

1. Allgemeiner Teil

a) Wissenschaftliche Entwicklung des Sonderforschungsbereichs

Auch in der laufenden Antragsperiode hat sich die Vernetzung der Projekte (s.u.), auch über die Projektbereiche hinaus, weiter fortgesetzt, was durch eine hohe Zahl gemeinsamer, teils hochrangiger Publikationen belegt wird.

Einige wichtige Befunde der laufenden Antragsperiode, welche international Beachtung fanden und in sehr guten bis ausgezeichneten Journalen publiziert werden konnten:

- Charakterisierung eines im wesentlichen nicht-neuronalen Mechanismus, der Infarkte produzieren kann und für Migräne-induzierte Infarkte verantwortlich sein könnte.
- Beschreibung eines unerwartet hohen physiologischen Turnovers von Mikroglia in der Maus durch Zellen aus dem Blut.
- Erstbeschreibung neuronaler Phänotypen im Cerebellum, welche Hinweise auf deren Ursprung aus dem Blut bzw. Knochenmark lieferten.
- Beschreibung des geringen Transdifferenzierungspotentials von nach experimentellem Schlaganfall aus dem Blut ins Hirn eingewanderten Entzündungszellen.
- Aufklärung der zerebrovaskulär modulatorischen Wirkung von Nitric Oxide über Aktivierung von Kaliumkanälen an glatten Gefäßmuskelnzellen
- Nachweis dass die mikrogliale Eisenaufnahme durch translationelle Regulation des Ferritins während Hypoxie gesteigert und in der posthypoxischen Reoxygenierung stark eingeschränkt ist.
- Identifizierung von neuen molekularen Mechanismen der Zellschädigung durch bakterielle Toxine und Zellwandkomponenten, und daraus Entwicklung von adjuvanten Therapieansätzen.
- Nachweis, dass T-Zellen strukturell neuroprotektiv wirken können und darüber hinaus das axonale Wachstum über lösliche Faktoren stimulieren bzw. hemmen können.
- Direkter Nachweis in lebendem Hirngewebe, dass T-Zellen antigenunabhängig durch direkten Kontakt zu einem pathologischen Calcium-Anstieg in Nervenzellen und zu konsekutivem neuronalen Schaden führen können.
- Beschreibung der Rolle des TRAIL-Signalwegs als Schadensvermittler und Immunregulator sowie als Therapiemarker bei der MS
- Aufklärung der Mechanismen, über den Thrombin neuro- und immunoregulatorische Zytokin- und Chemokine in Hirnmakrophagen/Mikroglia induziert
- Nachweis, dass mitochondriale metabolische Funktionen (NAD(P)H Generierung) wesentlich über zytoplasmatische/mitochondriale Kalziumerhöhungen reguliert werden und ROS-vermittelt während Status epilepticus schwer geschädigt werden.
- Nachweis dass NO bei der Aufrechterhaltung eines Status epilepticus beteiligt ist.
- Nachweis, dass Mikrogliazellen und neuronale Stammzellen das Tumorstadium beeinflussen.
- Erkenntnis, dass laufende Studien zur Tumorbildung mittels Eisenchelierung kritisch hinterfragt werden müssen, weil Proliferationshemmung von Gliomzellen mittels DFO auf Kosten einer erhöhten Tumorzellinvasion erfolgt .
- Ein oxidiertes Zerfallsprodukt von Myelinscheiden führt in im Liquor von MS-Patienten vorkommenden Konzentrationen im Tiermodell der Autoimmun-enzephalomyelitis zur Schädigung von Neuronen über die Aktivierung der MAPK und PARP-1 in Mikrogliazellen.

Allgemeiner Teil

b) Entwicklung der Kooperation im Sonderforschungsbereich

Die Kooperation der Projekte im SFB entwickelt sich weiter sehr positiv. Dies bezieht sich auf methodische Unterstützung (z.B. Generation von Chimären, Läsionsmodelle, 2-Photonenmikroskopie, etc.), aber erfreulicherweise auch sehr stark auf inhaltliche Aspekte. Dies wird ganz besonders deutlich, wenn man die gemeinsamen Publikationen betrachtet:

| Projekt | Projektleiter | Gemeinsame Publikationen mit Projekt |
|---------|------------------------------|---|
| A1 | Dreier, Einhäupl | A5, A6, A9, C3 |
| A5 | Priller, Dirmagl | A1, A6, A9, A10, B6, B11, B16, C10, C11 |
| A6 | Lindauer | A1, A5, A9, A10, B6 |
| A9 | Endres | A1, A5, A6, A10, B6, B11, B14 |
| A10 | A.Meisel, Prass, C.Meisel | A1, A5, A6, B6 |
| B6 | Weber/Braun | A1, A5, A6, A9, C10 |
| B11 | Müller-Röver, Nitsch | A5, A9, B14, B16, C3, C7, C10 |
| B14 | Zipp | A9, B11, B16 |
| B16 | Bechmann | A5, B11, B14, |
| B17 | Meyer, Szczepek | |
| C3 | Kann, Heinemann | A1, A5, B11, C10 |
| C7 | Eder, Schilling | B11, C3, C12 |
| C10 | Kettenmann | A5, B11 |
| C11 | Kempermann | A5 |
| C12 | Friedman, Heine- mann | A1, A5, B11, C10 |
| C13 | Kloetzel, Dahlmann | |

Dabei wird auch deutlich, dass auch neu aufgenommene Projekte sich bereits in die Themen und Methoden des SFBs integriert haben, und bereits erfolgreiche Kooperationen existieren.

Die Zusammenarbeit im SFB funktioniert also sehr effektiv auf Projektebene. Neben den Projektgruppentreffen und den Plenumsveranstaltungen des SFB existieren daneben eine Reihe von strukturellen Massnahmen, welche die Kooperation, auch mit Berliner Neurowissenschaftlern ausserhalb des SFB, fördern:

