäßsystem und im Herzen gefunden werden konnten.

Die transgenen Tiere zeigten darüber hinaus eine fünffache Überexpression von humanem Endothelin-2 und eine zwanzigfache Überexpression der Vorstufe Big-Endothelin-2 im Plasma. Trotz dieser deutlich erhöhten Werte war der Blutdruck vollkommen normal. Weitergehende Studien zeigten, daß die Normalisierung des Blutdrucks bei diesen transgenen Tieren wahrscheinlich durch gegenregulative Mechanismen hervorgerufen wird. Die exogene Zufuhr von humanem Endothelin-2 im akuten Versuch führte zu einer deutlich gesteigerten Blutdruckantwort im Vergleich zu nicht transgenen Tieren (1).

Weiterhin ergab die Infusion von L-NAME (*L-Nitroso-Arginin-Methyl-Ester*), einem Inhibitor der NO (nitric oxide)- Synthase, daß auch hier eine deutlich gesteigerte Blutdruckantwort im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren gefunden werden konnte. Hieraus ließ sich ableiten, daß eine Aktivierung des NO-Systems bei diesen Tieren zur Normalisierung des Blutdrucks beiträgt. Trotz der normalen Blutdruckwerte bei diesen Tieren zeigten sich eine Reihe von zellulären Veränderungen. So wurde eine interstitielle Fibrose in der Niere, die besonders hohe Mengen an Endothelin-2 in den transgenen Tieren exprimiert, festgestellt. Möglicherweise gelang es hier, ein Modell zu entwickeln, bei dem zelluläre Effekte von Endothelinen gezeigt werden können, die unabhängig vom Blutdruck sind.

Diese Tiere wurden zunächst hinsichtlich ihrer funktionellen Veränderungen aufgrund der erhöhten Endothelin-2-Expression im Gehirn untersucht. In Zusammenarbeit mit dem Projekt A1 (Dirnagl) wurde bei transgenen und nicht-transgenen Kontrolltieren versucht, eine *spreading depression* auszulösen und Parameter wie den kortikalen Blutfluß mittels Laser-Doppler-Untersuchungen zu charakterisieren. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß bei fast allen Endothelin-transgenen Tieren keine *spreading depression* auszulösen war. Dieser Befund deutete zunächst darauf hin, daß die Überexpression von Endothelin-2 im Gehirn der transgenen-Tiere einen spezifischen Einfluß auf die Auslösung der *spreading depression* hatte. In histologischen Untersuchungen der Gehirne der transgenen Tiere zeigt sich jedoch massive morphologische Veränderungen, die die Ursache für die funktionellen Veränderungen sein könnten. Die schwerwiegenden morphologischen Veränderungen zeigten ihr Maximum im Alter ab 6 Monaten und äußerten sich in einer signifikanten Reduktion des Gehirngewichts, einer Atrophie der kortikalen Schicht, einem *hydrocephalus e vacuo* und massiven gliären Deposits. Untersuchungen bei jüngeren Tieren ergaben, daß zelluläre Veränderungen bereits direkt nach der Geburt vorlagen, die dann über Monate in die o.g. auch makroskopisch sichtbaren Veränderungen einmünden.

Dieser Befund, der etwa in der Mitte der Förderperiode verifiziert wurde, führte zu einer inhaltlichen Neuausrichtung des Projekts, da er zeigte, daß die Endothelin-Überexpression primär nicht zu funktionellen Konsequenzen (z.B. für den cerebralen Blutfluß), sondern zu schwerwiegenden morphologischen Veränderungen im Gehirn führte. Dies führte zur Entscheidung, daß das zweite transgene Modell (astrozytäre Überexpression von Endothelin) nicht weiterverfolgt wurde, da in diesem Modell ähnliche morphologische Veränderungen zu erwarten waren, wie bei dem untersuchten Modell. Vielmehr wurden Arbeiten zur entwicklungsbiologischen Rolle von Endothelin im Gehirn eingeleitet. Diese beinhalten Untersuchungen zur Expression und Regulation von Komponenten des Endothelinsystems im Gehirn von transgenen und nichttransgenen Ratten. Diese Untersuchungen werden mittels in situ Hybridisierung und histologischen Analysen durchgeführt und werden mit Ablauf der jetzigen Förderphase abgeschlossen.

Fazit: Überexpression von Endothelin-2 führt im transgenen Rattenmodell zu massiven zellulären Differenzierungs- und Migrationsstörungen.

Untersuchungen mittels somatischem Gentransfer:

Da gezeigt wurde, daß die transgene Überexpression von Endothelin zu schwerwiegenden strukturellen Schäden im Gehirn führt erschien es sinnvoll, in einem zweiten Versuchsansatz zu überprüfen, inwieweit mittels somatischem Gentransfer beim adulten Tier funktionelle Veränderungen (z.B. im Rahmen von ischämischen Zuständen) ausgelöst werden können. Hierzu wurden zunächst experimentell verschiedene Carriersysteme erprobt, die einen spezifischen Gentransfer erlauben. In einem Ansatz wurde hierzu ein Minigenkonstrukt für Endothelin eingesetzt, daß mittels kationischer Liposomen zunächst in Zellkultur getestet wurde. In diesen Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß das Minigenkonstrukt zu einer deutlichen Endothelin-Überexpression führte (3). Dieses Konstrukt wurde dann in vivo zunächst in Schweinearterien (A. femoralis) getestet, wo es eine Neointima induzierte. Da mittels dieses Ansatzes vor allem eine endotheliale Expression erreicht wurde, wurden andere Carriersysteme involviert, die eine Expression vor allen in nichtendothelialen Zellen induziert, mit denen im Folgenden ein Gentransfer in Astrozyten erreicht werden kann. Hier gelang es Vektoren auf Basis des Semlicki-Forest Virus zu charakterisieren, die eine deutliche Affinität für nichtendotheliale Zellen zeigen (6).

Fazit: Es konnte ein virales Carriersystem für die Überexpression von Endothelin in nichtendothelialen Zellen entwickelt werden.

A.4.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftliche Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

In den letzten Jahren wurden wesentliche neue Konzepte zur physiologischen und pathophysiologischen Rolle des Endothelinsystems entwickelt, die auf seine vornehmliche Funktion als Wachstums- und Differenzierungsfaktor schließen lassen. Diese Untersuchungen wurden weitgehend an knock-out Modellen erhoben. Interessante Befunde zur Expression des ETA-Rezeptors wurde durch Knock-Out Experimente in embryonalen Stammzellen von Mäusen erhalten. Die Tiere zeichnen sich durch einen Phänotyp aus, der gekennzeichnet ist durch oropharyngeale Mißbildungen und Hypoplasie bestimmter Organe in diesem Bereich. Die Veränderungen treten nur bei den homozygoten Tieren auf, während heterozygote keinen spezifischen Veränderungen aufweisen. Der Phänotyp der Rezeptor-Knockout-Tiere entspricht dem Phänotyp eines Mäusestammes, bei dem das ET-1 Gen deletiert wurde (Harats et al. 1995). Hier resultierte die Manipulation wiederum in einem letalen Phänotyp bei den homozygoten Tieren, während bei den heterozygoten Ratten ein leichter Anstieg des Blutdrucks meßbar war. Dieser Befund war überraschend, da der Vasokonstriktor ET-1 nicht mehr gebildet werden konnte. Es ist allerdings möglich, daß andere Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, oder die übrigen Peptide der Endothelinfamilie, Platzhalterfunktionen übernehmen.

Bisher liegen nur funktionelle Daten zur Ausschaltung des ETB- Gens in Mäusen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen vor wie auch bei einem rattenstamm mit

einer funktionell ähnlichen Mutation (Gariépi et al, 1996). Die Tiere zeigten interessanterweise das Auftreten eines Megacolon. In weiteren Untersuchungen bei Patienten mit Hirschsprung'scher Krankheit konnte ein Defekt (Missense-Mutation) des ET-B Rezeptors gefunden werden (Puffenberger et al. 1994). Damit gelang es somit, einen direkten Zusammenhang zwischen einem Knock-Out-Modell und einer Mutation beim Menschen aufzuzeigen. Weiterhin gibt es eine Reihe von Befunden, daß Endotheline während der frühen Embryonalentwicklung vor allem als Migrations- und Differenzierungsfaktoren im Bereich der Neuralrinne wirken (Lataf et al, 1996; Nataf et al, 1996; Stone et al, 1997). Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die Entstehung der massiven Veränderungen bei den hier untersuchten transgenen Ratten, da auch die Überexpression des Endothelin-2 Gens zu einem veränderten Migrationsverhalten der kortikalen Zellschichten führen könnte. Die Untersuchungen an den transgenen Ratten, die ein Endothelin überexprimieren, passen daher in den Kontext der neuen Konzepte über das Endothelinsystem, die Endothelin vor allem als Differenzierungs- und Migrationsfaktor in der Entwicklung des ZNS sehen. Insofern sind sie auch zu den Befunden an knock-out Modellen anderer Gruppen komplementär, die besagen, daß der ETB-Rezeptor besonders wichtig für die Vermittlung dieser Wirkungen ist.

Die beschriebenen Arbeiten zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation sind die ersten, die den Rattenendothelin-1-Promotor, den die Gruppe des Antragstellers erstmalig kloniert hat, hinsichtlich typischer Stimuli auf das Endothelinsystem charakterisieren. Ebenso sind die *single cell* – PCR-Analysen und deren Kopplung an Studien zur Signaltransduktion die ersten die dies für das Endothelinsystem zeigen. Weiterhin war diese Arbeitsgruppe die erste die den β -Promotor des ECE hinsichtlich seiner transkriptionellen Regulation charakterisiert hat. Diese Befunde könnten wegweisend sein für die weitere Charakterisierung des ECE und seiner Funktion im Gehirn, die zunehmend diskutiert wird (Barnes et al, 1997a, b)

A.4.5 Offene Fragen

Der genaue regulatorische Mechanismus der pathophysiologischen Aktivierung der Endothelinexpression in Astrozyten ist weiterhin nicht letztendlich geklärt. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die transkriptionelle Aktivierung des Endothelin-1 Gens nicht die Grundlage für Heterogenitäten des Endothelinsystems zwischen Endothelzellen und Astrozyten sind. Die Befunde der *single cell*-PCR Experimente sprechen allerdings dafür, daß die zellspezifische Regulation vor allem auf Rezeptorebene relevant ist. Daher sollten in zukünftigen Untersuchungen vor allem die Regulation des ETB-Rezeptors untersucht werden.

Ebenso muß die Ursache für die massiven strukturellen Veränderungen bei den ET-2 transgenen Tieren gefunden werden. Handelt es sich hierbei wirklich um eine astrozytäre Differenzierungs- und Migrationsstörung? Daher muß die Untersuchung der frühen Embryonalstadien im Vordergrund weiterer Untersuchungen stehen.

Letztendlich ist zu zeigen, daß durch den Ansatz des somatischen Gentransfers in vivo Astrozyten als spezifische Targets bestätigt werden können. Hierzu sind Untersuchungen zur intracisternalen Applikation von Semlicki-Forest Vektoren vorgesehen.

A.4.6 Literatur

Fremdliteratur:

- Barnes K, Turner AJ (1997a) The endothelin system and endothelin converting enzyme in the brain: molecular and cellular studies. *Neurochem Res* 22: 1033-1040
- Barnes K, Walkden BJ, Wilkinson TC, Turner AJ (1997) Expression of endothelin converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its localization in rat hippocampus. *J Neurochem* 68: 570-577
- Garipey CE, Cass DT, Yanagisawa M (1996) Null mutation of the endothelin type B gene in spotted lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 867-872
- Harats, D., Kurihara, H., Belloni, P., Oakley, H., Ziober, A., Ackley, D., Cain, G., Kurihara, Y., Lawn, R., & Sigal, E. (1995). Targeting gene expression to the vascular wall in transgenic mice using the murine preproendothelin-1 promoter. *J Clin Invest*, 95, 1335-1344.
- Lahav R, Ziller C, Dupin E, Le Douarin NM (1996) Endothelin-3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 93:3892-3897
- Natav V, Lecoin L, Eicmann A, Le Douarin NM (1996) Endothelin B-receptor is expressed in neural cells in the avian embryo- *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9645-9650
- Puffenberger, E.G., Hosoda, K., Washington, S.S., Nakao, K., deWit, D., Yanagisawa, M., & Charkravarti, A. (1994). A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell*, 79, 1257-1266.
- Stone JG, Spirling LI, Richardson MK (1997) The neural crest population responding to endothelin-3 in vitro includes multipotent cells. *J Cell Sci* 110: 1673-1682

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug Teilprojekt:

- Hofer B, Liefeldt L, Thöne-Reineke Ch, Orzechowski HD, Distler A, Bauer C, Paul M (1996) Characterization of the phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *Hypertension* 28: 196-201
- Ihling C, Gobel HR, Lippoldt A, Wessels S, Paul M, Schaefer HE, Zeiher AM (1996) Endothelin-1 immunoreactivity in human atherosclerotic tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin-1. *J Pathol* 179 (3): 303-308
- Schott R, Tostes R, San H, Paul M, Webb C, Nabel E (1997) Expression of a recombinant preproendothelin-1 gene in arteries stimulates vascular contractility. *Am J Physiol* 272: H 2385-2393
- Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, Kröger B, Schmidt M, Menzel S, Bohnemeier H, Paul M (1997) Evidence for alternative promoters directing isoform-specific ex-

pression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. *J Mol Med* 1997; 75 (7): 512-521

Tuschik S, Kirischuk S, Kirchoff F, Liefeldt L, Paul M, Verkhatsky A, Kettenmann H (1997) Bergmann Glial Cells in situ express endothelin B receptors linked to cytoplasmic calcium signals. *Cell Calcium* 21: 409-419

Roks AJ, Pinto YM, Paul M, Pries F, Stula M, Eschenhagen T, Orzechowski HD, Gschwendt S, Wilschut J, van Gilst WH (1997) Vectors based on Semliki Forest Virus for rapid and efficient gene transfer into non-endothelial cardiovascular cells: comparison to adenovirus. *Cardiovasc Res* 35: 498-504

Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederholt T, Paul M (1997) Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Bio-techniques* 23: 456-460

Schmidt-Ott KM, Tuschik S, Kirchhoff F, Verhratsky A, Liefeldt L, Kettenmann H, Paul M (1998) Analysis of endothelin system gene expression in single cerebellar cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, im Druck

Funke-Kaiser H, Orzechowski H.-D., Richter CM, Paul M (1998) An alternative promoter directs ECE1b/a mRNA expression in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, im Druck

Sonstige eigene Originalarbeiten

Böhm M, Castellano C, Agabiti-Rosei E, Flesch M, Paul M, Erdmann E (1995) Dose-dependent dissociation of ACE-inhibitor effects on blood pressure, cardiac hypertrophy and beta-adrenergic signal transduction. *Circulation* 92: 3006-3013

Tawfik-Schlieper H, Moll M, Schmid B, Schwinger RH, Paul M, Ganten D, Böhm M (1995) Alterations of cardiac alpha and beta adrenoceptors and inotropic responsiveness in hypertensive transgenic rats harbouring the mouse renin gene. *Clin Exp Hypertens* 17:631-648

Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS, Liu Y, Ganten D, Paul M (1995) Induction of cardiac angiotensin II converting enzyme with dietary NaCl loading in genetically hypertensive and normotensive rats *J Mol Med* 73:243-248

Kreutz R.....Paul M (1996) Effect of losartan on right ventricular hypertrophy and cardiac angiotensin I-converting enzyme activity in pulmonary hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 18: 101-111

Lippoldt A, Paul M, Fuxe K, Ganten D The brain renin angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp. Hypertens.* 17: 251-266

Steckelings UM, Artuc M, Paul M, Stoll M, Hanz BM (1996) Angiotensin II stimulates proliferation of primary human keratinocytes via a non AT-1, non AT-2 angiotensin receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 229: 329-333

Wagner J, Volk S, Haufe CC, Ciechanowicz A, Paul M, Ritz E (1995) Renin gene expression in human kidney biopsies from patients with glomerulonephritis or graft rejection. *J Am Soc Nephrol* 5: 1469-1475

- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger M, Unger T (1995) The angiotensin AT₂ receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95:651-657
- Langheinrich M, Lee MA, Böhm M, Pinto YM, Ganten D, Paul M (1996) The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mRen2)27 in hypertension research. *Am J Hypertension* 9: 506-512
- Wagner J, Danser J, Derx FH, de Jong TV, Paul M, Mullins JJ, Schalekamp MA, Ganten D (1996) Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA and angiotensin converting enzyme mRNA in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol* 80: 159-163
- Schönfelder G, John M, Hopp H, Fuhr N, van der Giet M, Paul M (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes. *Faseb J* 10: 777-784
- Lee MA, Böhm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D (1996) Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR (mRen-2)27. *Am J Physiol* 270: E 919-929
- Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS, Liu Y, Ganten D, Paul M (1995) Induction of cardiac angiotensin-I converting enzyme with dietary NaCl-loading in genetically hypertensive and normotensive rats. *J Mol Med* 73: 243-248
- Nickenig G, Laufs U, Schnabel P, Knorr A, Paul M, Böhm MP (1997) Down-regulation of aortic and cardiac AT₁ receptor gene expression in transgenic (mRen-2) 27 rats. *Br. J. Pharmacol* 121:134-140
- Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH, Scholtens E, van Geel PP, de Graeff PA, Wagner J, Paul M (1997) Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med* 75: 371-377
- Fernandez-Alfonso MS, Martorana PA, Licka I, van Even P, Trobisch D, Schölkens BA, Paul M (1997) Early induction of angiotensin-I converting enzyme in rat carotid artery after balloon injury. *Hypertension* 20: 272-277
- Flesch M, Schiffer F, Zolk O, Pinto YM, Rosenkranz S, Hirth-Dietrich C, Arnold G, Paul M, Böhm M (1997) Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 30: 383-391
- Schnabel P, Nohr T, Nickenig G, Paul M, Böhm M (1997) Alpha-adrenergic signal transduction in renin transgenic rats. *Hypertension* 30: 1356-1361

A.4.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Intensive Kooperationen innerhalb des SFB's bestehen mit den Projekten A1, A2 und B1. In Zusammenarbeit mit A1 wurden die funktionellen Untersuchungen bei den transgenen Ratten durchgeführt. Mit A2 besteht eine Zusammenarbeit zur Entwicklung von spezifischen RT-PCR Assays zur Messung von Stickstoffmonoxidisoformen. Mit B1 besteht eine enge Zusammenarbeit hinsichtlich der Untersuchung der Expression des Endothelinsystems im Gehirnschnitten und seiner funktionellen Bedeutung, sowie hinsichtlich der Regulation des Systems bei hypoxischen Situationen.

B Projektbereich B: Physiologie und Beeinflussung glialer Tumore

B1

Helmut Kettenmann & Stefan Patt, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

Physiologische Eigenschaften glialer Tumore

B3

Regina Reszka, Friedrich Weber & Wolfgang Walther, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

Veränderungen von Zell-Zell-Wechselwirkungen glialer Tumore in vitro und in vivo nach retroviralem und liposomalem Zytokingentransfer

B4

Rosemarie Grantyn, Physiologisches Institut der Humboldt-Universität, Berlin

Funktionelle Eigenschaften und manipulierte Differenzierung von Retinoblastomzellen

ZUSAMMENFASSENDE BERICHT DES PROJEKTBEREICHES

Der Projektbereich B beschäftigte sich mit den zellulären Eigenschaften von Gliomzellen mit der Perspektive, diese Zellen in ihrem Verhalten zu modellieren. Dabei gibt es zwei wichtige Parameter, die auf der zellulären Ebene das Tumorstadium beeinflussen: 1. die Proliferation der Zellen und 2. deren Infiltration in das gesunde Gehirngewebe.

Das Projekt B1 hat sich in der Hauptsache auf die Eigenschaften von Gliomzellen konzentriert. In einem neuen Ansatz wurden akute Hirnschnitte von menschlichem Operationsmaterial herangezogen, um festzustellen, inwieweit sich normale Gliazellen und neoplastische ähneln. Überraschenderweise kam heraus, daß viele Gliome mehr Ähnlichkeiten mit Neuronen haben als mit primären Gliazellen. Die Kenntnisse bezüglich ihrer physiologischen Eigenschaften wurden dann herangezogen, um das Proliferationsverhalten dieser Zellen zu beeinflussen. Erste Ergebnisse zeigen sich bei der Aktivierung von Natriumkanälen, die gerade bei vielen Gliomzellen in hohem Grade vorhanden sind. Diese Natriumkanäle sind auch die molekulare Grundlage dafür, daß Gliomzellen elektrisch erregbar sein können. Diese Zellen können ähnlich Aktionspotentiale generieren wie Neurone. Der erregende Neurotransmitter Glutamat oder sein Agonist Kainat können repetitive Entladungen bei Gliomzellen erzeugen. Damit eröffnet sich auch die Möglichkeit, daß diese elektrisch erregbaren Tumorzellen epileptische Entladungen zumindest verstärken könnten. Ein weiterer interessanter Rezeptor, der mit der Malignität der Tumore korreliert, ist der GABA_A-Rezeptor. Expression dieses Rezeptors findet man ausschließlich auf niedergradigen Gliomen. Es paßt in diesem Zusammenhang auch sehr gut in das Bild, daß Gliomzelllinien, die per Definition sehr gut proliferieren, diesen Rezeptor nicht mehr besitzen. Der GABA-Rezeptor könnte zum einen als diagnostischer Marker für niedergradige Tumore eingesetzt werden, zum anderen könnte sich aber auch ein

Projektbereich B

funktioneller Zusammenhang zwischen der Rezeptorexpression und dem Proliferationsverhalten ergeben.

Das Projekt Reszka B3 konzentriert sich auf die Zell-Zell-Wechselwirkung zwischen gentechnisch veränderten Gliomzellen. Ansatzpunkt hierbei ist die Transfektion von Zellen mit Zytokin-cDNA /oder -genen durch retroviralen oder liposomalen Transfer. Dabei ergibt sich zum einen die Frage, ob die Proliferation der Zellen nach der Transfektion verändert ist und zum zweiten, ob diese Zellen in einer anderen Art und Weise mit intrinsischen Hirnzellen interagieren. Bei der Interaktion mit Hirnzellen wurde insbesondere Wert auf die Tumor-Mikrogliazell-Interaktion gelegt. Dies ergibt sich insbesondere auf dem Hintergrund, daß Mikrogliazellen viele Eigenschaften wie Makrophagen haben und daher zytotoxisch und über Phagozytose Zellen abtöten bzw. entfernen können. Erste Versuche deuten darauf hin, daß der Kontakt mit Tumorzellen eine erhöhte Motilität der Mikrogliazellen auslöst und daß diese Zellen durch den Kontakt aktiviert werden.

Im Projekt B4 waren die funktionellen Eigenschaften und die manipulierte Differenzierung von Retinoblastomzellen der Ausgangspunkt. Im Unterschied zu anderen Regionen im ZNS sind die Vorläuferzellen der Netzhaut pluripotent, das heißt, sie können sowohl Neuronen (Rezeptorzellen, Interneurone, Projektionsneurone) und Gliazellen (Müllerzellen) generieren. Eine interessante Frage ergibt sich, wie auf molekularer Ebene die verschiedenen Differenzierungswege kontrolliert werden. Leider gestaltete sich die immunzytochemische Charakterisierung der Retinoblastom-Zelllinien unerwartet schwierig, weil sich nur sehr wenige Zellen am Substrat anhefteten und außerdem diese Zellen eine ausgeprägte Autofluoreszenz in dem für Serotonin und Dopamin charakteristischen Bereich haben. Dennoch konnten die kalziumbindenden Proteinen Calbindin, Calretinin und Parvalbumin als lichtmikroskopischem Substrat gut dargestellt werden. Zusammenfassend hat sich dieser Projektbereich, der von vornherein schon sehr klein gestaltet war, sehr heterogen entwickelt. Im Neuantrag wird dieser Tatsache in sofern Rechnung getragen, daß nur das Projekt B1 weitergeführt und dieser Projektbereich durch eine ganze Anzahl von Neuanträgen ergänzt wird.

B.1 Helmut Kettenmann & Stefan Patt, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch: Physiologische Eigenschaften glialer Tumore

B.1.1 Arbeitsbericht

Akute Hirnschnitte humaner Gliome sind ein gutes Modell, die physiologischen Eigenschaften an Gliomzellen zu studieren

Bisherige Arbeiten zur Physiologie von Gliomzellen wurden an Zelllinien durchgeführt, die aus Kulturen von Gliommaterial entwickelt wurden. Wir haben uns in diesem Antrag die Frage gestellt, ob diese Zellen ein gutes Modell für Gliomzellen darstellen oder ob die Zellen im Tumorgewebeverband andere Eigenschaften besitzen. Wir haben dazu moderne physiologische Techniken auf akute Hirnschnitte angewandt. Das größte technische Problem war, aus dem nach der Operation entfernten Gewebe lebende Hirnschnitte herzustellen. Wir konnten erstmals untersuchen, welche physiologischen Eigenschaften Zellen aus den verschiedenen Typen von Gliomen *in situ* besitzen und ob diese vergleichbar sind mit denen normaler Gliazellen. So wurden zum Beispiel Experimente an Zellen aus Oligodendrogliomen durchgeführt, um Rückschlüsse auf ihre mögliche Abstammung von Oligodendrozyten ziehen zu können.

Primärkulturen eröffnen die Möglichkeit für zellbiologische Tests wie zum Beispiel Proliferationsmessungen

Während, wie oben beschrieben, ein Teil des Tumormaterials für akute Hirnschnitte verwendet wurde, haben wir Kulturen von demselben Tumor angelegt, um somit die Eigenschaften der Zellen aus dem Gewebe mit denen in Kultur zu vergleichen. Darüber hinaus gab uns die Kultur die Möglichkeit, zellbiologische Techniken wie zum Beispiel Proliferations-Assays anzuwenden. In diesen untersuchten wir, wie eine Modulation der in den Tumorzellen gefundenen Rezeptoren und Ionenkanäle ihre Proliferationsrate beeinflusst.

Gliomzellen sind elektrisch erregbar

Eine der größten Überraschungen in diesem Projekt war die elektrische Erregbarkeit von einem Drittel der Gliomzellen. Wir fanden diese Eigenschaften sowohl bei Glioblastomen, Astrozytomen als auch bei Oligodendrogliomen. Mit der Patch-clamp-Technik können durch Depolarisation der Zellmembran große Einwärtsströme aktiviert werden. Ihre Blockade durch Tetrodotoxin und ihre Abhängigkeit von der extrazellulären Natriumkonzentration deuten auf die Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen hin. Die Dichte dieser Kanäle in den Gliomzellen ist ausreichend, um mit depolarisierenden Strompulsen Aktionspotentiale zu erzeugen. Die Charakteristik der Spannungsabhängigkeit der Natriumkanäle ist ähnlich der in

vielen Neuronen gefundenen und weicht von der in Astrozyten beschriebenen ab. Natriumkanäle in Gliomzellen haben also Eigenschaften des „neuronalen Natriumkanals“. Während etwa ein Drittel der Glioblastomzellen Aktionspotentiale generieren können, fanden wir, daß Gewebe aus Oligodendrogliomen und Mischgliomen sogar von elektrisch erregbaren Zellen dominiert ist. In sechs untersuchten Oligodendrogliomen und zwei Oligoastrozytomen war die Mehrzahl der untersuchten Zellen elektrisch erregbar. Diese Befunde können erklären, warum eines der häufigsten Symptome von Patienten mit Oligodendrogliomen epileptische Anfälle sind. Möglicherweise ist das Tumorgewebe selbst epileptisch aktiv und löst nicht allein durch Druck auf das umgebende Nervengewebe Anfälle aus, wie bisher angenommen. Wir fanden die elektrisch aktiven Zellen sowohl in akuten Hirnschnitten als auch in Zellkultur. Allerdings konnten wir beobachten, daß der Anteil der Aktionspotential-generierenden Zellen in Kultur mit der Zeit abnimmt. Möglicherweise proliferieren die elektrisch erregbaren Zellen nicht so aktiv wie andere und werden in der Zellkultur durch eine Population von Zellen mit elektrisch passiven Membraneigenschaften ersetzt. Denkbar ist jedoch auch, daß die Expression von Na^+ -Kanälen unter den Bedingungen der Zellkultur herunterreguliert wird, denn auch in einem Teil der Zellen aus Gliomzelllinien werden durch Depolarisation TTX-sensitive Einwärtsströme aktiviert, die jedoch viel kleiner sind als die in den Schnitten oder in Primärkultur gemessenen. Die Dichte der Na^+ -Kanäle reicht nicht mehr aus, um Aktionspotentiale auszulösen. Das zeigt, daß Zelllinien bezüglich ihrer funktionellen physiologischen Eigenschaften kein gutes Modell für Gliomzellen darstellen.

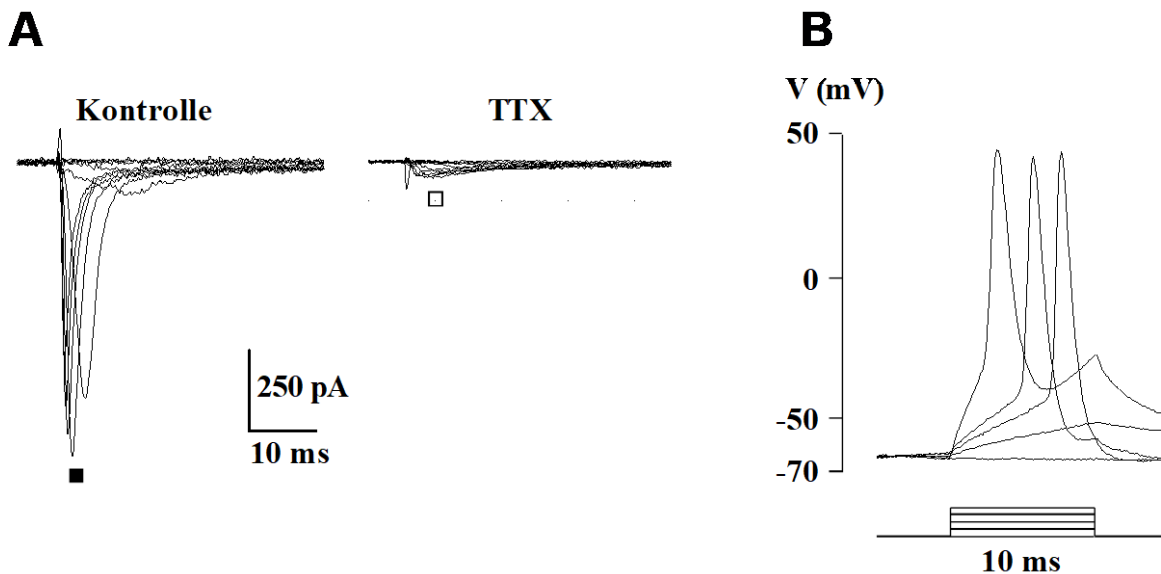


Abb. 1 Glioblastomzellen exprimieren Na^+ -Kanäle in ausreichender Dichte, um Aktionspotentiale zu generieren. A: Na^+ -Ströme wurden bei depolarisierenden Spannungspulsen von -70 mV bis +20 mV (in 10 mV-Schritten) gemessen. Die Depolarisation über -50 mV aktivierte einen schnellen Einwärtsstrom (links). Dieser wurde in Gegenwart von 100 nM Tetrodotoxin (eines spezifischen Inhibitors des spannungsaktivierten Na^+ -Kanals) gehemmt (rechts). B: Messung des Membranpotentials einer Glioblastomzelle in Primärkultur in der Stromklemme. Nach Strominjektionen von 120, 180 und 240 pA von je 10 ms Dauer konnten einzelne Aktionspotentiale ausgelöst werden.

Erste Ergebnisse, die auf einen Zusammenhang zwischen Na^+ -Kanalaktivierung und Proliferation hindeuten

In diesem Projekt haben wir uns die Frage gestellt, ob die Aktivität der Natriumkanäle in irgendeiner Form die Proliferation von Tumorzellen bzw. Gliomzelllinien beeinflusst. Da es sich um längerfristige Wachstumsassays handelte, konnten wir diese Experimente nur in Kultur bzw. an Linien durchführen. Eine chronische Aktivierung der Natriumkanäle mit Veratridin reduziert die Teilungsaktivität. Messungen mit der Patch-clamp-Technik im current clamp mode zeigten, daß Veratridin in der wachstumshemmenden Konzentration transiente Depolarisation bzw. Oszillation des Membranpotentials der Gliome hervorruft. Wir vermuten daher, daß die durch Natrium⁺-Kanäle aktivierte Depolarisation auf das Proliferationsverhalten der Zellen einwirkt. Die Blockade der Natriumkanäle mit TTX hat keinen Einfluß auf die Teilungsrate. Wir glauben daher, daß die Depolarisation selbst nicht Ursache für die Wachstumshemmung ist, da die Depolarisation der Zellen mit hohem Kalium keinen Einfluß hat. Möglich wäre der Einstrom von Natrium, der wiederum komplexe Vorgänge der Zelle auslösen könnte wie zum Beispiel die pH-Änderung durch Aktivierung durch Na⁺-abhängige pH-Regulationssysteme. Diesen Zusammenhang wollen wir in der nächsten Antragsperiode untersuchen.

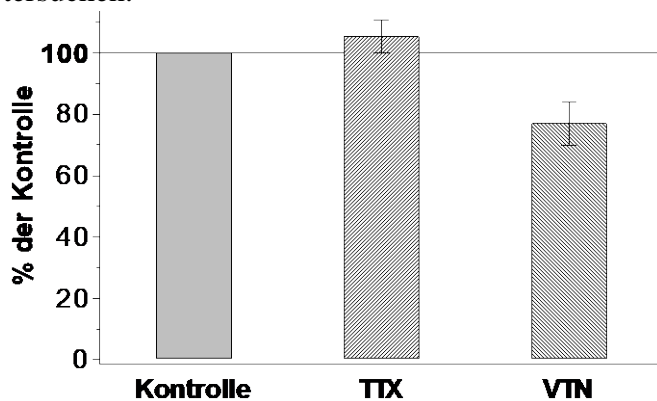


Abb. 2 Die Proliferation von Gliomzellen in serumfreiem Medium ist in Gegenwart des spezifischen Na⁺-Kanal-Aktivators Veratridin (VTN) im Vergleich zur Kontrolle verringert (200 µM; 76.7 ± 7.2 %; n=15), während die Inhibition der Kanäle mit Tetrodotoxin (TTX) kaum einen Effekt auf die Zellteilungsrate hat (1 µM; 105.1 ± 5.2; n=45).

Die Membraneigenschaften von Gliomzellen sind mehr neuronal als glial

Neben den spannungsaktivierbaren Natriumkanälen haben wir auch drei Typen von spannungsabhängigen Kaliumströmen charakterisiert: Wir konnten einen auswärtsrektifizierenden, einen A-Typ-Kaliumstrom und einen einwärtsgleichrichtenden Kaliumstrom charakterisieren. Diese spannungsabhängigen Kaliumströme findet man zwar auch teilweise bei Gliazellen, sind aber in Kombination mit den großen Natriumströmen bisher nie bei irgendeiner Form der Glia beschrieben. Das Strommuster paßt vielmehr zu Membraneigenschaften von Neuronen. Dies wirft natürlich die Frage auf, ob die Gliome in ihrer Entstehungsgeschichte aus Gliazellen bzw. deren direkten Vorläufern stammen. Unsere Daten deuten eher darauf hin, daß diese Zelle sich von einem Neuron oder von einer Vorläuferzelle ableitet, die sowohl neuronale als auch gliale Eigenschaften annehmen kann. Während gliale Vorläuferzellen im erwachsenen Gehirn bekannt sind, ist eine solche neurale Vorläuferzelle bisher nicht beschrieben.

Glutamat wirkt als erregender Neurotransmitter bei Gliomen

Glutamat als der wichtigste excitatorische Neurotransmitter des ZNS von Vertebraten löst auch bei vielen Gliomzellen Antworten aus. 66 Prozent der untersuchten Glioblastomzellen,

44 Prozent der Zellen aus Astrozytomen und 86 Prozent der Oligodendrogliomzellen wurden *in situ* und *in vitro* durch Glutamat bzw. den spezifischen Agonisten der Rezeptoren AMPA/Kainat depolarisiert. Sowohl die Kainat- als auch die Glutamat-aktivierten Ströme wurden durch den Antagonisten des Nicht-NMDA-Rezeptors CNQX gehemmt. Begleitet ist die Stromantwort von einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, wie wir mit dem kalziumbindenden Fluoreszenzfarbstoff FURA-2 messen konnten. Die Verbindung zwischen der Glutamatrezeptoraktivierung und dem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration wird über spannungsabhängige Kalziumkanäle vermittelt. Deren Eigenschaften wurden von uns mit Hilfe der Patch-clamp-Technik untersucht. Die Depolarisation durch den ionotropen Glutamatrezeptor ist ausreichend, um die spannungsabhängigen Kalziumkanäle zu aktivieren. Die Blockade dieser Kanäle blockiert auch die Kalziumantwort. Die durch Kainat vermittelte Depolarisation ist ausreichend, um die Schwelle für die Aktivierung von Aktionspotentialen zu überschreiten. Zugabe von Kainat löste bei einigen Zellen eine ganze Salve von Aktionspotentialen aus. Ein solches Verhalten ist im ZNS bisher nur bei Neuronen gefunden worden und entspricht in keiner Weise den Eigenschaften von Gliazellen. Glutamat depolarisierte diese Zellen zu langsam, um Aktionspotentiale auszulösen. Wir können uns aber vorstellen, daß Gliomzellen, die sehr nahe an synaptische Bereiche heranreichen, dort auch ausreichend depolarisiert werden, um Aktionspotentiale zu generieren.

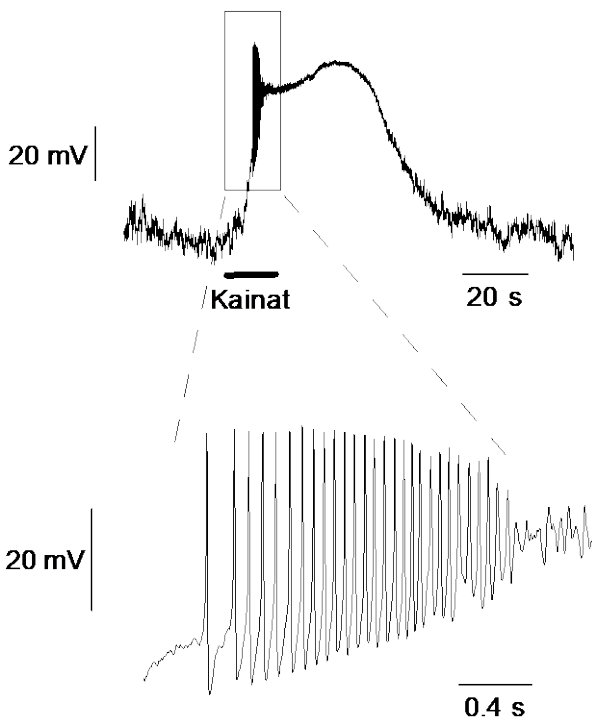


Abb. 3 Agonisten des Glutamatrezeptors können Gliomzellen depolarisieren. Oben: In der Stromklemme bewirkte die Applikation von Kainat auf die Membran einer kultivierten Astrozytomzelle (0.1 mM, 15 s) eine Depolarisation des Membranpotentials und löste eine Serie von Aktionspotentialen aus. Unten: Die Aktionspotentiale von oben in expandierter Zeitskala.

Gliomzellen können GABA_A-Rezeptoren exprimieren

Ein anderer Rezeptor, dessen Vorkommen und Eigenschaften in Gliomzellen im Berichtszeitraum detailliert untersucht wurde, ist der GABA-Rezeptor. In einem Teil der Gliomzellen löst die Applikation von GABA bei einem Haltepotential von -60 mV und hoher Cl⁻-Konzentration in der Pipettenlösung einen Einwärtsstrom aus. Die Aktivierung dieses Stroms durch Muscimol und seine Hemmung durch Bicucullin und Picrotoxin weisen darauf hin, daß es sich um den GABA_A-Rezeptor handelt. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung ergibt eine Dissoziationskon-

stante von 14.8 μM und einen Hill-Koeffizient von 1.6. Diese Werte sind charakteristisch für den neuronalen GABA_A-Rezeptor. Die weitere pharmakologische Untersuchung ergab, daß der GABA-induzierte Strom in den Gliomzellen durch Benzodiazepine beeinflusst wird: Durch Bindung von Flunitrazepam an den Rezeptor nimmt seine Amplitude zu, während der inverse Agonist DMCM ihre Verminderung bewirkt. Diese pharmakologischen Eigenschaften sind typisch für GABA-Rezeptoren in Neuronen und Oligodendrozyten, aber nicht für astrozytäre GABA-Rezeptoren.

Bezüglich der Richtung des durch GABA hervorgerufenen Stromes trat eine Heterogenität bei den Gliomzellen zutage, wie durch Messungen an mit Gramicidin perforierten Patches gezeigt werden konnte. In einigen Versuchen hyperpolarisierte GABA die Membran, in der Mehrzahl der Zellen jedoch rief es eine Depolarisation hervor. Wie im Falle der Glutamatrezeptoren führte eine Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Öffnung von Ca-Kanälen in der Plasmamembran.

Die Expression der GABA_A-Rezeptoren korreliert mit der Malignität des Tumors

Im Gegensatz zu Na⁺-Kanälen und Glutamatrezeptoren fanden wir bei der Untersuchung der GABA_A-Rezeptoren einen direkten Zusammenhang zwischen der Malignität des Tumors und den physiologischen Eigenschaften seiner Zellen. Während GABA-Antworten in der Mehrzahl der Zellen aus Astrozytomen und Oligodendrogliomen induziert werden konnten, wurden in 22 von 23 Glioblastomen keine funktionellen GABA_A-Rezeptoren gefunden. Zellen aus 7 Gliomzelllinien zeigten keine Stromantworten auf GABA-Applikation, unabhängig von der Malignität des Tumors, dem sie entstammten.

Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression des GABA_A-Rezeptors und dem Wachstum der Gliomzellen vermuten, da das Verschwinden des Rezeptors einhergeht mit unbegrenzter Zellteilung, wie es typisch für maligne Tumoren und immortalisierte Zelllinien ist. Möglicherweise wirkt GABA hemmend auf die Proliferation von Gliomzellen. Vorläufige Ergebnisse aus Proliferationsassays mit kultivierten Gliomzellen scheinen diese Vermutung zu bestätigen: Eine Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren durch Inkubation mit GABA im Kulturmedium führte zu niedrigeren Proliferationsraten im Vergleich zur Kontrolle.

Gliomzellen exprimieren ein heterogenes Muster an Neurotransmitterrezeptoren

In einem ersten Ansatz haben wir das Muster an exprimierten Neurotransmitterrezeptoren charakterisiert. Dabei haben wir uns auf die Rezeptoren beschränkt, die Kalziumsignale auslösen. Unsere Hoffnung war, die verschiedenen Gliomtypen auf Grund ihres Musters von Kalziumantworten zu unterscheiden. Dies hat sich leider nicht bestätigt. Bisher haben wir aber diese Experimente nur in Kultur ausgeführt, die Untersuchungen im Hirnschnitt stehen noch aus. Kulturen wurden mit dem Farbstoff fluo-3-acetomethylester geladen und die Kalziumantworten nach Zugabe von Angiotensin II, ATP, Bradykinin, Glutamat, Histamin, Norepinephrin, Serotonin und Substanz P getestet. Die häufigsten Antworten erhielten wir durch Zugabe von Histamin, Bradykinin und ATP, was auf die Expression von purinergen, histaminergen und Rezeptoren für Bradykinin hindeutet. Die anderen Liganden lösten nur bei einem kleinen Teil der Tumorzellen eine Kalziumantwort aus. Leider waren wir nicht in der Lage,

einen Zusammenhang zwischen Gliomtyp und der Malignität des Tumors zu etablieren. Wir hatten auch den Eindruck, daß innerhalb der Kulturen die Zellen sehr heterogen reagierten. Da unsere Daten aus den Natriumkanalexpressionen den Hinweis geben, daß sich Populationen in der Kultur verschieben, je länger diese kultiviert werden, glauben wir, daß es unumgänglich ist, diese Frage noch einmal an Hirnschnitten aufzugreifen. Dies soll in der folgenden Antragsperiode geschehen.

Aktivierung purinerger Rezeptoren löst komplexe Kalziumsignale bei Gliomzellen aus

Um die Signaltransduktionswege in humanen Gliomen weiter zu charakterisieren, untersuchten wir die durch ATP ausgelösten Änderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration genauer mit Hilfe der Video-Imaging Mikrofluometrie. Unsere Experimente zeigten, daß die durch ATP ausgelösten Ca^{2+} -Signale ausschließlich durch metabotrope Purinorezeptoren ausgelöst werden, die die pharmakologischen Eigenschaften von P_{2Y} -, P_{2U} - und P_{2T} -Rezeptoren haben. Dabei scheinen P_{2Y} -Rezeptoren am häufigsten vorzukommen. Die Aktivierung aller drei Rezeptoren löst einen Ca^{2+} -Austritt aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern aus, der von einem Ca-Einstrom in die Zellen gefolgt wird. Ein ähnlicher Ca^{2+} -Einstrom konnte durch Thapsigargin, das die intrazellulären Speicher entlädt, ausgelöst werden. Daraus kann geschlossen werden, daß humane Gliomzellen über einen ausgeprägten kapazitiven Ca^{2+} -Eintrittsweg (Putney, 1990) verfügen. Nach Aktivierung durch Thapsigargin bleibt dieser Weg über längere Zeit aktiv. Des weiteren wurde in Experimenten mit dem spezifischen Entlader mitochondrialer Ca^{2+} -Speicher CCCP gezeigt, daß Ca^{2+} -Ionen nach Eintritt über den kapazitiven Weg in Mitochondrien gespeichert werden. Die dort gespeicherten Ca^{2+} -Ionen werden langsam freigegeben und verlängern die durch Agonisten ausgelöste Ca^{2+} -Antwort der Zellen. Auf der Grundlage dieser Befunde können wir annehmen, daß humane Gliomzellen bezüglich der Ca^{2+} -Homöostase gemeinsame Eigenschaften mit der Mehrheit anderer elektrisch nicht erregbarer Zellen haben, für die typisch ist, daß die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher die Hauptquelle für Ca^{2+} -Signale ist und der Weg des Ca^{2+} -Einstroms im wesentlichen über speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle verläuft.

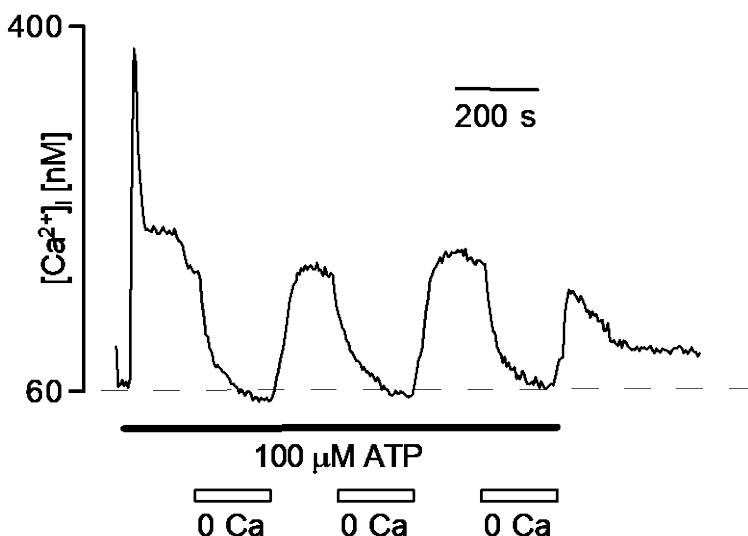


Abb.5 ATP aktiviert einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom in Glioblastomzellen. Dargestellt ist die gemittelte Reaktion von 51 Zellen auf längerdauernde Applikation von $100 \mu\text{M}$ ATP. ATP verursacht zunächst einen steilen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, der von einer Plateauphase gefolgt wird. Bei Perfusion der Zellen mit Ca^{2+} -freier Lösung verschwindet das Plateau, erscheint aber wieder nach Wechsel zu Ca^{2+} -haltiger externer Lösung. Das geschieht durch kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom durch speichergesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran, die nur in elektrisch nicht erregbaren Zellen anzutreffen sind.

B.1.2 Referenzen:*Eigene Arbeiten zum Antragsthema:*

- Labrakakis, C., S. Patt, J. Hartmann and H. Kettenmann (1997) Glutamate acts as an excitatory neurotransmitter in glioma cells, *Eur. J. Neurosci.*, im Druck.
- Labrakakis, C., S. Patt, P. Weydt, J. Cervós-Navarro, R. Meyer and H. Kettenmann (1997) Action potential generating cells in human glioblastoma, *J Neuropathol. Exp. Neurol.*, 56:243-254.
- Labrakakis, C., S. Patt, P. Weydt, J. Hartmann and H. Kettenmann (1997) Functional GABA_A receptors on glioma cells, *Eur. J. Neurosci.*, im Druck.
- Labrakakis, C., T. Müller and H. Kettenmann (1997) GABA_A receptor activation triggers a Cl⁻ conductance increase and a K⁺ channel blockade in cerebellar granule cells, *Neurosci.*, 79:177-189.
- Patt, S., C. Labrakakis, M. Bernstein, P. Weydt, J. Cervós-Navarro, G. Nisch, and H. Kettenmann (1996) Neuron-like properties of human neoplastic oligodendroglial cells, *Neurosci.*, 71:601-611.
- Patt, S., H. Schmidt, C. Labrakakis, P. Weydt, G. Nisch and H. Kettenmann (1996) Human central neurocytoma cells show neuronal physiological properties in vitro, *Acta Neuropath.*,
- Patt, S., Labrakakis, C., Weydt, P. and H. Kettenmann (1995) The physiological approach to neurooncology, *J. Neuropathol. Exp. Neurology, Suppl.* 42-43.
- Weydt, P., T. Möller, S. Patt, C. Labrakakis and H. Kettenmann (1997) Neuroligand-triggered calcium signalling in cultured human glioma cells, *Neurosci. Lett.*, 228:91-94.

Publikationen, die aus der Interaktion im SFB entstanden sind:

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

Weitere Publikationen mit Bezug auf das Antragsthema:

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

- Kirchhoff, F., C. Ohlemeyer and H. Kettenmann (1997) Expression of MAG transcripts in murine oligodendrocytes, *Neurosci.*, im Druck.
- Kirischuk, S., H. Kettenmann and A. Verkhratsky (1997) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger activity strongly modulates kainate triggered Ca^{2+} signalling in Bergmann glial cells, *FASEB J.*, 568: 566-572.
- Kirischuk, S., J. Neuhaus, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1995) Preferential localization of active mitochondria in process tips of immature retinal oligodendrocytes, *Neuroreport*, 6: 737-741.
- Kirischuk, S., J. Scherer, T. Möller, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1995) Subcellular heterogeneity of voltage-gated calcium channels in cells of the oligodendrocyte lineage, *Glia*, 13:1-12.
- Kirischuk, S., S. Tuschick, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1996) Calcium signalling in mouse Bergmann glial cells mediated by α_1 -adrenoreceptors and H_1 histamine receptors, *Eur. J. Neurosci.* 8:1198-1208.
- Kirischuk, S., Scherer, J., Kettenmann, H. and A. Verkhratsky (1995) Activation of P_2 -Purinoreceptors triggered Ca^{2+} release from InsP_3 -sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes, *J. Physiol.* 483.1:41-57
- Kirischuk, S., T. Möller, A. Verkhratsky, and H. Kettenmann (1995) ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells, *J. Neurosci.* 15:7861-7871.
- Möller, T., C. Nolte, R. Burger, A. Verkhratsky and H. Kettenmann (1997) Mechanisms of C5a and C3a complement fragments induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signalling in microglia: intracellular Ca^{2+} release and capacitative Ca^{2+} entry, *J. Neurosci.*, 17:615-624.
- Müller, T., T. Möller, J. Neuhaus and H. Kettenmann (1996) Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation, *Glia*, 17:274-284.
- Nolte, C., F. Kirchhoff and H. Kettenmann (1997) Epidermal growth factor is a motility factor for microglial cells *in vitro*: evidence for EGF receptor expression, *Eur. J. Neurosci.*, im Druck.
- Nolte, C., T. Möller, T. Walter and H. Kettenmann (1996) Complement 5a controls motility of murine microglial cells *in vitro* via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton, *Neurosci.*, 73:1091-1107.
- Oland L. A., T. Müller, H. Kettenmann and J. Hayashi (1996) Preparation of primary cultures and acute slices of the nervous system of the moth *Manduca sexta*, *J. Neurosc. Methods* 69:103-112.
- Pastor, A., A. Chvatal, E. Sykova, and H. Kettenmann (1995) Glycine- and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord., *Eur. J. Neurosci.*, 7:1188-1198.
- Rufer, M., S. B. Wirth, A. Hofer, R. Dermietzel, A. Pastor, H. Kettenmann and K. Unsicker (1996) Regulation of connexin-43, GFAP, and FGF-2 is not accompanied by changes in astroglial coupling in MPTP-lesioned, FGF-2-treated Parkinsonian mice, *J. Neurosci. Res.*, 46:606-617.
- Schmidt, C., C. Ohlemeyer, C. Labrakakis, T. Walter, H. Kettenmann and J. Schnitzer (1997) Analysis of motile oligodendrocyte precursor cells *in vitro* and in brain slices, *Glia*, 20: 284-298.

- Verkhatsky A., and H. Kettenmann (1996) Calcium signalling in glial cells, Trends Neurosci., 346-351.
- Verkhatsky, A., R. K. Orkand and H. Kettenmann (1997) Glial Ca^{2+} : homeostasis and signaling function, Physiol. Rev., im Druck.
- Zahn, J. v., Möller, T. , Kettenmann H.. and Nolte, C.(1997) Microglial phagocytosis is modulated by pro- and anti-inflammatory cytokines, NeuroReport 8: 3851-3856.

B.2 (entfällt)

**B.3 Regina Reszka, Friedrich Weber & Wolfgang Walther,
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-
Buch: Veränderungen von Zell-Zell-Wechselwirkungen
glialer Tumore in vitro und in vivo nach retroviralem und
liposomalem Zytokingentransfer**

B.3.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangs-
fragen

Zum Zeitpunkt der Erstantragstellung gab es nur wenige in vitro Untersuchungen, die die Effekte der Mitogen- bzw. Zytokinstimulierung von Astrozyten, Mikroglia und Glioblastomen beschrieben (Banati et al. 1993, Streit 1993, Frei 1993). Es konnte vor allem eine erhöhte Expression von MHC-II Antigen sowie einiger Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden. Die Effekte von Zytokin-sezernierenden Glioblastomzellen auf die sie umgebenden Zellen in vitro und in vivo waren weitgehend unbekannt. Wir definierten daher als unser Ziel, ein optimiertes nichtvirales Vektorsystem zum Transfer von Zytokingenen wie TNF α , IL-2 und IL-4 in humane und TNF α , IL-2 in Rattenglioblastom-Zellen zu entwickeln und die durch die Zytokine ausgelösten neurophysiologischen, immunologischen, tumortherapeutischen und toxischen Prozesse zu untersuchen. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

Ist das liposomale Vektorsystem in der Lage, eine ausreichende Menge an Zytokingen in die Zelle einzuschleußen, wird das Fremdgenprodukt in gewünschter Höhe exprimiert und welche Zytokinspiegel können erreicht werden?

Wird die Zielzelle in ihren biologischen Eigenschaften (Proliferationsverhalten, Zellmorphologie, Veränderungen in der Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinrezeptoren und anderen Oberflächenantigenen) beeinflusst?

Kann in vivo durch das sezernierte Zytokin bzw. die im weiteren induzierten Faktoren eine effiziente, gegen den Tumor gerichtete Immunstimulation induziert werden?

Welche toxischen Effekte werden durch das sezernierte bzw. die nachfolgend induzierten Zytokine und andere bisher unbekannte humorale Komponenten im ZNS verursacht?

B.3.2 Angewandte Methoden

Herstellung der Plasmid-DNA

Um die Zytokingeneprodukte in den Glioblastomzellen in gewünschter Höhe bzw. induzierbar exprimieren zu können, war die Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren notwendig. Im ersten Schritt wurden daher die cDNAs des humanen IL-2 (Taniguchi, Nature, 1983); des

humanen IL-4 (Yokota, 1986) und des humanen TNF- α (Sparmann et al., 1994) Gens in die Expressionsvektoren pcDNA3 (Invitrogen; Luk, Niederlande) und pMSG (Pharmacia, Uppsala, Schweden) kloniert.

Zur Klonierung der Vektorkonstrukte wurde eine chemische Transformationsmethode (Chung et al., 1989) für In-Gel-Klonierungen (Struhl 1985) optimiert. Diese Verbesserung des ursprünglichen Protokolls (Groth et al., 1996) reduziert und vereinfacht die notwendigen Arbeitsschritte erheblich.

Nach der Transformation der Plasmide in E.coli wurden diese amplifiziert. Der Aufschluß der Bakterien erfolgte mit Hilfe der alkalischen Lyse-Methode, (Sambrook et al., 1989) und die DNA wurde mit Hilfe von Qiagen-Ionenaustauschersäulen QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) chromatografisch aufgereinigt.

Herstellung der Liposomen

Die für den Transfer der DNA verwendeten kationischen Liposomen wurden mit Hilfe der Trockenfilm-Methode hergestellt (Felgner et al., 1987). Man löst im ersten Schritt die kationischen Lipide gemeinsam mit einem neutralen Helferlipid [Dioleoyl-phosphatidylethanolamine (DOPE) oder Cholesterol (Chol)] in Trichlormethan und entfernt anschließend das Lösungsmittel durch Verdampfen (Evaporation). Nach Zugabe von deionisiertem Wasser zum trockenen Lipidfilm werden die Liposomen durch Schütteln (vortexen) gebildet. Die Liposomenbildung läßt sich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und durch die Messung der Lichtstreuung kontrollieren.

Transfektion von Tumorzellen in vitro

Für die Transfektion von Glioblastomzellen in der Zellkultur wurden diese in Zellkulturschalen kultiviert und bei Erreichen einer etwa 50% konfluenten Kultur transfiziert.

Die Bildung der Liposomen/DNA-Komplexe (Lipoplexe) findet in serumfreiem Medium oder isotonischer NaCl-Lösung statt. Dazu werden Liposomen und DNA getrennt in serumfreiem Medium bzw. isotonischer NaCl Lösung verdünnt und anschließend gemischt. Nach Abschluß der Lipoplexbildung (15 min bis 1 h) können die Komplexe auf die Zellen gegeben werden. Nach einer Transfektionszeit von (3-16 h) kann ein kompletter Mediumwechsel oder die Zugabe von frischem Medium mit höherer Serumkonzentration erfolgen. Bei transienter Transfektion der Plasmid-DNA-Komplexe erfolgt nach 24-68 h die Analyse der Genexpression. Um stabile Klone zu generieren werden die Zellen nach 48 h umgesetzt und mit Hilfe des Antibiotikums, das für das Selektionsmarkergen im Vektor kodiert, über mehrere Wochen selektioniert.

Messung der Genexpression nach liposomalem Gentransfer

Die Messung der Genexpression nach Transfer des Markergens LacZ erfolgt mit Hilfe eines neu entwickelten colorimetrischen Testes, der sowohl die Bestimmung der Transferrate als auch die Toxizität gestattet (Groth et al., 1997c). Nach Transfektion von Zytokingenen wird die Konzentration des Genproduktes mit Hilfe der kommerziell erhältlichen ELISAs (Laboserv GmbH Diagnostica, Staufenberg Deutschland) bestimmt.

Lipoplexapplikation in vivo

In einem in vivo-Glioblastom-Modell wurden 4×10^4 Rattenglioblastomzellen (F98) stereotaktisch in die rechte frontale Hemisphäre von adulten Fischer-Ratten implantiert (Zhu et al., 1996b).

Sieben Tage nach Implantation wurden die Lipoplexe entweder einmalig appliziert oder über einen längeren Zeitraum mit Hilfe einer miniosmotischen Pumpe [Alzet, (Charles River, Kißlegg, Deutschland)] über 3-7 Tage kontinuierlich gegeben. 21 Tage nach Genapplikation wurden die Ratten abgetötet, die Hirne nach Perfusion entnommen und anschließend immunhistochemisch aufgearbeitet.

Immunhistochemie

Die Kryo-Hirnschnitte ($7\mu\text{m}$) wurden mit Hilfe der alkalischen Phosphatase-anti-alkalischen Phosphatase-Methode (APAAP) und folgenden Antikörpern - anti-CD4, anti-CD8, anti-Ratte RT1A, Ox-18, anti-Ratte RT1B, His19, Maus anti-Human $\text{TNF}\alpha$, MAb1, anti-Maus/Ratte Bax, (PharmMingen, Hamburg, Deutschland) - auf die Expression von CD4, DC8 MHC I, MHC II, Bax und $\text{hTNF}\alpha$ untersucht. (Die Schnitte wurden mit Hemalaun gegengefärbt.)

Kokultur von Rattenmikroglia und Rattenglioblastomzellen

Um den Einfluß von Zytokin-sezernierenden Tumorzellen auf die „Makrophagen“ des Rattenhirns untersuchen zu können, wurden Kokulturrexperimente mit Mikrogliazellen und stabil transfizierten F98-Zellen durchgeführt. Für diese Versuche wurden Mikrogliazellen aus dem Hirn neugeborener Ratten präpariert und gemeinsam mit Zytokin-sezernierenden (humane) F98 kultiviert. Dabei läßt sich die Gesamtzellvitalität mit Hilfe des MTT-Testes (Mosmann, 1983) erfassen. In einem weiteren Ansatz wurden sowohl die Expression des Markergens LacZ durch vorher transfizierte Rattenglioblastomzellen als auch die Zellvitalität mit Hilfe des sauren Phosphatasetestes (Groth et al., 1997c) untersucht.

Um die Membran-Wechselwirkungen von Mikrogliazellen und Zytokin-sezernierenden F98-Zellen bestimmen zu können, waren Transferexperimente mit dem Fluoreszenzmarker, DiIC16 (Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon USA) notwendig.

B.3.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

Vektorkonstruktion

Die bisher klonierten Expressionsvektoren sind als Übersicht in Tabelle 1 zusammengefaßt. Für die in vitro Versuche wurden bisher hauptsächlich Konstrukte mit dem Vektorgrundgerüst pcDNA3 und Vektoren mit viralen Promotoren [Sparmann et al., 1994 - pWGH $\text{TNF}\alpha$; pLIL2-SN, freundlicherweise von W. Uckert (MDC, Berlin-Buch) zur Verfügung gestellt] verwendet.

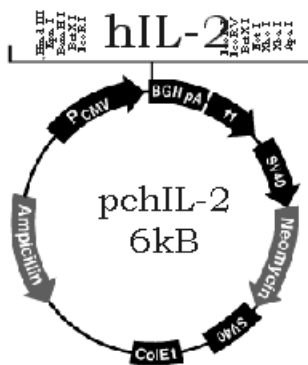
Die Fremdgen-Expression wird im pcDNA3 Vektor durch einen Cytomegalo-Virus (CMV)-Promotor reguliert. Dies ermöglicht eine hohe konstitutive Expression des Fremdgen-Produktes in einer großen Anzahl eukaryontischer Zellen. Ein Beispiel für einen Zytokingen-Expressionsvektor mit diesem Grundgerüst ist in Abbildung 1 dargestellt.

Konstrukte, die auf das pMSG-Vektorgrundgerüst aufbauen, besitzen einen Maus-Mammatumorigen-Virus (MMTV)-gesteuerten Promotor. Die Expression dieser Gene kann durch Zugabe von Dexamethason induziert werden (Lee, F. et al., 1981; Salmons and Günzburg, 1986). In ersten Untersuchungen wurde eine Dexamethason-Konzentration von 10^{-6} M als optimal für die Expression des Fremdgen-Produktes ermittelt (Sparmann et al., 1994). Weiterhin befinden sich z.Z. Vektoren in der Konstruktion, die über radiosensitive Promotoren verfügen. Durch Bestrahlung der Zellen soll eine hohe transiente Expression des Geneproduktes erreicht werden.

Tabelle 1: Übersicht der bisher verfügbaren Expressionsvektor-Systeme
 + vorhanden; o geplante; - nicht vorhandene Konstrukte

Gen	Promotor			
	CMV	MMTV	Egr-1	MMLV
hIL-2	+	+	-	+
hIL-4	+	o	o	-
hTNF- α	+	+	+	-
rTNF- α	o	o	o	-
lacZ	+	o	o	-
eGFP	+			-

Abbildung. 1: Karte des Expressionsvektors pchIL-2. Modifizierte Version des Vektors von Invitrogen (Luk, Niederlande).



Optimierung der Gentransferliposomen

Eine wesentliche Voraussetzung für die therapeutische Anwendung von Genen ist ein effizientes Transfersystem. Die bisher vorwiegend eingesetzten viralen Methoden weisen erhebliche Sicherheitsprobleme auf und verursachen hohe Herstellungskosten. Ziel unserer Untersuchungen war daher die Präparation und Charakterisierung von kationischen Liposomen, die als synthetische Vektorsysteme leicht und kostengünstig herstellbar sind und keine besonderen Sicherheitsvoraussetzungen erfüllen müssen. Diese kationischen Liposomen wurden auf ihre Transfereigenschaften untersucht. Zu Beginn unserer Arbeiten erzielten wir mit diesen Systemen auf humanen und Ratten-Glioblastomzellen nur eine Transfereffizienz von ~2% (Reszka et al., 1995). Nach einer umfassenden Optimierung der folgenden Parameter wie:

- Verhältnis von kationischem Lipid zu neutralem Helferlipid;
- Liposomen/DNA Verhältnis;
- Menge an Lipid und DNA für einen optimalen Gentransfer,
- Einfluß des Mediums auf die Komplexbildung (Groth et al., 1997b) konnten in vitro Transferraten von über 50 % an der Rattenzelllinie F98 wie auch der humanen Zelllinie N64 erzielt werden (Groth et al., 1997a, Zhu et al., 1996b). Eine der dabei entwickelten liposomalen Formulierungen (DAC-30TM) wird zur Zeit für in vitro Anwendungen durch Eurogentec (Seraing, Belgien) vertrieben. Desweiteren werden in Zusammenarbeit mit Prof. Schneider (Wuppertal) neuartige kationische Lipide entwickelt, die sich ebenfalls durch eine geringe Toxizität, gute Bioabbaubarkeit und hohe Transfereffizienz auszeichnen (Schneider et al., 1996; Groth et al., 1997b). Zur Zeit werden diese Lipide auf ihre Eignung als Bestandteil von Gentransfer-Systemen in vivo (Rattenmodell) untersucht. Die in vivo Anwendung der Lipid/DNA-Komplexe (Lipoplexe) erfolgt u.a. durch die von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Pumpapplikation. Nach Suizidgen-Transfer und anschließender Ganciclovir-Behandlung der Glioblastome konnten hierbei teilweise vollständige Tumorregressionen bei der Ratte erreicht werden (Zhu et al., 1996a). Vergleichende Untersuchungen zur Transfereffizienz der Lipoplexe an verschiedenen Tumorzelllinien und Primärisolaten aus Patienten, die uns von Frau Dr. Eifert (Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden, war festzustellen, das die Transferraten offensichtlich mit dem Grad der Malignität zunehmen (Abbildung 2).

In einer klinischen Studie (BMBF - Somatische Gentherapie) sollen weitere von unserer Gruppe entwickelte liposomale Formulierungen, (DAC-60 und DAC-40) zum Suizidgentransfer mittels miniosmotischer Pumpen am Menschen angewandt werden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß diese Formulierungen bei 37 °C mehrere Tage lang stabil bleiben und in vitro Zellen ebensogut wie frisch hergestellte Komplexe transfizieren (Reszka et al., in Vorbereitung).

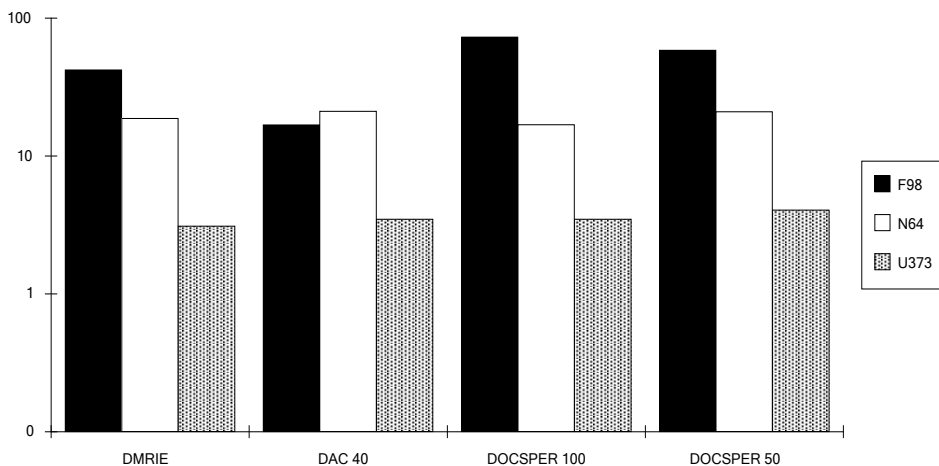


Abbildung 2: Vergleich der BG-Expression von 4 verschiedenen liposomalen Formulierungen getestet auf 3 verschiedenen Glioblastom-Zelllinien.

Etwa 20.000 Tumorzellen (F98 - Ratte; N64 und U373 - human) per well einer 96-Schale wurden mit Lipoplexten aus: 2, 1, 0.5 und 0.25 μ g DNA und 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 und 0.3 μ g Lipid transfiziert und nach 48 h wurde die BG-Expression bestimmt (Methode nach Groth et al., 1997c). Gezeigt wird hier die maximale BG-Expression je cm^2 .

Expression von Zytokinen nach liposomalem Gentransfer, Wachstum der Zellen in der Zellkultur und Veränderungen in der Oberflächenausstattung

Ziel dieser Untersuchungen war die Detektion der sekretierten Zytokinmenge nach liposomalem Gentransfer. Dazu wurde die Zytokinexpression von transfizierten und selektionierten F98-Zellklonen mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs bestimmt. Die von den Zellen sezernierten Zytokinmengen betragen zwischen 1-5 ng/ml/24h.

Desweiteren wurde das Proliferationsverhalten von F98-Zellen nach Transfektion von hIL-4, hIL-2 und hTNF- α mit Hilfe des MTT- und des sauren Phosphatase-Testes bestimmt. Bei Zellklonen, die „stabil“ transfiziert waren, konnte nur im Fall des hTNF- α eine Hemmung des Wachstums festgestellt werden (Reszka et al., 1995; Reszka et al., in Vorbereitung).

In der kommenden Antragsperiode sollen die Versuche auf Ratten-TNF und Ratten-IL-1 sezernierende Glioblastomzellen ausgedehnt werden.

Desweiteren sollen sich FACS-Analysen zur Untersuchung der Veränderungen von Rezeptor bzw. Adhäsionsmolekül-Ausstattung nach Zytokintransfer anschließen. Zur Identifikation der transfizierten Zellen wird ein eGFP-Vektorkonstrukt kotransfiziert.

Wechselwirkungen zwischen Mikroglia und F98-Zellen nach liposomalem Zytokingentransfer

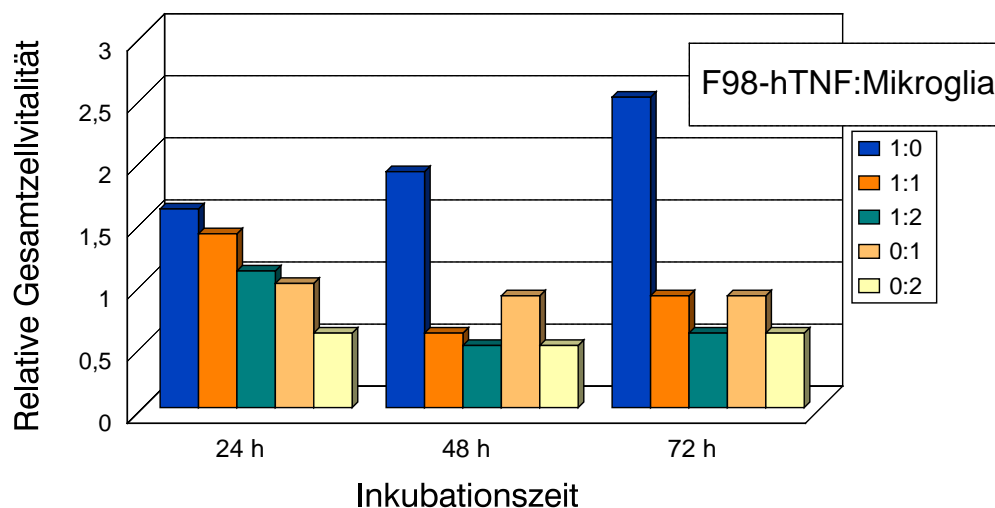
Bei der Kokultur von Mikrogliazellen mit Zytokinen-transfizierten F98-Zellen konnte mit Hilfe der Videomikroskopie eine erhöhte Motilität der Mikroglia und ein Ablösen der Tumorzellen im Falle von F98-hTNF- α -Zellen nachgewiesen werden (Reszka et al. in Vorbereitung). In einem Parallelversuch wurde der Transfer des Fluoreszenzfarbstoffs DiIC16, mit dem vorher die Membran von Mikrogliazellen markiert worden war, auf F98-Zellen beobach-

tet. Dieser Effekt scheint abhängig von der Farbstoffkonzentration und unabhängig von der Zytokinexpression zu sein. Weitere Untersuchungen sind hier zur Klärung geplant.

Um die Einwirkung der Mikrogliazellen auf die F98-Zellen näher zu charakterisieren, wurde desweiteren in Kokulturrexperimenten die Gesamtzellvitalität mittels MTT-Test (Moosmann, 1983) und mit Hilfe eines neuartigen Ansatzes (Groth et al., 1997c) ebenfalls die Expression eines Markerenzymes durch die F98-Zellen als Maß für die Zellvitalität bestimmt. Dabei konnte eine starke Hemmung der Markerexpression und eine Verringerung der Gesamtzellvitalität bei Kokultur von F98-hTNF- α und Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Abb. 4). Geplant ist nun die Untersuchung von Rattenmikroglia und Ratten-TNF- α -sezernierenden F98-Zellen.

Die in den Mikrogliazellen ablaufenden molekularen Prozesse, die zur Beeinflussung der Mikrogliazellaktivität führen, sollen im weiteren in Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Kettenmann untersucht werden (Hanisch - Genaktivierung, Hartmann - Elektrophysiologie)

Abbildung 4. Mikroglia-Glioblastomzell-Wechselwirkungen (in vitro)



Wirkungen im Tier

Im Tierexperiment wurde das Wachstum von F98-Zellen mit dem Wachstum von hTNF- α - und hIL-2-sezernierenden F98-Zellen verglichen. Dabei wurde ein Anwachsen der Zytokin-transfizierten F98-Zellen und ein im Vergleich zu F98-Zellen langsames Wachstum beobachtet. Weiterhin zeigte sich ein Immunisierungseffekt bei Gabe bestrahlter F98-hTNF- α -Zellen. So bildete sich bei anschließender Gabe von F98-Zellen nur bei einem von fünf Tieren ein Tumor - im Gegensatz zur Kontrolle, die mit bestrahlten F98-Zellen immunisiert wurde. Dort entwickelten alle Tiere einen Tumor (Zhu et al. 1996b). Weiterhin wurde eine verstärkte Expression von ICAM-1, MHC-I und MHC-II an der Oberfläche der IL-2- und TNF- α -sezernierenden Glioblastomzellen in vivo beobachtet (Zhang et al., 1997). Diese Steigerung der Expression von immunologisch relevanten Oberflächenmarkern konnte im Tiermodell bereits bei einmaliger Genapplikation beobachtet werden (Tabelle 2).

Tabelle 2:

Immunhistochemie von Hirnschnitten im Tumorgebiet der Ratte nach Applikation von F98-Zellen

Zelllinie	CD4	CD8	MHC I	MHC II
F98 (2 Tiere)	-	-	-	+
F98-hIL-2 (5 Tiere)	-	+	+	++
F98-hTNF- α (2 Tiere)	-	-	++	+

B.3.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

In den letzten Jahren wurde mehrfach versucht, unterschiedliche Zytokingene in menschliche Hirntumore zu transfizieren, um die therapeutische Relevanz der sekretierten Zytokine zu erfassen (Ram et al., 1994; Tjuvajew et al., 1995, Sobol et al.1995). Hierbei kamen retrovirale Vektoren mit nicht immer optimalen Virustitern zur Anwendung, die zwangsläufig zu einer geringeren Zytokinexpressionen führten.

Die Anwendung von Doppelexpressionsvektoren, die neben einem Zytokin- auch ein Suizidgen enthalten, sind zukünftig interessante Systeme. Desweiteren ist der Transfer anderer Gene, die z.B. die gezielte Sekretion von Chemokinen ermöglichen, und damit das Anlocken von immunkompetenten Zellen durch Expression von Erkennungsstrukturen an der Zelloberfläche fördern, ein denkbarer Forschungsansatz.

Die von uns für den Gentransfer entwickelten kationischen Liposomen erwiesen sich auch bei eine Vielzahl von normalen und Tumorzellen als geeignete Gentransfervehikel. Daraus ergaben sich für unsere Arbeitsgruppe eine Reihe interessanter Kooperationsmöglichkeiten. Unter anderem mit der Gruppe von Prof. Schneider (Wuppertal) zur Synthese verschiedener Lipide. Hier wird das Ziel verfolgt, die Transfereigenschaften kationischer Liposomen und die Bioverträglichkeit weiter zu erhöhen. Zur Zeit bestehen enge Kooperationen mit der Gruppe Neurobiologie von Prof. Kettenmann - Expression von GABA-Rezeptoren an Gliomzellen, Oberarzt Dr. Pleyer von der Augenklinik der Charité - Gentransfer in Corneaendothelzellen und mit Dr. Nikol vom Klinikum Großhadern, München - Gentransfer in glatte Muskelzellen zur Therapie der Restenose nach Gefäßdilationen.

B.3.5 Offene Fragen

Die im Verlauf der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werfen naturgemäß eine Reihe weiterer Fragen auf. So wurden in unseren bisherigen Versuchen ausschließlich humane Zytokingene verwendet. Da wir seit kurzem über das TNF- α - und das IL-1-Gen der Ratte verfügen (Dr. Scholz, Inst. für Zell und Mol. Biol. Schering AG, Berlin) wird es interessant sein nachzuweisen, ob die mit humanem TNF gewonnenen Ergebnisse reproduziert werden können oder ob

Spezies-spezifische Unterschiede in der Zytokinwirkung auftreten. Weiterhin haben wir vergleichende Kokultorexperimente von Zytokin-sezernierenden F98-Zellen mit Astrozyten und anschließend mit Mikroglia in Zusammenarbeit mit Dr. Nolte, Dr. Hartmann, Dr. Kirchhoff und Dr. Hanisch aus der Arbeitsgruppe Neurobiologie/MDC geplant, um die zellulären Prozesse der in den immunkompetenten Zellen des Hirns ablaufenden Prozesse besser verstehen zu können.

B.3.6 Literatur

- Banati R; Gehrman J; Schuber P; Kreutzberg GW (1993). Cytotoxicity of Microglia. *GLIA* 7: 11-118
- Chung-CT; Niemela-SL; Miller-RH (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 86: 2172-5.
- Felgner-PL; Gadek-TR; Holm-M; Roman-R; Chan-HW; Wenz-M; Northrop-JP; Ringold-GM; Danielsen-M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 84: 7413-7
- Frei K. (1993) Microglia and tumour rejection. In *Microglia Sonderausgabe von Glia 7(1)*: Herausgegeben von M.B. Graeber, G.W. Kreutzberg und W.J. Streit.
- Gunzburg-WH; Salmons-B (1986). Mouse mammary tumor virus mediated transfer and expression of neomycin resistance to infected cultured cells. *Virology.* 155: 236-48.
- Lee-F; Mulligan-R; Berg-P; Ringold-G (1981). Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimaeric plasmids. *Nature.* 294: 228-32.
- Mosmann-T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J-Immunol-Methods.* 65: 55-63
- Sparmann-G; Walther-W; Gunzburg-WH; Uckert-W; Salmons-B. (1994). Conditional expression of human TNF-alpha: a system for inducible cytotoxicity. *Int-J-Cancer.* 59: 103-7
- Ram-Z; Walbridge-S; Heiss-JD; Culver-KW; Blaese-RM; Oldfield-E (1994). In vivo transfer of the human interleukin-2 gene: negative tumoricidal results in experimental brain tumors. *J-Neurosurg.* 80: 535-4
- Streit WJ. (1993) Cellular immune response in brain tumours. In *Microglia Sonderausgabe von Glia 7(1)*: Herausgegeben von M.B. Graeber, G.W. Kreutzberg und W.J. Streit
- Struhl K (1985). A rapid method for creating recombinant DNA molecules. *Biotechniques* 3: 452-453.
- Tjuvajev-J; Gansbacher-B; Desai-R; Beattie-B; Kaplitt-M; Matei-C; Koutcher-J; Gilboa-E; Blasberg-R (1995) RG-2 glioma growth attenuation and severe brain edema caused by local production of interleukin-2 and interferon-gamma. *Cancer-Res.* 55: 1902-10
- Taniguchi-T; Matsui-H; Fujita-T; Takaoka-C; Kashima-N; Yoshimoto-R; Hamuro-J (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature.* 1983 302: 305-10.