- *Neurowissenschaftliches Kolloquium der Charité* (wöchentlich, durch SFB 507 organisiert und mitfinanziert): Die eingeladenen Sprecher des Kolloquiums repräsentieren die gesamte Breite der Forschung im SFB und dessen Umfeld, das Kolloquium ist damit auch eine gemeinsame Plattform der Information und der Diskussion unter den Projekten.
- Der SFB ist auch Hauptträger des *Berlin Neuroscience Forum* (BNF). Das BNF ist ein in 2-jährigem Turnus stattfindender Retreat aller Berliner Neurowissenschaftler. Er findet ausserhalb Berlins statt (nächstes Meeting: 22.-24.April 2004). Für in Projekten aktive Studenten werden die Übernachtungs- und Reiskosten übernommen. Beim BNF präsentieren sich neu in Berlin arbeitende Wissenschaftler ('Welcome sessions') sowie Nachwuchswissenschaftler ('Young investigator sessions'). Ausserdem sind internationale keynote speakers eingeladen (ca. 5). Daneben gibt es Posterpräsentationen von Berliner Neurowissenschaftler (vom Studenten bis zum Institutsdirektor), sowie Präsentationen von Berliner Neurowissenschaftlichen Forschungsverbänden. Auch die 'Socials' kommen nicht zu kurz, unter anderem mit gemeinsamen Exkursionen und Abendveranstaltungen. Das BNF hat sich als ausserordentlich erfolgreiches Instrument erwiesen, die Verknüpfungen im SFB sowie zwischen den anderen neurowissenschaftlichen Initiativen und Arbeitsgruppen auf Projektmitarbeiter-Ebene zu befördern.
- Auch das *Neurowissenschaftliche Zentrum* (NWFZ) ist eine Drehscheibe der Interaktion im SFB und zu den anderen neurowissenschaftlichen Gruppen der Charité. Hier spielen einer-

seits die Multiuser-Facilities (Multiphotonen-Mikroskop des Z-Projektes des SFB 507; 7-T Tier-MR; Tierstall; etc.) eine wichtige Rolle, aber auch die Veranstaltungen des NWFZ, wie das wöchentliche Doktorandensymposium und die jährlichen Präsentationen vor dem internationalen Beirat.

- Die in monatlichem Turnus stattfindenden Treffen des dem SFB assoziierten *Graduiertenkollegs 238* bringen intensiven Kontakt zwischen den Projekten, da hier jeweils 2 oder mehr aktuelle Projekte durch Studenten vorgestellt und unter den Graduierten und deren Tutoren diskutiert werden.
- Der neurowissenschaftliche, internationale Studiengang 'Medical Neurosciences', welcher von Wissenschaftlern des SFB 507 gegründet wurde (Dirnagl, Nitsch, Kettenmann, Heineemann) führt zu intensiven Kontakten der SFB - Projekte und darüber hinaus. Dies liegt zum einen an den notwendigen Absprachen und damit Austausch innerhalb der Faculty bzgl. des Curriculums, zum anderen aber an den Labor-Rotationen der Studenten, welche bereits zu einer Vielzahl von interessanten Querbeziehungen zwischen Arbeitsgruppen geführt haben.

c) Stellung innerhalb der Hochschule

Der Berliner Senat hat im Jahre 2002 eine unabhängige Expertenkommission eingesetzt zur Evaluierung der Berliner Hochschulmedizin und Entwicklung eines übergreifenden Gesamtkonzeptes für die Universitätsmedizin in Berlin. Der Wissenschaftsrat hat sich daraufhin mit dem Expertengutachten befasst, und hierzu eine Stellungnahme verfasst (16.1.03). Kern der Empfehlungen war die mittlerweile erfolgte Fusion der beiden medizinischen Fakultäten von HU und FU und damit eine forcierte Bildung von Schwerpunkten. Die ‚Neurowissenschaften‘ wurden dabei als maximal förderungswürdiger, wesentlicher Schwerpunkt der Berliner Hochschulmedizin herausgestellt. Die Rolle des SFB 507 wird dabei spezifisch gewürdigt.

Als gemeinsame Aktivität von neurowissenschaftlichen Einrichtungen der Humboldt – Universität und der Freien Universität sowie Berliner ausseruniversitären Einrichtungen (Max Delbrück Centrum der HGF, MPI für Infektionsbiologie) ist der SFB 507 nicht nur konform mit der Strukturreform der Berliner Hochschulmedizin, sondern er nimmt wesentliche Aspekte vorweg.

Neurologie/Abt. für Experimentelle Neurologie

An der Neurologischen Klinik und der Experimentellen Neurologie ist es im laufenden Antragszeitraum vermehrt gelungen, experimentelle Befunde in 'investigator-driven' klinische Studien zu überführen. Beispiele hierfür sind

- die aus dem Projekt A1 abgeleiteten klinischen Studien (zusammen mit der Neurochirurg. Klinik), welche nun mittels DC-EEG und Nahinfrarotspektroskopie eine klinische Charakterisierung des im Projekt erstmals beschriebenen Phänomens der Cortical Spreading Ischemia durchführen (Förderung im Berlin Neuroimaging Center, DFG/BMBF)
- die Untersuchungen von Herrn Endres (Projekt A9) und Herrn Dirnagl, die in eigenen experimentellen Studien gut voruntersuchten Mechanismen der positiven Beeinflussung von cerebraler Endothelfunktion durch Statine auch beim Menschen nachzuweisen (gefördert vom BMBF im Kompetenznetz Schlaganfall). Hierzu wird in einem Schlaganfall-Hochrisikokollektiv eine prospektive Studie mit $^{15}\text{H}_2\text{O}$ -PET-CBF-Messungen (in Verbindung mit Perfusions-gewichtetem MR und transcraniellem Doppler) nach chronischer Statingabe durchgeführt.
- die MR-Untersuchungen zum prospektiven Nachweis der protektiven Wirkungen von transienten ischämischen Attacken bei Schlaganfallpatienten ('Preconditioning', Projekt A6)
- die Interventionsstudie 'PANTHERIS', in der die von Meisel und Prass (Projekt A10) zum ersten mal im Tierexperiment beschriebene Immundepression nach Schlaganfall prospektiv, randomisiert und multizentrisch in einem Schlaganfallkollektiv untersucht wird und der Outcome durch präventive Antibiotikagabe verbessert werden soll.

Mit EU-Förderung wurde ein Transfer- und Ausgründungs-Bereich '*Berlin Molecular Brain Imaging (BMBI)*' etabliert (2003). Primäres Ziel ist die Entwicklung eines optischen CT für Kleintiere, sowie die Etablierung von nicht-invasiven Inflammationsmonitoring beim Schlaganfall (experimentell und human).

Allgemeiner Teil

Zusammen mit der Helmholtz-Gesellschaft von Forschungseinrichtungen (HGF) wurde am Konzept eines 'Comprehensive Stroke Centers' gearbeitet, das die Schlaganfallforschung und akademisch-klinische Versorgung integriert. Die HGF stellt nunmehr zwei Nachwuchsgruppen in Aussicht, von denen eine am MDC zu 'Functional Genomics of Stroke' und die andere am Campus Mitte zu 'Molecular Imaging of Stroke' forschen soll. Auch hat die HGF die Finanzierung einer Koordinationenstelle und einer Sekretariatsstelle für diese Initiative verbindlich zugesagt.