Yokota-T; Otsuka-T; Mosmann-T; Banchereau-J; DeFrance-T; Blanchard-D; De-Vries-JE; Lee-F; Arai-K (1986). Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 83: 5894-8

Liste derjenigen Veröffentlichungen der Mitarbeiter des SFB, die in den vergangenen 3 Jahren erschienen sind, also 1995/96/97.

Groth-D; Reszka-R; Schenk-JA (1996). Polyethylene glycol-mediated transformation of *Escherichia coli* is increased by room temperature incubation. *Anal-Biochem.* 240: 302-304

Groth D, Keil O, Lehmann C, Zhu JH, Zhang L, Schneider M and Reszka R (1997a). Cationic lipid-mediated gene transfer of cytokine and marker genes into rat and human glioblastoma cells. *J Mol Med* 75, B30.

Schneider M, Keil O, Reszka R and Groth D (1996). Newly cationic amphiphiles for gene transfer. German patent application Nr. 19631 189.6.

Zhang L, Zhu JH, v Eckardstein K and Reszka R (1997). Altered expression of adhesion molecules on brain glioma cells after TNF- α gene transfer in vitro and in vivo. *J Mol Med* 75: B40.

Zhu-J; Zhang-L; Hanisch-UK; Felgner-PL; Reszka-R (1996a). A continuous intracerebral gene delivery system for in vivo liposome-mediated gene therapy. *Gene-Ther.* 3: 472-6

Zhu J, Zhang L and Reszka R (1996b). Liposome mediated delivery of genes and oligonucleotides for the treatment of brain tumors. In *Targeting of Drugs 5: Strategies for Oligonucleotide and Gene Delivery in Therapy*.

R. Reszka, J.H: Zhu, F. Weber, W. Walther, R. Greferath, S. Dyballa (1995) Liposome mediated transfer of marker and cytokine genes into rat and human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *J. Liposome Research* 5 (1):149-167

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug Teilprojekt:

R. Reszka, J.H: Zhu, F. Weber, W. Walther, R. Greferath, S. Dyballa (1995) Liposome mediated transfer of marker and cytokine genes into rat and human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *J. Liposome Research* 5 (1):149-167

J. Zhu, L. Zhang, U.-K. Hanisch, P.L. Felgner, R. Reszka (1996) A continuous intracerebral gene delivery system for in vivo liposome-mediated gene therapy. *Gene Therapy* 3: 472-476

D. Groth, R. Reszka, J.A. Schenk (1996) Polyethylene glycol-mediated transformation of *Escherichia coli* is increased by room temperature incubation. *Analytical Biochemistry* 240:302-304

D. Groth, O. Keil, C. Lehmann, M. Schneider, M. Rudolph, R. Reszka (1997) Preparation and characterisation of a new lipospermine for gene delivery into various cell lines. *International Journal of Pharmaceutics* - accepted

D. Groth, O. Keil, M. Schneider, R. Reszka (1997) Transfection assay for dual determination of toxicity and gene expression. *Anal. Biochemistry*.- submitted

Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (noch nicht oben aufgeführt):

U. Dirnagl, U. Lindauer, A. Them, St. Schreiber, H-W. Pfister, U. Koedel, R. Reszka, D. Freyer, A. Villringer (1995) Global cerebral ischemia in the rat: Online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* 15:929-940

R.F. Haseloff, S. Zöllner, R. Reszka, R. Bernhardt, I.A. Grigorev, I.A. Kirilyuk, K. Mertsch, B. Roloff, I.E. Blasig (1997) Application of nitronyl nitroxids for the detection of free radicals generated by endothelial cells. *Free Radical Research* 26:7-17

Sonstige eigene Originalarbeiten:

I. Fichtner, R. Reszka, S. R. Goan, H. Naundorf, M. Hentschel (1995) Pharmacological effects of carboplatin-liposomes (CPL) in mice a review of present knowledge. *J. Liposome Research* 5 (1):75-89

I. Fichtner, R. Reszka, S.R. Goan, H. Naundorf (1995) Carboplatin-liposomes (CPL) in immunodeficient mice: improved antitumor activity for breast carcinomas and stimulation of hematopoiesis. *Medical Oncology* 11 (3/4):111-119

H. Naundorf, W. Zschiesche, R. Reszka, I. Fichtner (1995) Influence of liposomes rich in unsaturated or saturated fatty acids on the growth of human xenotransplanted mammary carcinomas and on the levels of heart type fatty acid binding protein. *in vivo* 9:247-252

J. Wagner, H. Madry, R. Reszka (1995) In vivo gene transfer: focus on the kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 10:1801-1807

M.R. Wenk, A. Fahr, R. Reszka, J. Seelig (1996) Taxol partitioning into lipid bilayers. *J. Pharmaceutical Science* 85:228-231

S. Päuser, S. Wagner, M. Lippmann, U. Pohlen, R. Reszka, K.J. Wolf, G. Berger (1996) Evaluation of efficient chemoembolization mixtures by magnetic resonance imaging therapy monitoring: An experimental study on the VX2 tumor in the rabbit liver. *Cancer Res.* 56:1863-1867

R. Reszka, A. du Bois, H.J. Lück, Th. Bauknecht, V. Möbus, I. Berger, H. Bochtler, H.-G. Meerpohl (1996) Clinical pharmacokinetics of paclitaxel and carboplatin in combination therapy. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 37:182

R. Reszka, P. Beck, I. Fichtner, M. Hentschel, J. Richter, J. Kreuter (1997) Body distribution of free, liposomal and nanoparticle-associated mitoxantrone in B16-melanoma-bearing mice. *J. Pharmac. Exp. Therapeutics* 280:232-237

- S. Päuser, R. Reszka, S. Wagner, K.-J. Wolf, H.-J. Buhr, G. Berger (1997) Liposome-encapsulated superparamagnetic iron oxide particles as markers in an MRI-guided search for tumor-specific drug carriers. *Anti-Cancer Drug Design* 12:125-135
- S. Päuser, R. Reszka, S. Wagner, K.-J. Wolf, H.J. Buhr, G. Berger (1997) Superparamagnetic iron oxide particles as marker Substance for searching tumorspecific liposomes with magnetic t:RR98MoTh - submitted
- M. Brandl, C. Tardi, M. Drechsler, D. Bachmann, R. Reszka, K.H. Bauer, R. Schubert (1997) Three-dimensional liposome networks: freeze fracture electron microscopical evaluation of their structure and in vitro analysis of release of hydrophilic markers. *Advanced Drug Delivery Reviews* (in press)

Buchbeiträge:

- J. Zhu, L. Zhang, R. Reszka. Liposome-mediated delivery of genes and oligonucleotides for the treatment of brain tumors. In: *Targeting of drugs: Strategies for oligonucleide and gene delivery in therapy* / ed. by G. Gregoriadis and McCormak, Plenum Press, New York, 1996, pp 169-187
- Zschesche, W., Naundorf, H., Reszka, R., Saul, G.J., Fichtner, I. Effects of liposomes with defined fatty acid composition on xenotransplanted human mammary carcinomas. In: *Immunodeficient Animals: Models for Cancer Research* / ed. by Arnold, W., Köpf-Maier, P., Micheel, B. - Karger, Basel, 1996, pp 138-141 (Contributions to Oncology; 51)
- R. Reszka, I. Fichtner, S.R. Goan, M. Rudolph, R. Winter. Encapsulation of the transition metal compounds carboplatin (CP) and lobaplatin (LP) in different types of liposomes and their physico-chemical, biochemical and biological characterization. In: *Bioinorganic Chemistry, Kap. B.3*, VCH-Verlag, Weinheim, 1997 (in press)

B.3.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs:

Christiane Nolte, Uwe Hanisch, Jana Hartmann, Frank Kirchhoff, Helmut Kettenmann; MDC Ulrich Dirnagl; Neurologische Klinik der Charité

B.4 Rosemarie Grantyn, Physiologisches Institut der Humboldt-Universität, Berlin: Funktionelle Eigenschaften und manipulierte Differenzierung von Retinoblastomzellen

B.4.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

Wir haben im Rahmen des SFB-Projekts an 3 Themen gearbeitet: 1) Ca^{2+} -Signale in retinalen Ganglionzellen während der Entwicklung, 2) Differenzierung und Reifung von retinalen Ganglienzellen *in vivo*, und 3) *In vitro*-Differenzierung von Tumorzellen retinalen Ursprungs. Insgesamt ging es darum, am Tiermodell (Maus und Ratte) die wesentlichen Etappen der Entwicklung retinaler Ganglienzellen (RGZ) zwischen letzter Mitose und Synapsenbildung in den Zielgebieten des N. Opticus zu erfassen, um dann gezielt einige Mechanismen der normalen Netzhautentwicklung an einem Tumorzellmodell (Y-79-Zellen) zu testen. Die Aufgaben im einzelnen ergaben sich aus den bis 1994 verfügbaren Informationen über die Besonderheiten der zellulären Differenzierung in der Netzhaut und die damaligen Hypothesen über die Möglichkeiten der manipulierten Differenzierung von Tumorzellen retinalen Ursprungs, wie sie im Antrag dargelegt wurden. Die wichtigsten Annahmen waren:

- 1) Im Unterschied zu anderen Regionen des ZNS (Großhirnrinde) sind die Vorläuferzellen der Netzhaut pluripotent, d. h. aus ihnen können unter der Kontrolle einer Reihe diffundibler und membranständiger Faktoren Rezeptorzellen (Stäbchen, Zapfen), Interneurone (Horizontal-, Bipolar-, Amakrinzellen, AZ), Projektionsneurone (RGZ) und Gliazellen (Müllerzellen) hervorgehen. Neurotrophine (BDNF, NT3), bFGF, extrazelluläre Matrixproteine (Laminin), Adhäsionsmoleküle (N-CAM), aber auch Neurotransmitter (GABA, Glu) werden als differenzierende Faktoren diskutiert.
- 2) Die Entwicklung der primären Sehbahn (Migration, Myelinisierung, synaptische Konnektivität, rezeptive Feldeigenschaften) ist aktivitätsabhängig, wobei intrazelluläre Ca^{2+} -Signale eine bedeutende Rolle spielen. Die Ca^{2+} -permeablen Ionenkanäle und intrazellulären Signalkaskaden sind der Schlüssel zur Aufklärung der normalen Differenzierungsabläufe.
- 3) Die von pluripotenten Vorläuferzellen ausgehenden Retinoblastomzellen könnten durch Wahl geeigneter Wachstumsbedingungen in die Differenzierung gezwungen werden und verlieren dadurch ihre Malignität.

Diese Annahmen mußten nicht korrigiert werden, allerdings hat sich sehr bald herausgestellt, daß wir unser eigentliches Ziel, von der normalen ZNS-Entwicklung die Tools für die manipulierte Differenzierung von Tumorzellen quasi zu übernehmen, zunächst zurückstellen müssen. Die Komplexität des Gegenstands übersteigt bei weitem unsere Ressourcen. Wir haben deshalb versucht und sind noch dabei, unsere experimentellen Strategien auf vergleichsweise überschaubare Themen zu lenken, wie sie oben unter 1-3 genannt sind. Das wichtigste Ergebnis ist in den unten mit ** bezeichneten Arbeiten dargestellt.

B.4.2 Angewandte Methoden

Unsere Strategie bestand darin, die Entwicklung der RGZ zunächst *in situ*, d. h. nach *in vivo* Entwicklung zu untersuchen und dann ausgewählte Aspekte der neuronalen Entwicklung und Synapsenentwicklung unter Zellkulturbedingungen zu testen. Wenn der umgekehrte Weg beschritten wurde, sind entsprechende Kontrollen an retinalen Zellen *in situ* gemacht worden, soweit das technisch möglich war.

Das von B. Rörig entwickelte und von Bähring, Rothe, Jüttner und Pastor verbesserte retinale 'whole-mount' Präparat ist ein sehr robustes Testobjekt und inzwischen ein im Labor gut etabliertes Modell für Entwicklungsstudien zwischen E13 und P28. International ist dieses Modell trotz des generell großen Interesses an der Netzhaut noch wenig erschlossen, was uns im Moment einen gewissen Vorsprung sichert. Wir untersuchen neben passiven Leitfähigkeiten, ligandaktivierten Ionenströmen auch synaptische Interaktionen in der Ganglionzellschicht. Außerdem testen wir das repetitive Entladungsverhalten und markieren einzelne Neurone mit intrazellulären Tracern.

In jeder einzelnen Zelle wurden somatischer Eingangswiderstand und Ganzzellkapazität bestimmt. Letztere ermöglichte die gewichtete Darstellung der Stromamplituden als Stromdichten in der Entwicklung. Die synaptische Aktivität wurde anhand der spontanen EPSCs und IPSCs beurteilt, wobei davon ausgegangen wurde, daß eine synaptische Spontanaktivität auch vor der strukturellen Differenzierung der entsprechenden Terminalien auftreten kann. Zur Analyse der pharmakologischen Eigenschaften der ligandenaktivierten Kanäle wurde ein relativ schnelles Mehrkanalsuperfusionssystem benutzt, mit dessen Hilfe Dosiswirkungskurven aufgenommen und Agonist-Antagonist-Interaktionen getestet wurden. Da in der Ganglionzellschicht der postnatalen Ratte und Maus etwa 50 % der Neurone Interneurone sind (vor

allem GABAerge Displaced Amacrine), haben wir einige Kontrollexperimente an retrograd markierten Netzhäuten nach Injektion von Granular Blue in den Colliculus superior durchgeführt, um den RGZ-Phänotyp auch aus elektrophysiologischer Sicht zweifelsfrei definieren zu können (Abb. 1).

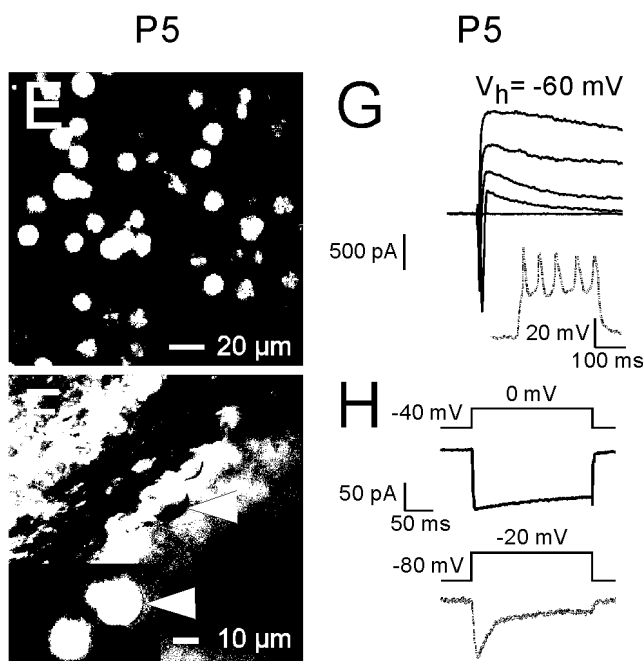


Abb. 1:
Patch Clamp-Ableitung (G, H) und Lucifer Yellow-Markierung (F) nach retrograder Markierung von retinalen Ganglionzellen der postnatalen Maus mit dem fluoreszierenden Farbstoff Granular Blue (E)

Unsere Kulturmodelle wurden vor allem für Tests an RGZ und AZ entwickelt (Rothe et al. 1994; Taschenberger und Grantyn 1995, Pronchouk et al., 1998). Für diese dissoziierten Kulturen wurde die Netzhaut von postnatalen (P4-6) Mäusen oder Ratten dissoziiert. RGZ und AZ wurden durch vitale Immunfärbung mit Antikörpern gegen Thy-1.1/Thy1.2 oder 3BA8 identifiziert. Die Charakterisierung des 3BA8 Epitops erfolgte z. T. ebenfalls im Rahmen dieses Projekts durch Immunfärbungen retinaler Schnitte und Kulturen, sowie Patch-Clamp-Ableitungen von immungefärbten Zellen. Die von Thy-1-positiven oder 3BA8-positiven Zellen gebildeten Synapsen wurden mit der Paar-Patch-Clamp-Methode untersucht.

Eine Serie von FURA-Experimenten beschreibt basale Mechanismen des Ca^{2+} -Signalling an RGZ, wobei vor allem die Regulation von Ca^{2+} -permeablen Glutamatrezeptoren (GluR) durch Neurotrophine interessiert (Jüttner, Niermann & Grantyn, in Vorbereitung).

Die Differenzierung von Retinoblastomzellen wurde an der menschlichen Zelllinie Y-79 untersucht (Offermann & Grantyn, study in progress), wobei im wesentlichen immunhistochemische Methoden zur Anwendung kamen (BRDU-labelling, Immunfärbung mit Antikörpern gegen Ca-bindende Proteine und zelltypspezifische Marker).

B.4.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

Zu 1) Ca^{2+} -Signale in retinalen Ganglionzellen während der Entwicklung

Die Eigenschaften spannungsaktivierter Ca^{2+} -Ströme retinaler Ganglionzellen wurden im Detail untersucht, einschließlich ihrer biophysikalischen Parameter, der kanalspezifischen Pharmakologie, ihrer Modulation durch Glutamat-Rezeptorliganden und Wachstumsfaktoren (Taschenberger, Grantyn, 1995a,b; Taschenberger, Grantyn, 1998; Rothe et al., 1998). Auf Grund einer Reihe von Besonderheiten nehmen wir die Existenz eines speziellen (R-type) Ca^{2+} -Kanals an retinalen Ganglionzellen an. Dieser auch ω -AgaTx-resistente Kanal wird, ebenso wie der ω -CgTX-sensitive Ca^{2+} -Kanal, entwicklungsabhängig exprimiert, was sich auch im repetitiven Entladungsverhalten der RGZ widerspiegelt. Dieser HVA-Kanal scheint eine essentielle Rolle in der Aktivierung des Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Stroms zu spielen. Dieser ist für die Aufrechterhaltung der repetitiven Entladung wichtig.

In vitro untersucht wurden jeweils an den Tagen DIV0-3 und DIV10-13 die Fraktionen der pharmakologisch separierten Anteile am Ca^{2+} -Gesamtstrom und die Empfindlichkeit der repetitiven Entladung im Current-Clamp gegenüber Ca^{2+} -Antagonisten. Diese Versuche zeigten, daß die ω -CgTX-sensitive Ca^{2+} -Komponente an jungen RGN (DIV0-3) signifikant größer ist und auch einen Beitrag zur Regulation der repetitiven Entladung der Ganglionzellen leistet. Dagegen dominiert in älteren Ganglionzellen (DIV10-13) die 'all-resistant' Komponente des Ca^{2+} -Stroms, und die Applikation von ω -CgTX hat wenig Effekt auf die Entladungsrate der Ganglionzellen. Unsere Versuche, eine Modulation von retinalen Ca^{2+} -Strömen durch Wachstumsfaktoren nachzuweisen, blieben an postnatalen RGN in Kultur bisher erfolglos. Dies betrifft BDNF, NT-3, bFGF, IGF und Insulin in saturierenden Konzentrationen. Eine

deutlich blockierende Wirkung von Insulin war lediglich auf den Zink-Anteil zurückzuführen. Dagegen war eine deutliche Reduktion des HVA Ca^{2+} -Stroms durch die bei einer Fraktion von RGZ hochgradig Ca^{2+} -permeablen Glutamatrezeptoren vom AMPA-Kainat-Typ zu beobachten (Taschenberger und Grantyn, 1998).

Die von uns an verschiedenen Tiermodellen durchgeführte detaillierte Analyse der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ströme zeigte, daß undifferenzierte Vorläuferzellen in der Ganglionzellschicht von E15 Mäusen vorwiegend LVA-Ströme generieren. Diese nahmen im Verlauf der *in vivo* Entwicklung signifikant ab (Stromdichtemessungen), während die HVA-Ströme deutlich zunahmten (s. Rothe et al., 1998). Interessant war in diesem Zusammenhang, daß den Ganglionzellen zu jedem Zeitpunkt ihrer Entwicklung zwischen Neurogenese und Synaptogenese ein jeweils spezifisches Repertoire an Ca^{2+} -leitenden Ionenkanälen für das Ca^{2+} -Signalling zur Verfügung steht.

Das von Grantyn et al. etablierte Zellkulturmodell und die im Labor eingeführte Technik zur vitalen Identifikation von RGZ und amakrinen Neuronen der postnatalen Netzhaut wurden darüberhinaus benutzt, präsynaptische Aspekte der Entwicklung glutamaterger Synapsen in der Netzhaut zu untersuchen. H. Taschenberger färbte retinale Ganglionzellen der Ratte mit einem mAB gegen Thy1.1, um in den gemischten retinalen Kulturen die selten vertretenen (<1%) Ganglionzellen zu selektieren. Die in Paar-Patch-Clamp-Experimenten induzierte postsynaptische Antwort diente als Indikator für den freigesetzten Transmitter und bildete die Grundlage für die weiterführende Analyse der pharmakologischen Eigenschaften des Glutamatfreisetzungprozesses (Taschenberger, Grantyn, 1995a,b 1998). Auf diese Weise wurde gezeigt, daß die Glutamatfreisetzung im wesentlichen von den ω -CgTX- und toxinresistenten Ca^{2+} -Kanälen kontrolliert wird.

Amakrine Neuronen der Netzhaut können ebenfalls durch vitale Markierung identifiziert werden, u. a. durch einen Antikörper gegen das Epitop 3BA8 (Pronchuk et al. 1996). Ein Teil dieser Zellen ist schwach Thy-1-positiv. Vermutlich handelt es sich dabei um displazierte Amakrine in der Ganglionzellschicht. Diese Neuronen sind GABAerg, wobei sich in der Paar-Patch-Clamp-Ableitung zeigt, daß sich die Pharmakologie der Transmitterfreisetzung offenbar nicht wesentlich von den Ganglionzellen unterscheidet.

Zu 2) Differenzierung und Reifung von retinalen Ganglionzellen *in vivo*

Die neuronale Differenzierung wird gewöhnlich anhand von Veränderungen in der Zellstruktur oder -position beurteilt oder auch aufgrund der Expression einzelner Markermoleküle. Bei retinalen Ganglionzellen schien es sinnvoll, auch das repetitive Entladungsverhalten von Neuronen als Differenzierungsparameter anzusehen, da angenommen wird, daß in der Netzhaut nur Ganglionzellen in der Lage sind, auf eine anhaltende Depolarisation mit kontinuierlicher Entladung zu antworten (s. Diskussion in Rothe et al., 1998 a,b).

Unsere Untersuchungen bieten eine erste Beschreibung der entwicklungsbedingten Veränderungen in den passiven und aktiven Membraneigenschaften von RGZ in Bl6 Mäusen, der Entwicklung des repetitiven Entladungsverhaltens und einer Reihe von spannungsaktivierten Ionenkanälen. Diese Parameter wurden auch an BDNF-defizienten transgenen Mäusen untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt unserer Arbeit war die Untersuchung von Transmitterrezeptoren und Synapsen im Laufe der Entwicklung. Wie im Projektantrag vorgesehen, konzentrierten wir uns auf Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle, intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher, Ca^{2+} -

abhängige Transmitterfreisetzungprozesse sowie die Ca^{2+} -Abhängigkeit im Zelltod oder Überleben der RGZ. Es war jedoch notwendig, darüberhinaus Informationen über andere Ionenkanäle und Rezeptoren zu sammeln.

Unsere Strategie bestand darin, die Entwicklung der RGZ zunächst *in situ*, d. h. nach *in vivo* Entwicklung zu untersuchen und dann ausgewählte Aspekte der neuronalen Entwicklung und Synapsenentwicklung unter Zellkulturbedingungen zu testen. Bei Beschreiten des umgekehrten Weges wurden Kontrollen am Präparat der isolierten Netzhaut durchgeführt.

Im Verlauf der Entwicklung zwischen E15 und P5 erreichen alle retinalen Ganglienzellen die Fähigkeit, auf eine direkte Depolarisation mit kontinuierlicher repetitiver Entladung zu antworten (Rothe et al., 1998). Interessanterweise besitzt schon zum Zeitpunkt E15 die Mehrzahl der Ganglienzellvorläufer die Fähigkeit, einzelne Aktionspotentiale (AP) zu generieren. Keine der Zellen in der inneren Netzhaut konnte jedoch mehr als ein Spike erzeugen. Im Unterschied dazu generierten am Tag P5 rund 80 % der RGZ Spike-Serien. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, daß nicht nur Veränderungen in der Dichte und in den Aktivierungseigenschaften eine Rolle spielen, sondern daß vor allem die zunehmende Expression des toxinresistenten HVA Ca^{2+} -Kanals und die vorwiegend von diesem Kanal getriggerte Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Leitfähigkeit für die repetitive Entladung notwendig ist.

An BDNF-defizienten transgenen Tieren ist die Entwicklung der repetitiven Entladung verzögert. An BDNF^{-/-}-Tieren war in allen getesteten Alterstufen (P2-P12) die Fraktion der repetitiv entladenden Ganglienzellen signifikant erniedrigt. Die RGZ der BDNF^{-/-} Tiere verhielten sich wie RGZ unter dem Einfluß eines Ca^{2+} -Kanalblockers, was auf die Unterexpression einer Ca^{2+} -aktivierten K-Leitfähigkeit als Grundlage dieses Defizits im repetitiven Entladungsverhalten der Nullmutanten hindeutet. Zum Ende der Untersuchungsperiode (bis P12) erlangte ein Teil der Zellen die Fähigkeit, multiple Spikes zu generieren. Auch hier war der Übergang von der Single-spike- zu der repetitiven Spike-Entladung mit Veränderungen in der Dichte und den Eigenschaften der Na^{+} -Kanäle und der Expression der Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Leitfähigkeiten korreliert. Dieser unerwartet subtile Defekt in der Funktion der RGZ geht interessanterweise einher mit einem Defizit in der Myelinisierung der RGZ-Axone. Neuronale Differenzierung in der Netzhaut (Cellerino et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist die von uns in der Periode der massiven Synaptogenese im Zielgebiet der RGZ beobachtete Verlust der Fähigkeit zur repetitiven Entladung ein wichtiges Indiz für einen Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und Myelinisierung.

Ein interessanter Aspekt der Entwicklung der RGZ ist, daß in den verschiedenen Phasen der Entwicklung zwischen Migration und Synaptogenese unterschiedliche Klassen von Ca^{2+} -Kanälen für den Ca^{2+} -Einstrom und die Ca^{2+} -Homöostase zur Verfügung stehen. Besonders interessant scheint in dieser Hinsicht ein Ca^{2+} -permeabler non-NMDA-type GluR (Taschenberger & Grantyn, 1998). Ableitungen von RGZ *in situ* haben gezeigt, daß zwischen E15 und P5 die Dichte der NMDA-Rezeptoren sinkt, während die Dichte der AMPA/Kainat-Rezeptoren vor allem nach der Geburt ansteigt. Die AMPA/Ka-Rezeptoren der RGZ erzeugen eine beträchtliche Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration, was jedoch in Gegenwart von BDNF sehr gut toleriert wird. Der Ca^{2+} -Einstrom durch AMPA-Kainat-Rezeptoren hat offenbar vier Funktionen: 1) Er vermittelt ein schnelles synaptisches Signal (Taschenberger, Grantyn,

(1995), 2) er aktiviert die Ca^{2+} -Freisetzung aus Koffein-sensitiven Ca^{2+} -Speichern (Jüttner, Niermann & Grantyn, in Vorbereitung), 3) er reguliert spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und 4) die Entladungsfrequenz der RGZ (Taschenberger & Grantyn, 1998). Weitere Funktionen sind denkbar, wurden aber noch nicht getestet. Es scheint jedoch sicher, daß entgegen einer ersten Annahme, eine Rolle in der Auslösung des regulierten Zelltods der RGZ unwahrscheinlich ist. Es ist außerdem zu bemerken, daß RGZ eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegenüber Ca^{2+} -abhängigen exzitotoxischen Einflüssen zeigten (Pronchouk et al., 1998).

Zu 3) *In vitro*-Differenzierung von Tumorzellen retinalen Ursprungs

Im Hinblick auf das o.g. Ziel wollten wir folgendes erreichen:

- 1.) Eine Strategie zur Differenzierung und Proliferationshemmung von RB-Zellen *in vitro* finden.
- 2.) Die Expression calciumbindender Proteine in undifferenzierten RB-Zellen bestimmen.
- 3.) Die Veränderungen der Expression calciumbindender Proteine nach induzierter Differenzierung charakterisieren.
- 4.) Den Phänotyp der RB-Zellen nach induzierter Differenzierung bestimmen.
- 5.) Die in RB-Zellen exprimierten Ionenkanäle vor und nach Differenzierung beschreiben.
- 6.) Die Expression der $\alpha 6$ -Untereinheit des Integrin-Rezeptors in RB-Zellen bestimmen.
- 7.) Die Differenzierung von RB-Zellen durch genetische Manipulation einleiten.
- 8.) Die transfizierten Zellen anhand ihrer Proliferationsrate und ihres Differenzierungsgrads charakterisieren.

Wir sind bis zu Punkt 4 gekommen. Pilotversuche zu den Punkten 6-7 waren bisher noch nicht erfolgreich. Deshalb entfällt Punkt 8.

Es ging also bisher in erster Linie darum, ein geeignetes Schema zur *in vitro*-Differenzierung der Y-79 Zellen zu erstellen, Differenzierungsparameter zu definieren und ein Proliferationsassay zu gestalten. Folgendes Differenzierungsschema hat sich als geeignet herausgestellt: Die Y-79 Zellen (bezogen von ATCC) werden zunächst in Suspensionskultur gehalten (RPMI 1640 Medium + 15 % FCS), dann dissoziiert und auf Poly-D-lysine und Laminin beschichtete Glascoverslips ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation mit serumhaltigem Medium erfolgt ein kompletter Mediumwechsel zu serumfreiem Medium mit N2-Supplement und Zugabe der jeweiligen Agentien, also Neurotrophine (BDNF 10-50 ng/ml, NGF 50 ng/ml, NT3 10 ng/ml), db-cAMP (4 mM) und Butyrat (4 mM). Die Behandlung der Zellen wird über 14 Tage fortgeführt, mit zweitägigem Mediowechsel.

Nach 7-14 Tagen werden die Kulturen für morphometrische und immunzytochemische Studien fixiert.

Die Wirkung der ausgewählten Substanzen wird auf der Basis folgender Parameter bestimmt: Proliferationsrate, Fraktion der differenzierten Zellen, Veränderungen in der Immunreaktivität für calciumbindende Proteine, neuronale und gliale Marker und zelltypspezifische Marker. Die Proliferationsrate wird mittels BrdU-labeling bestimmt.

Morphologische Kriterien der Differenzierung: undifferenzierte Zellen sind rund, haben keine Ausläufer, einen Zelldurchmesser von 10 - 15 μm ; differenzierte Zellen zeigen fusiform verlängerte Zellkörper, lange verzweigte Fortsätze oder auch eine flache Morphologie mit einigen zytoplasmatischen Protrusionen, ihr Durchmesser reicht von 15- 100 μm .

Die immunzytochemische Charakterisierung der Y-79 Zellen in Monolayerkultur gestaltete sich unerwartet schwierig, weil die das Gros der (undifferenzierten) Zellen sehr schlecht an-

heftet und nach Formaldehydfixierung eine ausgeprägte Autofluoreszenz in dem für Serotonin und Dopamin charakteristischen Bereich hat. Die calciumbindenden Proteine Parvalbumin, Calbindin und Calretinin konnten jedoch mit DAB als lichtmikroskopischem Substrat gut dargestellt werden. Als zelltypspezifische Marker sind Thy-1 (RGZ), 4 F3 (Müller-Zellen) und 3BA8 (AZ) vorgesehen. Die Antigenverteilung wurde jedoch an humanem Gewebe bisher nicht untersucht. Nachdem uns jetzt geklungen ist, humanes Gewebe unterschiedlichen Alters zum Austesten der Antikörper zu bekommen, werden wir im Februar an Schnitten der embryonalen Netzhaut überprüfen ob diese Antikörper die für die Ratten-, bzw. Mäusenetz- haut charakteristische Verteilung (Pronchouk et al., 1998) aufweist.

Abgesehen von diesen methodischen Entwicklungen konnten bisher folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- 1) Db-cAMP und Butyrat reduzieren die Proliferation von Y-79 Zellen in serumfreien Medium. Neurotrophine steigern die Proliferationsrate.
- 2) Zugabe von BDNF (50 ng/ml) erhöht den Anteil morphologisch differenzierter Zellen (bis zu 18 %). Dagegen bleiben in Gegenwart von db-cAMP die meisten Zellen undifferenziert, nur ca. 5 % bilden kurze Fortsätze aus. Butyrat ändert die Zellmorphologie kaum, die Zellen bleiben rund.
- 3) In undifferenziertem Zustand zeigen 70 % der Y-79 Zellen Immunoreaktivität für Calbindin, fast 100 % für Calretinin und über 90 % für Parvalbumin. Die durch Neurotrophine induzierte Differenzierung ist durch einen Verlust der Parvalbumin-Immunoreaktivität charakterisiert. Dagegen ändert sich die Calbindin- und Calretinin-Immunoreaktivität der Y-79 Zellen kaum.
- 4) Undifferenzierte Y-79 Zellen sind sowohl NF68 als auch GFAP-positiv. Die differenzierten Y-79 Zellen zeigen einen Verlust ihrer GFAP- Immunoreaktivität.

B.4.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftliche Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die von uns durchgeführten Arbeiten erschließen durchweg wissenschaftliches Neuland. Allerdings läuft die Publikation zu den Punkten 2 und 3 erst an. Die Arbeiten zu 1 finden bereits Anerkennung, werden entsprechend zitiert und in Current Opinions in Neurobiology durch 1, bzw. 2 Sterne (= 'Publication of outstanding interest') gewürdigt.

B.4.5 Offene Fragen

s. Abschnitt 3, zu Punkt 3)

B.4.6 Literatur

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug zum Teilprojekt

- PRONCHOUK, N., KORENBAUM, E. & GRANTYN R. (1998) Identification, functional characteristics and neurotrophin requirements of retinal amacrine cells in vivo and in vitro. *J. Neurobiol.*, in preparation (IF: 4.8)
- **ROTHE, R., BÄHRING, R., CARROLL, P., THOENEN, H.. & GRANTYN, R. (1998) Repetitive firing deficits during development of retinal ganglion cells in BDNF knock-out mice. *Development*, in preparation (IF: 9.2)
- **ROTHE, R., JÜTTNER, R., BÄHRING, R. & GRANTYN, R. (1998) Ion conductances related to development of repetitive firing in mouse retinal ganglion cells in situ *J.Neurosci.*, submitted (IF: 8.0)
- TASCHENBERGER, H. & GRANTYN, R. (1998). Interaction of calcium-permeable non-n-methyl-d-aspartate receptor channels with voltage-activated potassium and calcium currents in retinal ganglion cells in vitro. *Neurosci. in Press*, **IF: 3,9**
- TASCHENBERGER, H. & GRANTYN, R. (1995) Synaptic current kinetics in a solely AMPA-receptor-operated glutamatergic synapse formed by the rat retinal ganglion neurons, *J. Neurophysiol.* 74,1123-1136. **IF: 3.8**

Sonstige eigene Originalarbeiten

- JÜTTNER, R. & EBEL, H. (1998). Mg²⁺-transport in brush border membrane vesicles of rabbit ileum studied with mag-fura-2. *Biochim.Biophys.Acta* (In Press), **IF: 2,4**
- DAS, S., SASAKI, Y. F., ROTHE, T., TAKASU, M., CRANDALL, J. E., DIKES, P., CONNER, D. A., CHEN, H.-S. V., SUCHER, N. J., LIPTON, S. A.. & NAKANISHI, N. (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking a novel NMDAR subunit, NR3A. *submitted*
- ROTHE, T., CHEN, H.-S. V., SUCHER, N. J., DAS, S., NAKANISHI, N. & LIPTON, S. A. (1998) Developmentally regulated increase of NMDA currents in cerebral cortex of NR3A-deficient mice. *submitted*
- KIRISCHUK, S., VESELOVSKY, S.N. & GRANTYN, R. (1998) Evoked neurotransmission induced by electrical stimulation of a single CND bouton, *submitted*
- VESELOVSKY, N. S. & GRANTYN, R. (1998). Multiquantal transmitter release from single GABAergic boutons. *submitted*
- GRANTYN, R. & VESELOVSKY, N. S. (1997). Release capacity of single inhibitory synapses in collicular cultures. *HFSP Workshop Ser.* 4, 146-153.
- TASCHENBERGER, H. & GRANTYN, R. (1995) Several types of Ca²⁺ channels mediate glutamatergic synaptic responses to activation of single Thy-1-immunolabelled rat retinal ganglion neurons, *J. Neurosci.* 15,2240-2254.

- PAN, Z.-H., BÄHRING, R., GRANTYN, R. & LIPTON, S.A. (1995) Differential modulation of GABA- and glycine-evoked currents in rat retinal ganglion cells, *J. Neurosci.* 15, 1086-1093.
- GRANTYN, R., KRASZEWSKI, K., MELNICK, I., TASCHEBERGER, H., WARTON, S. (1995) In vitro development of vertebrate central synapses, *Persp. Dev. Neurobiol.* 2, 387-397.

Ausgewählte Abstracts

- JÜTTNER, R. & GRANTYN, R. (1997). Expression sequences of voltage-activated Ca^{2+} channels in retinal ganglion cells during pre- and postnatal development of the mouse retina. *Proc. 25th Göttingen Neurobiol. Conf.* **25**, 935(Abstract)
- OFFERMANN, N. & GRANTYN, R. (1997). Calcium-binding proteins in cultured human retinoblastoma cells before and after induced differentiation. *Proc. 25th Göttingen Neurobiol. Conf.* **25**, 936(Abstract)
- ROTHER, T., CHEN, H.-S. V., SUCHER, N. J., DAS, S., NAKANISHI, N. & LIPTON, S. A. (1997). Increased NMDA currents in cerebral cortex of NMDAR-L deficient mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* **23**, 948(Abstract)
- TASCHEBERGER, H. & GRANTYN, R. (1997). Modulation of voltage-gated K^+ - and Ca^{2+} -channels by activation of Ca^{2+} -permeable non-NMDA channels in retinal ganglion cells (RGGs). *Proc. 25th Göttingen Neurobiol. Conf.* **25**, 842(Abstract)

C Projektbereich C: Funktionen nicht-neuronaler Zellen bei degenerativen und regenerativen Prozessen im zentralen Nervensystem

C1

Robert Nitsch, Anatomisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin

Die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion

C2

Thomas Ohm, Anatomisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin

Expression und Regulation von Apolipoprotein E (ApoE) in Gliazellen nach experimenteller und neuropathologischer Läsion (M. Alzheimer)

C3

Claudia Eder & Uwe Heinemann, Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin

Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse

C4

Wolfgang Müller & Uwe Heinemann, Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin

Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration, freier Fettsäuren und des Glutathionspiegels in pathologisch veränderten und normalen Astrozyten

ZUSAMMENFASSENDE BERICHT DES PROJEKTBEREICHES

Die Projekte des Bereiches C hatten die Beschreibung der Beteiligung von nicht-neuronalen Zellen, im Besonderen von Mikrogliazellen und Astrozyten bei neurodegenerativen Veränderungen zum Gegenstand. Hierbei wurden gliale Reaktionen nach experimentellen Läsionen, die Prozessierung von Lipoproteinen und β -Amyloid in Astrozyten, sowie die funktionelle Bedeutung astroglialer und mikroglialer Antworten im Rahmen von Epilepsiemodellen sowie die intrazelluläre Signalverarbeitung in Astrozyten eines Tiermodells des Downsyndroms untersucht. Gemeinsamer Focus dieser Untersuchungen lag auf der Betonung der Untersuchung von langandauernden neurodegenerativen Veränderungen und der Analyse des entsprechenden Zeitablaufes solcher chronischen Reaktionen.

Im Projekt C1 (Nitsch) wurde untersucht, welche Typen von Gliazellen am Phagozytoseprozeß im Verlaufe anterograder Degeneration nach Läsion beteiligt sind und wie der Zeitablauf dieser Beteiligung sich darstellte. Hierbei gelang es in vivo zu zeigen, daß nicht nur Mikrogliazellen, sondern nachgeschaltet auch Astrozyten an solchen Abbauprozessen anterograde degenerierender Axone beteiligt sind. Interessanterweise scheinen Mikrogliazellen in einem Zeitrahmen von 20 Tagen nach Läsion vollständig aus dem Läsionsgebiet ausgewandert, bzw. untergegangen zu sein, wohingegen Astrozyten noch nach langen Überlebenszeiten degeneriertes Material enthalten. Weiterhin wurde die Frage geklärt, welche morphologischen Veränderungen durch diese Phagozytoseprozesse bewirkt werden und ob diese Prozesse zur Expres-

sion immunologisch relevanter Moleküle beitragen. Die mikrogliale Aktivierung, die sich morphologisch zunächst durch das Auftreten eines amoeboiden Phänotypes nachweisen läßt, ebenso wie fortsatzreiche Astrozyten, fanden sich selektiv in der Deafferenzierungszone. All diese morphologischen Veränderungen bildeten sich allerdings im Verlaufe der Reorganisationsprozesse nach Läsion zurück. Sie waren regelmäßig begleitet durch die Expression von Integrinen (LFA1 und VLA4) sowie von ICAM 1. Unser Ansatz erlaubte es nachzuweisen, daß sich diese Expression insbesondere auf denjenigen Mikrogliazellen vorfand, die tatsächlich am Phagozytoseprozeß beteiligt sind. Desweiteren wurde der Frage nachgegangen, welche Mechanismen für die Aktivierung und die Expression von solchen Molekülen verantwortlich sein könnten. Hierbei wurde unter Einsatz der Mikroglia-Einzelzell-Kultur die Rolle von proinflammatorischen Zytokinen als Stimulatoren, aber auch von Antioxidantien wie dem Vitamin E und Vitamin C als protektive Faktoren beschrieben. Um eine Brücke zwischen unseren in vivo-Untersuchungen und den Studien an Einzelzellkulturen zu schlagen, wurde die organotypische Slicekultur zur Analyse von Gliazellaktivierung und Deaktivierung eingesetzt. Wir konnten nachweisen, daß sich in der Mittelzone eines solchen ex vivo Präparates tatsächlich auch hinsichtlich Gliazellen organotypische Verhältnisse nach etwa einer Woche in Kultur einstellen. Dieses Modell konnte nun hinsichtlich seines Expressionsmusters von immunologisch relevanten Molekülen untersucht werden und der Effekt von Schädigungen wie etwa NMDA Läsionen und Schnittläsionen des Tractus perforans studiert werden. Es ist gelungen, die Vergleichbarkeit dieser Prozesse zu bekannten in vivo Daten nachzuweisen. Auf der Basis dieser Daten sollen nun im weiteren Projektverlauf die experimentellen Möglichkeiten der organotypischen Slice-Kultur zur Untersuchung von Gliazellen nach neuronaler Schädigung ausgebaut werden.

Im Rahmen der Untersuchungen des Projektes C2 (Ohm) kann gezeigt werden, daß bei alters- und geschlechtsentsprechenden Fällen, der Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphismus sowohl in klinischen als auch in prä-klinischen Stadien (Braak-Klassifizierung) beide histologischen Hauptkennzeichen, β /A4-Amyloid-Ablagerung und Tau-Pathologie, beeinflusst. Das ApoE4-Allele verlegt den Beginn der Erkrankung um bis zu fast zwei Dekaden von (ApoE2-Allel < β 3-Allel < E4-Allel), wobei der Verlauf selbst nicht beeinflusst wird. Es konnte von uns - in Kooperation mit der AG W. Müller, TP C4 - erstmals gezeigt werden, daß Apo E einen Calciumkanal aktivieren kann. Initial ist dafür externes Calcium nötig. Vermutlich spielen die klassischen Bindungsstellen und/oder Apo/E-Rezeptoren bei der Kanalaktivierung keine Rolle, da Kompletions- und Hemmexperimente mit Lactoferrin aktiviertem alpha-2-Macroglobulin, LDL und Heparinase/Natriumchlorat keinen Effekt zeigten - was bei Beteiligung der Rezeptoren bzw. ihrer Bindungsstellen zu erwarten wäre. Der beteiligte Calciumkanal konnte als spannungsabhängiger P-Typ-artiger Kanal identifiziert werden. Die beobachtete transiente Erhöhung des freien intrazellulären Calciums ist durch Apo-E-Isoformen unterschiedlich stark: ApoE2 < ApoE3 < ApoE4. Sie kann durch β /A4-Amyloid verstärkt werden. β /A4-Amyloid, wobei 12 verschiedene Fragmente getestet wurden, kann die frei verfügbare Menge von in Astrozyten gebildetem Apo-E massiv unterdrücken. Insbesondere die als neurotoxisch bekannten Fragmente (1-38mer und länger sowie das 25-35mer Fragment) reduzieren dosis- und zeitabhängig und nahezu zu 100 % die mittels Apo-E-Elisa meßbare Apo-E-Menge im konditionierten medium. Diese Fragmente führen auch zu einer verstärkten Expression von S100 β und GFAP und Ramifizierung der Astrozyten. Ein analoges Bild ist bei Aktivierung cAMP-abhängiger Signalwege zu sehen, und ist umgekehrt gehemmt durch Gabe von Phorbolestern, bekannten Aktivatoren der PKC-assoziierten Signaltransduktionswege.

Im Projekt C3 (Eder/Heinemann) wurden zunächst die Reaktionen von Mikrogliazellen auf epileptische Aktivität und ihre Beteiligung an anfallsinduzierten Zellschäden zu studiert und das Verhalten von Mikrogliazellen in vitro und Zellverluste während und nach epileptischer Aktivität untersucht. Unter Nutzung verschiedener Kultivierungs-Techniken konnte anhand von patch-clamp-Messungen gezeigt werden, daß Mikrogliazellen in unterschiedlichen funktionellen Stadien oder mit morphologisch differentem Phänotypus unterschiedliche Ionenströme exprimieren. Alle an den Mikrogliazellen identifizierten Ionenströme wurden hinsichtlich ihrer kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften detailliert charakterisiert, so daß die Eigenschaften von Mikrogliazellen in epileptischen Geweben mit den bisher erhobenen Befunden verglichen und mögliche Veränderungen sowie deren Mechanismen detektiert werden können. Anfallsinduzierte und zytotoxische Zellverluste sowie deren mögliche Mechanismen wurden an akuten Hirnschnittpräparaten, Hirnschnittkulturen (Hippokampus-Entorhinaler Kortex) und dissoziierten Zellkulturen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß Status epilepticus-ähnliche Aktivität akuten und verzögerten Nervenzell-Verlust, verzögertes Absterben von Gliazellen (Vakuolisierung, Granulation astrozytärer Fortsätze, Zelltod) sowie verzögertes Erscheinen phagozytischer amöboider Zellen in von Zelltod betroffenen Regionen induziert. Aus diesen Befunden ergeben sich mehrere Strategien zum Schutz vor anfallsbedingten Läsionen, deren Testung zugleich eine Differenzierung der am Zellverlust beteiligten glialen und neuronalen Mechanismen gestattet. Der Übergang vom pharmakosensitiven zum pharmakoresistenten Status epilepticus ist mit einem Verlust der Effizienz verschiedener GABAerger Substanzen verbunden. Pharmakologische Untersuchungen am Hirnschnittpräparat zeigten, daß gliale GABA-Aufnahmehemmer die pharmakoresistente Aktivität unterbrechen, während der neuronale Aufnahme-Hemmer Tiagabin wirkungslos bleibt. Diese Befunde erhöhen die Wahrscheinlichkeit, daß eine Verschiebung von GABA aus dem neuronalen in den glialen Pool am Übergang zur pharmakoresistenten Aktivität beteiligt ist. Die Eigenschaften von Astrozyten im sklerotischen und nichtsklerotischen Hippokampus wurden in bezug auf deren Barium-sensitive räumliche Kaliumpufferungsfunktion untersucht. Die Befunde deuten darauf hin, daß die Fähigkeit zur Aufnahme und räumliche Umverteilung von Kaliumionen durch Gliazellen in epileptischem Gewebe beeinträchtigt ist.

Im Projekt C4 (Müller/Heinemann) konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung intrazellulärer Kalziumspiegel in Abhängigkeit des zugrundeliegenden Mechanismus, z.B. Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Fettsäureradikalen führt. Ein Überwiegen reaktiver Radikale gegenüber intrinsischen Scavenger-Substanzen wie dem Glutathion (GSH) soll ganz wesentlich an Zellschädigungen sowohl an Nerven- als auch an Gliazellen beteiligt sein. Hinweise auf eine Beteiligung reaktiver Radikale gibt es bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, u.a. beim Down-Syndrom. In diploiden Astrozyten und Neuronen fanden wir eine durch subzelluläre Ca-Anstiege und mitochondriale Ca ($[Ca]_m$)-Aufnahme vermehrte Radikalenproduktion. Glutamatstimulation führt zu wesentlich längeranhaltenden $[Ca]_m$ -Signalen aufgrund Entleerung von Ca-Speichern als Depolarisation mit 60mM $[K]_o$. In Astrozyten des Trisomie-16 Mausmodells für das Down-Syndrom sind Ca-Ruhepegel sowie ATP-abhängige Ca-Speicherung bei Unterdrückung von Neurotransmitter-Effekten erhöht. In trisomen Neuronen sind Ca-Spiegel, evozierte Ca-Signale, mitochondriale Depolarisation infolge Ca-Aufnahme und oxydative Antworten erhöht. Dabei zeigt NAD(P)H einen initialen Abfall, dem trisome Zellen keine aktive Überkompensation entgegensetzen. Blockade der Komplexe I, III und IV der Atmungskette führen in den diploiden Kulturen zu einer deutlichen Hemmung der stimulierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den trisomen

Projektbereich C

Kulturen keine Hemmung durch Blockade des I. Komplexes, was auf eine Störung dieses Komplexes hinweist. Die Glutathion-Spiegel sind vermindert, können aber durch Cystein angehoben und damit Zelltod gehemmt werden. In diploiden Zellen fanden wir eine oxidative Unterdrückung des transienten K-Stroms spezifisch durch 1pM intrazelluläre oder 10^6 pM extrazelluläre Arachidonsäure ohne Beteiligung von Cyclooxygenase, Lipoxygenase oder Cytochrom P450. Eine Kopplung zu Sauerstoffradikalen ergibt sich über Glutathion. Durch den Effekt könnte es zu einer tödlichen Spirale über Ca- und Glutamatfreisetzung kommen. In Zusammenarbeit mit Thomas Ohm (C3) konnten wir zeigen, daß Apolipoprotein E isoform-spezifisch über einen P-Typ Ca-Kanal sowohl in Neuronen wie in Astrozyten Ca-Anstiege auslösen kann. Der isoform-spezifische Effekt korreliert mit der entsprechenden Häufigkeit des M. Alzheimer. Weitere Untersuchungen zeigen, daß Cholezystokinin in vielen Astrozyten deutliche Ca-Erhöhungen über CCK-B-Rezeptoren und intrazelluläre Freisetzung von Ca auslöst.

C.1 Robert Nitsch, Anatomisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion

C.1.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

C.1.1.1 Hintergrund

Umbauvorgänge nach neuronaler Schädigung betreffen nicht nur Nervenzellen, sondern finden unter Beteiligung von Gliazellen statt. Untersuchungen, die eine solche Hypothese stützen, zeigen etwa bei der *retrograden* Degeneration nach Axotomie eine Aktivierung von perineuronalen Gliazellen (Kreutzberg, 1968). Im vorgenannten Modell ist die Aktivierung von Gliazellen und deren Rolle bei postläsionalen Umbauvorgängen weitreichend untersucht. In der Literatur liegen vielfältige Daten zu morphologischen Veränderungen hippocampaler Neurone nach Läsion des entorhinalen Cortex vor (als Übersichtsarbeit siehe Steward, 1991). Diese beschreiben den Prozeß der *anterograden* Degeneration sowie das "sprouting" anderer Afferenzen in das freigewordene Terminationsgebiet des Tractus perforans. Hinzukommen Untersuchungen zu *transneuronalen* Veränderungen an *identifizierten* rezeptiven Strukturen im Gefolge einer solchen Deafferenzierung (Parnavelas et al., 1974; Caceres and Steward, 1983). Die Arbeiten beschrieben dabei eine transiente Abnahme der "spine"-Anzahl an Pyramiden- und Körnerzellen, morphologische Veränderungen dieser rezeptiver Strukturen sowie Veränderungen peripherer Körnerzellendriten in der Terminationszone des Tractus perforans, welche zeitgleich mit dem Verlauf des Einwachsens anderer Afferenzen ("sprouting") reversibel sind. Erst in jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, daß solche transneuronalen Veränderungen persistierende Umbauvorgänge darstellen, die auch zu einer bleibenden Veränderung der physiologischen Signalweiterleitung im Hippocampus führen. Es liegen nun zunehmend Hinweise vor, daß auch bei solchen *anterograden* und *transneuronalen* Veränderungen Gliazellen eine entscheidende Rolle zukommt (etwa Nieto-Sampedro et al., 1985; Steward et al., 1993).

Der entorhinale Cortex stellt 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 Zweidritteln des Stratum moleculare der Fascia dentata sowie im äußeren Stratum lacunosum-moleculare des Ammonshorns (Witter et al., 1989). Die synaptische Verschaltung findet an den peripheren Dendritenabschnitten dieser Neurone statt, die sich in das äußere Zweidrittel des Stratum moleculare bzw. das äußere Stratum lacunosum-moleculare erstrecken. Läsionen des Tractus perforans oder seiner Ursprungsneurone führen somit zu einer selektiven Deafferenzierung dendritischer Strukturen, da Nervenzellsomata und Axone nicht vom Tractus perforans erreicht werden.

Die zentrale Rolle der entorhinal-hippocampalen Interaktion bei neurodegenerativen Erkrankungen wird zunehmend in der internationalen Literatur realisiert (de Lacoste and White, 1993). Hierbei treten Veränderungen des neuronalen Zytoskelettes in den Vordergrund (Crut-

cher et al., 1993; Braak and Braak, 1993). Es gibt dabei neue Hinweise, daß Mechanismen der physiologischen Signalübertragung, etwa über den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, für zytoskelettäre Umbauvorgänge von großer Wichtigkeit sind (Mattson and Barger, 1993). Die Regulation von Calcium über dieses Transmittersystem, aber auch die intrazelluläre Calcium-Steuerung könnte dabei eine Verbindung schaffen zwischen zytoskelettären Umbauvorgängen und der Rolle von Wachstumsfaktoren und von "Amyloid Precursor Protein" (APP; siehe Mattson and Barger, 1993; Crutcher et al., 1993). Verschiedene Neurotrophine können den intrazellulären Calciumgehalt regulieren, sind zum Teil an der Steuerung der Expression von Calcium-bindenden Proteinen, bFGF darüber hinaus auch an der Expression des NMDA-Rezeptors beteiligt (Mattson and Barger, 1993). Umgekehrt liegen Hinweise vor, daß die NGF-Expression im entorhinal-hippocampalen System durch einen NMDA-Rezeptor abhängigen Prozeß gesteuert wird (Gwag et al., 1993). Entorhinale Deafferenzierung resultiert in einer sehr differenzierten Hochregulation von hippocampalen Wachstumsfaktoren (NGF, BDNF, bFGF, IGF, TGF-beta 1; (Kar et al., 1993; Lapchak et al., 1993; Morgan et al., 1993), die zum überwiegenden Teil von Gliazellen exprimiert werden. Hierbei zeigt sich, daß die gliale Expression von solchen Faktoren schichtenspezifisch vor sich geht, d.h., selektiv in der Deafferenzierungszone konzentriert ist. Auch das APP als Vorstufe des β -A4 Proteins, welches in den bei der Alzheimerschen Erkrankung auftretenden Plaques vorkommt und dem in jüngster Zeit neurotrophe und neurotrope Eigenschaften zugesprochen worden, wird von Gliazellen nach entorhinaler Deafferenzierung in der ehemaligen Terminationszone entorhinaler Fasern synthetisiert (Banati et al., 1993). Die Expression von APP scheint transmitterabhängig kontrolliert zu werden (Nitsch et al., 1992). Experimentelle Daten konnten zeigen, daß Antikörper gegen NGF hippocampales "Sprouting" nach entorhinaler Läsion verhindern können (van der Zee et al., 1992). Interessanterweise führen diese Läsionen zu einer selektiven Verminderung der Glucocorticoidrezeptor-Expression (nicht der Mineralocorticoidrezeptor-Expression) und die Gabe von Glucocorticoiden scheint postläsionales "sprouting" hemmen zu können (O'Donnell et al., 1993). Gonadale Steroide selber regulieren dabei die Expression von GFAP in hippocampalen Gliazellen, so daß Gliazellen sowohl als Effektoren als auch als Intermediärkomponenten spezifisch in den Prozeß des hippocampalen Umbaus eingreifen (Day et al., 1993).

Morphologisch liegen Daten für eine schichtenspezifische Aktivierung von Gliazellen in der Deafferenzierungszone sowohl für Astrozyten (Steward et al., 1993) als auch Mikrogliazellen vor (Gehrmann et al., 1991). Dabei ist bis jetzt im wesentlichen der zeitliche Zusammenhang mit axonalen Reorganisationsprozessen aufgezeigt worden.

Zitierte Literatur

- Banati RB, Gehrmann J, Czech C, Mönning U, Jones LL, König G, Beyreuther K, Kreutzberg GW (1993) Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer betaA4-amyloid precursor protein (APP) in activated Microglia. *Glia* 9:199-210.
- Braak H, Braak E (1993) Entorhinal-hippocampal interaction in mnestic disorders. *Hippocampus* 3:239-241.
- Caceres A, Steward O (1983) Dendritic reorganization in the denervated dentate gyrus of the rat following entorhinal cortex lesions: a Golgi and electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 214:387-403.

- Crutcher K, Anderton BH, Barger SW, Ohm TG, Snow AD (1993) Cellular and molecular pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus Special Issue*, 3:271-288.
- Day JR, Laping NJ, Lampert Etchells M, Brown SA, O'Callaghan JP, McNeill TH, Finch CE (1993) Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus. *Neuroscience* 55:435-443.
- de Lacoste MC, White CL (1993) The role of cortical connectivity in Alzheimer's disease pathogenesis: a review and model system. *Neurobiol Aging* 14:1-16.
- 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.
- Gwag BJ, Sessler FM, Waterhouse BD, Springer JE (1993) Regulation of nerve growth factor mRNA in the hippocampal formation effects of N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Exp Neurol* 121:160-171.
- Kar S, Baccichet A, Quirion R, Poirier J (1993) Entorhinal cortex lesion induces differential responses in [125I]insulin-like growth factor I, [125I]insulin-like growth factor II and [125I]insulin receptor binding sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 55:69-80.
- Kreutzberg GW (1968) Autoradiographic studies on perineuronal microgliaocytes. *Acta Neuropathol (Berl)* 4:141-145.
- Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F (1993) BDNF and trkB mRNA expression in the rat hippocampus following entorhinal cortex lesions. *Neuroreport* 2:191-194.
- Mattson MP, Barger SW (1993) Roles for calcium signalling in structural plasticity and pathology in the hippocampal system. *Hippocampus Special Issue*, 3:73-88.
- Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM, Finch CE (1993) TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp Neurol* 120:291-301.
- Nieto-Sampedro M, Saneto RP, De Vellis J, Cotman CW (1985) The control of glial populations in the brain: changes in astrocyte mitogenic and morphogenic factors in response to injury. *Brain Res* 343:320-328.
- Nitsch R, Bader S and Frotscher M (1992) Reorganization of input synapses of parabumin-containing neurons in the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Neuroscience Letters* 135:33-36
- O'Donnell D, Baccichet A, Seckl JR, Meaney MJ, Poirier J (1993) Entorhinal cortex lesions transiently alter glucocorticoid but not mineralocorticoid receptor gene expression in the rat hippocampus. *J Neurochem* 61:356-359.
- Parnavelas JG, Lynch G, Brecha N, Cotman CW, Globus A (1974) Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature* 248:71-73.
- 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.

- 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.

C.1.1.2 Eigene Vorarbeiten zum Vortrag

In der Arbeitsgruppe werden transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion *qualitativ* und *quantitativ* untersucht. Wir konnten zeigen, daß sich langandauernde transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion nicht nur - (bis zu 55 Tagen nach Läsion: Nitsch and Frotscher, 1991; in einer neuen Untersuchung auch bis zu 360 Tage nach Läsion: Nitsch, 1993) - bei der Ratte, sondern auch bei Primaten vorfinden. Dendritische Veränderungen wurden an Parvalbumin (PV)-immungefärbten Neuronen des African Green Monkey (*Cercocebus aetiops*) mittels eines Neuron Tracing Systems erhoben (Miehe et al., 1994). Diese Befunde sprechen dafür, daß sich die distalen Dendritensegmente permanent aus der ehemaligen Terminationszone des Tractus perforans zurückziehen und der Gesamtdendrit in seiner Arborisation rarefiziert ist. Die Anzahl PV-immunpositiver Zellen blieb hingegen unbeeinflusst, ebenso die dendritischen Parameter im nicht-deafferenzierten Hilus der Fascia dentata, was für einen läsionsspezifischen Effekt spricht. Diese Befunde sind daher von großer Bedeutung für das gesamte Forschungsprojekt zu transneuronalen Veränderungen, da es sich bei zunächst gemachten Beobachtungen bei der Ratte (Nitsch and Frotscher, 1991) auch im Primaten nachzuvollziehen sind. Transneuronalen Veränderungen im Hippocampus im Gefolge einer neurodegenerativen Schädigung des entorhinalen Cortex können somit in wichtigen Aspekten modellhaft an der Ratte studiert werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Nitsch and Frotscher, 1993) konnten nachweisen, daß es zu langanhaltenden Veränderungen des dendritischen Zytoskelettes kommt, besonders zum Auftreten von Invaginationen der Dendritenmembran. Gliazellfortsätze füllen diese Einbuchtungen auch noch sehr lange nach der Deafferenzierung aus (60 Tage). Unsere elektronenmikroskopische Untersuchungen legen es nahe, daß Gliazellen eine enge Assoziation auch mit dendritischen Umbauvorgängen eingehen und noch nach langen postläsionalen Überlebenszeiten in engem Membrankontakt mit dauerhaft veränderten hippocampalen Dendriten stehen (Nitsch and Frotscher, 1993, Diekmann et al. 1994). Diese Veränderungen bleiben auf die Deafferenzierungszone in der mittleren und äußeren Molekularschicht beschränkt. Interessanterweise kommt es zu einer schichtenspezifischen Überinnervation PV-immunreaktiver Dendriten in der vormaligen Terminationszone des Tractus perforans von 21% (Nitsch et al., 1992). Unserer Daten weisen dabei darauf hin, daß es nach Deafferenzierung zunächst zu einer Verbreiterung der postsynaptischen Membranspezialisation im Hippocampus verbliebener Afferenzen anderen Ursprungs kommt, die auf diese Weise die vorherige Terminationszone des Tractus perforans invadieren. Diese verbreiterten synaptischen Kontakte scheinen sich dann derartig aufzuteilen, daß nicht mehr eine verbreiterte Kontaktzone, sondern eine Zunahme an Terminalen für diese Überinnervation verantwortlich gemacht werden kann.

Durch perioperative Behandlung der Tiere mit dem NMDA-Rezeptor-antagonisten MK-801 konnten die transneuronalen Dendritenveränderungen zumindest in der Initialphase drastisch reduziert werden (Nitsch and Frotscher, 1992). Diese Befunde legen eine Beteiligung einer

pathologischen Glutamaterhöhung (Glutamat ist der physiologische Neurotransmitter im entorhinal-hippocampalen System) bei diesem Phänomen nahe.

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). Auch diese Ereignisse ließen sich durch MK-801 blocken. Aufgrund unserer Ergebnisse muß angenommen werden, daß partielle Deafferenzierung zur Aktivierung der Genexpression über einen NMDA-Rezeptor vermittelten Signalmechanismus führt und somit eine aktive Reaktion solcher deafferenzierter Zellen bewirkt. Inwieweit eine c-fos Expression und die beobachteten transneuronalen Umbauvorgänge auch kausal zusammenhängen, muß weiter geklärt werden.

Der Prozeß axonaler Reorganisation nach entorhinaler Läsion ist bisher nur mittels indirekter Methoden nachgewiesen worden (etwa Matthews et al., 1976a; b, siehe Steward, 1991. Unter Einsatz des anterograden Tracers Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (PHAL) konnten wir auf dem Niveau einzelner Fasern und ihrer ultrastrukturellen Kontakte zeigen, daß auch dieser Prozeß Gesetzmäßigkeiten der Schichtenspezifität unterliegt (Deller et al., 1994a; b). Hierbei kommt es zum spezifischen "sprouting" solcher commissuraler Fasern, die schon unter normalen Bedingungen in der Terminationszone des Tractus perforans liegen, nicht aber zum wirklichen Einwachsen anderer Afferenzen. Diese Schichtenspezifität der Umbauvorgänge scheint somit ein generelles Prinzip darzustellen, was die Vermutung nahelegt, daß spezifisch exprimierte Faktoren für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten. Gliazellen wären plausible Kandidaten als Produzenten dieser Faktoren. Zur Zeit werden stehen methodische Vorarbeiten kurz vor dem Abschluß, die Doppelfärbungen mit PHAL und immunzytochemischer und Lektin-histochemischer Darstellung von verschiedenen Gliazelltypen möglich machen.

Physiologische Untersuchungen zur Auswirkung entorhinaler Läsionen hinsichtlich der Signalweiterleitung von der Fascia dentata in die CA3 Region des Hippocampus haben zeigen können, daß es zu langanhaltenden (60 Tage nach Läsion) Veränderungen der Feldpotentiale der Körnerzellen kommt (Clussman et al., 1994). Diese Daten unserer extrazellulären Ableitungen am Hippocampusschnitt-Präparat können im Sinne einer Zunahme der Inhibition in der Fascia dentata nach Deafferenzierung gewertet werden.

Eigene Literaturbeiträge

- Clussman, H., Nitsch, R. and Heinemann, U. (1994) Long lasting functional alterations in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: A current source density analysis. *Neuroscience* 61:805-815.
- Deller, T., Nitsch, R. and Frotscher, M. (1994) Phaseolus-vulgaris-Leucoagglutinin (PHAL) tracing of commissural fibers to the rat fascia dentata: Evidence for a novel commissural projection to the outer molecular layer. *J. Comp. Neurol.* 350:612-622
- Miehe, U., Leranath, C., Ohm, T. G. and Nitsch, R. (1994) Long-lasting transneuronal dendritic changes of GABAergic neurons in the monkey dentate gyrus following entorhinal cortex lesion. *Neurosci. Lett.* 168:115-118.
- Nitsch, R. (1993) Transneuronal changes in the lesioned entorhinal-hippocampal system. *Hippocampus* 3, Special Issue: 247-256.

- Nitsch, R., Bader, S., and Frotscher, M. (1992) Reorganization of input synapses of parvalbumin-containing neurons in the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Neurosci. Lett.* 135:33-36.
- Nitsch, R. and Frotscher, M. (1991) Maintenance of peripheral dendrites of GABAergic neurons requires specific input. *Brain Res.* 554:304-307.
- Nitsch, R. and Frotscher, M. (1992) Reduction of posttraumatic transneuronal "early gene" activation and dendritic atrophy by the NMDA-receptor antagonist MK-801. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5197-5200.
- Nitsch, R. and Frotscher, M. (1993) Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin containing neurons in the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Hippocampus* 3:481-490.

C.1.1.3 Ausgangsfragen

Als Ausgangspunkt unserer Untersuchungen stand das Vorhaben, (I) im Läsionsexperiment und (II) am *in-vitro* System der entorhinalen-hippocampalen Komplexschnittkultur adoleszenter Ratten die Beteiligung von Gliazellen an den molekularen und zellulären Vorgängen zu analysieren, die im deafferenzierten Hippocampus stattfinden. Mit den geplanten Untersuchungen soll ein besseres Verständnis der den transneuronalen Veränderungen zugrundeliegenden Mechanismen geleistet und damit die mögliche Rolle solcher Veränderungen bei neuropathologischen Erkrankungen (Morbus Alzheimer) spezifiziert werden. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- a. Welche Typen von Gliazellen sind am Phagozytoseprozess bei *anterograder* Degeneration nach Läsion beteiligt?
- b. Wie ist der Zeitablauf dieser Beteiligung?
- c. Mit welchen morphologischen Veränderungen geht die Phagozytose einher?
- d. Führt dieser Prozeß zur Expression immunologisch relevanter Moleküle?
- e. Über welche Mechanismen ist die Aktivierung und die Expression von immunologisch relevanten Molekülen gesteuert und wie läßt sie sich beeinflussen?
- f. Läßt sich das Slicekulturmodell zur Analyse von Gliazellaktivierung und Deaktivierung einsetzen?
- g. Zeigen sich vergleichbare Expressionsmuster von immunologisch relevanten Molekülen wie *in vivo*?
- h. Wie verhalten sich Gliazellen nach experimenteller Schädigung im Slice?
 - nach NMDA-Läsion
 - nach Schnittläsion des Tractus perforans

C.1.2 Angewandte Methoden

Innerhalb des durchgeführten Projektes sind sowohl *in vivo* Untersuchungen unter Einsatz von Fluoreszenzstracern und der stereotaktischen entorhinalen Läsion als auch *in vivo* Untersuchungen an Einzellzellkulturen (Mikrogliazellen und Astrozyten) und der organotypischen Slicekultur durchgeführt worden. Zum Einsatz kamen immunzytochemische Methoden auf

licht-, konfokal- und elektronenmikroskopischem Niveau, die Durchflußzytometrie, die *in situ*-Hybridisierung und die PCR-Technik.

C.1.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

zu a.

Nachdem schon früh in unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen Hinweise vorlagen, daß auch unter den Bedingungen der anterograden Degeneration nicht nur Mikrogliazellen, sondern auch Astrozyten an der Phagozytose degenerierender Axone beteiligt sind (Zipp et al., 1989; Nitsch and Frotscher, 1993), konnten wir in einer elektronenmikroskopischen Studie an intrazellulär gefüllten Körnerzellen im fixierten Schnitt direkte Hinweise auf die Beteiligung zumindest von Mikrogliazellen auch an dendritischen Umbauvorgängen nach entorhinaler Läsion aufzeigen (Diekmann et al., 1996). Dabei weisen diese Daten nicht nur auf Phagozytose, sondern auf einen Zell-Zell-Kontakt von Dendriten und Mikrogliazellen im Sinne einer Zytoplasma-Zytoplasma-Interaktion hin. Diesem Phänomen soll in der nächsten Antragsperiode weiter nachgegangen werden (siehe unten). Durch die Etablierung einer Tracing-Technik, die *in vivo* die Charakterisierung solcher Gliazellen erlaubt, die sich nach der Läsion an der Phagozytose des anterograd degenerierenden Materials beteiligen (Bechmann and Nitsch, 1997a), konnten wir im Modell der entorhinalen Läsion zunächst die offene Frage klären, daß sowohl Mikrogliazellen als auch Astrozyten an diesem Prozeß beteiligt sind (Bechmann and Nitsch, 1997b).

zu b.

Wie aus anderen Untersuchungen bekannt, kommt es zunächst zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen innerhalb des ersten Tages nach Läsion. Diese zeigen aber noch nicht phagozytotische Aktivität, sind jedoch schon in die Deafferenzierungszone migriert. Etwa einen Tag später findet sich identifiziertes anterograd degeneriertes Material in solchen Mikrogliazellen. Einige Tage später findet sich solches Material auch in Astrozyten. Beide Zelltypen wurden mit spezifischen Markern identifiziert (MAC-1, Isolectin B4, OX42 für Mikrogliazellen, GFAP für Astrozyten) und sowohl licht- als auch konfokal- und elektronenmikroskopisch dargestellt (Bechmann and Nitsch, 1997b). Interessanterweise finden sich nach längeren Überlebenszeiten nach Läsion (> 20 Tage) ausschließlich Astrozyten, die noch das phagozytierte Material enthalten. Diese Daten legen entweder einen apoptotischen Untergang von Mikrogliazellen oder deren eigene Phagozytose durch Astrozyten nahe.

zu c.

Die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten zeigte die bekannten morphologischen Charakteristika. Amöboide Mikrogliazellen und fortsatzreiche Astrozyten fanden sich in der Deafferenzierungszone. Interessanterweise führte aber eine Phagozytose nicht zu einer bleibenden morphologisch faßbaren Aktivierung, sondern es fanden sich nach einigen Tagen nach Läsion wieder morphologisch ruhende Gliazellen, die degenerierendes Material phagozytiert hatten (Bechmann and Nitsch, 1997b). Elektronenmikroskopisch fanden sich enge und langstreckige Appositionen der Gliamembranen (zunächst von Mikrogliazellen, dann auch von Astrozyten) mit Dendriten, die in dieser Zone keine Synapsen mehr aufwiesen. Ein solches Phänomen ist dem "synaptic stripping" (siehe Stand der Forschung) zumindestens phänomenologisch sehr ähnlich.

zu d.

Wir konnten darüberhinaus zeigen, daß die postläsionale Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten mit einer Expression der Integrine LFA-1 und VLA-4 sowie des ICAM-1 auf aktivierten, in der äußeren Molekularschicht des deafferenzierten Gyrus dentatus akkumulierenden Mikrogliazellen einher geht. Damit sind offensichtlich die Voraussetzungen für eine effektive Interaktion der aktivierten Mikroglia-Zellen miteinander und mit der umgebenden Extrazellulärmatrix gegeben. In einem experimentellen Ansatz, der durch das Vormarkieren der äußeren Molekularschicht innervierenden Tractus perforans und die anschließende entorhinale Läsion die Identifizierung einzelner, phagozytischer Zellen erlaubt, konnte gezeigt werden, daß insbesondere diejenigen Mikroglia-Zellen, die den zerfallenden Tractus perforans phagozytieren, die genannten Adhäsionsmoleküle exprimieren (Hailer et al., 1997a).

zu e.

Mit Hilfe der Mikroglia-Einzelzellkultur war es möglich, erste Faktoren zu charakterisieren, die für morphologische Veränderungen und für die Induktion der Expression der Integrine LFA-1 und VLA-4 verantwortlich sind. Die Behandlung der Mikroglia-Einzelzellkulturen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 und TNF- α sowie mit IFN- γ resultierte im rapiden Verlust filigraner Zellfortsätze und einer Transformation zu einer amöboiden Morphologie. Durch durchflußzytometrische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß parallel zu diesen morphologischen Veränderungen die Expression der schon in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur charakterisierten Integrine induziert wurde. So führten das proinflammatorische Zytokin TNF- α und das Interferon- γ zu einer deutlichen Verstärkung der Expression von LFA-1, während IL-1 nicht als Induktor wirksam war. Lipopolysaccharid, ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien und in immunologischen Untersuchungen als unspezifischer Stimulus verwendet, erwies sich ebenfalls als sehr starker Induktor der LFA-1-Expression. Die Expression von VLA-4 lies sich durch alle genannten Zytokine und das LPS induzieren, wenn auch in wesentlich schwächerem Ausmaß. Mit der Gabe des Antioxidans Vitamin E konnte eine erhebliche Verbesserung der Kulturbedingungen erreicht werden, was sich in einem höheren Anteil ramifizierter Mikroglia-Zellen und in einer deutlich verbesserten Vitalität niederschlug (Heppner et al., eingereicht-a). Damit korrelierend fand sich unter dem Einfluß von Vitamin E eine reduzierte Basis-Expression der untersuchten Integrine und des ICAM-1 (Heppner et al., 1997).

zu f.

Eine Analyse der Morphologie von Mikrogliazellen und ihrer Expression von Adhäsionsmolekülen erbrachte, daß nach der anfänglichen, explantationsbedingten Aktivierung nach mindestens 6 Tagen *in vitro* in inneren Schichten der Kulturen eine Ramifizierung vormals amöboider Mikrogliazellen zu beobachten war, während die in äußeren Schichten der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur gelegenen Mikrogliazellen ihre amöboide Morphologie beibehielten. (Hailer et al. 1996). Weitergehende Untersuchungen erbrachten, daß in der Einzelzellkultur vormarkierte, aktivierte Mikrogliazellen in organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur hineinmigrierten und im Verlauf der *in vitro*-Kultivierung eine Ramifizierung erfuhren, wodurch eine direkte Beobachtung vormarkierter und einzeln identifizierbarer Mikrogliazellen in der organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur ermöglicht wurde (Hailer et al., 1997b).

zu g.

Neben diesen rein morphologischen Kriterien wurde nach immunologischen Markern der Aktivierung von Mikrogliazellen gesucht. Die Integrine VLA-4 und LFA-1 konnten als gute Indikatoren von Aktivierungsprozessen charakterisiert werden, da sie sich auf den hochramifizierten und somit nach morphologischen Kriterien ruhenden Mikrogliazellen nicht fanden, während die nach der Explantation in großer Zahl zu findenden amöboiden Mikrogliazellen eine intensive Immunreaktivität für VLA-4 und LFA-1 aufwiesen. Somit konnte die organotypischen hippocampalen Komplexschnittkultur erstmals als experimentelles Modell zur Untersuchung nicht nur neuronaler, sondern auch nicht-neuronaler Bestandteile des ZNS etabliert werden (Hailer et al. 1996).

zu h.1.

Unter Einsatz des Superkultivierungsansatzes (Hailer et al., 1997b), bei dem mit MiniRuby vormarkierte Mikrogliazellen in die organotypische Slicekultur migrieren, konnten nun das Verhalten dieser Zellen auf eine experimentell induzierte neuronale Schädigung untersucht werden. Zur Induktion eines solchen neuronalen Schadens wurde dem Kulturmedium kurzzeitig NMDA hinzugegeben und die untergehenden Nervenzellen mit Propidiumjodid als *in situ* Marker für Zelltod eingesetzt. Die Befunde zeigten, daß vormarkierte Mikrogliazellen spezifisch zum Ort neuronaler Schädigung migrierten (Heppner et al., eingereicht-b). Mikrogliazellen können nicht direkt durch NMDA beeinflusst werden, da sie nicht über entsprechende Rezeptoren verfügen. Somit müssen andere Signalkaskaden für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden. Es liegt nahe anzunehmen, daß das Complementsystem sowie migratorisch wirkende Zytokine hierbei eine zentrale Rolle spielen.

zu h.2.

Analog zur Darstellung des *Tractus perforans in vivo* (Bechmann and Nitsch, 1997a) wurde auch im Komplexschnittpräparat von entorhinalem Cortex und Hippocampus das Vorhandensein dieser Faserverbindung *in situ* zur Darstellung gebracht (Kluge et al., im Druck). Läsionen des *Tractus perforans in situ* führten zur Aktivierung von Gliazellen und zur Phagozytose, welches sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch gesichert wurde. Dieser Ansatz soll nun in der weitem Förderungsperiode weiterverfolgt werden.

Zitierte Literatur

- Bechmann I and Nitsch R (1997a) Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: Combination of axonal tracing and lectin- or immunostaining. *Histochem. and Cell Biol.* 107:391-397
- Bechmann I and Nitsch R (1997b) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion. A light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia.* 20:145-154
- Diekmann S ,Ohm TG and Nitsch R (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopic study. *Brain Pathol.* 6:205-215.
- Förster E, Naumann T, Deller T, Straube A, Nitsch R and Frotscher M (1997) Cholinergic sprouting in the rat fascia dentata after entorhinal lesion is not linked to early changes in neurotrophin mRNA expression. *Neuroscience.* 80:731-739

- Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S and Nitsch R (1997a) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus*. 7:341-349
- Hailer NP, Järhult J, Nitsch R (1996) Resting microglial cells *in vitro*: Analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18:319-331
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R (1997b) Fluorescent deoxy prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neuroscience*. 9:836-866
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R and Hailer NP (1997) Vitamin E induces ramification and downregulation of Adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* (im Druck)
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R and Hailer NP Quantifying microglial morphology: A novel index of ramification (eingereicht-a)
- Heppner FL, Hailer NP, Skutella T and Nitsch R Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures (eingereicht-b)
- Kluge A, Hailer NP, Horvath TL, Bechmann I and Nitsch R (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway *in vitro*. (*Hippocampus*, im Druck)
- Nitsch R, Frotscher M (1993) Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin containing neurons in the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Hippocampus*. 3:481-490.
- Zipp F, Nitsch R, Soriano E and Frotscher M (1989) Entorhinal fibers form synaptic contact on parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. *Brain Res* 495:161-166

C.1.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftliche Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die Rolle von Gliazellen bei pathologischen Veränderungen des ZNS wird auch international zunehmend herausgestellt. Hierbei steht therapeutisch der Versuch im Vordergrund, durch Deaktivierung von Gliazellen bei sowohl akuten als auch chronischen Entzündungsprozessen die letztlich neuronale Schädigung zu verhindern bzw. aufzuhalten. Die im Rahmen dieses Projektes erarbeiteten Modelle werden dabei eingesetzt. In einem in *TINS* erschienen Review von Gähwiler et al (1997) findet sich unsere Arbeit über Deaktivierungsprozesse der Mikroglia in Gewebekulturen, die im Dezember 1996 in *GLIA* erschienen ist, schon zitiert.