Berlin NeuroImaging Center (BNIC)

Das BNIC (Eröffnung März 2003) ist das erste von insgesamt fünf "Zentren für Bildgebung in den klinischen Neurowissenschaften", die vom BMBF und der DFG gefördert werden. Das BNIC ist eine Berlin-übergreifende Einrichtung (Charité, FU, PTB). Es ist thematisch auf multimodales Imaging, sowie auf das (patho)-physiologische Verständnis der erhaltenen Befunde fokussiert. Neue bildgebende Verfahren werden entwickelt, zunächst im Experiment und dann am Patienten validiert. Bei den optischen bildgebenden Verfahren des Gehirns, im Bereich der multimodalen Integration (EEG-fMRI, MEG-NIRS) sowie in der Entwicklung von optimierten MEG-„Environments“ gehört das BNIC zu den weltweit führenden Gruppen. Das BNIC betreibt unter anderem einen Bruker 7T Tierscanner (im Neurowiss. Forschungszentrum) der für eine Reihe der SFB Projekte eingesetzt wird. Das BNIC bietet darüber hinaus für den SFB 507 Expertise und Hardware auf den Gebieten der Physik (MR, Optik), Chemie (Farbstoffe, Liganden), Phantom und tierexperimenteller Validierung, sowie klinischer Neurologie. Das BNIC pflegt eine enge regionale Zusammenarbeit mit dem Magdeburger Center for Advanced Imaging, mit dem zusammen auch Ausbildung bzw. spezielle Schulungen von Nachwuchswissenschaftlern (im sog. Leibniz-Programm) organisiert werden.

Neuroimmunologie

Im Juni 2002 ist die Neugründung eines selbständigen Instituts für Neuroimmunologie gelungen, welches von Frauke Zipp, Projekt B 14 geleitet wird. Der Laborbereich des Institutes ist im NWFZ untergebracht, der klinische Bereich ist in Kooperation mit dem Helios-Klinikum am Charité Campus Buch organisiert. Hierbei besteht eine enge Kooperation mit dem MDC. Bildgebende Verfahren werden in Kooperation mit dem BNIC durchgeführt. Hierdurch ist es im Antragszeitraum gelungen, auf der Basis experimenteller Befunde in klinische Studien zu überführen. Beispiele hierfür sind die 'investigator-driven' Atrovastatin-Studie sowie die multizentrische, internationale CCR-1 Antagonisten-Studie (Lead-Investigator) zur Therapie der MS.

Neuroradiologie

Neuropathologie

Anatomie

Im Rahmen der Neustrukturierung der Charité - Universitätsmedizin Berlin ist innerhalb des Zentrums für Anatomie ein selbstständiges Institut für Zell- und Neurobiologie etabliert worden (Direktor: Robert Nitsch), dem eine Juniorprofessur (Ingo Bechmann) zugeordnet worden ist. Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie sind im vergangenen und diesem Jahr insgesamt vier Rufe auf C 3-Professuren auf Lebenszeit ergangen (Ingo Bechmann, Greifswald; Bernd Heimrich, Freiburg; Thomas Skutella, Tübingen; Oliver Ullrich, Bochum und Magdeburg, Teilprojektleiter C6 im SFB 507). Im Rahmen von Bleibeverhandlungen zur Abwendung des Rufes an die Universität Greifswald (Ingo Bechmann), ist die Übernahme auf eine freiwerdende C3-Professur auf Lebenszeit an der Charité verabredet.

Physiologie

Im Rahmen der Neustrukturierung wurde auch ein Institut für Neurophysiologie geschaffen, dass zur Zeit mit einer C4 und zwei C3 Stellen ausgestattet ist. Langfristig sollen davon eine C4 und

eine C3 Stelle erhalten werden. Dem Institut assoziiert ist eine von der Fakultät ausserhalb der Stellenplans bereitgestellte Juniorprofessur (D. Schmitz). Eine Assistentenstelle wurde bereitgestellt um eine C3 Professur auf Zeit einzurichten. Hierdurch soll der Neuroimaging und Kognitions-wissenschaftliche Scherpunkt der Charité bzw. epileptologische Schwerpunkt verstärkt werden. Zwei Mitarbeiter bzw. Mitarbeiterinnen der AG Heinemann folgten im letzten Jahr Rufe an andere Universitäten (Draguhn FU Berlin und Heidelberg; Manahan-Vaughan Ruhruniversität Bochum) und einer verhandelt mit mehreren amerikanischen Universitäten (Müller). Das Institut stellt Arbeitsmöglichkeiten im Bereich der zellulären Elektrophysiologie auch anderen Gruppen der Charité zur Verfügung. Dies wird gegenwärtig von folgenden Einrichtungen genutzt: Lehmann Neurochirurgie; Dreier, Buchheim, Holtkamp, Neurologie, v. Haebler Psychiatrie, Spiess Anesthesiologie und Opladen Neonatologie, sowie Herz und Mitarbeiter theoretische Neurobiologie. Mitarbeiter des Institutes sind am SFB 507, TR3 und SFB 515 sowie am Graduiertenkolleg 238 beteiligt. Das Institut hat durchschnittlich 2-3 Gastwissenschaftler zu Besuch, die sich rege an der Forschung des Institutes beteiligen. Darüber hinaus werden Forschungsmöglichkeiten für PhD Studenten im Rahmen des Marie Curie Programms im FP5 zur Verfügung gestellt.

Psychiatrie

Die Charité Universitätsmedizin Berlin wird künftig über zwei psychiatrische Kliniken und eine kinderpsychiatrische Einrichtung verfügen. Beide Psychiatrie C4 Stellen sind kürzlich neu besetzt worden. Die Forschungsgebiete der beiden Kliniken sind komplementär angeordnet. Zur Zeit werden an beiden Kliniken Juniorprofessuren und C3 Stellen besetzt, die die Chance bieten, den neurowissenschaftlichen Schwerpunkt der Charité zu verstärken. Besonders interessant ist eine Forschungsprofessur am Standort Mitte, die Herr PD Dr. J. Priller (Projekt A5) angeboten worden ist und damit diesen begabten Nachwuchswissenschaftler aus dem SFB an die Charité bindet, und eine 'Brücke' vom SFB 507 zur Psychiatrischen Klinik entsteht.

Neurowissenschaftliches Forschungszentrum

Das Neurowissenschaftliche Forschungszentrum ist eine Fördermaßnahme für Nachwuchsgruppen aus der Charité. Es begann vor 4 Jahren mit 12 Nachwuchsgruppen von denen 7 mittlerweile Rufe an andere Universitäten oder die Charité erhalten haben (Zipp, Ikonomido, Grune, Skutella, Müller Ahnert-Hilger, Plagemann). Damit hat es sich als ein ideales Sprungbrett für Nachwuchswissenschaftler erwiesen. Im NWFZ stehen neben einem Tierstall ein Doppelmessplatz für Multiphotonen-konfokale Mikroskopie (Z-Projekt SFB 507), ein Forschungs-MRT Gerät für Untersuchungen am Menschen, und ein 7 T Tierexperimentelles MRT auch für Gruppen ausserhalb der NWFZ zur Mitnutzung bereit. Der SFB 507 nutzt diese Möglichkeiten intensiv. Die Vergabe der Forschungsflächen erfolgt nach Ausschreibung unter bestimmender Mitwirkung eines wissenschaftlichen Beirats (Vorsitzender Dichgans, Mitglieder: Zrenner, Beyreuther, Pape, Nicotera, Höhn und Wallmark). Die Gruppenleiter im NWFZ beteiligen sich besonders an der Ausbildung im Studiengang Medical Neurosciences und sind in den SFB 507, TR3, 515 oder den SFB 680 integriert, sowie am Graduiertenkolleg 238 beteiligt.

Max-Delbrück Centrum

Am Max-Delbrück-Centrum wurde - ausgehend von der programmorientierten Förderung - der Koordinationsbereich Neurowissenschaften neu strukturiert. Durch die Berufung von Erich Wanker auf eine Professur in der Charité und zum Arbeitsgruppenleiter am MDC und Gary Lewin (Ruf auf C4 Position an der Freien Universität und Arbeitsgruppenleiter am MDC), und unter Einbeziehung von Carmen Birchmeier, hat sich der Koordinationsbereich erheblich erweitert. Gerd Kempermann mit seiner Expertise zu neuronalen Vorläuferzellen ist zum Sonderforschungsbereich gestossen. Uwe-Karsten Hanisch, Projektleiter im SFB, hat inzwischen einen C3 Ruf an der Universität Göttingen in der Neuropathologie angenommen.

Zukünftige Entwicklung im Berliner Neurowissenschaftlichen Umfeld im Bezug auf den SFB

Die gegenwärtige Situation der HU der FU und der Charité Universitätsmedizin Berlin ist durch erhebliche Sparmaßnahmen gekennzeichnet. Insgesamt müssen bis 2010 die Landeszuschüsse für

Allgemeiner Teil

die HU um 25 Mill € der der FU ebenfalls um 25 Mill € und für Charité um 98 Mill € abgebaut werden. Dies beinhaltet neben einer starken Reduktion der Verwaltung an der Charité den Abbau von etwa 80 Professorenstellen. An diesem Abbau werden auch die Neurowissenschaften mit Verlust von Strukturstellen in der Physiologie, Med. Psychologie, Neurologie, Neuropathologie, Neurochirurgie, Psychiatrie, Kinderpsychiatrie ua) betroffen sein. Andererseits wird die finanzielle Situation der neuen Charité mit einem Landeszuschuß von ca 170 Mill € bei rund 780 Studenten nicht wesentlich unter dem Bundesdurchschnitt liegen und nach wie vor erheblichen Bewegungsspielraum eröffnen, wobei die Entwicklung an den ausseruniversitären Einrichtungen mehr noch als bisher einbezogen werden muss.

An der HU wurde der Beschluss gefasst, die Agrarwissenschaftliche Fakultät und die Biologische Fakultät in Mitte zu belassen und zu einem Partner für die Grundlagenforschung an der Charité Standort Mitte auszubauen. Dies befördert Initiativen wie die Biophysik, Neurobiologie und theoretische Neurobiologie mit einem Studiengang Computational Neurosciences. In diesem Zusammenhang ist an die Einrichtung von zwei Professuren am Schnittpunkt zwischen experimenteller Forschung und Computational Neurosciences gedacht, deren Berufung von der Bewilligung eines Zentrums für Computational Neurosciences in Berlin abhängt.

Am MDC soll der neurobiologische Forschungsschwerpunkt in Zukunft weiter ausgebaut werden. Eine erste Verstärkung ist durch die Berufung von C. Birchmeier erfolgt und gegenwärtig werden auch Verhandlungen mit T. Jentsch aus Hamburg geführt.

In den Naturwissenschaften der FU wurden in den letzten 2 Jahren vier neue Neurobiologie-Professuren eingerichtet, die mit Kuhl, Multhaupt und Hanke und demnächst Scharff besetzt wurden und im Bereich der Plastizitätsforschung und Neurodegenerationsforschung eine wesentlich Verstärkung der Berliner Neuroszene darstellen. Auch im Bereich der Psychologie an der HU und FU zeichnen sich neuropsychologisch interessante Berufungen ab, die den neurowissenschaftlichen Schwerpunkt in Berlin verstärken können

In der Charité stehen in den nächsten Jahren Neuberufungen im Bereich der Physiologie (C4, C3 in Dahlem), C3 in Mitte, im Bereich der Med. Psychologie, der Neurochirurgie, der Biochemie, der Neuropathologie, der Neuroradiologie und der Psychosomatik an. Offen ist die Entwicklung im Bereich der Pharmakologie. Gleichzeitig muss für eine Nachfinanzierung von Stiftungsprofessuren gesorgt werden.

Leistungsorientierte Verteilung des Landeszuschusses

An der Charité ist das Konzept leistungsorientierter Mittelvergabe stabil und langfristig etabliert. Es werden gemäß Wirtschaftsplanung im Haushaltsjahr 2004 etwa 30M€ des Landeszuschusses direkt leistungsorientiert als Sachmittel vergeben. Hierbei dienen der Impact-Faktor und die eingeworbenen Drittmittel jeweils zu 50% als Parameter, wobei nicht begutachtete Drittmittel nur zur Hälfte angerechnet werden. Neben einer Bonusfinanzierung, die eine Kofinanzierung von eingeworbenen Drittmittel in der Höhe von etwa 10% sichert (insgesamt Sachmittel von ca. 12 M€), bestehen spezielle Förderprogramme für den Nachwuchs (Sachmittel und Personalstellen aus dem Althoff-Förderprogramm an Oliver Ullrich, jetzt Magdeburg, Andreas Meisel; aus dem Rachel-Hirsch Förderprogramm an Ulrike Gimsa, jetzt Rostock). Ein Leistungsstellenpool von etwa 400 Vollkraftstellen wird im Rahmen von Berufungs- und Bleibezusagen, von Kofinanzierungszusagen (etwa Klinische Forschergruppen und SFBs) und besonderen Leistungsnachweisen vergeben. Mitglieder des SFB 507 haben an der Entwicklung und Etablierung dieses leistungsorientierten Vergabesystems wesentlichen Anteil.