C.1.5 Offene Fragen

Die nun folgenden Untersuchungen sollen *in vivo* die Frage nach der Phagozytose dendritischer Strukturen durch Gliazellen und die dadurch induzierte Regulation von immunologisch

relevanten Oberflächenmolekülen beantworten, das Schicksal dieser Zellen (Proliferation, Deaktivierung, Apoptose) aufklären und der funktionellen Relevanz von Adhäsionsmolekülen, Integrinen und dem MHC-System beim Phagozytoseprozess durch pharmakologische Untersuchungen *in vivo* und *in situ* (in der organotypische Schnittkultur) sowie durch Transformationsexperimente mit Antisensestransekonstrukten nach entorhinaler Läsion *in situ* nachgehen. Auf diese Weise sollen sowohl die Art der Beteiligung von Gliazellen bei anterograder Degeneration besser verstanden als auch erste Schritte unternommen werden, in diese Prozesse einzugreifen.

C.1.6 Literatur

- Bechmann I and Nitsch R (1997a) 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 (1997b) Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: Combination of axonal tracing and lectin- or immunostaining. *Histochem. and Cell Biol.* 107:391-397
- Blümcke I, Beck H, Nitsch R, Eickhoff C, Scheffler B, Celio MR, Schramm J, Elger CE, Wolf HK and Wiestler OD (1996) Preservation of calretinin-immunoreactive neurons in the hippocampus of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:329-341.
- Deller T, Adelmann G, Nitsch R and Frotscher M (1996a) The alvear pathway of the rat hippocampus. *Cell Tissue Res* 286:293-303
- Deller T, Frotscher M and Nitsch R (1996b) Sprouting of crossed entorhinodentate fibers after a unilateral entorhinal lesion: anterograde tracing of fiber reorganization with *phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHAL). *J Comp Neurol* 365:42-55.
- Deller T, Frotscher M, Nitsch R (1995a) Morphological evidence for the sprouting of inhibitory commissural fibers in response to the lesion of the excitatory entorhinal input to the rat dentate gyrus. *J Neurosci* 15:6668-6878.
- Deller T, Martinez A, Nitsch R and Frotscher M (1996c) A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J Neurosci* 16:3322-3333.
- Deller T, Nitsch R (1995b) Selective rostral transection of the fornix that spares the hippocampal commissural pathway in the rat: A PHAL-tracing study. *Exp Brain Res* 104:243-248.
- Deller T, Nitsch R and Frotscher M (1996d) Heterogeneity of the commissural projection to the rat dentate gyrus: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin tracing study. *Neuroscience* 75:111-121.
- Deller T, Nitsch R and Frotscher M (1996e) Layer-specific sprouting of commissural fibres to the rat fascia dentata after unilateral entorhinal cortex lesion: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin tracing study. *Neuroscience* 71:651-660.

- Deller T, Nitsch R, Frotscher M (1995c) Phaseolus-vulgaris-Leucoagglutinin (PHAL) tracing of commissural fibers to the rat fascia dentata: Evidence for a novel commissural projection to the outer molecular layer. *J Comp Neurol* 352:55-68
- Diekmann S, Ohm TG and Nitsch R (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopic study. *Brain Pathol* 6:205-215.
- Förster E, Naumann T, Deller T, Straube A, Nitsch R and Frotscher M (1997) Cholinergic sprouting in the rat fascia dentata after entorhinal lesion is not linked to early changes in neurotrophin mRNA expression, *Neuroscience* 80:731-739
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T, Nitsch R (1995) Understanding the cortex through the hippocampus: lamina-specific connections of the rat hippocampal neurons. *J Anat* 187:539-545.
- Hailer N, Bechmann I, Heizmann S and Nitsch R (1997a) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons, *Hippocampus* 7:341-349
- Hailer NP, Heppner FL, Hass D and Nitsch R (1997b) Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice culture and ramify, *Eur J of Neurosci* 9:863-866
- Hailer NP, Jährhult J, Nitsch R (1996) Resting microglial cells *in vitro*: Analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18:319-331
- Hailer NP, Heppner FL, Hass D and Nitsch R Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system (eingereicht-a)
- Hailer NP, Scholz M, Encke A, Markus BH and Blaheta RA Prostaglandin E₂ (PGE₂) induces expression of P-Selection (CD62P) on cultured human umbilical vein endothelial cells (eingereicht-b)
- Heppner FL; Roth K, Nitsch R and Hailer N (1997) Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells, *Glia* (im Druck)
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R and Hailer NP Quantifying microglial morphology: A novel index of ramification (eingereicht-a)
- Heppner FL, Hailer NP, Skutella T, Nitsch R Microglia specifically invade NMDA-lesioned hippocampal fields in organotypic slice cultures. (eingereicht-b)
- Kluge A, Hailer NP, Horvath TL, Bechmann I and Nitsch R (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway *in vitro*. (*Hippocampus*, im Druck)
- Nitsch R and Leranth C (1996) GABAergic neurons in the rat dentate gyrus are innervated by subcortical calretinin-containing afferents. *J Comp Neurol* 364:425-438.
- Nitsch R, Ohm TG (1995) Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 360:475-487
- Skutella T, Nitsch R, Behl C Protection of organotypic hippocampal slice cultures against oxidative stress-induced cell death by 17-β estradiol as assessed by different viability assay. (eingereicht)

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug Teilprojekt

- Bechmann I and Nitsch R (1997a) 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 (1997b) Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: Combination of axonal tracing and lectin- or immunostaining. *Histochem. and Cell Biol.* 107:391-397
- Förster E, Naumann T, Deller T, Straube A, Nitsch R and Frotscher M (1997) Cholinergic sprouting in the rat fascia dentata after entorhinal lesion is not linked to early changes in neurotrophin mRNA expression, *Neuroscience*, Vol.80, No 3:731-739
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system, eingereicht
- Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S and Nitsch R (1997) Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus*, 7:341-349
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D and Nitsch R (1997) Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur. J. Neuroscience* 9:836-866
- Hailer NP, Jährhult J, Nitsch R (1996) Resting microglial cells *in vitro*: Analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18:319-331
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R and Hailer N (1997) Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells, *Glia*, im Druck
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP Quantifying microglial morphology: A novel index of ramification (eingereicht-a)
- Heppner FL, Hailer NP, Skutella T and Nitsch R Microglia specifically invade NMDA-lesioned hippocampal fields in organotypic slice cultures. (eingereicht-a)
- Kluge A, Hailer NP, Horvath TL, Bechmann I and Nitsch R (1998) Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway *in vitro*. (*Hippocampus*, im Druck)
- Skutella T, Nitsch R and Behl C Oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal slice cultures as assessed by various viability assays and protection by 17- β estradiol, eingereicht
- Turner DA, Buhl EH, Hailer NP and Nitsch R (1997) Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. *Progress in Neurobiology*, im Druck

Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (noch nicht oben aufgeführt)

- Diekmann S, Ohm TG and Nitsch R (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal cortex lesion. A combined intracellular injection and electron microscopic study. *Brain Pathol* 6:205-215.

Sonstige eigene Originalarbeiten

- Bergmann M, Post A, Rittel I, Bechmann I and Nitsch R Expression of synaptophysin in sprouting neurons after entorhinal lesion in the rat (im Druck)
- Blümcke I, Beck H, Nitsch R, Eickhoff C, Scheffler B, Celio MR, Schramm J, Elger CE, Wolf HK and Wiestler OD (1996) Preservation of calretinin-immunoreactive neurons in the hippocampus of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:329-341.
- Blümcke I, Schweie Ch, Beck H, Steffens R, Nitsch R, Waha A, Kuhn R and Wiestler OD The metabotropic glutamate receptor mGluR1 is up-regulated and presynaptically localized in rat hippocampus following kainic acid induced seizures (in Vorbereitung)
- Deller T, Adelmann G, Nitsch R and Frotscher M (1996) The alvear pathway of the rat hippocampus. *Cell Tissue Res.* 286:293-303
- Deller T, Frotscher M and Nitsch R (1996) Sprouting of crossed entorhinodentate fibers after a unilateral entorhinal lesion: anterograde tracing of fiber reorganization with *phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHAL). *J Comp Neurol.* 365:42-55.
- Deller T, Frotscher M, Nitsch R (1995) Morphological evidence for the sprouting of inhibitory commissural fibers in response to the lesion of the excitatory entorhinal input to the rat dentate gyrus. *J Neuroscience.* 15:6668-6878.
- Deller T, Martinez A, Nitsch R and Frotscher M (1996) A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J Neuroscience.* 16:3322-3333.
- Deller T, Nitsch R (1995) Selective rostral transection of the fornix that spares the hippocampal commissural pathway in the rat: A PHAL-tracing study. *Exp Brain Res.* 104:243-248.
- Deller T, Nitsch R and Frotscher M (1996) Heterogeneity of the commissural projection to the rat dentate gyrus: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin tracing study. *Neuroscience.* 75:111-121.
- Deller T, Nitsch R and Frotscher M (1996) Layer-specific sprouting of commissural fibres to the rat fascia dentata after unilateral entorhinal cortex lesion: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin tracing study. *Neuroscience.* 71:651-660.
- Deller T, Nitsch R, Frotscher M (1995) Phaseolus-vulgaris-Leucoagglutinin (PHAL) tracing of commissural fibers to the rat fascia dentata: Evidence for a novel commissural projection to the outer molecular layer. *J Comp Neurol.* 352:55-68
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T, Nitsch R (1995) Understanding the cortex through the hippocampus: lamina-specific connections of the rat hippocampal neurons. *J Anat.* 187:539-545.
- Nitsch R and Leranth C (1996) GABAergic neurons in the rat dentate gyrus are innervated by subcortical calretinin-containing afferents. *J Comp Neurol.* 364:425-438.
- Nitsch R, Ohm TG (1995) Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 360:475-48
- Ohm TG, Münch S, Schönheit B, Zarski R and Nitsch R Transneuronally altered dendritic processing of tangle-free neurons in Alzheimer's disease (in Vorbereitung)

C.1.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Helmut Kettenmann, MDC, werden die physiologischen Auswirkungen der Microglia-Ramifizierung sowohl in der Slicekultur als auch nach Vitamin-E Gabe in der Einzelzellkultur untersucht. Zusammen mit Dr. Claudia Eder und Prof. Dr. Uwe Heinemann wird eine Korrelation der Downregulation von Adhäsionsmolekülen und der Veränderung des Strommusters als Zeichen immunologischer Deaktivierung analysiert.

C.2 Thomas Ohm, Anatomisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Expression und Regulation von Apolipoprotein E (ApoE) in Gliazellen nach experimenteller und neuropathologischer Läsion (M. Alzheimer)

C.2.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

C.2.1.1 ApoE und ZNS

ApoE mRNA wurde im ZNS ausschließlich in Gliazellen nachgewiesen (Pitas et al. 1987). ApoE, ein gut charakterisiertes 34 kD Glykoprotein (Mahley, 1988), unterliegt beim Menschen aufgrund einer Punktmutation einem Polymorphismus ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$), wobei sich die Allele $\epsilon 4$ und $\epsilon 2$ vom Wildtyp $\epsilon 3$ nur jeweils durch eine Aminosäure unterscheiden. Im Plasma erfüllt ApoE zentrale Funktionen im Transport von Cholesterin. Die Rolle von ApoE im ZNS war und ist auch jetzt noch weitgehend ungeklärt. Zum Zeitpunkt der Antragstellung wurde angenommen, daß es nur beim Auf- und Abbau von Zellmembranen eine Rolle hat, da seine Synthese im ZNS unter normalen Bedingungen nur während der Ontogenese hochreguliert ist. Die dabei ins Auge gefaßte Rolle beschränkte sich auf klassische Funktionen von ApoE im Lipidstoffwechsel, d.h. der Direktion, Internalisation und damit Metabolisierung von bestimmten Lipidpartikeln (z.B. Cholesterol) Fetten in ihre Zielzellen.

C.2.1.2 ApoE und Alzheimer

Es wurde bis zum Beginn der ersten Antragsphase gezeigt, daß Träger der $\epsilon 4/\epsilon 3$ - bzw. $\epsilon 4/\epsilon 4$ -Allele ein gegenüber $\epsilon 3$ -Homozygoten ein drei- bis achtfach erhöhtes Risiko haben, die Alzheimersche Erkrankung zu bekommen, während $\epsilon 2$ -Träger ein geringeres Risiko tragen (z.B. Rebeck et al. 1993; West et al. 1994). Die Assoziation des $\epsilon 4$ -Allels mit der Alzheimer-Erkrankung ist damit enger als die bekannte Assoziation zwischen $\epsilon 4$ und koronarer Herzerkrankung. Dabei korreliert nicht nur der klinische Schweregrad sondern auch die bei der neuropathologischen Diagnosestellung nachweisbare histologische Veränderung, wobei zum Teil widersprüchliche Befunde vorlagen. So war in allen Studien gezeigt, daß die $\beta/A4$ -amyloid Bildung mit der Gendosis des $\epsilon 4$ -Allels korreliert, (Rebeck et al. 1993; Schmechel et al. 1993). Bezüglich einer Korrelation zur intraneuronalen Pathologie, der Ausbildung von neurofibrillary tangles aus hyperphosphoryliertem Microtubuli-assoziiertem Protein tau, fanden sich negative Befunde, die mit eigenen Vorbefunden nicht übereinstimmten. Es war nicht bekannt, ob zwischen Individuen mit Alzheimer-Erkrankung und solchen ohne eine unterschiedliche ApoE-Expression und/oder ApoE-assoziierte Rezeptorexpression vorliegt.

In einer ersten immunocytochemischen Untersuchung wurde kein Unterschied im Muster der ApoE-Expression zwischen ApoE3- und ApoE4-homozygoten Alzheimer-Hirnen gefunden (Rebeck et al. 1993). Eine erhöhte Expression von ApoE war allerdings auch bei anderen, ganz unterschiedlichen Erkrankungen des ZNS beobachtet worden. All dies - und der Umstand, daß die ϵ -Allele nicht prädiktiv für oder gegen die Alzheimer-Erkrankung sind - deuten an, daß der ApoE-Polymorphismus modulierend auf einen bestehenden Prozeß (z.B. eine

Störung in den Phosphorylierungs/Dephosphorylierungskaskaden) wirkt. Die Mechanismen, mit denen die verschiedenen ApoE-Varianten auf die Entwicklung der extra- und intraneuronalen histologischen Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung unterschiedlich wirken, müssen jedoch transzellulärer Natur sein: ApoE wird im ZNS nur in Astrozyten gebildet (Pitas et al. 1987), während die mit dem klinischen Schweregrad korrelierenden Alzheimer-assoziierten histologischen Neurofibrillenveränderungen in Nervenzellen entstehen. ApoE-Immunoreaktivität wurde zumindest in einigen Neuronen nachgewiesen (Han et al. 1994), wobei offen war, ob es von Astrozyten stammend bloß aufgenommen und nicht - oder zu langsam - degradiert worden ist. Allerdings war und ist nicht auszuschließen, daß es im Rahmen einer beginnenden Pathologie zu einer Expression von ApoE auch in Neuronen kommen könnte.

Vom extrazellulären Raum aus kann ApoE über mindestens zwei Rezeptoren (LDL-Rezeptor; LRP-Rezeptor (=LDL-receptor related protein) sowohl mit anderen Gliazellen als auch mit Neuronen in Kontakt treten. Der LDL-Rezeptor ist im gesunden menschlichen Cortex immunocytochemisch auf Astrozyten und als diffuse Neuropilfärbung zu finden, wobei hierzu auch Mikroglia-assoziierte LDL-Rezeptoren beitragen. Neurone bleiben unmarkiert. Der LRP-Rezeptor hingegen ist auf Neuronen zu finden. Beide Rezeptoren binden ApoE3 bzw. ApoE4 nahezu gleich, wobei entsprechende Daten zu ApoE2 fehlen. Inwieweit ganz feine Unterschiede in der Bindung den - bei einem insgesamt sehr langsamen Verlauf - um 10 Jahre unterschiedlichen Beginn der Erkrankung (Ohm et al. 1995b) alleine zu erklären vermögen, bleibt noch offen. ApoE3 und ApoE4 binden synthetisches β /A4-Amyloid unterschiedlich (Strittmatter et al. 1993), wobei ApoE3 langsamer und schlechter als ApoE4 gebunden wird. Denkbar wäre also auch, daß komplexierte ApoE-Varianten unterschiedlich internalisiert und degradiert werden. An den LRP-Rezeptor können an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen sowohl ApoE/ β A4-Amyloid-Komplexe als auch der Proteinaseinhibitor Alpha-2-Macroglobulin binden (z.B. Williams et al., 1992). Inwieweit sich die beiden Bindungsstellen durch die ApoE-Varianten alleine und in Komplexierung mit β A4-Amyloid gegenseitig beeinflussen, muß geklärt werden.

C.2.1.3 Gliale ApoE-Regulation

Die Regulationskaskaden der glialen Expression von ApoE sind zum Zeitpunkt des Projektbeginns noch unklar gewesen. Möglich war, daß sie im Hirn nicht identisch zu anderen Organen erfolgen wird (Simonet et al. 1991), die ebenfalls hohe ApoE-Spiegel exprimieren. Die damals vorgelegenen Untersuchungen zur Regulation von ApoE an Zellen außerhalb des Hirns deuteten auf eine Beteiligung der Signaltransduktionswege und second messenger (cAMP, Ca²⁺, IP₃) hin, die auf die Proteinkinasen A und C wirken (Dory 1993; Driscoll et al., 1989; Wyne et al., 1989). Mit einer mit humaner ApoE-cDNA transfizierten adrenocorticalen Mauszelllinie wurde gezeigt, daß die Expression von ApoE die cAMP-vermittelte Signaltransduktion nach der Proteinkinase-A blockt (Reyland and Williams, 1991). Sowohl das cAMP-System, welches auf die Proteinkinase A wirkt, als auch die Proteinkinase C, auf die z.B. Ca-Signale wirken, gelten als früh bei der Alzheimerschen Erkrankung verändert (Saitoh et al. 1991; Ohm, 1993). Inwieweit ausgeschleustes ApoE direkt oder indirekt z.B. nach Interaktion mit anderen Molekülen (z.B. β /A4-amyloid) entweder über gliale LDL-Rezeptoren oder andere Wege auf die ApoE-Expression und Metabolisierung rückkoppelt, war gar nicht bekannt.

Unabhängig vom tatsächlichen Mechanismus müßte bei einer kausalen Beteiligung von verschiedenen ApoE-Varianten (die aufgrund der bisherigen Daten sehr wahrscheinlich ist) jedoch die Regulation der Bildung, Metabolisierung und Ausschleusung von ApoE die Entwicklung der Alzheimer-assoziierten histologischen Veränderungen unterschiedlich beeinflusst werden bzw. durch ApoE-Isoformen-spezifische Interaktion mit anderen Molekülen (z.B. β /A4-Amyloid) unterschiedlich erfolgen.

C.2.1.4 Ausgangsfragen

Die geplanten Untersuchungen der letzten Antragsphase sollten Beiträge zu folgenden Komplexen leisten und die damit verbundenen Fragen helfen zu klären:

Inwieweit korreliert die Expression und das Muster der Expression von ApoE-Varianten und ApoE-assoziierten Rezeptoren (LRP, LDL) mit dem der Alzheimer-assoziierten pathologischen Veränderungen (plaques,tangles)?

Ist die Expression von ApoE-Varianten und ApoE-assoziierten Rezeptoren zwischen Kontrollen und Alzheimer-Fällen quantitativ unterschiedlich?

Wie ist die regionale und zelluläre Verteilung von ApoE-Varianten und ApoE-assoziierten Rezeptoren bei experimenteller und neuropathologischer Läsion?

Durch welche Moleküle, Rezeptoren und nachgeschalteten second messenger-Kaskaden wird die ApoE-Bildung, Metabolisierung und Ausschleusung beeinflusst?

C.2.2 Angewandte Methoden

Zur Klärung der oben aufgeführten Fragestellungen konnten bereits vier verschiedene Methoden aufgebaut und etabliert werden.

C.2.2.1 ApoE-ELISA

Die zahlreichen Quantifizierungen von ApoE erforderte die Aufreinigung von großen Mengen relativ preiswerter Seren, die anschließende Charakterisierung der erhaltenen Antikörper und die Etablierung eines für die verschiedenen ApoE-Isoformen gleich sensitiven ELISAs.

C.2.2.2 Calcium-Imaging

Die Analyse der Effekte von ApoE-Isoformen etc. auf die intrazellulären freien Calcium-Konzentrationen identifizierter Zellen erforderte den Aufbau der FURA-Analyse mittels des Ca-Imagings.

C.2.2.3 Einzelzellkultur

Zur Analyse der Signaltransduktionswege, der ApoE-Metabolisierung, Sekretion etc. wurden primäre dissoziierte hippocampale Mischkulturen sowie Zelltyp-angereicherte (z.B. Astrozyten oder Neurone) Kulturen von der Arbeitsgruppe etabliert.

C.2.2.4 Protein/Protein-Interaktion (2-Vektor-Hybrid-Modell; Resonant-Mirror-Technik)

Um die Interaktion der Isoformen ApoE2, E3 und E4 mit anderen Molekülen unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden zwei Ansätze aufgebaut bzw adaptiert, die 2-Vektor-Hybrid-Technik in der Hefe und das in vitro Modell mit relativ physiologischen Randbedingungen der Resonant-Mirror-Technik.

C.2.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

C.2.3.1 Korrelation zwischen ApoE-Genotyp und Alzheimer-Pathologie

Die post mortem Analyse von in Alter und Geschlecht vergleichbaren Fällen unterschiedlicher histopathologischer Stadien der Alzheimerschen Pathologie (Braak, Braak, 1991) ergab, daß das ϵ 4-Allel sowohl das Auftreten der mit klinischen Symptomen verbundenen Stadien (IV, V und VI) als auch der Stadien, die lange präklinisch bleiben (Stadium I, II und i.d.R. auch III), um Jahre vorverlegt (März et al., 1996; Ohm, 1997; Ohm et al. 1995a und b; Ohm et al., 1998, submitted). Damit geht implizit einher, daß auch die Anzahl der Neurone mit Cytoskelettveränderungen (neurofibrillary tangles) größer wird. Dies ist - im Gegensatz zu der Studie von Schmechel et al. (1993) - nunmehr von drei anderen Arbeitsgruppen auch in rein quantitativen Analysen bestätigt worden (Nagy et al. 1995; Morris et al. 1995; Olichney et al. 1996). Somit ist neben der früheren und vermehrten Ablagerung von β /A4-Amyloid auch die zweite klassische histologische Veränderung der Alzheimerschen Erkrankung, die intraneuronale Pathologie, vom ApoE-Polymorphismus beeinflusst. Da beide Veränderungen aus völlig verschiedenen Molekülen (Amyloid Precursor Protein (APP) bzw. Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau) aufgebaut sind und unterschiedliche regionale Verteilungen haben, deutet dies daraufhin, daß ApoE einen Mechanismus bereits sehr früh modulieren muß, der auf beide histopathologischen Kennzeichen der Alzheimerschen Demenz einwirkt. Ein Kandidat wäre z.B. ein Signaltransduktionsweg, auf den ApoE isoformspezifisch einwirkt, und der sowohl bei der Tau-Phosphorylierung als auch dem APP-Metabolismus eine Rolle spielen müßte. Alternativ wäre eine unterschiedliche direkte Molekülinteraktion zwischen den ApoE-Isoformen und APP oder Tau zu prüfen.

März W, Scharnagl H, Kirca M, Bohl J, Groß W, Ohm TG (1996) Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann NY Acad Sci*, 777:276-280.

Ohm TG, Müller H, Braak H, Bohl J (1995a) Close-meshed prevalence rates of different stages as a tool to uncover the pace of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neuroscience*, 64:209-217

Ohm TG, Kirca M, Bohl J, Scharnagl H, Groß W, März W (1995b) ApoE polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Neuroscience* 66:583-587

Ohm TG (1997) Does Alzheimer's disease start early in life? *Mol Psychiatry* 2: 21-25.

Ohm TG, Scharnagl H, März W, Bohl J (1998) ApoE-isoforms and the development of pre-clinical phases of Alzheimer's disease. Eingereicht.

C.2.3.2 ApoE und Signaltransduktion

Das Hauptgewicht der Untersuchungen in der ersten Antragsphase lag daher auf der Analyse der isoformspezifischen Wirkung von ApoE auf intrazelluläre Signalmoleküle und der Interaktion zwischen den Alzheimer-assoziierten Molekülen ApoE, β /A4-Amyloid und Tau.

Unsere Untersuchungen zur Signaltransduktion und ApoE, die durch eine enge methodische Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Wolfgang Müller (Projekt C4) begonnen wurden, ergaben, daß rekombinantes, reines ApoE die Konzentration von freiem intrazellulären Calcium vorübergehend erhöht (Wüstenberg et al., 1997; Müller, Meske, et al. 1997 submitted). Dieser Effekt ist dosisabhängig. Dabei sind die Isoformen signifikant unterschiedlich potent: $E4 > E3 > E2$ (bis zu 400% über Ruhespiegel). Diese Reihe reflektiert das Risikopotential für die Alzheimersche Erkrankung $\epsilon4 > \epsilon3 > \epsilon2$. Bei Prä-Inkubation von ApoE mit β /A4 (1-43, 1-42 und 1-40mer; 37°C, 12-16 Stunden), welches zur Vermeidung unkontrollierter β -Faltblatt-haltiger Aggregate in leicht alkalischem Milieu gelöst wurde, kam es zu einer supra-additiven Verstärkung dieser ApoE-induzierten Erhöhung des freien intrazellulären Calciums. Bei Verwendung der reversen Sequenz von β /A4-Amyloid blieb dieser Effekt aus. Die immunocytochemische Identifikation der Zellen mittels anti-GFAP (Astrozytenmarker) und anti-MAP2-Färbung (Neuronmarker) zeigte, daß beide Zellklassen gleichartig reagierten. Alle Untersuchungen erfolgten unter Gabe von CNQX, um unkontrollierte Netzwerkaktivität zu unterbinden. Die Effekte von ApoE waren nicht durch Blockade der ApoE-Rezeptoren wie LDL-Rezeptoren mit LDL oder der LRP-Rezeptoren mittels aktiviertem $\alpha2$ -Makroglobulin, Heparinase oder Lactoferrin modulierbar. Dies deutet daraufhin, daß zumindest die bekannten Bindungsstellen der ApoE-Rezeptoren nicht an dieser neu entdeckten Funktion von ApoE, ein Signalmolekül mit Calcium *als second messenger* zu sein, teilhaben. Der intrazelluläre Anstieg des freien Calcium erfordert zumindest initial einen Calcium-Einstrom, da er bei Null-Calcium im Medium (EGTA-Gabe) nicht mehr auslösbar war. Die Gabe von TTX modifizierte die ApoE-induzierte Antwort nicht. Hochmolares Nickel führte zur Blockade des Effekts, was auf die Beteiligung spannungsabhängigen Calciumkanälen hindeutete. Die anschließende Analyse mit verschiedenen Calciumkanalblockern (niedermolares Nickel, Nimodipin, Nifedipine, Omega-Conotoxin und omega-Agatoxin) zeigte, vermutlich ein P-Typ-artiger Kanal beteiligt ist, da er nur mit hochmolarem Nickel und Omega-Agatoxin IVa blockierbar war. Veränderungen in der Konzentration von freiem Calcium in Neuronen könnte also die gesuchte Schnittstelle zwischen APP-Metabolismus und Tau-Hyperphosphorylierung sein, da beide Prozesse durch zumindest teilweise calciumabhängige Kinasen gesteuert werden.

Der Befund, daß ApoE isoformenspezifisch die intrazelluläre Calciumkonzentration über selektiven Einbezug eines Calciumkanalsubtyps verändern kann - und zwar in der Potenz wie sie als Risikofaktor für die Alzheimersche Erkrankung über den Polymorphismus bekannt ist - könnte langfristig neue Therapiestrategien eröffnen. In einer mit der Bayer AG begonnenen multizentrischen Studie analysieren wir derzeit die Rolle von Calciumkanal-Blockern auf die Krankheitsprogredienz von ApoE-genotypisierten Individuen. Möglicherweise hat der neue Signalweg auch Implikationen für die Atherosklerose, da auch hier das $\epsilon4$ -Allel bzw. ApoE4 eine kritische Rolle spielt.

Wüstenberg F, Berlin K, Scharnagl H, März W, Ohm TG and Müller W. (1997). Complexes of ApoE-isoforms and Amyloid- β peptides elevate intracellular Calcium levels differ-

entially. Proceedings of the 5th International Conference on Alzheimer's Disease. In Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics. K. Iqbal et al. (eds.), John Wiley & Sons, Chichester, UK. Ch. 49, 383-388

Anderton BH, Callahan L, Coleman P, Davies P, Flood D, Jicha GA, Ohm TG, Weaver C (1997) Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. Prog Neurobiol, in press

Müller W, Meske V, Berlin K, Scharnagl H, März W, Ohm TG (1998) ApolipoproteinE increases intracellular Ca^{2+} isoform specific through a omega-Agatoxin IVa-sensitive Ca^{2+} channel. Eingereicht

C.2.3.3 ApoE-Interaktionen mit anderen Molekülen

Auch wenn dieser Befund der isoformabhängigen Calciumkonzentrationsveränderung bereits einen Erklärungsansatz für den isoformenabhängigen Effekt des ApoE-Polymorphismus auf die Genese und Ausbildung der Alzheimerschen Erkrankung bietet, haben wir überprüft, ob eine andere Erklärungsalternative, die Interaktion von ApoE-Isoformen mit β /A4-Amyloid bzw. anderen Alzheimer-relevanten Molekülen wie z.B. Tau, ebenfalls Unterstützung fände.

Die Beobachtung, daß ApoE in vitro isoform-different mit β /A4-Amyloid bindet (E3 langsamer und schlechter als ApoE4 (Strittmatter et al. 1993), induzierte u.a. zwei Fragen. Erstens wollten wir wissen, ob dies auch unter physiologischeren Bedingungen gilt (nicht in Anwesenheit von Mercaptoethanol z.B.) und zweitens, ob solche Komplexe unterschiedliche Metabolisierung in Zellen aufwiesen.

ApoE und Interaktionsstudien mit β /A4-Amyloid und Tau

Ergebnisse mit dem 2-Vektor-Hybrid-Ansatz

Zur Klärung der ersten Frage haben wir zwei Ansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurde in der eukaryontischen Hefe mittels des 2-Vektor-Hybrid-Systems versucht, die in vivo Interaktion von ApoE-Isoformen mit bestimmten Tau-Domänen („four-repeat“-Bereich) bzw. β /A4-Amyloid (1-40, 1-42 und 1-43) zu demonstrieren. Dieser Ansatz hat den Vorteil, daß prinzipiell damit auch eine (evtl. region- oder pathologiespezifische) cDNA-Bank auf bisher noch unbekannte Interaktionspartner durchsucht werden kann. Das Two-Hybrid-System basiert auf dem modularen Aufbau des Transkriptionsfaktors GAL4, der aus zwei funktionell essentiellen, aber separierbaren Domänen besteht, einer DNA-bindenden Domäne (GAL4-BD) und einer aktivierenden Domäne (GAL4-AD). Im Two-Hybrid-System wurden zwei Plasmide verwendet, die jeweils für Fusionsproteine aus den (potentiellen) Interaktionspartnern (z.B. ApoE2 und β /A4) und der GAL4-BD bzw. der GAL4-AD codieren. Diese beiden Fusions- oder Hybridproteine wurden im Hefestamm YRG-2 sequentiell transformiert und koexprimiert. Die Selektion der erfolgreichen Konstrukte erfolgte auf Leucin- (Leu^-) bzw. Tryptophan- (Trp^-) defizientem Medium. Hefekolonien, die mit beiden Vektoren transformiert wurden, sollten auf Leu^-/Trp^- - Nährmedium wachsen. Die Interaktion von Proteinen, die durch die Expressionsvektoren exprimiert werden, sollte zur Rekonstitution des Transkriptionsfaktors führen und damit zur transkriptionellen Aktivierung von Reportergenen wird über die beiden Reportergene des Hefestammes angezeigt. Die Aktivierung des HIS3-Gens wurde durch Wachstum auf $Leu^-/Trp^-/His^-$ -Nährmedium überprüft. Die Expression von β -

Galaktosidase wurde durch ein LacZ-Assay überprüft, in dem die Umsetzung von 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) in einer Blaufärbung resultiert.

Da wir bisher keine publizierten Daten zu diesem Ansatz vorliegen haben, sind die im folgenden kleiner gedruckten Bereiche für methodisch im Detail Interessierten aufgeführt, der zum weiteren Verständnis auch übersprungen werden kann.

Für die Konstruktion der GAL4-BD- bzw. -AD-ApoE-Plasmide wurden folgende Primer verwendet:

5' - GAG GAA TTC AAG GTG GAG CAA GCG GTG GAG und

5' - GAG CTG CAG TCA GTG ATT GTC GCT GGG CAC

Das mit diesem Primerpaar mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment enthält die *vollständige* cDNA des ApoE mit Ausnahme der für das Sekretionssignal codierenden Sequenz.

Unter Verwendung der Primer

5' - CTA GCT CGA GCG ATG CAG AAT TCC GAC ATG AC oder

5' - CTA CTC GAG ATG CAG AAT TCC GAC ATG AC und

5' - GAA CTG CAG TCA GAC AAC ACC GCC CAC CAT G oder

5' - GAA CTG CAG TCA CGC TAT GAC AAC ACC GCC C

wurden mittels PCR cDNA-Fragmente generiert, die für das β A4₁₋₄₀ bzw. das β A4₁₋₄₂ codieren. Nach Restriktionsverdau mit XhoI und PstI wurden sie über die gleichen Schnittstellen in das Plasmid pAD-GAL4 bzw. über SalI und PstI in das Plasmid pBD-GAL4 kloniert.

Für Interaktionsstudien mit Tau wurde nicht das gesamte Protein, sondern nur das *four-repeat*-Element eingesetzt. Für die Amplifikation des entsprechenden cDNA-Fragments (bp 973-1138) wurden die Primer

5' - GAG GAA TTC GAC CTG AAG AAT GTC AAG TCC und

5' - AAC TGC AGT CAC AGC TTG TGG GTT TCA ATC

verwendet. Die Klonierung in die Plasmide pAD-GAL4 bzw. pBD-GAL4 erfolgte über EcoRI- und PstI-Schnittstellen.

LDL-Rezeptor-Konstrukte (pAD LDL_{Lig}BD und pBD LDL_{ApoE}BD):

Als Positivkontrolle wurden der ligandenbindende Teil sowie nur der aus in vitro Studien vermutete für die Bindung von ApoE essentielle Teil des LDL-Rezeptors in das Plasmid pAD-GAL4 kloniert. Dies erfolgte über Amplifikation der entsprechenden cDNA-Fragmente mit den Primern

5' - GAG CTC GAG CGC AGT GGG CGA CAG ATG TG oder

5' - GAG CTC GAG AGA GTT CCA CTG CCT AAG TG und

5' - GAA CTG CAG AGC CGC CGT TGT TGT CCA AG

In keinem Fall konnte eine Aktivität des *lacZ*-Reportergens festgestellt werden. Ebenso blieb das Wachstum auf Leu⁻/Trp⁻/His⁻-Selektionsplatten aus, was heißt, daß auch das *his3*-Reportergen nicht aktiviert wurde. Eine Interaktion zwischen den verschiedenen ApoE-Isoformen und β A4 bzw. tau konnte mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems also nicht detektiert werden.

Um der Frage nachzugehen, ob vielleicht ApoE für die Untersuchung von Protein/Protein-Interaktionen im Two-Hybrid-System ungeeignet ist, wurde es zur Kontrolle gegen die ligandenbindende Domäne bzw. den für die Bindung von ApoE essentiellen Teil des LDL-Rezeptors getestet. Auch dieser Versuch führte jedoch zu keinem positiven Ergebnis.

Als Positivkontrolle wurden in allen Fällen die Plasmide pADSV40 und PBDp53 verwendet, von denen bekannt ist, daß ihre Expressionsprodukte im Two-Hybrid-System eine positive Interaktion zeigen. So konnte gezeigt werden, daß kein technischer Fehler bei der Durchführung des LacZ-Assays vorlag. Außerdem wurden zur Kontrolle der Transformation die mit beiden zu testenden Plasmiden transformierten Hefen auf Leu⁻/Trp⁻-Selektionsplatten ausplattiert, so daß sichergestellt war, daß beide Plasmide in den Hefen enthalten waren.

Die Ursachen dafür, daß die Untersuchungen mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems in unserem Fall zu keinem befriedigenden Ergebnis führten, könnten u. a. darin zu suchen sein, daß die Proteine nicht in der richtigen Form gefaltet und glykosyliert vorliegen. Von ApoE bekannt, daß seine Konformation für die Bindung an den Rezeptor entscheidend sein kann und daß die Lipid-bindende Domäne auf die Rezeptorbindende Domäne wirkt. Die Tatsache, daß die Proteine als Fusionsproteine vorliegen, könnte ihre Funktion im Hinblick auf die Bindung anderer Proteine in ungünstiger Weise beeinflussen. Gegenwärtig arbeiten wir (u.a. Carsten Jacobi) an dem Aufbau einer humanen cDNA-Bank, aus der wir mittels der 2-Vektor-Hybrid-technik noch unbekannt mögliche Interaktionspartner 'fischen' wollen.

Ergebnisse mit der Resonant-Mirror-Technik

Da der zuerst gewählte Ansatz (2-Vektor-Hybrid-technik) nicht zur Bestätigung der bisher publizierten in vitro Befunde geführt hat, wählten wir einen zweiten unabhängigen methodischen Weg um zu prüfen, ob die mit der 2-Vektor-Hybrid-Technik verbundenen Restriktionen (s.o.) zu dem negativen Resultat geführt haben. Die Resonant-Mirror-Technik stellt eine biophysikalische Methode zur Untersuchung von Bindungen zwischen Biomolekülen wie zum Beispiel Proteinen dar (Davies and Pollard Knight, 1993). Dabei wird eine Komponente (z.B. Protein A) kovalent auf einer Matrix immobilisiert während die zweite Komponente (Protein B) in Lösung zugegeben wird. Bei Bindung der Komponenten kommt es zur Änderung von optischen Eigenschaften, die gemessen werden. Da auch hierzu von uns keine publizierten Daten vorliegen sind die methodischen Details ausführlicher im kleingedruckten Bereich vorstellt.

Für die Kopplung von ApoE an die Aminosilanoberfläche wurde der homobifunktionelle Crosslinker Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) verwendet. Die Kopplungsreaktion erfolgte in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,7. Für die Kopplung von β A4 an die Carboxymethyl-dextranoberfläche wurden die Carboxylatgruppen der Oberfläche mit Hilfe der Reagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Die Bindung von β A4 wurde in 10 mM Acetatpuffer, pH 4 ausgeführt. Überschüssige freie Bindungsstellen wurden in beiden Fällen mit 1 M Ethanolamin, pH 8,4 blockiert.

Alle Messungen wurden in 10 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4 mit 0,05% Tween-20 durchgeführt. Der gleiche Puffer wurde auch zum Waschen der Küvette zwischen den einzelnen Messungen genommen.

Für die praktische Anwendbarkeit der Resonant-Mirror-Methode ist es essentiell, daß die zu beobachtenden Bindungen reversibel sind. Auf der Suche nach Bedingungen, unter denen die Bindung zwischen ApoE und β A4 reversibel ist, stellte sich heraus, daß die Bindung gegen reduzierende, denaturierende Reagenzien (70 mM β -Mercaptoethanol, 300 mM DTT), starke Säure (HCl, pH3) und hohe Salzkonzentration (2 M NaCl) stabil ist. Lediglich mit Detergen-

zien (0,5-1% LDAO, CHAPS oder SDS) sowie mit dem reversibel denaturierenden Reagenz Guanidiniumhydrochlorid zeigte die Bindung Reversibilität.

Zur Untersuchung der Frage, ob die Bindung von ApoE an β A4 isoform-abhängige Unterschiede zeigt, wurden nacheinander ApoE4, ApoE3 und ApoE2 (jeweils ca. 3 μ M) in 200 μ l Phosphatpuffer zu immobilisiertem β A4 zugegeben. Außerdem wurden für ApoE3 und ApoE4 konzentrationsabhängige Bindungskurven (6-0,2 μ M) aufgenommen. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Küvette mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 10 mM Tris, pH 8 regeneriert.