Chancen und Risiken der Neustrukturierung der Berliner Universitätsmedizin im Bezug auf den SFB

Durch das Gesetz zur Neuordnung der Hochschulmedizin in Berlin sind die beiden (ehemaligen) Fakultäten der Humboldt-Universität und der Freien Universität zur Charité – Universitätsmedizin Berlin, einer gemeinsamen Medizinischen Einrichtung beider Universitäten, allerdings mit weitreichenden eigenständigen Kompetenzen in Strukturgebung und Finanzen fusioniert worden. Zunächst ist diese Maßnahme Folge von Einsparplanungen, die effektiv eine Reduktion des Landeszuschusses für die Hochschulmedizin in Berlin von etwa 40% bis zum Jahr 2010 zu Gegens-

tand haben. Hierdurch kommt es zur Fusion (z.B. sämtlicher vorklinischer Bereiche, aber auch der Neurologie, der Neurochirurgie, Neuropathologie) sowie auch zum Wegfall ganzer Institute und Einrichtungen. Der Kondensationsprozess findet allerdings (siehe auch Gutachten der Expertenkommission) unter Anlegung von Qualitätskriterien in der Forschung statt. Die etablieren zum ersten Mal eine sehr stark durch die Wissenschaft bestimmte Leitungsstruktur, die die bisher verwaltungsdominierte Leitungsstruktur ablöst. Der neue, hauptamtliche Dekan ist demnach in vollem Umfang für die Mittel des Landeszuschusses verantwortlich. Dem Dekan gegenüber ist der kaufmännische Leiter der Fakultät weisungsgebunden. In einem gemeinsamen Vorstand aus Vorsitzendem (Detlev Ganten, vormals MDC), Direktor des Klinikums und Dekan (Prof.Dr.M.Paul, Stellvertreter Prof.Dr.C.Frömmel) werden Strukturentscheidungen zwischen Krankenhausbereich, der finanziell vollkommen abgegrenzt bewirtschaftet wird, und dem Bereich Forschung und Lehre abgestimmt. Somit kann die sachgerechte Verwendung des Landeszuschusses für Forschung und Lehre und damit auch die finanzielle und strukturelle Sicherung von Leistungsbereichen, etwa SFBs, gesichert werden.

Biowissenschaftliche SFBs in Berlin

Derzeit existieren neben dem SFB 507 in Berlin 12 biowissenschaftliche SFBs:

- 421 Protektive und pathologische Folgen der Antigenverarbeitung
- 429 Molekulare Physiologie, Energetik und Regulation primärer pflanzlicher Stoffwechselprozesse, Berlin
- 449 Struktur und Funktion membranständiger Rezeptoren
- 450 Analyse und Steuerung ultraschneller photoinduzierter Reaktionen
- 498 Protein-Kofaktor-Wechselwirkungen in biologischen Prozessen,
- 366 Zelluläre Signalerkennung und -umsetzung
- 498 Protein-Kofaktor-Wechselwirkungen in biologischen Prozessen
- 506 Rekombinante Nukleinsäuren und Proteine zur Tumorthherapie
- 515 Mechanismen entwicklungs- und erfahrungsabhängiger Plastizität des Nervensystems
- 577 Molecular Basis of Clinical Variability in Mendelian Disorders, Berlin
- 618 Theoretische Biologie: Robustheit, Modularität und evolutionäres Design lebender Systeme, Berlin
- 633 Induktion und Modulation T-zellvermittelter Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt, Berlin
- ausserdem ist Berlin an einem Transregio/SFB beteiligt: TR03 Mesiale Temporallappen-Epilepsien, Bonn

Auf die starke Vernetzung mit dem SFB 515 und 421 sowie TR3 ist bereits mehrfach hingewiesen worden.

d) Förderung der Lehre und des wissenschaftlichen Nachwuchses

Unmittelbares Resultat der Interaktionen im SFB 507 ist die Gründung eines innovativen neurowissenschaftlichen Graduiertenprogramms, dem *internationalen Master-MD/PhD Program 'Medical Neurosciences'*. Der Studiengang wird vom DAAD im Rahmen des Programmes 'Promotionen in Deutschland' gefördert.

Hauptziel des Studienganges ist es, dem Mangel an strukturierter Ausbildung zum neurowissenschaftlichen Arbeiten an medizinischen Fakultäten in Deutschland entgegenzuwirken. Für Studierende der Medizin, welche anstreben, nicht primär in der reinen Krankenversorgung, sondern im Bereich der akademischen oder industriellen medizinischen Grundlagenforschung zu arbeiten, sollen hierzu die ausbildungstechnischen Voraussetzungen geschaffen werden. Auf der anderen Seite sollen Studierende der Naturwissenschaften, die sich für eine berufliche Tätigkeit im biomedizinischen Umfeld an den Universitäten oder in der Industrie interessieren, die Möglichkeit haben, sich in ihrer Ausbildung mit klinischem Denken und Problemen sowie deren Modellen und Fragestellungen vertraut zu machen. Der Schwerpunkt liegt dabei, wie beim SFB 507 auch, in der Besetzung der Schnittstelle zwischen bench and bedside, was den Studiengang in Deutschland einzigartig macht. Die beteiligten Wissenschaftler der Faculty (fast 50 % aus SFB 507) sowie die uns fördernden Pharma- und Biotechunternehmen (Initiative 'Partners in Education', der-

Allgemeiner Teil

zeit Novartis, Wyeth, GSK) erwarten sich die Rekrutierung hochmotivierter und sehr gut ausgebildeter Wissenschaftler für biomedizinische Forschung.

Eine Besonderheit des Master-Studienganges ist, dass er auch neben einem Medizin- oder Naturwissenschaftlichen Studium absolviert werden kann (Ergänzungsstudiengang). Die Module müssen von Teilzeitstudierenden in drei Jahren bewältigt werden. Vollzeitstudierende, also Studierende mit erstem berufsqualifizierendem Abschluss, sei es Arzt, Diplom, Master of Science oder auch Bachelor of Science, die das Programm als Zusatzstudiengang absolvieren, haben eineinhalb Jahre Zeit.

Eine weitere Besonderheit des Master-Studiengangs ist es, dass er als Rekrutierungsmechanismus für den Promotionsabschnitt und damit auch für Projekte des SFB507 fungiert. In den eineinhalb bis drei Jahren, die die Studierenden durchlaufen, lernen sie den Forschungsbetrieb an den beteiligten Instituten kennen und können ihre Fähigkeiten in Theorie und Praxis bereits unter Beweis stellen. Projektleiter und Studierende können so zu einander finden, Promotionsprojekte gemeinsam längerfristig planen und die Finanzierung mittels Doktorandenstellen sichern.

Die Absolventen des Master-Programms können also auf Empfehlung zum PhD-Abschnitt (Ausbildungsstudiengang) zugelassen werden. Studierende, die kein Doktorat anstreben oder sich nicht bewährt haben, schließen mit dem Master ab. Externe diplomierte Naturwissenschaftler oder Absolventen anderer MSc-Programme können nach einer mündlichen Eignungsprüfung auch direkt zum PhD zugelassen werden.

Den Hauptteil des auf drei Jahre angelegten PhD-Programms bildet die Forschungsarbeit in der Arbeitsgruppe, d.h. auch in Projekten des SFB507. Zusätzlich gibt es das Doktoranden-Kolloquium, werden Kurse zu Spezialthemen und Methoden angeboten sowie Zusatzqualifikationen wie wissenschaftliches Schreiben oder Antragstellung und Drittmittelinwerbung unterrichtet. Einmal im Jahr wird von den Doktoranden ein internationaler PhD-Tag organisiert, in dem sie ihre Projekte vorstellen und einen Gastvortragenden zu einem bestimmten Thema einladen.

Der Studiengang ist international vernetzt, und hat folgende Partnerprogramme: Ruhr Universität Bochum, International Graduate School of Neurosciences, Prof. Denise Manahan-Vaughan; University of Helsinki, Finnish Graduate School of Neuroscience, Prof. Kai Kaila; University College London, Dr. Frances Edwards; University of Oslo, Prof. Ole Pettersen; Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic (Prag), Prof. Eva Sykova; Karolinska Institutet (Stockholm), Prof. Sten Grillner; Neuroscience Center Zurich (Universität und ETH Zürich), Prof. Martin Schwab. Mit diesen Programmen besteht ein Austausch von Faculty und Studenten, und Berlin hat federführend einen Antrag bei der EU innerhalb des Marie Curie Programmes gestellt ("CORTEX" Cooperation in Research and Training for European Excellence in the Neurosciences).

Der Studiengang läuft nun seit einem Jahr. Der zweite Jahrgang Master-Studierender wurde im September 2003 in Berlin begrüßt. Einer Umfrage zufolge beabsichtigt die Hälfte des ersten Jahrganges nach dem Master mit dem PhD-Abschnitt fortzufahren. Wir haben aber auch schon Doktoranden direkt rekrutiert. Sie arbeiten intensiv in ihren Projekten und nehmen das Kursangebot des Studienganges intensiv war.

In sehr enger Beziehung zum SFB steht nach wie vor das von Heinemann geleitete *Graduiertenkolleg 238*: Schadensmechanismen im ZNS: Einsatz bildgebender Verfahren. Das GRK läuft im Jahr 2004 aus. Die Mehrzahl der Projektleiter im GRK sind auch SFB 507 Mitglieder, viele Graduierte arbeiten in den SFB Projekten.

Mitglieder des GRK 238 und des SFB haben Initiativen gestartet für Nachfolge-GRKs: 'The impact of inflammation on nervous system function'; Sprecher: Kettenmann/Zipp); sowie 'Zelluläre Mechanismen von Lernen und Gedächtniskonsolidierung'; Sprecher: Heinemann. Die Vorträge sind fertiggestellt und haben die Fakultäts-Gremien passiert.

Im laufenden Förderzeitraum haben Nachwuchswissenschaftler des SFB Rufe erhalten (C3 Molekulare Psychiatrie Berlin, Priller, Jun.-Prof. Berlin und C3 Anatomie Greifswald, Bechmann, C3 Immunologie Magdeburg, Ullrich, C3 Experimentelle Neuropathologie Göttingen, Hanisch, C3 Klinische Immunologie Göttingen und C3 Neuroimmunologie Berlin, Zipp, Arbeitsgruppenleiter Düsseldorf, Grune). Frau Eder erhielt ein Heisenbergstipendium der DFG. Die Habilitati-

onsverfahren von Lindauer, Bechmann, Dreier, Braun und Gimsa konnten abgeschlossen werden.

e) Förderung der Gleichstellung von Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern

Ulrike Gimsa (Projekt B11) hat ein Rachel Hirsch-Stipendium (Nachwuchsförderung für Frauen) der Charité erhalten und ist zwischenzeitlich Nachwuchsgruppenleiterin an der Universität Rostock. Frauke Zipp konnte in Abwendung eines Rufes an die Universität Göttingen (C 3 Professur auf Lebenszeit Klinische Immunologie) durch eine C 3 Professur auf Lebenszeit für Neuroimmunologie an der Charité gehalten werden. Parallel ist damit die Etablierung eines neuen Institutes für Neuroimmunologie unter der Leitung von Frauke Zipp verbunden gewesen. Für die Durchsetzbarkeit dieser Maßnahmen war des SFB 507 von entscheidender Bedeutung. Frauke Zipp ist Mitglied des wissenschaftlichen Beirates des Gender Centrums der Charité.

Dokumentation der sonstigen Aktivitäten

Kontakte mit anderen Wissenschaftlern (Mitwirkung an wichtigen Kongressen und Fachtagungen, Einladung von Gastwissenschaftlern, Kolloquien, Arbeitsbesprechungen usw.) enthalten; insbesondere wird um eine Auflistung der Gastwissenschaftler gebeten (bitte mit Angaben zu Heimathochschule und Aufenthaltsdauer), die im Berichtszeitraum im Sonderforschungsbereich mitgearbeitet haben.

2. Arbeitsberichte der Teilprojekte

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

- A1** 'Cortical spreading ischemia': Ein neues Ischämieprinzip
Dreier/Einhäupl
- A5** Fokale cerebrale Ischämie und induzierte Ischämietoleranz: Rolle von Makrophagen und Mikroglia
Dirnagl/Priller
- A6** Rolle der endothelialen NO Synthase bei zerebraler Gefäßreaktivität: Beeinflussung der Enzymaktivität mittels HMG-CoA Reduktase-Inhibition und Einfluß auf die Infarktvolumentwicklung bei fokaler zerebraler Ischämie
Lindauer
- A7** Rolle der Microglia im Eisen-Stoffwechsel des Gehirns: Schädigung Eisen-bindender Proteine bei Ischämie und Reperfusion
Grune

Zusammenfassender Bericht des Projektbereiches

Der Projektbereich A des SFB fokussiert auf die Rolle nicht-neuronaler Zellen bei *akuten* ZNS-Erkrankungen, wobei der Schwerpunkt auf cerebraler Hypoxie und Ischämie liegt. Alle Projekte der Gruppe waren intensiv vernetzt und konnten auch in gemeinsamen Projekten publizieren. Diese Vernetzung war aber nicht nur auf den Projektbereich beschränkt, es kam auch zu sehr produktiven Interaktion zu den anderen Projekt-Bereichen, z.B. A1-C3, A5-B11, oder A7-C6.