Die Interaktion von immobilisierten ApoE-Isoformen an gelöstem β /A4-Amyloid (1-40 und als Kontrolle die reverse Sequenz, 40-1) zeigte in den bisherigen Versuchen eine deutliche Bindung sowie Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen. Danach scheint ApoE3 besser an β /A4 zu binden als ApoE4. Die Bindung von ApoE2 liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie ApoE3. Darüber hinaus läßt sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von ApoE3 und ApoE4 an β A4 feststellen. Jedoch sieht es so aus, als ob ApoE4 zwar schwächer, dafür aber schneller an β A4 bindet als ApoE3 (Steffenhagen et al., unveröffentlicht). Dies stimmt mit Daten aus Studien unter denaturierenden Bedingungen überein (Strittmatter et al. 1993; LaDu et al. 1995): Lipid-freies ApoE4 bindet schneller und besser β /A4-Amyloid als ApoE3, während dies bei ApoE mit Lipidquelle umgekehrt ist. Die Bindung zwischen ApoE3 konnte unter nicht-denaturierenden Assaybedingungen ebenfalls gezeigt werden (Shuvaev, Siest, 1996). Andere Studien zeigen, daß β /A4-Amyloid zwar mit 'nativem' ApoE aber nicht mit ApoE4 denaturierungsresistente Komplexe zu bilden vermag (Zhou et al., 1996). In unseren Experimenten zeigte sich die Bindung stabil gegen β -Mercaptoethanol und DTT. Dagegen ließ sich die Bindung mit Detergenzien, zum Beispiel SDS, lösen. Ebensov wenig konnte eine Oxidationsabhängigkeit der Bindung bestätigt werden

Diese teilweise im Widerspruch zu früheren Befunden stehenden Beobachtungen bedürfen der näheren Untersuchung, da dies deutet auf konformationsabhängige Bindungsstellen von ApoE hinweist, die bei der Alzheimer-Pathologie verändert sein könnten. Auch könnten solche konformationsabhängige Bindungsstellen erklären, weshalb wir mit der anderen verwendeten Technik, der 2-Vektor-Hybrid-Methode, keine Interaktion haben nachweisen können. Ferner muß die Frage nach der „Spezifität“ der beobachteten Bindung von ApoE-(Isoformen) an β A4 weiter untersucht werden. So bindet nämlich ApoE auch an hitzedenaturiertes β A4. Andererseits läßt sich aber die Bindung von β A4 an ApoE durch „Maskierung“ des ApoE mit einem entsprechenden Antikörper völlig unterbinden.

ApoE und Metabolisierung

Die zweite Ausgangsfrage, nämlich ob die Interaktion von ApoE mit anderen Alzheimer-assoziierten Molekülen (z.B. β /A4) die Metabolisierung beeinflusst, haben wir an normalen humanen Fibroblasten, Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und primären hippokampalen Mischkulturen der Ratte untersucht (Scharnagl et al., re-submitted; Scharnagl et al., 1996). Die Untersuchungen zeigten, daß β /A4-Amyloid mit β VLDL von Cholesterol-gefütterten Kaninchen um die Bindung an den LRP-Rezeptor konkurriert. Bei Prä-Inkubation von β VLDL/ApoE mit β /A4-Amyloid bei 37°C entstand ein SDS stabiler Komplex, der gegenüber β VLDL/ApoE verstärkt aufgenommen wurde, jedoch nur etwa zur Hälfte lysosomal degradiert wurde. Diese Aufnahme ist vermutlich ebenfalls LRP-vermittelt, da sie inhibiert werden konnte durch Heparin, Lactoferrin 39kDa-RAP und aktiviertes α 2-

Makroglobulin. Deutlich verminderte oder fehlende Aufnahme war bei CHO-Zellen zu sehen, die teilweise (pgsB-650-Zellen) oder vollständig (pgs A745-Zellen) Oberflächenproteoglycan-frei sind. Ein synthetisches β /A4-Amyloid, bei dem wir die positiv geladenen Aminosäuren zwischen Positionen 13-17 gegen Glycin ausgetauscht haben, der führte nicht zu einer erhöhten Aufnahme von β VLDL. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, daß β /A4 Ligand für den LRP/Heparansulfatproteoglycan-Weg ist und bei Komplexbildung mit zumindest β VLDL-artigen Lipidpartikel deren lysosomale Degradation und Metabolisierung stört. Dieser Mechanismus war gleichermaßen zu finden, wenn die β VLDL mit humanem ApoE3 oder ApoE4 beladen wurden.

Scharnagl H, Winkler K, Hüttinger M, Wittmann D, Nauck M, Wieland H, Groß W, Ohm TG and W März (1996) The β A4 amyloid peptide enhances cellular uptake of apolipoprotein E-containing receptor-related protein/ α 2 -macroglobulin receptor. In: Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease, A.D. Roses et al. (Eds.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, 136-144

Scharnagl H, Tisljar U, Winkler K, Hüttinger M, Nauck MA, Groß W, Wieland H, Ohm TG, März W (1997) Endocytosis of the β A4 amyloid peptide by the low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor and heparan sulfate proteoglycans pathway. J Biol Chem. In re-review.

ApoE Expressionsstudien

Neuropathologische Studien

Die Frage, inwieweit die histologisch detektierbare ApoE-Expression mit den verschiedenen Stadien (Braak-Klassifikation) und tierexperimentell mit Zonen degenerierender Fasern des entorhinal-hippokampalen Systems nach entorhinaler Läsion korreliert, konnte noch nicht beantwortet werden. Einerseits konzentrierten wir uns auf Experimente, die im Zusammenhang des von entdeckten Effekts stehen, daß nämlich ApoE freie intrazelluläre Calciumkonzentrationen isoformenabhängig moduliert. Andererseits zeigte sich, daß unser Antikörper offenkundig hervorragend für ELISA und Western-Blot-Studien ist, jedoch weder im Autopsie-Material noch in den tierexperimentellen Studien die zu erwartende astrozytäre ApoE-Expression im histologischen Präparat sichtbar macht. Parallel durchgeführte Western-Blots zeigen, daß dabei offenkundig keine post mortem Degradation verantwortlich ist. Die Markierung von β /A4-Amyloid in Plaques und an extrazellulären Tangles („ghost-tangles“), die wir auch sehen, deutet eher auf eine Kreuzreaktion (wie z.B. der Boehringer-Antikörper gegen β /A4 auch rekombinantes ApoE erkennt; Winkler et al., 1997 submitted), ein fixationsabhängiges oder gar auf ein konformationsabhängiges Epitop hin. Eine Testung der kommerziell erhältlichen Antikörper gegen ApoE zeigte, daß eine große Heterogenität in den angefärbten Strukturen vorliegt. So sind z.B. bei einer Färbeserie an benachbarten Schnitten von Ratten- und Menschenhirn und sechs verschiedenen getesteten Antikörpern gegen ApoE, die alle für ApoE-spezifisch sein sollen, sechs verschiedene Färbemuster im Schnitt zu finden. Eine genaue Analyse der Literatur zur Histologie der ApoE-Expression bei Mensch und experimentell geschädigter Ratte zeigt, daß dies offenkundig ein Problem auch für andere Arbeitsgruppen darstellt.

Die Quantifizierung von ApoE aus Hirngewebe mittels ELISA erwies sich ebenfalls als schwieriger als gedacht. Die Messwerte sind nicht linear von der Verdünnung bzw. dem bisherigen Isolationsprotokoll abhängig. Wir entwickeln derzeit ein neues Protokoll zur Aufreinigung von ApoE aus Hirngewebe, so daß die Frage nach einer unterschiedlichen Expressionsmenge von ApoE in den stadieneingeteilten Fällen erst danach genau beantwortet werden kann. Die wenigen Literaturbefunde über Western-Blot-Quantifizierung in Alzheimer-Hirnen sind widersprüchlich, wobei das N für die relative seltenen ApoE-Varianten ($\epsilon 2/2$ und $\epsilon 4/4$) jeweils klein war (erniedrigt: Bertrand et al., 1995; erhöht: Diedrich et al., 1991). ELISA- oder Immunopräzipitatinmessungen von Gewebsspiegeln fehlen. Im Rahmen der Alzheimerschen Erkrankung könnte die Expression von ApoE verringert zu sein, was aus Messungen von ApoE im Liquor cerebrospinalis geschlossen wurde (Pirtillä et al., 1996; Blennow et al., 1994). Allerdings haben andere Studien keine signifikante Unterschiede gefunden (Rösler et al., 1996; Lehtimäki et al., 1995).

Experimentelle Studie zur ApoE Expression

Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Minderung der mit der Risikoform ApoE4 verbundenen Effekte wäre mit der Blockade der P-Typ-artigen Kanaäle verbunden (s. 3.2.1) Alternativ zu einer selektiven Kanalblockade, die auch andere über diesen Kanal laufenden Signalwege beeinflussen würde, käme eine Regulation der ApoE-Bildung und Bereitstellung durch Astrozyten in Frage. Darüber hinaus ist das Verständnis der Regulation dieser Vorgänge für die Rolle von ApoE bei neuronaler Plastizität nötig. Unsere bisherigen Untersuchungen zeigen, daß in kultivierten Astrozyten die Sekretion von ApoE konzentrationsabhängig durch Phorbolester, die die Proteinkinase C aktivieren, und cAMP-Analoga, die die Proteinkinase A aktivieren, gegenläufig reguliert wird: cAMP fördert und Phorbolester hemmt die ApoE-Sekretion (Hamker et al., 1998 submitted). Retinolsäure, welche die Transcription stimuliert, hat praktisch keinen Erfolg. Interessant ist, daß Inkubation von Astrozyten mit verschiedenen $\beta/A4$ -Fragmenten, wobei wir 12 getestet haben um mögliche Wirkdomänen einzugrenzen, die - mittels unseres ELISAs (Nachweisgrenze 250 pg/ml) erfaßbare - ApoE-Menge im von Astrozyten konditionierten Medium teilweise sogar vollständig reduziert (Hamker et al., 1998, submitted). Es sind u.a. genau die Fragmente, die als neurotoxisch und bei der Alzheimer-Pathologie als plaquebildend bekannt sind. Sollte dies auch in vivo gelten, so würde dies bedeuten können, daß bei Astrozyten, deren Fortsätze von bestimmten $\beta/A4$ -Amyloid umgeben sind, die ApoE-Sekretion entweder blockiert wird - oder falls bloß an $\beta/A4$ -Amyloid gebunden und unserem polyklonalen Antikörper gegen ApoE nicht mehr zugänglich - als frei verfügbares ApoE verloren geht. Interessant ist auch unser Befund, daß die Aktivität der Adenylatzyklase, die cAMP generiert, bereits sehr früh (Braak-Stadium II-III) signifikant reduziert ist (Ohm et al., 1997). Auch dadurch könnte ApoE, ein zentrales Molekül, welches offenkundig bei Plastizität und Regeneration eine Hauptrolle spielt (Poirier, 1994), in geringeren Mengen als nötig bereitgestellt werden. Dies könnte insbesondere dann Auswirkungen haben, wenn ApoE selbst als Signal woanders gebraucht würde und dies isoform-spezifisch unterschiedlich ausführen würde - oder isoformspezifische Interaktionen einging, wie sie ja bereits in vitro beschrieben wurden. In vivo scheint ApoE4 mit einer geringeren dendritischen Regenerationskapazität verbunden zu sein (Arendt et al. 1997) bzw. - wie an Zwillingsstudien mit unterschiedlichem ApoE-Typ gezeigt - mit einer reduzierten kognitiven Leistungsfähigkeit (Reed et al. 1994).

Die β /A4-Fragmente, die zu einer reduzierten Bereitstellung von freiem (meßbarem) ApoE im Kulturmedium führen, sind dabei nicht in der Lage die Astrozyten zu schädigen, wie unsere quantitativen Analysen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-basierten „Life/Death-Assay“ zeigten. Allerdings kommt es zu einem massiven Anstieg von GFAP und S100 β -Immunoreaktivität, ein Effekt der durch bekannte Aktivatoren von Astrozyten (z.B. cAMP) ebenfalls ausgelöst werden konnte. Es liegt also nahe, daß einige β /A4-Fragmente, die im Gegensatz zu unseren Untersuchungen zur Potenzierung von ApoE-induzierten akuten Effekten auf die intrazelluläre Calciumkonzentration ‘gealtert’ wurden, zu einer „Aktivierung“ der Astrozyten führen (Meske et al., 1998). Neben den als neurotoxisch bekannten Fragmenten war dies die Sequenz 10-20. Damit ist gezeigt, daß β /A4 auf Astrozyten gegenüber Neuronen diametral entgegengesetzt wirkt, d.h. die Vitalität nicht verändert und den freien intrazellulären Calciumspiegel senkt statt erhöht. Diese Zellklassenspezifität bedeutet entweder, daß ein primär anderer Mechanismus vorliegt - oder das gegenregulierende Mechanismen zusätzlich vorkommen, die Neuronen fehlen. Auch zeigte sich keine Korrelation der im konditionierten Medium mittels ELISA gemessenen ApoE-Spiegel zum intra-astrozytären freien Calciumspiegel (Meske et al., 1998).

Ohm TG, Schmitt M, Bohl J, Lemmer B (1997) Decrease in adenylate cyclase activity antecedes neurofibrillary tangle formation. *Neurobiol Aging* 18: 275-279

Meske V, Hamker U, Albert F, Ohm TG (1977) The effects of β /A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, GFAP- and S100 β -staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes. *Neuroscience*, in press

Hamker U, Meske V, Albert F, Ohm TG (1998) β A4 lowers available apoE secreted from cultured astrocytes differentially. Eingereicht.

C.2.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Siehe vorherigen Punkt und Neuantrag

C.2.5 Offene Fragen

1. Wird ApoE bei Alzheimer-Fällen in den verschiedenen Allelgruppen gleich stark exprimiert?
2. Was induziert die ApoE-Expression bzw. wie wird sie moduliert?
3. Gibt es eine bezüglich der ApoE-Isoformen unterschiedliche Rückkopplung auf Bildung und Sekretion von ApoE selbst?
4. Ist der transiente und unterschiedliche Calciumanstieg durch die ApoE-Isoformen auch durch nicht-rekombinantes ApoE (z.B. aus Liquor cerebrospinalis) beobachtbar?
Welche Effekte hat die durch ApoE induzierte Erhöhung des freien intrazellulären Calciums in der Zelle, z.B. auf Phosphorylierungsmuster?

Mit welchen Molekülen interagiert ApoE bzw. interagieren die Isoformen differentiell?

C.2.6 Literatur

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug Teilprojekt

- März W, Scharnagl H, Kirca M, Bohl J, Groß W, Ohm TG (1996) Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann NY Acad Sci*, 777:276-280.
- Ohm TG, Müller H, Braak H, Bohl J (1995) Close-meshed prevalence rates of different stages as a tool to uncover the pace of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neuroscience*, 64:209-217
- Ohm TG, Kirca M, Bohl J, Scharnagl H, Groß W, März W (1995) ApoE polymorphism influences not only cerebral senile plaque load but also Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Neuroscience* 66:583-587
- Ohm TG (1997) Does Alzheimer's disease start early in life? *Mol Psychiatry* 2: 21-25.
- Wüstenberg F, Berlin K, Scharnagl H, März W, Ohm TG and Müller W. (1997). Complexes of ApoE-isoforms and Amyloid- β peptides elevate intracellular Calcium levels differentially. *Proceedings of the 5th International Conference on Alzheimer's Disease*. In *Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics*. K. Iqbal et al. (eds.), John Wiley & Sons, Chichester, UK. Ch. 49, 383-388
- Ohm TG, Schmitt M, Bohl J, Lemmer B (1997) Decrease in adenylate cyclase activity antecedes neurofibrillary tangle formation. *Neurobiol Aging* 18: 275-279
- Meske V, Hamker U, Albert F, Ohm TG (1977) The effects of β /A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, GFAP- and S100 β -staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes. *Neuroscience*, in press
- Anderton BH, Callahan L, Coleman P, Davies P, Flood D, Jicha GA, Ohm TG, Weaver C (1997) Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog Neurobiol*, in press
- Scharnagl H, Tisljar U, Winkler K, Hüttinger M, Nauck MA, Groß W, Wieland H, Ohm TG, März W (1997) Endocytosis of the β A4 amyloid peptide by the low density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -macroglobulin receptor and heparan sulfate proteoglycans pathway. *J Biol Chem*. In re-review.
- Ohm TG, Scharnagl H, März W, Bohl J (1998) ApoE-isoforms and the development of pre-clinical phases of Alzheimer's disease. *Eingereicht*.
- Müller W, Meske V, Berlin K, Scharnagl H, März W, Ohm TG (1998) ApolipoproteinE increases intracellular Ca^{2+} isoform specific through a omega-Agatoxin IVa-sensitive Ca^{2+} channel. *Eingereicht*
- Hamker U, Meske V, Albert F, Ohm TG (1998) β A4 lowers available apoE secreted from cultured astrocytes differentially. *Eingereicht*.

Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (noch nicht oben aufgeführt)

Diekmann S, Ohm TG, Nitsch R (1996) Long-lasting transneuronal changes in rat dentate granule cell dendrites after entorhinal lesion. A combined intracellular injection and electron microscopic study. *Brain Pathol* 6: 205-215

Ohm TG, von Dewitz G, Witte K, Nitsch R, Lemmer B (1997) Basal and stimulated hippocampal adenylate cyclase activity after unilateral electrolytic lesion of the entorhinal cortex in young adult rats. Eingereicht

Ohm TG, Münch S., Schönheit B., Nitsch R (1997) Transneuronally altered dendritic processing of tangle-free neurons in Alzheimer's disease. Eingereicht.

Sonstige eigene Originalarbeiten

Schägger H, Ohm TG (1995) Human diseases with defects in oxidative phosphorylation: 2. F₁F₀ ATP synthase defects in Alzheimer's disease revealed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem* 227:916-921

Nitsch R, Ohm TG (1995) Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 360:475-487

Ohm TG, Busch C, Bohl J (1997) Unbiased estimation of neuronal number in the human nucleus coeruleus during aging. *Neurobiol Aging*,18:393-399

Busch C, Bohl J, Ohm TG (1997) Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging*,18:401-406

Busch C and TG Ohm (1997) Gender differences in the human noradrenergic nucleus coeruleus. Eingereicht.

Hartmann J, Weiss DG, Ohm TG (1997) Microtubule elasticity and brain stability. Eingereicht.

Kurumatani T, Fastbom J, Bonkale WL, Bogdanovic N, Winblad B, Ohm TG, Cowburn RF (1997) [³H]Inositol 1,4,5-triphosphate, [³H]Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and [³H]Phorbol 12,12-dibutyrate binding in postmortem brain stages for Alzheimer's disease neurofibrillary pathology. Eingereicht

Buchbeiträge

Scharnagl H, Winkler K, Hüttinger M, Wittmann D, Nauck M, Wieland H, Groß W, Ohm TG and W März (1996) The β A4 amyloid peptide enhances cellular uptake of apolipoprotein E-containing receptor-related protein/ α 2 -macroglobulin receptor. In: Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease, A.D. Roses et al. (Eds.), Springer Verlag Berlin Heidelberg, 136-144

Ohm TG, Scharnagl H and W März (1996) Apolipoprotein E and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proceedings CINP Regional Meeting, Basic and Clinical Science of Mental and Addictive Disorders*. 167 (1997): 119-122.

Ohm TG (1997) Prävalenzraten der neuropathologischen Stadien bei DAT. Proceedings of the Aloys-Alzheimer Symposium, Würzburg, im Druck

Fastbom J, Ohm TG, Bonkale WL, Kurumatani T, Winblad B, Cowburn RF (1997) Signal transduction mechanisms in Alzheimer's disease. Proceedings of the International Academy for Biomedical and Drug Research workshop "Mental disorders in the elderly : new therapeutic approaches". Basel. Karger Vol 13, im Druck

Ausgewählte Abstracts

Ohm TG, Zarski R, Rieger-Hug D and J Bohl (1995) Differentially altered G-protein-mediated signalling in Alzheimer's disease: A study of staged autopsy cases. Soc. Neurosci. 25th Annual Meeting, San Diego, USA, Abstr. 774.12

F. Wüstenberg, K. Berlin, H. Scharnagel, W. März, TG Ohm and W. Müller (1996) Complexes of Apo E-isoform as and amyloid- β peptides elevate intracellular calcium levels differentially. 5th International Conference on Alzheimer's Disease., Osaka, Abstract.

W. Müller, K. Berlin, F. Wüstenberg, H. Scharnagel, W. März and TG Ohm (1996) Apolipoprotein E enhances β A4-induced Ca-increases in neurons and astrocytes. 5th International Conference on Alzheimer's Disease. Osaka, Abstract.

W. Müller, K. Berlin, F. Wüstenberg, H. Scharnagl, W. März, TG Ohm, (1996) Impairment of Ca-homeostasis in central neurons and astrocytes by apolipoprotein E and β A4. Soc. Neurosci. 26th Annual Meeting, Washington, USA, Abstr. 105.8.

F. Wüstenberg, K. Berlin, W. März, TG Ohm, W. Müller (1996) Differentially elevated intracellular calcium levels by apo-E isoforms in the presence of β A4-amyloid. Soc. Neurosci. 26th Annual Meeting, Washington, USA, Abstr. 105.9.

TG Ohm, V Meske, W Müller, K Berlin, H Scharnagl, W März (1997) Alzheimer's disease, ApoE isoforms and a P-like Ca^{2+} channel. 42. Annual Convention German Society for Neuropathology and Neuroanatomy. (Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie), Magdeburg. Abstract.

U Hamker, V Meske, F Albert, U Steffenhagen, TG Ohm (1997) Different effects of β /A4-amyloid fragments on calcium homeostasis, survival and ApoE-levels of cultured hippocampal astrocytes. 42. Annual Convention German Society for Neuropathology and Neuroanatomy. (Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie), Magdeburg. Abstract.

T Jöns, C Jacobi, O Ninnemann, R Zarski., RW Veh and TG Ohm (1997) A new Protein 4.1 family member: Association with development of tau pathology in Alzheimer's disease. Soc. Neurosci. 27th Annual Meeting, New Orleans, USA, Abstr.

U Hamker, V Meske, F Albert, U Steffenhagen and TG Ohm (1977) Different Effects of β /A4-amyloid fragments on Calcium homeostasis, survival and ApoE-levels of cultured hippocampal astrocytes. Soc. Neurosci. 27th Annual Meeting, New Orleans, USA, Abstr. 332.10.

Zitierte Literatur (ohne eigene Beiträge)

- Arendt T, Schindler C, Brückner MK, Eschrich K, Bigl V, Zedlick D, Markova L (1997) Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein E4. *J Neurosci* 17:516-529
- Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* 33:174-178
- Blennow K, Hesse C, Fredman P (1994) Cerebrospinal fluid apolipoprotein E is reduced in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5:2534-2536
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol Berl* 82:239-259
- Davies RJ, Pollard Knight D (1993) An optical biosensor system for molecular interaction studies. *Am Biotechnol Lab* 11:52-54
- Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W, 2d, Haase AT (1991) Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol* 65:4759-4768
- Dory L (1993) Post-transcriptional regulation of apolipoprotein E expression in mouse macrophages by phorbol ester. *Biochem J* 292:105-111
- Driscoll DM, Schreiber JR, Schmit VM, Getz GS (1985) Regulation of apolipoprotein E synthesis in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 260:9031-9038
- Golabek AA, Soto C, Vogel T, Wisniewski T (1996) The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation. *J Biol Chem* 271:10602-10606
- Han SH, Einstein G, Weisgraber KH, Strittmatter WJ, Saunders AM, Pericak Vance M, Roses AD, Schmechel DE (1994) Apolipoprotein E is localized to the cytoplasm of human cortical neurons: a light and electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:535-544
- LaDu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT (1995) Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J Biol Chem* 270:9039-9042
- Lehtimäki T, Pirttilä T, Mehta PD, Wisniewski HM, Frey H, Nikkari T (1995) Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease. *Hum Genet* 95:39-42
- Lund Katz S, Weisgraber KH, Mahley RW, Phillips MC (1993) Conformation of apolipoprotein E in lipoproteins. *J Biol Chem* 268:23008-23015
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-630
- Morris CM, Benjamin R, Leake A, McArthur FK, Candy JM, Ince PG, Torvik A, Bjertness E, Edwardson JA (1995) Effect of apolipoprotein E genotype on Alzheimer's disease neuropathology in a cohort of elderly Norwegians. *Neurosci Lett* 201:45-47

- Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, Johnston C, Litchfield S, Sim E, Smith AD (1995) Influence of the apolipoprotein E genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 69:757-761
- Olichney JM, Hansen LA, Galasko D, Saitoh T, Hofstetter CR, Katzman R, Thal LJ (1996) The apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with increased neuritic plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and Lewy body variant. *Neurology* 47:190-196
- Pirttila T, Mehta PD, Soininen H, Kim KS, Heinonen O, Paljarvi L, Kosunen O, Riekkinen P, Wisniewski HM (1996) Cerebrospinal fluid concentrations of soluble amyloid beta protein and apolipoprotein e in patients with alzheimer's disease: correlations with amyloid load in the brain. *Arch Neurol* 53:189-193.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917:148-161
- Poirier J (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17:525-530
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT (1993) Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11:575-580
- Reed T, Carmelli D, Swan GE, Breitner JC, Welsh KA, Jarvik GP, Deeb S, Auwerx J (1994) Lower cognitive performance in normal older adult male twins carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele. *Arch Neurol* 51:1189-1192
- Rosler N, Wichart I, Jellinger KA (1996) Intra vitam lumbar cerebrospinal fluid and serum and postmortem ventricular immunoreactive apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:452-454
- Reyland ME, Williams DL (1991) Suppression of cAMP-mediated signal transduction in mouse adrenocortical cells which express apolipoprotein E. *J Biol Chem* 266:21099-21104
- Saitoh T, Masliah E, Jin LW, Cole GM, Wieloch T, Shapiro IP (1991) Protein kinases and phosphorylation in neurologic disorders and cell death. *Lab Invest* 64:596-616
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9649-9653
- Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, Taylor JM (1991) Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J Biol Chem* 266:8651-8654
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8098-8102
- West HL, Rebeck GW, Hyman BT (1994) Frequency of the apolipoprotein E epsilon 2 allele is diminished in sporadic Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 175:46-48
- Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson T (1992) Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density li-

poprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 267:13284-13292

Wyne KL, Schreiber JR, Larsen AL, Getz GS (1989) Regulation of apolipoprotein E biosynthesis by cAMP and phorbol ester in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 264:981-989

Zhou Z, Smith JD, Greengard P, Gandy S (1996) Alzheimer amyloid-beta peptide forms denaturant-resistant complex with type epsilon 3 but not type epsilon 4 isoform of native apolipoprotein E. *Mol Med* 2:175-180

C.2.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Bezüglich der entorhinalen Läsion beim Tier besteht eine seit Jahren fruchtbare Kooperation mit der AG von Robert Nitsch (Projekt C1)

Bezüglich der Calcium-Analysen und der elektrophysiologischen Charakterisierung der Kanäle hat sich bereits zu Beginn des SFBs eine intensive und erfolgreiche Kooperation mit der AG von PD Dr. Wolfgang Müller, Institut für Physiologie der Charité, etabliert.

C.3 Claudia Eder & Uwe Heinemann, Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse

C.3.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

Die Reaktionen von Mikrogliazellen auf epileptische Aktivität und ihre Beteiligung an anfallsinduzierten Zellschäden waren unbekannt. Dazu mußten Informationen über das Verhalten von Mikrogliazellen in vitro und über Zellverluste während und nach epileptischer Aktivität gesammelt werden.

Der Übergang vom pharmakosensitiven zum pharmakoresistenten Status epilepticus war mit einem Verlust der Effizienz GABAerger Substanzen verbunden. Es war zu klären, ob eine Verschiebung von GABA aus dem neuronalen in den glialen Zellpool mit anschließender Verstoffwechslung an diesem Übergang beteiligt sein kann.

Die Eigenschaften von Astrozyten im sklerotischen und nichtsklerotischen Hippokampus sollten in bezug auf Aspekte der Kaliumregulation an tierexperimentellen Modellen der Temporallappenepilepsie untersucht werden. Dazu war es zunächst erforderlich, Befunde zur Effizienz der glialen räumlichen Kalium-Pufferung zu erheben.

C.3.2 Angewandte Methoden

C.3.2.1 Dissoziierte und organotypische Kulturen

Es wurden folgende Kultursysteme im Labor etabliert:

- Mikrogliazellen- und Makrophagenkulturen, unter Verwendung verschiedener Proliferationsfaktoren (astrozytenkonditioniertes Medium, MCSF, GMCSF, γ - Interferon u.a.)
- Dissoziierte Hippokampuskulturen der Ratte
- Organotypische Hirnschnittkulturen des Hippokampus mit und ohne entorhinalen Kortex

C.3.2.2 Chronische Epilepsiemodelle und humanes Gewebe

- Pilocarpinstatusmodell
- Kindlingmodell
- Anfertigung axialer Hirnschnittpräparate des humanen Hippokampus und Transfer aus dem Virchow-Klinikum in die Charité, Entwicklung eines Transportsystems

C.3.2.3 Bildgebende Meßverfahren:

- Zelltodmarkierung mit Ethidumbromid und Acridinorange-Gegenfärbung
- Ratiometrisches Kalzium-Imaging
- Messung der Mitochondrien-Potentiale
- Messung der NADH-Autofluoreszenz
- Messung der Produktion freier Radikale
- Messung der Glutathionspiegel

C.3.2.4 Elektrophysiologische Methoden

- Untersuchungen von Membranströmen mit Hilfe der Patchclamp-Methode
- Messungen von Membranpotentialen
- Extrazelluläre Feldpotentialregistrierungen
- Stromsenkendichte-Analyse
- Messungen des Extrazellulär-raums und extrazellulärer Ionenänderungen

C.3.2.5 Histologie

- Dünnschnitte ethiumbromidgefärbter Hirnschnitte und Schnittkulturen ohne und mit GFAP-Darstellung (biotynilierte und fluorescein-gekoppelte Sekundärantikörper)
- Dextranaminmarkierung lebender Zellen in Hirnschnitten und Schnittkulturen
- Immunhistochemie von Mikrogliazellen und Makrophagen (ICAM, MHC Klasse II, OX6, VLA-4, LFA-1, u.a. in Zusammenarbeit mit R. Nitsch)

C.3.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

C.3.3.1 Entwicklung eines pharmakoresistenten Status epilepticus

Untersuchungen an kombinierten Hirnschnittpräparaten des Hippokampus und entorhinalen Kortex haben ergeben, daß im entorhinalen Kortex, im benachbarten Subiculum und im temporalen Neokortex besonders leicht anfallsähnliche Ereignisse ausgelöst werden können (Dreier & Heinemann, 1991), Brückner, Stenkamp, Draguhn, Meierkord und Heinemann (in Vorbereitung). Die Frequenz dieser Anfälle ist bei Behandlung mit 4AP niedriger als bei Auslösung durch Niedrig-Magnesiumlösungen. Die Anfälle gehen nach unterschiedlich langen Zeiten in späte Status epilepticus-ähnliche Aktivität über, die durch die vorhandenen Antikonvulsiva nicht mehr blockiert werden kann (Zhang et al. 1995). Dazu zählen auch Substanzen wie Barbiturate und Benzodiazepine, die die postsynaptische GABA-Wirkung verstärken. Wir konnten zeigen, daß sowohl GABA, Muscimol wie auch Baclofen in der Lage sind, diese Aktivität zu unterbrechen (Pfeiffer et al. 1996). Es erscheint deshalb möglich, daß der Übergang zu schwer behandelbaren Anfällen auf einer Verschiebung von GABA aus dem neuronalen Pool in den Gliapool beruht. Wir haben deshalb die Wirkung verschiedener GABA-Aufnahme-Blocker auf die späte Status epilepticus-Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß Nipicotinsäure und Beta-Alanin die späte Krampfaktivität unterbrechen können (Pfeiffer et al. 1996). Beide Substanzen setzen über einen reversen Transport GABA frei. An Zellen

der Area dentata wurde die Wirkung der genannten GABA-Aufnahme-Hemmer untersucht. Sowohl Nipicotinsäure als auch Beta-Alanin induzierten einen Bicucullin-sensitiven Strom (Draguhn & Heinemann, 1996). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß es während einer Anfallsserie zu einer zunehmenden Verschiebung von GABA aus dem neuronalen Pool in den Gliapool kommen kann. Da Tiagabin selbst nicht transportiert wird und deshalb GABA nicht über einen Transportmechanismus aus Gliazellen freisetzen kann, ist verständlich, warum Tiagabin die schwer behandelbaren States nicht beeinflusst.

C.3.3.2 Untersuchungen zu Status-induziertem akuten und verzögerten Zelltod

a. Hirnschnittpräparate

An Hirnschnittpräparaten wurde eine Reihe von orientierenden Untersuchungen zu Status epilepticus-induziertem Zelltod vorgenommen. Als Indikatoren für den Zellverlust wurden das irreversible Verschwinden reizinduzierter antidromer Potentiale sowie Färbungen der Hirnschnitte mit Ethidiumbromid verwendet. Es zeigte sich, daß langanhaltende epileptiforme Aktivität zu einer Abnahme der reizinduzierten Potentiale und zu fleckförmigen Zellverlusten im entorhinalen Kortex und Hippokampus führt. Ein ähnlicher irreversibler Verlust von Zellen und evozierbaren Potentialen konnte nach ca. 20minütiger Hypoglykämie sowie nach Applikation von ca. 5 mM Glutamat oder 1 mM Kainat evoziert werden. Vollständiges Absterben der Nervenzellen wurde nach Applikation von 20 mM Glutamat, 5 mM Kainat oder 40minütiger Hypoglykämie beobachtet (Alici & Heinemann, 1995; Alici et al. 1997; Alici et al. 1996; Alici et al. 1997; Alici et al. 1996). Die notwendigen Glutamatwerte liegen sehr deutlich über jenen, die während epileptischer Aktivität gemessen wurden. Da theoretisch wesentlich mehr Glutamat während epileptischer Aktivität freigesetzt wird, ergab sich die Frage, ob Glutamat über präsynaptische Autorezeptoren die Glutamatfreisetzung reguliert. In unseren Zytotoxizitätsmessungen hatte sich gezeigt, daß afferente Fasern noch einige Zeit funktional bleiben, da sich nach Reizung immer noch ein afferentes Summenaktionspotential nachweisen ließ. Durch repetitive Reizung afferenter Fasern ließ sich ein gleich großer Abfall der extrazellulären Kalziumkonzentration induzieren wie nach pharmakologischer Blockade der synaptischen Transmission. Die so gemessene präsynaptische Kalziumaufnahme ließ sich durch verschiedene Glutamat-Agonisten blockieren. Zu unserer Überraschung reduzierten metabotrope Glutamatagonisten die präsynaptische Kalziumaufnahme nicht. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die Reduktion der Transmitterfreisetzung durch Aktivierung präsynaptischer metabotroper Glutamatagonisten nicht direkt auf einer Modulation der präsynaptischen Kalziumaufnahme beruht. Diese Befunde erklären, warum der iktale Glutamatanstieg im Extrazellulärraum begrenzt bleibt.

b. Hirnschnittkulturen

Gegen Messungen zu krampfbedingtem Zelltod an Hirnschnittpräparaten läßt sich unter anderem einwenden, daß die Untersuchungen an vorgeschädigten Präparaten erfolgen und daß die Sauerstoffspannung in der Mitte des Hirnschnittpräparates bereits erniedrigt ist. Wir haben deshalb unsere Untersuchungen auf Hirnschnittkulturen des Hippokampus und des entorhinalen Kortex-Hippokampuskomplexes ausgedehnt. Auch die Hirnschnittkulturen entsprechen sicher nicht in jeder Form der physiologischen Situation. Zwar läßt sich die hippokampale

Schleife von der Area dentata nach CA3 und von dort nach CA1 weiter nachweisen, aber unphysiologische Verbindungen vom CA1- und CA3- Gebiet zurück in die Area dentata haben sich ausgebildet (Gutiérrez et al., submitted). Als Folge dieser synaptischen Umorganisation wird die Area dentata an Krampfanfällen beteiligt. Untersuchungen zum anfallsinduzierten Zelltod haben ergeben, daß wie am intakten Tier und den Hirnschnitten längere Anfallsserien zu einem erheblichen Zelluntergang führen, der sich anhand der reizevozierten Potentiale ebenso ablesen läßt wie anhand der Ethidiumbromidfärbungen. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Zellen verschwinden innerhalb von zwei Tagen aus dem Präparat. Nachfärbungen mit unterschiedlichem Abstand zum Status epilepticus ergaben, daß bis zu 6 Tage nach einem Status epilepticus Zellen vermehrt mit Ethidiumbromid markiert werden konnten (Gutiérrez et al., submitted, Kovacs, Gabriel, Schuchmann und Heinemann, in Vorbereitung). Es kommt also auch in der Hirnschnittkultur nach einem Status zu akuten und darüber hinaus auch zu verzögert auftretenden Zellverlusten. Diese betreffen initial vorwiegend Nervenzellen, später auch GFAP-positive Astrozyten. Neben Ethidiumbromid-positiven Zellkernen finden sich sowohl Neurone als auch GFAP-positive Astrozyten mit Ethidiumbromid-positivem Zytoplasma. Diese Befunde deuten darauf hin, daß auch Astrozyten eine Status-induzierte Membranschädigung aufweisen können. Am Rand der fleckenförmigen Läsionszonen finden sich amöboide Zellen, bei denen es sich vermutlich um Mikrogliazellen handelt. Erste Hinweise zeigen in noch nicht sicher identifizierten Mikrogliazellen Lysosomen, die Ethidiumbromid-positiv sind. Phagozytotische Aktivität wird auch durch Experimente belegt, in denen mit dem anterograd- und retrograd-transportierten fluoreszierenden Dextranaminen lebende Nervenzellen vor Induktion des Status epilepticus markiert wurden. Auch dieser Marker findet sich parallel zur Ethidiumbromidfärbung in Lysosomen. Da die amöboiden Zellen in den Hirnschnittkulturen gut visuell zu identifizieren sind, lassen sich unter Sicht elektrophysiologische Messungen und Füllungen mit Farbstoffindikatoren für Kalzium, pH, freie Radikale u.a. vornehmen.

C.3.3.3 Untersuchungen an dissoziierten Zellkulturen

Um die an den Zellschäden beteiligten Prozesse weiter charakterisieren zu können, haben wir mit Versuchen begonnen, epileptiforme Aktivität an Zellkulturen auszulösen. In der Literatur war beschrieben, daß Absenken der Mg^{2+} - Konzentration Serien rekurrenter EPSP's auslöst. Diese gleichen in vielerlei Hinsicht epileptiformen Entladungen. Diese Entladungen führen zu einem verstärkten Absterben der Nervenzellen. Epileptiforme Aktivität und Zellverluste ließen sich durch NMDA-Rezeptorantagonisten hemmen. Wir haben statt Absenken der Mg^{2+} - Konzentration 4AP verwendet. 4AP erhöht über die Blockade eines TEA- und 4AP-sensitiven, offenbar in präsynaptischen Endigungen lokalisierten Kaliumauswärts-gleichrichterkanals (Klee et al. 1995; Beck et al. 1992; Ficker & Heinemann, 1992) die präsynaptische Transmitterfreisetzung. In den Zellen lassen sich Serien von PSP's ableiten. Durch Blockade von GABA-Kanälen mit Picrotoxin (GABA-A und -C) und CGP 55845 A können synchrone Glutamat-Rezeptor- vermittelte Anfälle ausgelöst werden, während bei Blockade der Glutamatantworten synchronisierte GABAerge Potentiale beobachtet werden. Letztere sind ein entferntes Modell von Absence-States, während erstere ein Modell der exzitatorischen Konvulsionen sind. Die pharmakologischen Eigenschaften dieser Konvulsionsmodelle wurden charakterisiert (Brückner, Draguhn und Heinemann, in Vorbereitung). Voruntersuchungen ergaben, daß auch in diesem Modell Zellverluste auftreten.

Um die zugrundeliegenden Mechanismen zu klären, wurde an hippokampalen Zellkulturen Glutamat in verschiedenen Konzentrationen appliziert und mit bildgebenden Meßverfahren

die Reaktionen der Zellen verfolgt (Klee et al. 1995; Beck et al. 1992; Ficker & Heinemann, 1992; Lückermann et al. 1996; Schuchmann et al. 1997; Stabel-Burow et al. 1997). Glutamat induziert einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und eine Mitochondrien-depolarisation. Darüber hinaus erhöht es die Produktion freier Radikale und führt parallel zu einem Anstieg der NAD(P)H-Autofluoreszenz (nach einem initialen Abfall) und zu einer Abnahme der intrazellulären Glutathion-Konzentration. Die Glutamatapplikation führte innerhalb von 14 Std. zu einem fast vollständigen Verlust der Nervenzellen. Mit Verzögerung traten auch Vakuolisierungen und Granulierungen an Astrozyten auf. Zwei Strategien konnten den Zelltod reduzieren: 1. Applikation von Glutamat in kalziumfreien Lösungen und 2. Ein Hochregeln des Glutathiongehaltes in Nerven- und Gliazellen.