Das **Projekt A1** konnte ein nicht-neuronaler Mechanismus beschrieben werden ('Spreading Ischemia'), der Infarkte produzieren kann und für Migräne-induzierte Infarkte verantwortlich sein könnte sowie für die verzögert auftretenden neurologischen Defizite nach Subarachnoidalblutung. Mechanistisch kommt es hierbei durch Kombination einer NO-Senkung mit Verminderung der α_2 - und/oder α_3 -Aktivität der Na, K-ATPase zu einer Umkehrung der Kopplung zwischen Spreading Depression und cerebralem Blutfluss. Diese Befunde wurden vielbeachtet, und sind bereits in mehreren Übersichtsartikeln zur Genese des verzögerten Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung als neuer, möglicherweise klinisch hochrelevanter Mechanismus hervorgehoben worden. Das Projekt konnte im Berichtszeitraum in Journalen wie Brain, J. Neurosurg., Ann. Neurol., Neurosurgery, Am. J. Physiol, Neurology, J.Cereb. Blood Flow Metab. etc. publizieren. Besonders hervorzuheben ist, dass hierunter auch klinische Arbeiten zu finden sind, da das Projekt mittlerweile in eine Phase eingetreten ist, in der die Befunde am Patientenbett überprüft werden. Dies reflektiert auch der Fortsetzungsantrag, in dem auch klinische Untersuchungen beantragt werden.

Im **Projekt A5** konnte in sog. Knochenmarks-Chimären der Maus ein unerwartet hoher physiologischer Turnover von Mikroglia durch Zellen aus dem Blut beschrieben werden. Diese Befunde wurden mittlerweile von einer Reihe von Untersuchern repliziert. Im Projekt A5 gelang auch die Erstbeschreibung von Purkinje-Zellen des Kleinhirnes, welche Hinweise auf deren möglichen Ursprung aus dem Blut bzw. Knochenmark tragen. In der Publikation der Ergebnisse wurde als Mechanismus einerseits Transdifferenzierung und zum anderen die Fusion von invadierten Zellen mit Purkinje-Zellen diskutiert. Der Nachweis von Fusion mittels FISH wurde im Projekt angegangen, konnte aber wegen technischer Probleme weder belegt noch ausgeschlossen werden. Der Befund erregte internationales Aufsehen, und konnte mittlerwei-

A

le von einer Reihe von Arbeitsgruppen sowohl in Mausexperimenten als auch in einer Studie mit humanem Autopsiematerial bestätigt werden (Weimann et al. PNAS (2003) 100:2088-93). Erst kürzlich gelang der Nachweis (Alvarez-Dolado et al. Nature. (2003) 425:968-73, Weimann et al. Nat Cell Biol. (2003) 5:959-66.), dass Fusionsereignisse mit nachfolgender nukleärer Reprogrammierung eine wahrscheinliche Ursache der Befundes aus dem Projekt A5 sind. Das Projekt charakterisierte das Schicksal von aus dem Blut in das Gehirn eingewanderten Zellen unter physiologischen Bedingungen, um die Grundlagen zu schaffen, die Rolle dieser Zellen bei fokaler zerebraler Ischämie (Schlaganfall) zu untersuchen. Hier gelang es, das Einwanderungsverhalten von Blutzellen in den Infarkt und die Periinfarktregion zu quantifizieren, und das geringe Transdifferenzierungspotentials der eingewanderten Entzündungszellen zu zeigen. Diese Befunde standen im Widerspruch zu einigen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, welche eine hohe Rate von 'Transdifferenzierung' fanden, unter anderem in Astrozyten, Oligodendrozyten, und kortikale Neurone. Gerade in den letzten Monaten mehren sich jedoch die Arbeiten, welche die Befunde des Projektes A5 stützen. In einem weiteren Projektabschnitt setzte das Projekt die Knochmarks-Chimären ein, um die differentielle Rolle der induzierbaren NOS bei der Infarktenstehung abhängig von der zellulären Quelle (parenchymatös vs. inflammatorisch) zu klären. Die Untersuchungen dauern noch an, es deutet sich aber an, dass die Rolle dieses Proteins im Infarktgeschehen und der Beitrag von invadierten Blutzellen bisher überinterpretiert wurde. Das Projekt publizierte in Journalen wie Nat.Med., J.Neurosci, J.Cell Biol., Circulation, etc., auch erschienen in mehreren Journalen 'News and Views'-artige Kommentare zu den Befunden. Herr Priller hat für seine Arbeiten den '*Robert Feulgen Preis*' der internationalen Society for Histochemistry erhalten. Das Projekt hat in verschiedenen Bereichen Neuland beschritten und die internationale Diskussion angeführt. Dies gilt nicht nur wie oben ausgeführt für die Frage der Invasion, Transdifferenzierung oder Fusion von Blutzellen mit Hirnzellen, sondern auch für die Transplantation von Blutzellen welche rekombinant therapeutische Proteine exprimieren (z.B. Asheuer et al. PNAS (2004) 101:3557-62).

Im **Projekt A6** wurde erstmals beschrieben, dass Nitric Oxide an der Regulation der zerebralen Zirkulation nicht als Mediator, sondern als Modulator beteiligt ist. Dieser Befund ist mittlerweile international anerkannt und vielzitiert. In der laufenden Antragsphase konnte nun ein wesentlicher Mechanismen der modulatorischen Wirkung von Nitric Oxide an glatten zerebrovaskulären Gefäßmuskelzellen aufgeklärt werden: diese erfolgt über Aktivierung von Kaliumkanälen. Daneben konnte das Projekt A6 eine Reihe von weiteren, wichtigen Befunden zum Verständnis der cerebralen Vasoregulation liefern. Hierzu gehören in vitro Untersuchungen zur Induktion von NOS in cerebralen Endothelien nach Statinen, die Aufklärung von Mechanismen der Störung der cerebralen Vasoreaktivität nach Spreading Depression, sowie die Charakterisierung von endogenen vaskulären Mechanismen der Neuroprotektion. Das Projekt publizierte im Berichtszeitraum in Journalen wie z.B. J. Cereb.Blood Flow Metab., Am. J. Physiol., und Stroke.