Das Hochregeln der Glutathionspiegel erfolgte durch Applikation von Cystin, das über einen Na-abhängigen und über einen Anionen-Transport in Astrozyten aufgenommen wird (Pannicke et al. 1994; Reichelt et al. 1997). Dort wird Cystin zu Cystein abgebaut, das aus den Astrozyten ausgeschleust und den Nervenzellen zur Verfügung gestellt wird. Wir konnten zeigen, daß nach Vergiftung des Gliastoffwechsels mit Fluoracetat Applikation von Cystin nicht mehr zu einem Anstieg der intrazellulären Glutathionspiegel führte, während Applikation von Cystein bei gleichzeitigem Oxydationsschutz in der Lage war, die Glutathionsynthese in Nervenzellen zu steigern (Schuchmann, Müller und Heinemann, in Vorbereitung). Umgekehrt konnten wir zeigen, daß ein Absenken der Glutathionspiegel in Nerven- und Gliazellen zu vermehrten Zellverlusten führte.

Erste Messungen der NAD(P)H-Autofluoreszenz in Hirnschnittpräparaten während Anfallsereien ergaben während des ersten Anfalls einen initialen Abfall der NAD(P)H-Autofluoreszenz, gefolgt von einem Überschießen. Während aufeinanderfolgender Anfälle nahmen die NAD(P)H-Overshoots konsekutiv ab, so daß es möglicherweise nach langen Anfallsereien auch zu einer Verarmung der Zellen an ATP kommt.

Aus diesen Überlegungen ergeben sich mehrere Strategien zu einem Schutz vor anfallsbedingten Läsionen: 1. Die Hochregulation der intrazellulären ATP-Spiegel über Vorbehandlung mit Kreatin 2. Der Schutz vor freien Radikalen durch Hochregulation der intrazellulären Glutathionspiegel 3. Die Applikation von anderen Scavengern wie Beta-Liponsäure und Tocopherol. Hierbei ist vor allem auch die Frage zu beantworten, wie die Astrozyten auf das Krampfgeschehen reagieren und wie der Untergang von Astrozyten verhindert werden kann.

C.3.3.4 Gliale Kaliumregulation

Extrazelluläre Kaliumkonzentrationserhöhungen sind ein wichtiger Faktor bei der Induktion und Ausbreitung epileptischer Aktivität (Heinemann et al. 1996). Der Anstieg der Kaliumkonzentration wird unter Mitwirkung der Gliazellen reguliert. Drei Mechanismen sind an der Kaliumregulation beteiligt:

1. Aufnahme von Kalium in Nerven- und Gliazellen durch die Na-K-ATPase, deren gliale Variante durch extrazelluläres Kalium stimuliert wird
2. KCl-Transport in die Gliazellen
3. Umverteilung von Kalium über den glialen räumlichen Puffermechanismus.

Folgende Argumente sprechen für eine Beteiligung von Gliazellen an der Begrenzung des Kaliumanstieges:

- In juvenilen Hirnschnittpräparaten, in denen die Gliazellen noch nicht voll ausgereift sind, steigt die Kaliumkonzentration während maximaler repetitiver Reizung auf Werte bis 18 mM, womit der Grenzwert von 12 mM im adultem Gewebe deutlich überschritten wird (Nixdorf-Bergweiler et al. 1994).
- Barium, das für die Kalium-Pufferung wichtige Leckkaliumkanäle und Einwärtsgleichrichter in Gliazellen blockiert, verstärkt reiz- und iontophoretisch-induzierte Kaliumsignale im adulten, aber nicht im juvenilen Gewebe.
- Laminare Profile antidrom ausgelöster Kaliumkonzentrationserhöhungen und Stromsenkendenanalysen der begleitenden langsamen Feldpotentiale zeigen am Ort der maximalen Kaliumakkumulation im Stratum pyramidale (SP) eine Senke. Diese wird durch Barium in eine Quelle umgewandelt, wobei gleichzeitig die Kaliumkonzentrationserhöhung um 80 - 140 % gesteigert wird (Gabriel et al., in press, Gabriel et al., in revision).

Diese Befunde belegen, daß die während neuronaler Aktivität freigesetzten Kaliumionen unter Vermittlung Barium-sensitiver Kanäle in Gliazellen aufgenommen und räumlich umverteilt werden. Es ist nicht bekannt, ob dieser Mechanismus in Gewebe mit Hippokampussklerose funktioniert. Deshalb haben wir damit begonnen, die Effekte von Barium auf durch repetitive Reizung ausgelöste Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration im Hippokampus von Pilocarpin-behandelten Tieren, von gekindelten Tieren sowie in humanem Gewebe mit und ohne Hippokampussklerose zu untersuchen. In Hirnschnitten chronisch epileptischer Ratten (Pilocarpin-Modell) waren bei extrem kleinen Feldpotentialen relativ große Kaliumkonzentrationserhöhungen zu registrieren. Applikation von Barium führte lediglich bei der Hälfte der Hirnschnitte zu signifikanten Steigerungen der reizinduzierten Kaliumkonzentrationserhöhungen, die im Unterschied zu den Kontrolltieren auf das Stratum pyramidale und unmittelbar benachbarte Anteile des Stratum radiatum und Stratum oriens begrenzt blieben. Das deutet darauf hin, daß die durch Barium-sensitive Kanäle vermittelte Aufnahme und Umverteilung extrazellulärer Kaliumionen im epileptischen Gewebe beeinträchtigt sein kann (Gabriel et al., in press). In ersten Untersuchungen an humanen epilepsie-chirurgisch gewonnenen Hippokampus-Resektaten sahen wir Barium-Effekte auf die reizinduzierte Kaliumkonzentrationserhöhung häufiger in der Area dentata als in der CA1.

C.3.3.5 GABA-Aufnahme

Im weiteren haben wir uns damit beschäftigt, welche Rolle die GABA-Aufnahme bei der Regulation der synaptischen Transmission spielt. Diese Daten wurden im Rahmen eines SFB-Projektes mit Andreas Draguhn erhoben. Es zeigte sich, daß der Einfluß von GABA-Aufnahme-Hemmern auf die Dauer von IPSP's entwicklungsabhängig variiert (Draguhn & Heinemann, 1996; Sabau et al. 1997).

An gekindelten Tieren fanden wir in in situ-Hybridisierungsexperimenten keinen Hinweis für eine veränderte Expression des GAT-1 (Draguhn et al., in Vorbereitung). In Untersuchungen an der Area dentata humanen Gewebes wurde eine Reduktion der Effizienz der GABA-Aufnahme postuliert. Unklar ist aber, ob diese Reduktion auf einer Abnahme der GABA-Transporter in glialen Zellen oder in Nervenzellen beruht. Im Zuge dieses Projektes haben wir

auch mit Untersuchungen zum GABA-Transport an akut isolierten Zellen begonnen. Wir hoffen, auf diese Weise und in Verbindung mit Einzelzell-PCR-Experimenten klären zu können, in welchem Kompartiment bei einer Hippokampussklerose der GABA-Transport vermindert ist. In unseren Experimenten konnten wir ferner zeigen, daß sowohl Beta-Alanin wie Nipicotinsäure GABA über einen nichtsynaptischen Mechanismus freisetzen kann. Da insbesondere nach einem Status epilepticus GABA in Dendriten und Axonen von an sich glutamatergen Körnerzellen gefunden wurde, besteht die Möglichkeit, daß GABA während neuronaler Aktivität aus diesen Zellen freigesetzt wird und Gliazellen beeinflußt (Gutiérrez und Heinemann, *Nature*, under revision). Dieser Frage soll in Untersuchungen an Hirnschnitten und akut isolierten Zellen von Pilokarpintieren und humanem Gewebe weiter nachgegangen werden.

C.3.3.6 Glutamat-Aufnahme

Eine weitere wichtige Funktion der Gliazellen betrifft die Aufnahme von Glutamat aus dem Extrazellulärraum. In Voruntersuchungen im Zusammenhang mit einem DFG-Einzelantrag haben wir verschiedene glutamaterge synaptische Komponenten der neuronalen Übertragung im entorhinalen Kortex und Hippokampus untersucht und neben den AMPA- und konventionellen NMDA-rezeptorvermittelten synaptischen Komponenten auch ein langsames EPSP identifiziert, das durch Kynurensäure, CPP und 7-Chloro-Kynurensäure blockiert wird. Diese Potentiale zeigen während repetitiver Reizung eine Frequenzpotenzierung, die verstärkt werden kann, wenn Glutamat-Aufnahme-Hemmer appliziert werden. Damit stehen Vordaten zur Verfügung, um der Frage nachzugehen, ob bei Hirngewebe mit und ohne Hippokampussklerose Veränderungen in der Glutamatresorption vorkommen. Vormessungen an Müller-Zellen haben darüber hinaus gezeigt, daß es möglich ist, die Effizienz des Glutamat-Transportes zu analysieren (Draguhn & Heinemann, 1996; Sabau et al. 1997; Pannicke et al. 1994; Reichelt et al. 1997).

C.3.3.7 Mikrogliazellen

In den letzten 2 Jahren haben wir uns intensiv bemüht, die Ionenkanäle an kultivierten Mikrogliazellen detailliert zu untersuchen. Dabei war von besonderem Interesse, ob sich die Expression bestimmter Kanäle mit dem funktionellen Stadium der Zellen verändert. Wir konnten zeigen, daß M-CSF-kultivierte Mikrogliazellen einen ausgeprägten einwärtsgerichtenden K⁺-Strom exprimieren (Fischer et al., 1995). Dieser Strom ist Barium- und Caesium-sensitiv und zeigt eine starke Abhängigkeit gegenüber extrazellulären K⁺-Ionen (Eder et al., 1995a). Zusätzlich konnten wir erstmalig an den M-CSF-kultivierten Mikrogliazellen einen Protonenstrom beschreiben. Dieser Strom ist reguliert durch die Differenz des intrazellulären und extrazellulären pH-Wertes. Er ist gut inhibierbar durch die extrazelluläre Applikation verschiedener polyvalenter Kationen, wobei sich Zink- und Lanthan-Ionen als die potentesten Blocker dieses Stroms erwiesen (Eder et al., 1995a). Wir konnten ebenfalls zeigen, daß in GM-CSF-kultivierten Mikrogliazellen der einwärtsgerichtende K⁺-Strom herunterreguliert wird. Dafür exprimierten GM-CSF-kultivierte Mikrogliazellen einen K⁺-Auswärtsstrom, der nur selten an M-CSF-kultivierten Mikrogliazellen gesehen wurde (Fischer et al., 1995). Dieser Strom war blockierbar durch extrazellulär appliziertes TEA, 4-AP, CTX, NTX und konnte durch divalente Kationen moduliert werden (Eder et al., 1995b). Es zeigte sich außerdem, daß dieser Auswärtsstrom durch Veränderungen des intrazellulären und extrazellulären

pH-Wertes moduliert werden konnte (Eder and Heinemann, 1996). In der Annahme, daß die unterschiedliche Expression der K^+ -Ströme in Mikrogliazellen mit dem funktionellen Stadium der Zellen korreliert, wurde die Fähigkeit der Mikrogliazellen zur Antigenpräsentation gemessen.

Es zeigte sich, daß die aktivierten Mikrogliazellen, die zur Antigenpräsentation fähig waren, verstärkt den K^+ -Auswärtsstrom exprimierten, wohingegen die Zellen, die nicht in der Lage waren, Antigen zu präsentieren, den einwärtsgerichtenden Strom zeigten (Fischer et al., 1995). Parallel zu den Untersuchungen an Mikrogliazellen wurden Knochenmarks-gereifte Makrophagen untersucht. Es zeigte sich, daß die mit M-CSF-gereiften Makrophagen ebenfalls nur den einwärtsgerichtenden K^+ -Strom exprimierten, wohingegen die mit GM-CSF kultivierten Makrophagen verstärkt nur den K^+ -Auswärtsstrom exprimierten (Eder and Fischer, 1997). Bei intrinsisch aktivierten dendritischen Zellen fanden wir, daß diese zur Antigenpräsentation fähigen Zellen auch nur einen K^+ -Auswärtsstrom, aber keinen K^+ -Einwärtsstrom exprimierten (Fischer and Eder, 1995). In weiteren Untersuchungen wurden Mikrogliazellen mit Hilfe des Astrozyten-konditionierten Mediums in den ramifizierten Zustand überführt (Eder et al., 1997a). In diesen Zellen wurden sowohl Einwärts- als auch Auswärts- K^+ -Ströme nachgewiesen. Die Auswärts- K^+ -Ströme zeigten die gleichen pharmakologischen Eigenschaften wie die Ströme der GM-CSF-stimulierten Mikroglia, d.h. sie waren hoch sensitiv gegenüber extrazellulär appliziertem CTX, KTX oder NTX (Eder et al., 1996). Es zeigte sich allerdings, daß die K^+ -Auswärtsströme nur transient nach Zugabe des ACM exprimiert wurden und dadurch nicht mit den morphologischen Veränderungen der Zellen korreliert werden konnten (Eder et al., 1997a). Es wird vermutet, daß zwei verschiedene lösliche astrozytäre Faktoren für die Induktion der Ramifizierung und die Expression der K^+ -Kanäle verantwortlich sind. Wir konnten außerdem einen neuen Ca-aktivierten K^+ -Kanal in Mikrogliazellen identifizieren, der verstärkt an den ramifizierten Mikrogliazellen ausgebildet wird. Dieser Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Strom ist spannungsunabhängig, CTX-sensitiv und nur gering durch extrazelluläres TEA blockierbar (Eder et al., 1997b).

C.3.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

- Expression von Einwärtsgleichrichter- und Natrium-Kanälen in Astrozyten aus humanem epileptischen Gewebe (Sontheimer, laufende Untersuchungen)
- Effekte von Barium auf iontophoretisch induzierte Kaliumsignale (Nicholson, noch nicht abgeschlossen)
- Zellverluste bei epileptischer Aktivität (Lindvall, Schmidt-Kastner)

C.3.5 Offene Fragen

1. Welche Mechanismen führen zu akutem und verzögertem Verlust an Neuronen und zum verzögerten Absterben von Astrozyten nach Status epilepticus? Lassen sich solche Mechanismen mit Hilfe verschiedener glio- und neuroprotektiv wirkender Prozesse (Substitution

energiehaltiger Substrate, Regulierung der intrazellulären Glutathionspiegel, Abfangen freier Radikale) differenzieren?

2. Welchen Anteil hat die Aktivierung von Mikrogliazellen an Zellverlusten?

Welche Eigenschaften zeigen Mikrogliazellen in Hirnschnittkulturen und wie verändern sich diese Eigenschaften nach Schädigung (neurotoxisch, gliotoxisch, epileptisch)?

3. Ist die Kaliumregulation in epileptischem Gewebe eingeschränkt? Welche Korrelationen bestehen zwischen veränderter Kaliumregulation und lokalen strukturellen Veränderungen (Läsionszonen, lokale Gliose)? Ist der Verteilungsraum für Kalium verkleinert? Ist die Expression von glialen Kaliumkanälen reduziert oder werden Kanäle mit anderen Eigenschaften exprimiert? Gibt es Unterschiede der Veränderungen zwischen Tiermodellen (Pilocarpin, Kindling) und humanem sklerotischen und nicht sklerotischen Gewebe?

4. Wie und in welchem Maße sind Prozesse der glialen GABA- und Glutamat-Aufnahme in sklerotischem und nicht sklerotischem Hirngewebe verändert? Wie wirkt eine Blockierung des glialen Glutamat- und GABA-Transportes auf neuronale NMDA-vermittelte EPSP's und GABA vermittelte IPSP's in sklerotischem und nicht sklerotischem Hirngewebe? Führen Veränderungen der glialen Glutamataufnahme zu Zellverlust?

5. Läßt sich ein pharmakoresistenter Status epilepticus durch Freisetzung von GABA aus Gliazellen unterbrechen? Durch welche Mechanismen bzw. kompetitiv transportierte Substanzen kann eine Freisetzung von GABA aus Gliazellen ausgelöst bzw. unterhalten werden?

6. Welche glialen Regulationsprozesse sind nach akutem neuronalen Zelltod und im Gewebe mit synaptischer Reorganisation verändert? Unterscheiden sich Ionenkonzentrationen, pH und Größe des Extrazellulärraumes sowie Eigenschaften der Astrozyten in Geweben mit und ohne synaptischer Reorganisation?

C.3.6 Literatur

Eigene Literatur 1995 - 96 - 97

ALICI, K., GLOVELI, T., SCHMITZ, D. & HEINEMANN, U. (1997). Effects of glutamate receptor agonists and antagonists on Ca²⁺-uptake in rat hippocampal slices lesioned by glucose deprivation or by kainate. *Neuroscience* 77, 97-109.

ALICI, K., GLOVELI, T., WEBER-LUXENBURGER, G., MOTINE, V. & HEINEMANN, U. (1996). Comparison of effects induced by toxic applications of kainate and glutamate and by glucose deprivation on area CA1 of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 738, 109-120.

ALICI, K. & HEINEMANN, U. (1995). Effects of low glucose levels on changes in [Ca²⁺]₀ induced by stimulation of Schaffer collaterals under conditions of blocked chemical synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 185, 5-8.

- ALICI, K., MÜLLER, W. & HEINEMANN, U. (1996). Effects of glutamate receptor agonists on presumed presynaptic Ca²⁺-signals in juvenile rat hippocampal area CA1. *Neuroscience Letters* 214, 17-20.
- BECK, H., FICKER, E. & HEINEMANN, U. (1992). Properties of two voltage-activated potassium currents in acutely isolated juvenile rat dentate gyrus granule cells. *Journal of Neurophysiology* 68, 2086-2099.
- DRAGUHN, A. & HEINEMANN, U. (1996). Different mechanisms regulate IPSC kinetics in early postnatal and juvenile hippocampal granule cells. *Journal of Neurophysiology* 76, 3983-3993.
- DREIER, J. P. & HEINEMANN, U. (1991). Regional and time dependent variations of low magnesium induced epileptiform activity in rat temporal cortex. *Experimental Brain Research* 87, 581-596.
- EDER, C., FISCHER, H.-G., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Properties of voltage-gated potassium currents of microglia differentiated with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Membr.Biol.* 147, 137-146.
- EDER, C., FISCHER, H.-G., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Properties of voltage-gated currents of microglia developed using macrophage colony-stimulating factor. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 430, 526-533.
- EDER, C. & HEINEMANN, U. (1996). Proton modulation of outward K⁺ currents in interferon- γ -activated microglia. *Neuroscience Letters* 206, 101-104.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Pharmacological properties of Ca²⁺-activated K⁺ currents of ramified murine brain macrophages. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 356, 233-239.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K⁺ currents and ramification of brain macrophages. *Neuroscience Letters* 226, 147-150.
- FICKER, E. & HEINEMANN, U. (1992). Slow and fast transient potassium currents in cultured rat hippocampal cells. *Journal of Physiology* 445, 431-455.
- FISCHER, H.-G., EDER, C., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Cytokine-dependent K⁺ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 64, 183-191.
- HEINEMANN, U., DRAGUHN, A. & MEIERKORD, H. (1996). The pathophysiology of seizure generation. In *The Treatment of Epilepsy*, eds. SHORVON, S., DREIFUSS, F., FISH, D. & THOMAS, D. pp. 3-19. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- HEINEMANN, U., GABRIEL, S. & MEIERKORD, H. (1996). Änderungen von Ionenkonzentrationen während epileptiformer Aktivität im entorhinalen Kortex-Hippokampuspräparat der Ratte. *Zeitung für EEG und EMG* 27, 218-225.
- KLEE, R., FICKER, E. & HEINEMANN, U. (1995). Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *Journal of Neurophysiology* 74, 1982-1995.
- NIXDORF-BERGWEILER, B. E., ALBRECHT, D. & HEINEMANN, U. (1994). Developmental changes in the number, size and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 12, 180-195.

- PANNICKE, T., STABEL, J., HEINEMANN, U. & REICHELT, W. (1994). Alpha-amino adipic acid blocks the Na⁺-dependent glutamate transport into acutely isolated Müller glial cells from guinea pig retina. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 429, 140-142.
- PFEIFFER, M., DRAGUHN, A., MEIERKORD, H. & HEINEMANN, U. (1996). Effects of t-aminobutyric acid (GABA) agonists and GABA uptake inhibitors on pharmacosensitive and pharmacoresistant epileptiform activity in vitro. *Br.J.Pharmacol.* 119, 569-577.
- REICHELT, W., STABEL-BUROW, J., PANNICKE, T., WEICHERT, H. & HEINEMANN, U. (1997). The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience* 77, 1213-1224.
- STABEL-BUROW, J., KLEU, A., SCHUCHMANN, S. & HEINEMANN, U. (1997). Glutathione levels and nerve cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mice - a model of Down syndrome. *Brain Res.* (In Press)
- ZHANG, C. L., DREIER, J. P. & HEINEMANN, U. (1995). Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. *Epilepsy Research* 20, 105-111.

Manuskripte im Druck/ in Revision/ eingereicht:

- ALICI, K., WEBER-LUXENBURGER, G., HEINEMANN, U. Effects of glucose deprivation in area CA1 hippocampal slices from adult and juvenile rats. *Dev. Brain Res.* (In Press)
- ARMAND, V., GABRIEL, S., HOFFMANN, P., HEINEMANN, U., VERGNES, M. Properties of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in a genetic rat model of absence epilepsy. (In Revision)
- GABRIEL, S., EILERS, A., KIVI, A., KOVÁCS, R., SCHULZE, K., LEHMANN, T., HEINEMANN, U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine treated epileptic rats. (In Press)
- GABRIEL, S., EILERS, A., LEWEKE, F.M., WEBER-LUXENBURGER, G., HEINEMANN, U. Stimulus induced changes in [K⁺]_o, slow field potentials and glial membrane potentials in area CA1 of rat hippocampal slices: evidence for spatial K⁺ buffering. (In Revision)
- GUTTIÉRREZ, R., ARMAND, V., SCHUCHMANN, S. & HEINEMANN, U. Epileptiform activity and neuronal cell loss induced by low Mg²⁺ in cultured rat hippocampal slices (submitted to *Hippocampus*)

Bücher und Buchkapitel:

- Heinemann, U., Eder, C. Control of neuronal Excitability. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, Eds. Engel, J.jr., Pedley, T.A. , Philadelphia: Lippincott-Raven Publ. 1997.

Abstracts:

- DRAGUHN, A., GUTIÉRREZ, R., GABRIEL, S. & HEINEMANN, U. (1997). Altered connectivity in hippocampal explant cultures causes enhanced excitation of dentate granule cells. (Göttinger Neurobiology Report 1997, Proceedings of the 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997, Volume II)(Abstract)
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Ca²⁺-activated K⁺-currents of ramified murine microglial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 433 (Suppl.), R103(Abstract)
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Effects of astrocyte-conditioned medium on cell shape and on K⁺ currents of microglia. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 433 (Suppl.), R103(Abstract)
- GABRIEL, S., EILERS, A., KIVI, A., KOVÁCS, R., LEHMANN, T., SCHULZE, K., TURSKI, L., HEINEMANN, U. (1997) Laminar profiles of stimulus induced slow field potentials and rises of [K⁺]_o in the CA1 of normal and chronic epileptic rats (Abstract)
- GUTIÉRREZ, R., ARMAND, V., SCHUCHMANN, S. & HEINEMANN, U. (1997). Epileptiform activity and neuronal cell loss induced by low Mg⁺⁺ in cultured rat hippocampal slices. (Abstract)
- GUTIÉRREZ, R. & HEINEMANN, U. (1997). Synaptic reorganization in explanted cultures of rat hippocampus. (Abstract)
- HEINEMANN, U., DRAGUHN, A. & EDER, C. (1996). Possible contribution of glial cells to initiation and spread of seizure activity. (Abstract)
- KLEE, R., RICHTER, H., HEINEMANN, U., EDER, C. (1997). Proton currents of immunologically resting and activated microglial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 433 (Suppl.), R104 (76th Annual Meeting 11-15 March 1997, Rostock)
- LÜCKERMANN, M., SCHUCHMANN, S., HEINEMANN, U. & BALLANYI, K. (1996). Mitochondrial membrane potential of the CA1 neurons in thin hippocampal slices. (Göttinger Neurobiology Report 1996, Proceedings of the 24th Göttingen Neurobiology Conference 1996, Volume II), 495(Abstract)
- SABAU, A., PFEIFFER, M., HEINEMANN, U. & DRAGUHN, A. (1997). Age-dependence of the anticonvulsant effect of tiagabine in vitro. (Göttinger Neurobiology Report 1997, Proceedings of the 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997, Volume II), 637(Abstract)
- SCHUCHMANN, S., MÜLLER, W., HEINEMANN, U. (1997). Cultured hippocampal trisomy 16 neurons of mice, a model of Down's syndrome, show an age dependent elevation in [Ca²⁺]_i. 2, 971 (Göttinger Neurobiology Report 1997, Proceedings of the 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997, Volume II)
- SCHUCHMANN, S., MÜLLER, W., HEINEMANN, U. (1997). Neurons maintain their glutathione level by taking up cysteine released from glial cells. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 433 (Suppl.), R148 (76th Annual Meeting 11-15 March 1997, Rostock)

Manuskripte in Vorbereitung:

Gabriel, S., Kivi, A., Eilers, A., Heinemann, U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal area CA1 of juvenile rats in vitro.

Kovács, R., Schuchmann, S., Schulze, K., Gabriel, S., Heinemann, U. Acute and delayed loss of neurones and astrocytes after induction of epileptiform activity in cultured hippocampal slices: Time course of Ethidiumbromide fluorescence.

Lehmann, T., Gabriel, S., Eilers, A., Kivi, A., Kovács, R., Schulze, K., Heinemann, U. Aberrant fiber connections in hippocampal slices of chronic epileptic rats demonstrated by fluorescent dextran amines.

Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (noch nicht oben aufgeführt)

Eder, C., Nitsch, R., Klee, R. and Heinemann, U. Effects of astrocyte conditioned medium on morphological and electrophysiological properties of microglia in vitro.

C.3.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Mit Prof. H. Kettenmann wurden experimentelle Ansätze zur Charakterisierung von Mikrogliazellen in vitro und in situ abgestimmt und teilweise gemeinsame Experimente durchgeführt. Mit R. Nitsch wurden Untersuchungen zur morphologischen Charakterisierung von Mikrogliazellen in vitro begonnen und eine Kooperation zur Charakterisierung von Mikrogliazellen in Hirnschnittkulturen nach Status epilepticus verabredet. Herrn PD Dr. Dirnagl wurde ein Bildauswerteprogramm zur Analyse konfokaler Mikroskopbilder zur Verfügung gestellt.

C.4 Wolfgang Müller & Uwe Heinemann, Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität Berlin: Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration, freier Fettsäuren und des Glutathionspiegels in pathologisch veränderten und normalen Astrozyten

C.4.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

C.4.1.1 Ca- und freie Radikale bei Schädigungsmechanismen

In der Diskussion von Schädigungsmechanismen im Nervensystem standen lange Zeit Ca-abhängige Prozesse im Mittelpunkt (Siesjö 89). Tatsächlich konnte eine starke intrazelluläre Kalziumbelastung nach Applikation exzitotoxischer Substanzen wie Glutamat, bei Hypoglykämie, Hypoxie und epileptischer Aktivität nachgewiesen werden. Insbesondere der verzögerte Zelltod kann durch diese Ca-Erhöhungen ausgelöst werden (Choi 1992). Da der Zelltod nicht zwangsläufig eintritt und Blockade von NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängigen Ca-Kanäle nur mäßig neuroprotektiv wirkt, richtete sich das Interesse vermehrt auf andere Mechanismen, insbesondere freie Sauerstoffradikale. Deren Produktion erfolgt sowohl Ca-abhängig als auch Ca-unabhängig (Cadet 1994; Dykens 1994). Ca-abhängig erfolgt eine Aktivierung von Phospholipasen, wobei beim Abbau der freigesetzten Fettsäuren freie Radikale entstehen. Desweiteren entstehen freie Radikale bei der oxydativen Phosphorylierung in den Mitochondrien.

C.4.1.2 Ts-16 Mausmodell

Aufgrund einer genetischen Homologie zwischen dem Maus Chromosom 16 und dem humanen Chromosom 21 gilt die Trisomie 16 Maus als ein Modell für das humane Down-Syndrom (Reeves 1986). Durch die Trisomie 21 bzw. 16 werden eine Reihe von Genprodukten überexprimiert, u.a. APP und SOD. Die durch die SOD bedingte Umwandlung von freien Sauerstoffradikalen in H_2O_2 ist dabei nur bedingt protektiv, da der Abbau von H_2O_2 ebenfalls den zelleigenen Schutzstoff Glutathion (GSH) verbraucht.

Ausgangsfragen waren:

Gibt es in trisomen Astrozyten bzw. Neuronen in Kultur Veränderungen der GSH-Spiegel, der GSH Synthese, der Ca-Signalgebung oder der Produktion freier Radikale und aufgrund welcher pathophysiologischen Mechanismen kommen ggf. diese Veränderungen zustande.

C.4.1.3 Arachidonsäure und K-Kanäle

Arachidonsäure wird überwiegend durch die Ca-abhängige PLA_2 freigesetzt und ist ein wichtiger Botenstoff, der u.a. bei synaptischer Plastizität sowie Schadenskaskaden diskutiert wird. Ca-Signale, denen eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zugrundeliegt, führen zu besonders starker Freisetzung von Arachidonsäure in den Extrazellulärraum.

Ausgangsfrage:

Gibt es eine Modulation von K-Kanälen durch Arachidonsäure, die im Sinne einer Erregungsverstärkung synaptische Plastizität bzw. Exzitotoxizität verstärken können. Ggf. welche Mechanismen vermitteln die Effekte.

C.4.1.4 Apolipoprotein E

Es wurde gezeigt, daß der ApolipoproteinE Polymorphismus eine hochsignifikante Korrelation zur Häufigkeit der Alzheimer'schen Erkrankung zeigt im Sinne einer Verbindung des e4-Alleles mit einem stark erhöhten Risiko der Erkrankung. Vorexperimente an Fibroblasten weisen auf eine Störung der Ca-Homeostase durch ApolipoproteinE hin.

Ausgangsfrage:

Gibt es eine isoform-spezifische Störung der Ca-Homöostase durch ApolipoproteinE in Astrozyten oder Neuronen und weist diese Störung eine Korrelation mit dem Erkrankungsrisiko für den M. Alzheimer auf ?

C.4.2 Angewandte Methoden

- a) digitales Ratio Ca-Imaging
- b) Video-Imaging von Glutathion, Mitochondrienpotential, mitochondrialem Ca, NAD(P)H-Autofluoreszenz, Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid.
- c) Whole cell patch clamp Ableitung von dissoziierten Zellkulturen
- d) dissoziierte Zellkultur von diploiden und trisomen Embryonen

C.4.3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

Erhöhungen des intrazellulären freien Calciums sollen über Aktivierung von Lipasen zu Anstiegen freier Fettsäuren wie z.B. Diacylglycerol und Arachidonsäure wie auch freier Radikale führen. Freie Radikale sollen an Zellschädigungen sowohl an Nerven- wie an Gliazellen beteiligt sein. Als Schutzsubstanz ist Glutathion für die Elimination freier Radikale notwendig. Freie Fettsäuren und freie Radikale können sowohl innerhalb der Gliazellen wie in Neuronen die Aktivität von Enzymen und Ionenkanälen und damit das zelluläre Verhalten beeinflussen. Wir wollen mit Hilfe bildgebender Verfahren und Einzelzelleitung diese Signalkaskaden nachvollziehen. An Astrozyten des Trisomie-16 Mausmodells für das Down-Syndrom und damit eingeschränkt auch für M. Alzheimer konnten wir eine reduzierte Esteraseaktivität, erhöhte Ca-Ruhepegel sowie massiv verstärkte ATP-abhängige Akkumulation von freiem Ca in intracellulären Organellen zeigen. Neurotransmitter-induzierte Ca-Oszillationen und Wellen sind dagegen in ihren Amplituden weitgehend unterdrückt. Dieses Ergebnis kam sehr überraschend, da Neurotransmitter-induzierte Ca-Oszillationen und Wellen ganz wesentlich von intrazellulären Ca-Freisetzungsprozessen abhängen (van den Pol, Finkbeiner et al. 1992; Finkbeiner 1993). Vermutlich kommt der massiv verstärkten Speicherung von Ca in subzellulären Kompartimenten, die nicht durch Neurotransmitter entleert werden, eine pathophysiologische Bedeutung für die Produktion freier Radikale zu.

Mit Messungen des oxydativen Stoffwechsels mit Dichlorofluorescein (DCF) fanden wir in diploiden Astrozyten und Neuronen eine starke Abhängigkeit der Radikalenproduktion von intrazellulärem Ca. Dabei spielt die subzelluläre Verteilung der Ca-Signale offensichtlich

eine Rolle. Intrazelluläre Verstärkung der Ca-Diffusion (Bindung an den exogen zugeführten Ca-Puffer BAPTA) führt zu einer Verstärkung der durch Depolarisation der Zellen mit hohem K ausgelösten DCF-Oxydation. Der intrazelluläre Ca-Anstieg führt dabei sowohl über Lipasen wie über Beeinflussung mitochondrialer Reaktionen zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Fettsäure-Radikalen und Sauerstoffverbindungen. In Zusammenarbeit mit Y. Kudo, Tokio, fanden wir, daß der Ca-Farbstoff rhod-2 auch in Glia- und Nervenzellen spezifisch für mitochondriales Ca ($[Ca]_m$) ist. Mitochondriale Entkopplung mit carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) führt zu einer vollständigen Blockade des rhod-2 Signals nach Stimulation mit Glutamat. Glutamatstimulation führt, bei ähnlicher Amplitude, zu wesentlich längeranhaltenden $[Ca]_m$ -Signalen als Depolarisation mit 60mM $[K]_o$, möglicherweise aufgrund lokalisierter Ca-Freisetzung durch Glutamat. Tatsächlich blockierte Entleerung der Ca-Speicher durch Blockade der Ca-ATPase des glatten endoplasmatischen Reticulums (SERCA) mittels Thapsigargin den Anstieg von $[Ca]_m$ nach Glutamatstimulation. Die Oxidation von Dihydrorhodamin bzw. Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) durch freie Radikale korrelierte während Stimulation mit Glutamat oder hohem $[K]_o$ im Mittel mit den Anstiegen von $[Ca]_m$.

In den trisomen Zellen fanden wir signifikant verminderte Spiegel von Glutathion (GSH), die unter Belastungssituationen auch zu einer entsprechenden Zunahme des neuronalen Zelltods führen. Diese GSH-Spiegel kommen als steady states von Synthese und Verbrauch durch Oxydation zustande und können daher durch eine verminderte Synthese, einen erhöhten Verbrauch oder beides zusammen erklärt werden. Interessanterweise konnten die GSH-Spiegel durch Gabe des Precursors Cystein (oder Cystin in Gegenwart von Glia), vermutlich infolge vermehrter Synthese, angehoben und damit der Zelltod signifikant gehemmt werden.

Mit Hilfe des Ca-Farbstoffes Fura-2/AM ist es uns gelungen einen altersabhängigen Anstieg der basalen Ca-Spiegel in trisomen gegenüber diploiden Astrozyten und Neuronen zu zeigen (Müller, Heinemann et al. 1997; Schuchmann, Müller et al. 1998). Zusätzlich kommt es zu einer massiven Verstärkung der ATP-abhängigen Ca-Aufnahme in subzelluläre Organellen, wie wir durch Permeabilisierung der Zellen und Auswaschen des zytosolischen Fura-2 zeigen konnten. Trotz dieser vermehrten Ca-Speicherung sind die astrozytären Ca-Antworten auf die Neurotransmitter Glutamat und Serotonin massiv unterdrückt (Müller, Heinemann et al. 1997). Insbesondere bei hochauflösenden Messungen mit starker mikroskopischer Vergrößerung und damit hohen Photonenintensitäten beobachteten wir auch zytosolische Ca-Erhöhungen, die vermutlich durch Phototoxizität ausgelöst wurden. In den trisomen Neuronen löste kurze Glutamatstimulation dagegen nur relativ geringfügig reduzierte Ca-Anstiege aus. Aufgrund einer deutlich verlangsamten Rückbildung dieser Ca-Anstiege kommt es allerdings in den trisomen Zellen zu einem signifikanten Anstieg des Integrals der Ca-Konzentration über die Zeit (Schuchmann, Müller et al. 1998).

Die mitochondriale Depolarisation infolge Ca-Aufnahme wurde dabei in den trisomen Zellen mit zunehmendem Alter in Kultur deutlich größer und entsprechend dem Ca-Signal länger andauernd. Der mit Glutamat induzierte Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies war dabei in den trisomen Kulturen erheblich schneller und stärker als in den diploiden Kontrollkulturen. Im unstimulierten Zustand war keine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen in trisomen Kulturen festzustellen. Blockade der Komplexe I, III und IV der Atmungskette führen in den diploiden Kulturen zu einer deutlichen Hemmung der stimulierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den trisomen Kulturen keine Hemmung durch Blockade des I. Komplexes, was auf eine Störung dieses Komplexes hinweist. Blockade des III. und IV. Komplexes der Atmungskette

unterdrückte dagegen in trisomen Kulturen die Glutamat-induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen in ähnlichem Ausmaß wie in diploiden Kulturen. Die mit Autofluoreszenz gemessenen Verläufe von NAD(P)H zeigten einen initialen Abfall mit Glutamatexposition, der in den diploiden Zellen von einem kompensatorischen Überanstieg abgelöst wird. Diese Gegenkompensation fehlt in den trisomen Kulturen, es kommt lediglich zu einer langsamen Wiederannäherung an die unstimulierten Spiegel.

In Bezug auf die freien Fettsäuren konnten wir zeigen, daß Arachidonsäure den A-Strom in Neuronen mit sehr hoher Potenz unterdrückt. Dabei sind intrazellulär bereits pM Konzentrationen wirksam während extrazellulär etwa 100.000 fache Konzentrationen vergleichbare Effekte auslösen. Unter Berücksichtigung eines Flächenanteils des Patches von 1/150 bis 1/400 ergibt sich daraus eine membranäre Diffusionshemmnis von etwa 1/15.000.000 bis 1/40.000.000. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Effektes sind aber trotzdem auch signifikante transmembranäre Effekte zu erwarten, etwa nach glialer Freisetzung von Arachidonsäure (AA). Die Unterdrückung des A-Stroms kommt nicht unter Beteiligung der Cyclooxygenase, der Lipoxxygenase oder von Cytochrom P450 zustande, da Blockade dieser Enzyme den Effekt nicht verhindern. Der durch diese Enzyme nicht metabolisierte Analog ETYA ist in etwas höherer Konzentration ebenfalls wirksam, vermutlich durch spontanen Zerfall unter Freisetzung freier Fettsäureradikale. Reduzierende Substanzen wie Ascorbinsäure oder GSH blockieren den Effekt, wobei GSH in der verwendeten Konzentration nur von intrazellulär wirksam ist. Zusammen mit der intrazellulären Wirksamkeit von Arachidonsäure ergibt sich damit hochwahrscheinlich eine intrazelluläre Oxydationsstelle, möglicherweise direkt am Kanal. Untersuchungen an Expressionssystemen zeigen entsprechende Oxydations-abhängige Modifikationen von K-Kanälen. Die entgegengesetzte Modulation in diesen Systemen könnte z.B. auf der molekularen Komposition der Kanäle beruhen. In juvenilen Zellen, von denen Veränderungen der Expression von A-Strom K-Kanälen bekannt sind, konnten wir keinerlei Effekt der Arachidonsäure beobachten. Die Hemmung bestimmter A-Ströme durch Arachidonsäure kann vermutlich sowohl bei synaptischer Plastizität als auch bei Excitotoxizität prä- wie postsynaptisch unterstützend respektive schädigend wirksam werden.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ohm vom Anatomischen Institut der Charité wurden Untersuchungen zur Rolle des Amyloidproteins β A4 und von Apolipoprotein E auf die Ca-Homöostase hippokampaler Neurone und Astrozyten durchgeführt. Beide Proteine sind bekanntermaßen bei der Pathogenese des M. Alzheimer beteiligt. Unsere Untersuchungen zeigen, daß Apolipoprotein E durch β A4 ausgelöste Ca-Erhöhungen sowohl in Neuronen wie in Astrozyten erheblich verstärken kann. Diesem Mechanismus könnte eine kausale Bedeutung für den Untergang zentralnervöser Zellen beim M. Alzheimer zukommen.

Desweiteren wurden Auswirkungen des Peptids Cholecystokinin (CCK), das u.a. im Hippokampus in hoher Konzentration nachgewiesen wurde, auf hippokampale Astrozyten untersucht. Diese Untersuchungen zeigen, daß Cholecystokinin in vielen Astrozyten deutliche Ca-Erhöhungen auslöst. Dieser Effekt läßt sich auch bei Abwesenheit extrazellulären Ca auslösen, was auf eine intrazelluläre Freisetzung von Ca aus Speichern hinweist. Der Effekt wird offensichtlich durch den CCK-B Rezeptorsubtyp vermittelt, da der CCK-induzierte Ca-Anstieg durch CCK-B Antagonisten, aber nicht durch CCK-A Antagonisten blockiert wird. Da direkte neuronale Effekte von CCK eher subtil erscheinen, weisen diese Befunde möglicherweise auf Astrozyten als primäres Ziel neuronal freigesetzten CCKs hin.

Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der AG Dirnagl zur Wirkung von Ammonium auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Endothelzellen zeigte sehr unterschiedliche

Ergebnisse, denen vermutlich unterschiedliche funktionelle Zustände der Zellen zugrundeliegen.

C.4.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftliche Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Der Befund erhöhter Produktion freier Sauerstoffradikale in embryonalen humanen Ts21-Zellen (Busciglio and Yankner 1995) unterstützt die Gültigkeit des Ts-16 Mausmodells für das Down-Syndrom. Befunde von Bambrick und Kollegen bestätigen erhöhte Ca-Spiegel und ATP-abhängige Ca-Speicherung in ZNS-Zellen der Ts-16 Maus (Bambrick, Golovina et al. 1997). Für vermutete Störungen des Komplexes III der Atmungskette gab es dagegen in unseren Untersuchungen keine Hinweise. ApolipoproteinE induzierte Störungen der Ca-Homöostase wurden mittlerweile auch von einer weiteren Arbeitsgruppe als Kongressbeitrag berichtet. Für unsere bis jetzt zur Veröffentlichung eingereichten Arbeiten bzw. als Kongressbeiträge vorgestellten Arbeiten gab es sowohl von den Gutachtern wie von vielen Kollegen großes Interesse und viel Anerkennung.

C.4.5 Offene Fragen

Nach wie vor offen ist, ob die primäre Störung bei der Trisomie 16 der Maus im Ca-Stoffwechsel oder im oxidativen Stoffwechsel lokalisiert ist. Für die mitochondrialen Störungen stellt sich die Frage, ob zu der vermehrten Radikalenproduktion wie in Herzzellen die Öffnung der Transitionsprore beiträgt und ob diese Öffnung in trisomen Zellen erleichtert ist. Weiter ist unklar, ob die Störung des Komplexes I der Atmungskette zu einer vermehrten Radikalenproduktion führt oder sekundär infolge Hemmung durch oxidativen Stress zustandekommt. Offen ist auch, ob die fehlende Kompensationsfähigkeit der NADH-Synthese in trisomen Kulturen auf einen bereits basal erhöhten ATP-Verbrauch oder auf eine Anomalie des Citratzyklus zurückzuführen ist. Für die Störungen der Ca-Homöostase und der Ca-Signalgebung ist offen, ob diese durch verminderte Extrusion oder vermehrten (kapazitiven) Ca-Einstrom verursacht werden. Es ist weiter offen ob die vermehrte ATP-abhängige intrazelluläre Ca-Speicherung einen Versuch der Kompensation darstellt, ob dieser Versuch zu vermehrtem ATP-Verbrauch führt und ob die vermehrte Ca-Speicherung bzw. die erhöhten basalen Ca-Spiegel über Mitochondrien oder Fettsäurestoffwechsel zu vermehrter Produktion freier Radikale führt.

C.4.6 Literatur

Liste derjenigen Veröffentlichungen der Mitarbeiter des SFB, die in den vergangenen 3 Jahren erschienen sind, also 1995/96/97.

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug Teilprojekt

Bittner, K., and Müller, W. 1997. Transmembrane diffusion and developmental stage determine blockade of I_A by arachidonic acid through channel oxidation in hippocampal cultures of the rat, submitted.

Schuchmann S., Müller, W., and Heinemann, U., 1998. Altered Ca-signaling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mice - a model of Down syndrome., submitted.

Schuchmann S., Müller, W., and Heinemann, U., 1998. Glutathione deficiency and neuronal death in hippocampal cultures from trisomy 16 mice - a model of Down syndrome., submitted.

Müller, W., Heinemann, U., and Schuchmann S., 1997. Impaired Ca-signaling in astrocytes from the Ts-16 mouse model of Down's syndrome, *Neurosci. Lett.*, 223, 81-84. IF:2,318

Müller, W., Berlin, K., and Heinemann U., 1997. Cholecystokinin evokes Ca-accumulations in hippocampal astrocytes by CCKB-receptor activation, *J. Neurophysiol.*, in press. IF: 3,578

Stabel-Burow, J., Kleu, A., Schuchmann, S., and Heinemann, U., 1997. Glutathione levels and nerve cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mouse - a model of Down syndrome. *Brain Res.* in press. IF: 2,687

Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (noch nicht oben aufgeführt)

Müller, W., Meske, V., Berlin, K., Scharnagl, H., März, W., and Ohm, T.G., 1997. Risky ApolipoproteinE, an w-agatoxin IVa-sensitive Ca-channel and Alzheimer's disease, submitted.

Sonstige eigene Originalarbeiten

Biesalski, H.K., Bässler, K.H., Diehl, J.F., Ebersdobler, H.F., Fürst, P., Hammes, W., Kempki, O., Müller, W., and Steinhart, H., 1997. Na-Glutamat - Eine Standortbestimmung, Aktuelle Ernährungsmedizin, in press. IF: kein IF

Erdmann, S., Burkhardt, H., and Müller, W., 1997. Mapping by Ca-imaging of a carboxyterminal active site of parathyroid hormone, submitted.

- Egorov, A., Heinemann, U., and Müller, W., 1996. Activation of muscarinic M1 receptors reduces presumably presynaptic Ca-influx during blocked synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampal slice, *Neurosci. Lett.*, 214, 187-190. IF: 2,318
- Alici, K., Müller, W., and Heinemann U., 1996. Effects of glutamate receptor agonists on presumed presynaptic Ca²⁺-signals in juvenile rat hippocampal area CA1, *Neurosci. Lett.*, 214, 17-20. IF: 2,318
- Müller, W., and Swandulla, D. 1996. Perspectives in imaging of second messengers, invited review, *NIPS*, 11, 281-288. IF: 2,052
- Erdmann S., Müller, W., Vornehm S., Bruckner P., Mayer H., von der Mark K., and Burkhardt H. 1996. Differential effects of parathyroid hormone fragments on collagen gene expression in chondrocytes. *J. Cell Biol.*, 135, 1179-1191. IF: 12,480
- Müller, W., and Swandulla D., 1995. Synaptic feedback excitation has hypothalamic neural networks generate quasi- rhythmic burst activity, *J. Neurophysiol.* 73, 855-861. IF: 3,578
- Bang⁺, H., Müller⁺, W., Hans, M., Brune, K. and Swandulla, D., 1995. Activation of Ca-signaling in neutrophils induced by the mast cell released immunophilin FKBP, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 3435-3438. IF: 10,520

+The first two authors contributed equally to this work.

Buchbeiträge

- Wüstenberg, F., Berlin, K., Scharnagl, H., März, W., Ohm, T.G., and Müller, W. 1996. Complexes of Apo E-isoforms and amyloid-b peptides elevate intracellular calcium levels differentially. In: Al Snider (ed.) Proceedings of the 5th Int. Conf. on Alzheimer's disease, Wiley, Chichester, p. 383-387.
- Müller, W., Schuchmann S., Egorov, A., Gloveli, T., and Bittner, K. 1998. Microfluorometry of cellular and subcellular processing in CNS cells. in 'Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine. Eds. W. Rettig, B. Strehmel and S. Schrader. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, in press.

C.4.7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

AG T.G. Ohm, AG U. Dirnagl

D Veranstaltungen unter Beteiligung des SFB 507

(Symposien sind grau unterlegt)

Vortragender	Thema	Datum	Ort
Khramtsov, V.V. ; Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Novosibirsk, Rußland	In-vitro and in-vivo studies of new donors and acceptors of nitric oxide: Possible pharmacological applications.	07.09.95	FMP
M. Chrétien , Montreal	Processing of Neuropeptides	26.09.95	Charité
A. Aguzzi , Zürich	Molekulare Pathogenese der Prionerkrankungen	27.09.95	Charité
S. Noachtar , München	Fokale motorische Phänomene im epileptischen Anfall	06.11.95	Charité
W. Paulus , Göttingen	EEG-Quellenanalyse bei neurologischen Erkrankungen	04.12.95	Charité
A. Thron , Aachen	Diagnostik und therapeutische Perspektiven spinaler Gefäßmißbildungen	11.12.95	Charité
Prof. Dr. E. Neher ; Göttingen	Biophysikalische Aspekte der Transmitterfreisetzung in neuroendokrinen Zellen und Nervenendigungen.	03.01.96	Anatomie/Charité
Prof. Dr. D. Swandulla ; Erlangen	Immunophilins as mediators of inflammation - a novel role for FK506-binding protein FKBP12.	10.01.96	Anatomie/Charité
Dr. Volker Schmieden ; Frankfurt	Funktion und pharmakologisches Profil des inhibitorischen Glycinrezeptors und Modellierung seiner Ligandenbindung	12.01.96	Neurophysiologie Charité

Veranstungsverzeichnis

Prof. Dr. U. Misgeld ; Universität Heidelberg	GABA _A - and GABA _B receptor-mediated mechanisms in rat midbrain culture.	17.01.96	Anatomie/Charité
R. Dengler ; MHH Hannover	Funktionelle Veränderungen motorischer Einheiten bei Motoneuron-Krankheiten	22.01.96	Neurologische Klinik
Prof. Dr. B. Windblad ; Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden	Alzheimer's disease: Clinic, management and future treatments.	24.01.96	Anatomie/Charité
G. Curio ; FU Berlin	Biophysikalische Grundlagen und klinische Perspektiven neuromagnetischer Meßtechnik	29.01.96	Neurologische Klinik
Prof. Dr. U. Rapp ; MSZ, Universität Würzburg	Rolle der Raf Kinasen bei Proliferation und Differenzierung.	31.01.96	Anatomie/Charité
Dr. Terlau ; Göttingen	Aktivierung und Regulation heterologisch exprimierter Kaliumkanäle	02.02.96	Neurophysiologie, Charité
K. Poeck ; RWTH Aachen	Tutorielle Expertensysteme in der Neurologie	05.02.96	Neurologische Klinik
Dr. T. Naumann ; Universität Freiburg	Axotomie induzierte Veränderungen im Septumkomplex der Ratte: Welche Rolle spielt der neurotrophe Faktor NGF?	07.02.96	Anatomie/Charité
B.-U. Meyer ; HU Berlin	Die diagnostische Erschließung des kallosalen motorischen Systems mit der transkraniellen magnetischen Kortextstimulation	12.02.96	Neurologische Klinik
Prof. Dr. G. Schwach ; Universität Göttingen	Subzelluläre Lokalisation und Regulation cAMP-abhängiger Proteinkinasen.	14.02.96	Anatomie/Charité
Ulrich Müller	Analysis of integrin functions by molecular genetic approaches	19.02.96	MDC

Veranstungsverzeichnis

Symposium: Choi, Klockgether, Beyreuther, Hohlfeld	Impact of modern neuroscience on clinical neurology	24.02.96	Charité, Berlin
Pfrieger , F., USA, Stanford	‘Glial cells promote synapse formation between retinal ganglion cells in vitro’	26.02.96	MDC
Symposium: Robert Nitsch und Thomas G. Ohm	“Entorhinal-Hippocampal interaction”	27.02.96	Anatomie/Charité
Dr. Rolf Klee ; Berlin	Eigenschaften von K ⁺ -Strömen in akut isolierten hippokampalen Neuronen	08.03.96	Neurophysiologie, Charité
Laborseminar: Bildgebende Methoden zur Darstellung von Schadensmechanismen		01.04.96	Institut für Physiologie
Prof. Dr. L. Szeress ; University of Pecs, Hungary	Species differences of neuronal connections between rodents and primates.	03.04.96	Anatomie/Charité
Prof. Dr. J. Bockaert ; CRNS, Montpellier, France	Glutamate metabotropic receptors — structure, function and transduction.	10.04.96	Anatomie/Charité
Prof. Dr. W. Grodd ; Neuro-radiologische Abt., Radiol. Unikliniken, Tübingen	Volumenselektive Protonen-Spektroskopie des Gehirns.	17.04.96	Anatomie/Charité
Prof. Dr. D. Kömpf ; Lübeck	Kortikale Organisation von Augenbewegungen	22.04.96	Neurologie
Prof. Dr. B. Anderton ; Institute of Psychiatry, London, U.K.	Molecular mechanisms of neurofibrillary pathology in Alzheimer’s disease.	24.04.96	Anatomie/Charité
Brust , Peter; Forschungszentrum Rossendorf	Regulation der Blut-Hirnschranke durch vasoaktive Faktoren.	25.04.96	Blasig, FMP

Veranstungsverzeichnis

Prof. Trimble , Institute of Neurology, London, England	Clinical journey through the frontal lobe	29.04.96	Neurologische Klinik
Prof. Faber	Biophysical basis of inhibition: Lessons from the Mauthner cell circuitry an from cultured synapses	02.05.96	Graduiertenkolleg
Prof. Dr. M. Lauritzen ; Lab of Clinical Neuro-physiology, Glostrup, DK	Pathophysiology of Migraine: The Spreading Depression Hypothesis	08.05.96	Anatomie/Charité
Seega , Ludwigshafen	Stoke therapy with ancrod: Preclinical MRI studies	09.05.96	Charité
Dr. C. Kaltschmidt ; Biochemisches Institut, Albert Ludwig Universität Freiburg	Signalcascades activating transcription factor NF-kB in the nervous system.	15.05.96	Anatomie/Charité
Dr. T. Sander ; Neurologische Klinik	Molekulargenetische Befunde bei idiopathisch generalisierten Epilepsien	20.05.96	Neurologische Klinik
Prof. Dr. S. File ; Psychopharmacology Research Unit, London, UK	Psychopharmacology of Anxiolytics	22.05.96	Anatomie/Charité
Prof. Dr. H. Mourek ; Karls Univ. Prag	Fettsäuren und Entwicklung des ZNS	23.05.96	Universitätsklinikum Charité, Forschungshaus
Prof. O. Pongs ; Zentrum f. Mol.Neuro-Biol.; Inst. f. Neuronale Signalverarbeitung, Hamburg	Molecular biology of voltage gated K ⁺ channels	24.05.96	Graduiertenkolleg
PD Dr. H. Jarry ; Frauenklinik, Abt. f. Klin. und Exp. Endokrinol., Göttingen	Neuroendokrinologische Regulationsprozesse im Hypothalamus.	29.05.96	Anatomie/Charité
Symposium : Frahm, Freund, Turner, Flor, Birbaumer, Kleinschmidt, Thrams, Cohen	1st Berlin International Conference on Cortical Plasticity	01.06.96	Neurologische Klinik

Veranstungsverzeichnis

Prof. Dr. M. Dietrich ; LMU München	Topische Hirnstammdiagnostik anhand von Augenbewegungsstörungen	03.06.96	Neurologische Klinik
Prof. Dr. I. Soltesz ; Anatomy and Neurobiol., Univ. of California, Irvine, U.S.A.	Functional Organization and Plasticity of Hippocampal GABAergic Inhibition.	05.06.96	Anatomie/Charité
Uwe Drescher	Eph receptor tyrosine kinases and axonal guidance	05.06.96	MDC
Prof. Wadman	Changes in properties of outward K ⁺ -channels in chronically induced epileptic tissue	07.06.96	
Dr. Thomas Mittmann ; Seattle, USA	Über die Ergebnisse zu bildgebenden Meßverfahren von Natrium-Konzentrationsänderungen in kortikalen Nervenzellen	10.06.96	Neurophysiologie, Charité
Prof. Dr. B. Nixon ; Ralph Lowell Labs, Harvard Med. Sch. McLean Hosp. Belmont, USA	Proteolytic systems and vesicular trafficking in Alzheimer's disease.	12.06.96	Anatomie/Charité
Prof. Dr. O. Pongs ; Zentrum für Mol. Neuro-biol., Inst. f. Neurale Signalverarb., Hamburg	Funktionelle Bedeutung Schnell Inaktivierender Kalium-Kanäle im ZNS der Säuger.	19.06.96	Anatomie/Charité
Prof. Spudich ; Houston, Texas, USA	Bacterial Phototaxis	21.06.96	Charité
Prof. Dr. John S. Kelly ; Univ. Edinburgh	5-HT receptors in the central nervous system	24.06.96	Neurophysiologie Charité
Pico Caroni	Intrinsic determinants of neurite outgrowth and synaptic plasticity	26.06.96	MDC
Prof. Dr. M Gratzl ; Institut für Anatomie, TU München	Proteine des Exozytoseapparates endokriner Zellen.	26.06.96	Anatomie/Charité

Veranstungsverzeichnis

Prof. Dr. H. D. Schmidt ; Physiologie; FU Berlin	Adaptation isolierter Rattenherzen nach abrupter Änderung der Calcium-Konzentration: ein bisher unbekannter kardialer Regelmechanismus	28.06.96	Physiologie, FU Berlin
Prof. Isaac Parnass , Prof. Hanna Parnass ; Israel	Is the presynaptic autoreceptor the voltage sensor which regulates the time course of transmitter release in fast synapses?	01.07.96	Neurophysiologie, Charité
Dr. R. Banati ; MCR Clinical Sciences Centre, London, U.K.	Imaging microglial activation in vivo.	03.07.96	Anatomie/Charité
Prof. Galla ; Münster	Lipid-Protein-Monoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche als Modelle des alveolaren Lungensurfactants	10.07.96	Medizinische Physik und Biophysik, Charité
Prof. Dr. D. N. Stephens , Lab. of Exp. Psychol., Univ. Sussex, Brighton, U.K.	A glutamatergic hypothesis of drug dependence.	10.07.96	Anatomie/Charité
Herde , J., Univ. Halle	‘Retinale Tumore - eine Standortbestimmung und neue Optionen in der Therapie’	11.07.96	Neurophysiologie+D70
Symposium des Projektbereichs B Rothe, Herde, Voges, Patt, Babrakakis, Wiestler, Westphal u.a.	„Physiologie und Beeinflussung glialer Tumore“	11.07.96	MDC
Prof. Pepperberg ; Chicago, USA	Lifetime of Rhodopsin	12.07.96	Charité
Martin Grumet	Multiple interactions of receptor protein tyrosine phosphatase b with neural cell adhesion molecules	03.08.96	MDC
Bernarding , Berlin	NMR-Diffusions-Bildgebung des Gehirns	15.08.96	Charité

Veranstungsverzeichnis

Markus A. Rüegg	The role of agrin and its binding proteins in synapse formation	21.08.96	MDC
Symposion: Aguzzi, Brandner, Klein, Raeber	Prion Diseases	27.08.96	Charité
Stavrou , Hamburg	Monoklonale Antikörper gegen gliomassoziierte Antigene	29.08.96	Charité
Peter Sonderegger	Neuroserpin, a neuron-specific axonally secreted serine protease inhibitor	11.09.96	MDC
Peter Sonderegger	NgCAM and axonin-1 as components of the pathway sensor apparatus of growth cones	12.09.96	MDC
Jonathan A. Raper	Repellent cues and growth cone guidance	16.09.96	MDC
Lückermann , Göttingen	Ca ²⁺ -abhängige intrazelluläre pH-Änderungen in hippocampalen CA1 Neuronen in vitro	17.09.96	Graduiertenkolleg
Dr. Stanewsky ; Waltham, USA	Luciferase as a new reporter to study circadian rhythms in living Drosophila individuals	23.09.96	Neurophysiologie, Charité
Dr. Johannes Bernarding , Berlin	Diffusionswichtige Bildgebung beim Hirninfarkt	26.09.96	Neurologische Klinik
Symposion	Calcium Signalling	28.09.96	MDC
Symposion: Einhäupl, VillringerArnold, Lempert, Weber, Harms, Zschenderlein, Egert, Schielke	"State of the Art" in der neurologischen Therapie.	01.10.96	Neurologische Klinik

Veranstungsverzeichnis

Prof. A. Marty	Synaptic transmission in the cerebellum	02.10.96	MDC
Prof. Joel Yaari ; Israel	Functional and structural changes in synaptic NMDA receptors in the developing hippocampus	09.10.96	Neurophysiologie, Charité
Eggsdorf-Symposion des Graduiertenkollegs		18.10.96	Graduiertenkolleg
Jürgen Behrens	The E-cadherin/catenin complex in cell adhesion and signal transduction	23.10.96	MDC
Dr. Elisabeth Koss ; Cleveland University	Alzheimer`s Disease from a Neuropsychological Perspective	29.10.96	Neurologische Klinik
Prof. Sakmar ; New York, USA	Visual Transduction	30.10.96	Charité
Prof. Dr. Wolf	Reflex-Epilepsien	31.10.96	Virchow, Berlin
Llano , I., Göttingen, MPI	„Ca- Imaging in cerebellar slices“	01.11.96	Physiologie, Charité
Meeting der neurowissenschaftlichen Forschungsgruppen am MDC		01.11.96	Bogensee
Robert A. Weinberg , USA	Berlin Lecture on Molecular Medicine 1996: Cyclin and the control of the cell cycle	07.11.96	MDC
Khramtsov , V.V.; Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Novosibirsk, Rußland	The role of nitric oxide in stress-induced hypertension and in the regulation of mitochondrial permeability transitions.	07.11.96	FMP

Veranstungsverzeichnis

Symposium des Projektbereich C: Beyreuther, Hamprecht, Lassmann u. a.	Funktionen nicht-neuronaler Zellen bei degenerativen und regenerativen Prozessen im Zentralnervensystem	08.11.96	Anatomie/Charité
Dr. T. Lempert ; Berlin	Otolithen-Erkrankungen und Schwindel	11.11.96	Neurologische Klinik
Prof. McGeer	Immune response of the brain	13.11.96	Charité
Dr. H. Meierkord	Optische Messung epileptischer Aktivität	14.11.96	Virchow, Berlin
PD M. Schabet ; Tübingen	Therapeutische Prinzipien bei malignen Hirntumoren	25.11.96	Neurologische Klinik
Adrian Pini	Axon guidance by chemorepulsion	27.11.96	MDC
Sander	Genetik der idiopathischen generalisierten Epilepsien	28.11.96	Virchow, Berlin
Prof. Wittinghofer ; Dortmund	p21-ras and GAP	05.12.96	FU Berlin
Prof. Dr. M. Dietrich ; München	Topische Hirnstamm-Diagnostik anhand von Augenbewegungsstörungen	09.12.96	Neurologische Klinik
Symposium	Neuronale Zellkulturen als Ersatz für Tierversuche bei Untersuchungen zur zerebralen Ischämie: Neurotoxizität und neuroprotektive Wirkung von Pharmaka	11.12.96	MDC

Veranstungsverzeichnis

Prof. Dr. H. Flor ; Berlin	Chronischer Schmerz: Neue Aspekte der Pathophysiologie und Therapie	16.12.96	Neurologische Klinik
Prof. Krishtal ; Ukraine	K, Na-gated K conductance in hippocampal neurons	19.12.96	Neurophysiologie, Charité
Prof. Lohse ; Würzburg	G-Protein ab-Untereinheiten	10.01.97	FUBerlin
Prof. Dr. J. Bogousslavsky ; Lausanne	Progressive Stroke	13.01.97	Neurologische Klinik
Dr. Hättig , Neuropsychologie UKRV, Berlin	Lateralisierte Gedächtnisfunktionen bei Temporallappenepilepsie	16.01.97	Virchow, Berlin
Symposium des Projektbereich A : Resch, Dermietzel, Wiestler u.a.	Funktionen nicht-neuronaler Zellen bei akuten ZNS Erkrankungen	20.1.97	Neurologische Klinik
Dr. Andrea Streit	Neural Induction and competence	21.01.97	MDC
Prof. Kretschmar Göttingen	Prionkrankheiten	22.01.97	Charité
PD O. Witte ; Düsseldorf	Späteeffekte und Ferneffekte nach fokalen zerebralen Ischämien: Sekundäre Schädigung und reaktive Plastizität	27.01.97	Neurologische Klinik
Prof. Trimble , Institute of Neurology, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, England	The effect of seizures on the individual and society	30.01.97	Virchow, Berlin
Prof. Dr. P. Marx ; Berlin	Stroke Units - Die Antwort der Neurologen auf ein aktuelles Problem? Erste Erfahrungen und Ausblick	10.02.97	Neurologische Klinik

Veranstungsverzeichnis

Scheuler	Negative motorische Phänomene bei Epilepsie	13.02.97	Virchow, Berlin
Kolloquium	Die Rolle von Mikrogliazellen bei Erkrankungen des Nervensystems	19.02.97	MDC
Dr. Frances Edwards , London	ATP - a fast transmitter. How is it different from glutamate	07.03.97	MDC
Mathias Burg ; Schering, Berlin	Steroid-induzierte GABAA-rezeptorvermittelte depolarisierende PSPs in der CA1-Region des Hippocampus der Ratte	19.03.97	Neurophysiologie, Charité, Berlin
Dr. Jean Lauder , USA	GABA as a trophic signal for embryonic monoamine neurons but negative signal for GABA neurons	19.03.97	MDC
Oliver Hobert	Lim homeobox genes and neural development in the nematode <i>C.elegans</i>	25.03.97	MDC
Prof. Dr. T. E.; DeCoursey , USA	Physiology of ion channels in Leukocytes	07.04.97	Neurophysiologie, Charité, Berlin
Symposion	Der Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie in Anatomie und Physiologie	07.04.97	MDC
Dr. Heinz Beck ; Bonn	Ca ²⁺ -activated K ⁺ -currents in human hippocampal neurons	09.04.97	Neurophysiologie, Charité, Berlin
Prof. Dr. T. E., DeCoursey , USA	Voltage-gated proton channels: mechanisms of gating and permeation by protons	09.04.97	Neurophysiologie, Charité, Berlin
Dr. Emil Toescu , Birmingham, UK	Mechanismen des kapazitiven Kalziumeinstroms in Mikrogliazellen in aktivierten Astrozyten	09.04.97	MDC

Veranstungsverzeichnis

Prof. Dr. E. Torebjörk ; Uppsala	Novel classes of nociceptors in human skin and their role in pain and hyperalgesia	05.05.97	Neurologische Klinik
Dr. H. Haberl ; Berlin	Indikationen und Operationstechnik des ventrikuloperitonealen Shunts	26.05.97	Neurologische Klinik
Carter , Adrian; Boehringer Ingelheim KG	Zukünftige neuroprotektive Strategien für die Behandlung des menschlichen Schlaganfalles.	27.05.97	Blasig, FMP
Esther T. Stoeckli	Molecular mechanisms of commissural axon pathfinding	28.05.97	MDC
Szabo , Andrea; Biological research center, Hungarian Academy of Sciences	Production of vasoactive agents in different cerebral endothelial cells.	29.05.97	Blasig, FMP
Prof. Dr. Anders Björklund, University of Lund	„Neural transplantation in Parkinson's disease: Present status and future perspective	04.06.97	Charité
Prof. Somjen ; USA	Cellular Physiology of Cerebral Hypoxia	06.06.97	Neurophysiologie, Charité, Berlin
Symposium	Functions of Glial Cells	07.06.97	Bogensee
Prof. Dr. A. Straube ; München	Augenbewegungs-Störungen und Kleinhirn	09.06.97	Neurologische Klinik
Prof. Sprinzi ; Bayreuth	Steuerung der Proteinbiosynthese durch GTPasen	12.06.97	Charité
Prof. Dr. C. E. Elger ; Bonn	Temporallappenepilepsie und Gedächtnis	23.06.97	Neurologische Klinik

Veranstungsverzeichnis

Andrew J.W. Furley	Analysis of mice carrying mutations in the neural cell adhesion molecules TAG-1 and L1	25.06.97	MDC
Gemeinsames Meeting der Berliner Neurowissenschaftlichen SFBs und Graduiertenkollege		4./5.7.97	Bogensee
Dr. W. Reith ; Heidelberg	Diffusions- undperusions-Bildgebung bei akuter zerebraler Ischämie	07.07.97	Neurologische Klinik
Prof. Schultz ; Berlin	Rezeptor-G-Protein Interaktion	09.07.97	Charité
Bähr , Tübingen	Leben und Tod im Nervensystem: Molekulare Grundlagen neuraler Reparaturmechanismen	21.07.97	Charité
Symposion : Einhäupl, Dirnagl, Beyreuther, Heiss, Jendroska, Villringer, Aguzzi	Demenz: Ende des Nihilismus	24.07.97	Hilton Hotel, Berlin
Michael Hortsch	Molecular functions of the L1 family of cell adhesion molecules...	13.08.97	MDC
Engelhardt , Bad Nauheim	Mechanisms of lymphocyte migration across the blood-brain barrier	18.08.97	Charité
Paul G. Layer	Retinospheroids: complete reconstitution of a vertebrate retina from fully dispersed cells	20.08.97	MDC
Symposion : Burmester, Buttgereit, Hiepe, Krause, Priem, Einhäupl	Rheumatisch-Neurologische Systemerkrankungen	30.08.97	Charité, Berlin
Symposion : Wiestler, Pietsch, Weggen Waha u. a.	Molekulare Pathogenese des Medulloblastoms, Tumore des Nervensystems: ein Modell f. Humane PNETs usw.	02.09.97	Charité

Veranstungsverzeichnis

Susan Kenwick	Neural cell adhesion molecule L1: lessons from a human disease	10.09.97	MDC
Symposion: Einhäupl, Bachus, Kllier Meier, Zierz	Amyotrophe Lateralsklerose	13.09.97	Charité, Berlin
Prof. Sergej Korogod , Dnjepropetrowsk, Rußland	Electro-geometrical coupling in morphologically complex neurons	22.09.97	MDC
Prof. Quingming Luo , Wuhan, China	Optical Imager of the Human Brain	23.09.97	Neurologische Klinik
Prof. Dr. Arno Villringer	Neurovascular Coupling	01.10.97	Neurologische Klinik
Sidney Strickland ; Stony Brook University, Dept. of Pharmacology New York, USA	Proteases, the extracellular matrix, and neuronal death in the mouse central nervous system	15.10.97	Anatomie/Charité
Prof. Dr. P. Lavie ; Israel	Melatonin - the key to sleep gate	20.10.97	Neurologische Klinik
Prof. Krishtal ; Kiew	Excitatory connectivity between CA1 pyramidal cells mediated by NMDA receptors	20.10.97	Neurophysiologie, Charité
Wieland B. Huttner ; Universität Heidelberg	Biogenesis of neurosecretory vesicles	22.10.97	Anatomie/Charité
Dr. J. Bernarding , Berlin	Diffusionswichtende Bildgebung beim Hirninfarkt	27.10.97	FU/Bejamin Franklin
Symposion: Einhäupl, Lempert, von Pannwitz, Weber, Schmitz, Valdueza, Wolf, Arnold, Schielke, Dreier	Der neurologische Notfall.	01.11.97	Neurologische Klinik

Veranstungsverzeichnis

Klaus Unsicker ; Universität Heidelberg Institut für Anatomie und Zellbiologie	Functions of transforming growth factors β in the nervous system	05.11.97	Anatomie/Charité
Dr. Alessandro Cellerino	Physiological, pharmacological, and pathological actions of brain derived neurotrophic factor in the retina	05.11.97	MDC
Symposium New approaches to liposomal transfection -Performance characteristics and Transfection in applications		06.11.97	Karl-Lohmann Raum, MDC
Arnold R. Kriegstein ; Columbia Physicians & Surgeons Dept. of Neurology New York, USA	Unusual roles for amino acid transmitters during neocortical development	12.11.97	Anatomie/Charité
Dr. J. Weber ; Neurologie	Bakterielle Meningitis: Pathophysiologie und adjuvante Therapie heute!	17.11.97	Neurologische Klinik
Rudolf Jaenisch ; Whitehead Institute, MIT Boston, USA	DNA methylation and imprinting: who needs it anyway	19.11.97	Anatomie/Charité
Dr. René Pumain ; Paris	4-Aminopyridin induces activities in the hippocampus and neocortex	24.11.97	Neurophysiologie, Charité
Prof. Dr. S. Willich , Berlin	Epidemiologie atherothrombotischer Erkrankungen	24.11.97	FU/Bejamin Franklin
Dr. Denise Manahan-Vaughan ; Dublin, Irland	Metabotropic glutamate receptors as bidirectional modulators of synaptic plasticity	25.11.97	Neurophysiologie, Charité
Roland Martin ; NIH, Neuroimmunology Branch Bethesda, USA	Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis from cellular immunology to novel treatments	26.11.97	Anatomie/Charité
Dr. Hans-Herrmann Gerdes	Sorting and vesicular transport of chromogranin B imaged with GFP	26.11.97	MDC

Veranstungsverzeichnis

Prof. Weissman ; Zürich	Prion Diseases	27.11.97	Charité
Dr. H. Haberl ; Berlin	Indikation und Technik der Shunt-Anlage beim Hydrocephalus	01.12.97	Neurologische Klinik
Onur Güntürkün ; Ruhr-Universität Bochum Fakultät für Psychologie AE Biopsychologie	Zur Genese von Gedächtnis aus biologischer Materie - Untersuchungen an neuronalen und virtuellen Schaltkreisen	03.12.97	Anatomie/Charité
Prof. Dr. M. Kaps , Lübeck	Neue technische Entwicklungen der neurovaskulären Ultraschalldiagnostik	08.12.97	FU/Bejamin Franklin
Wolfgang Kuschinsky ; Universität Heidelberg Physiologisches Institut	Mikrozirkulation und Glucosetransporter im Gehirn	10.12.97	Anatomie/Charité
Dr. Dietmar Kuhl	Synaptic Plasticity: Learning about activity-dependent genes	10.12.97	MDC
Prof. Dr. Ohm ; Anatomie	Altern, Apolipoprotein E und Alzheimersche Erkrankung	15.12.97	Neurologische Klinik
Peter Janich ; Universität Marburg Institut für Philosophie	Woher haben die Neurowissenschaften ihre Gegenstände? Philosophische Bemerkungen aus der Sicht des methodischen Kulturalismus	17.12.97	Anatomie/Charité
Dr. Ruth Empson ; Birmingham, England	Calcium-induced calcium release in neurons and its modulation by cyclic ADP ribose, a metabolite of NAD	18.12.97	Neurophysiologie, Charité
Rodney Murphey ; University of Massachusetts; Neuroscience & Behavior Program; Massachusetts, USA	Searching for the molecular engram: CaMKII and habituation in Drosophila	07.01.98	Anatomie/Charité

Veranstungsverzeichnis

PD Dr. Müller-Felber ; München	Prognose und Verlauf entzündlicher Myopathien	12.01.98	Neurologische Klinik
Richard Miles ; Institute Pasteur Lab Neurobiology CellParis, Frankreich	On the functional diversity of synaptic inhibition in the hippocampus	14.01.98	Anatomie/Charité
Prof. Dr. Bo Norrving , Lund; Schweden	Quality systems in stroke care and therapy	19.01.98	FU/Bejamin Franklin
Menahem Segal ; Weizman Institute, Dept. of Neurobiology, Rehovot, Israel	Dendritic spines: regulation of growth and function	21.01.98	Anatomie/Charité
Prof. Dr. Helmchen , Berlin	Forschung mit nichteinwilligungsfähigen Patienten	26.01.98	Neurologische Klinik
Etty Benveniste ; University of Alabama Dept. of Cellbiology	Cytokine Modulation of glial cell gene expression	28.01.98	Anatomie/Charité
Priv.-Doz. Dr. Dr. T.R. Tölle , München	Molekulare Mechanismen der Chronifizierung von Schmerzen	02.02.98	FU/Bejamin Franklin
Roger Tootell ; MGH NMR-Center Charlestown, USA	From retinotopy to recognition: functional MRI studies of human visual cortex	04.02.98	Anatomie/Charité
Prof. Dr. Stöhr ; Augsburg	Radikuläre Syndrome - klinische und elektrophysiologische Diagnostik	09.02.98	Neurologische Klinik
Rodolfo R. Llinas ; New York University, Medical Center-New York, USA	Calcium concentration microdomain and the molecular events triggered during synaptic release	11.02.98	Anatomie/Charité

E Gäste des SFB 507

Name	Herkunft	Zeitraum	Projekt
Victorov, Ilya	Rußland, Moskau	95/96/97/98 (je 3 Monate)	A1
Gutiérrez, Rafael	Mexiko	01.06.96	C3
Armand, Vincent	Frankreich, Paris	07.12.97	C3
DeCoursey, Thomas E.	USA, Chicago	05.-11.04.97	C3
Hetka, Robert	Tschechien, Prag	01.09.-30.11.97	C3
Wittner, M.	Tschechien, Prag	08/96-05/97	C3
Bilkey, D.	Neuseeland	05.12.96	C3
Rodríguez-Tébar, A.	Spanien, Madrid, Instituto Neurobiologia Cajal	15.08.-15.09.95	B4
Szeress, L.	Ungarn, Pécs	10-12/95; 05-06/96	C1
Horvath, T.	USA, New Haven		C2
Collins, James	USA		B3
Fernandez-Alfonso	Spanien, Maria Soledad	11.12.95	A4
Peter, Markus	England, Cambridge	08.12.96	A4
Gasc, Jean-Marie	Frankreich, Paris	03.04.97	A4
Goni, Guillermo	Spanien, Bilbao	06.12.97	A4
Schumann, Pascale	Caen, Frankreich	seit 01/98	A1
Bille, Margarete	Kopenhagen, Dänemark	seit 08/97	A3
Iurato, Linda	Palermo, Italien	seit 8/97	A1/2
Liao, Weijing	Wuhan, China	6/96-12/97	A1

F Kongreßbesuche 1997

Projekt	Teilnehmer/Name	Kongreß/Ort	Zeitraum	Ausgabe durch SFB in DM
A1	Dreier	Meeting SFB, Bogensee	04.07 - 05.07.97	213
A1	Dreier	Neuroscience Meeting, New Orleans	24.10 - 31.10.97	2455
A3	Freyer	Neuroscience Meeting, New Orleans	24.10 - 01.11.97	1956
A3	Weber	Meeting SFB, Bogensee	04.07 - 05.07.97	139
A3	Weber	Meeting, Projektplanung, Vorträge Toronto/Montreal	27.09 - 01.10.97	2499
A3	Angstwurm	Neuroscience Meeting, New Orleans	24.10 - 30.10.97	2145
A4	Paul	Scientific Congress of the American Heart Association	1 Woche in 11/95	2500
A4	Yu	Scientific Congress of the American Heart Association	1 Woche in 11/96	800
A4	Scmitt-Ott	5 th International Conference on Endothelin	12.-17.09.97	2500
B4	Grantyn	Neuroscience Meeting, New Orleans	24.10 - 31.10.97	3905
C1	Hass	Meeting SFB, Bogensee	04.07 - 05.07.97	213
C1	Ninnemann	Neuroscience Meeting, New Orleans	20.10 - 30.10.97	1688,
C1	Skutella	Neuroscience Meeting, New Orleans	20.10 - 31.10.97	340
C1	Nitsch	Neuroscience Meeting, New Orleans	24.10 - 30.10.97	2202
C2	Ohm	Meeting SFB, Bogensee	04.07 - 05.07.97	139
C2	Meske	Anatomenkongreß, Würzburg	01.10 - 02.10.97	105
C2	Hamker	Anatomenkongreß, Würzburg	01.10. - 02.10.97	672
C2	Jacobi	Anatomenkongreß, Würzburg	01.10 - 02.10.97	59
C2	Ohm	Jahrestagung d. Ges. F. Neuropath., Magdeburg	08.10 - 11.10.97	125
C2	Jacobi	Jahrestagung d. Ges. f. Neuropath., Magdeburg	10.10.97	161

Kongreßbesuche 1997

<i>Projekt</i>	<i>Teilnehmer/Name</i>	<i>Kongreß/Ort</i>	<i>Zeitraum</i>	<i>Ausgabe durch SFB in DM</i>
C3	Heinemann	Neuroscience Meeting NewOrleans	25.10.-09.11.97	3000
C4	Müller	Tagung Dt. Physiolog. Ges. , Rostock	11.03. - 14.03.97	430
C4	Müller	Präsentation, Kongreß Int.K-Kanal, Ulm	16.07 - 19.07.97	178
C4	Müller	Posterpräsentation, Neu- robiologentagung, Göt- tingen	22.05 - 25.05.97	141
C4	Müller	Meeting SFB, Bogensee	04.07 - 05.07.97	160
C4	Müller	Neuroscience Meeting, New Orleans	23.10.97 - 31.10.97	2399
gesamt				31631

Berlin 1998

Redaktion: U. Dirnagl und T. Wolf

Drucklegung am 27.02.98

gedruckt und gebunden bei

Schmohl & Partner

Berlin - Weißensee