Das **Projekt A7** befasste sich mit der Rolle der Microglia im Eisen-Stoffwechsel des Gehirns. Im Projekt konnte gezeigt werden, dass mikrogliale Zellen in der Lage sind, im aktivierten Zustand mehr Eisen aufzunehmen und es im Ferritin abzulagern. Die Aufnahme des Eisens über das Transferrin hängt vom Schädigungsgrad dieses Proteins ab. Der Anstieg des Ferritin- und Transferrin-Rezeptor (TfR) -Gehaltes erfolgt über Regulation auf Translationsebene durch die Iron regulatory proteins IRP-1 und IRP-2. Projekt A7 fand auch, dass Mikroglia nach hypoxischer Belastung in der Lage ist, schnell die Eisenaufnahme zu steigern. Dies gilt sowohl für Transferrin-gebundenes Eisen als auch für niedrigmolekulares Eisen. Der posthypoxisch verstärkten Eisenaufnahme liegt ein translationell regulierter Anstieg des Ferritin und TfR zu Grunde. Aus den Befunden wird gefolgert, dass mikrogliale Zellen im Gewebeverband für die Beseitigung des extrazellulären Eisens verantwortlich sind. Dies wird durch verstärkte Ferritin- und TfR-Expression gewährleistet. Das Projekt konnte im Berichtszeitraum unter anderem in FasebJ, Mol. Brain Res., und Free Rad. Biol. Med. publizieren. Der Projektleiter, Herr Grune, wechselte Ende 2003 an das Institut für umweltmedizinische Forschung der Universität Düsseldorf, wo er seither als Projektleiter im Bereich *Molekulare Alternsforschung* tätig ist.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB507/A1 2002 - 2004

Thema:

Cortical Spreading Ischaemia: Ein neues Ischämieprinzip

Leiter:

PD Dr. med. Jens P. Dreier und Prof. Dr. med. Karl M. Einhäupl

Dienstanschrift:

Neurologische Klinik

Charité – Universitätsmedizin Berlin
10098 Berlin

Telefon: 030-450 560024

Fax: 030-450 560932

e-mail: jens.dreier@charite.de

Mitarbeiter: Dr. med. Gabor Petzold

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragen

Im Jahre 1941 beschrieb der Bostoner Neuropsychologe Lashley seine eigenen visuellen Migräneauraen als transiente neurologische Defizite, welche sich typischerweise vor dem Auftreten von Migränekopfschmerzen entwickelten. Er interpretierte das Symptom als eine Welle intensiver neuronaler Erregung gefolgt von neuronaler Inhibition, die sich mit etwa 3 mm/min in der visuellen Hirnrinde ausbreitet. Drei Jahre später entdeckte der brasilianische Physiologe Leão eine Welle intensiver neuronaler Erregung, gefolgt von einer Depression der Aktivität, die mit 3 mm/min in der Hirnrinde des Kaninchens wanderte. Leão nannte das Phänomen Cortical Spreading Depression (CSD). 1945 formulierten Leão und Morison dann die sogenannte Spreading Depression-Theorie der Migräneaura.

Das spontane Auftreten Migräneaura-artiger Symptome wird aber nicht nur bei Migränepatienten beobachtet. So berichteten Wijman et al (1998), daß 1,23 % von 2110 Personen der Framingham Kohorte über visuelle Migräneaura-artige Sensationen klagten. In 58 % der Fälle waren diese Aura-artigen Symptome nie mit einem Kopfschmerz assoziiert und eine Kopfschmerzanamnese fand sich insgesamt nur bei 42 % der Betroffenen. Darüberhinaus können Migräneaura-artige Sensationen auch exogen oder im Rahmen anderer Erkrankungen induziert werden z.B. durch zerebrale Angiographie, Schädel-Hirn-Trauma oder epileptische Anfälle. Ein Neuaufreten oder eine Häufung von Auren kann Symptom einer organischen Läsion sein, z.B. bei Dissektion der A. carotis interna, Hirntumor, arteriovenöser Malformation oder zerebraler Venenthrombose (Review siehe Olesen et al 1993). Diese Ubiquität von Migräneaura-artigen Symptomen im klinischen Alltag stimmt hervorragend mit der Natur der CSD überein als fundamentale neuronale Netzwerkantwort auf akute noxische Stimuli.

Daß der CSD auch eine Rolle in den pathophysiologischen Prozessen nach Subarachnoidalblutung (SAB) zukommen könnte, wurde schon Anfang der achtziger Jahre postuliert (Hubschmann und Kornhauser 1980; 1982; Hansen and Lauritzen 1984). Dabei sind zwei Phasen zu unterscheiden: Die Akutphase und die Phase des Vasospasmus nach SAB. Das Auftreten von CSDs in der Akutphase nach SAB bestätigten Busch et al (1998) und Beaulieu et al (2000) tierexperimentell mit Hilfe der funktionellen Kernspintomographie.

Der Zeitraum zwischen dem 4. und 14. Tag nach SAB ist die klinisch bedeutsame Phase des Vasospasmus. In dieser Phase kommt es bei 70% der Patienten zu einem Vasospasmus im zerebralen Angiogramm und bei 20-30% der Patienten zum Auftreten von sogenannten "delayed ischaemic neurological deficits" (DINDs) (1990). DINDs stellen die wichtigste Komplikation nach SAB dar (Kassell et al 1990). Sie führen bei ungefähr 6 % der SAB-Patienten zu bleibenden Behinderungen und bei 7 % zum Tod. Die Pathogenese der DINDs ist nicht verstanden. Die Häufigkeit ihres Auftretens korreliert mit der Menge des subarachnoidalen Blutes im initialen Computertomogramm (Fisher et al 1980). Der Zeitpunkt ihres Auftretens fällt zusammen mit dem Maximum der Hämolyse des subarachnoidalen Blutes (Vermeulen et al 1984; Pluta et al 1998). Es wird daher allgemein vermutet, daß Hämolyseprodukte für die Entstehung der verzögerten ischämischen

A1 Dreier/Einhäupl

Schlaganfälle verantwortlich sind (MacDonald and Weir 1991). Megyesi et al (2000) zählten 57 verschiedene Tiermodelle zur Studie des Vasospasmus. Die in diesen Modellen bisher durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich im wesentlichen auf die Auswirkung der subarachnoidalen Blutprodukte auf die Gefäßweite. Eine direkte Untersuchung der dabei möglicherweise auftretenden Ischämien, neuronalen Netzwerkantworten oder histologischen Veränderungen des Nervengewebes wurde erstaunlicherweise nur selten durchgeführt. Vermutlich ist der Grund für diese Unterlassung darin zu suchen, daß in den vorliegenden Modellen kaum Ischämien auftreten. Dies jedenfalls legt eine der wenigen Ischämie-Studien im meistverwendeten Vasospasmusmodell nahe (Kaoutzanis et al 1993).

Daß bei der Entstehung von DINDs auch die Reaktionsweise der Mikrozirkulation und des neuronal-astroglialen Netzwerks sowohl auf den Vasospasmus als auch direkt auf die subarachnoidalen Blutprodukte eine Rolle spielen, wird erst in jüngster Zeit ein Schwerpunkt in diesem Forschungsbereich (Dietrich und Dacey 2000). An dieser Entwicklung hat auch unser SFB-Projekt einen gewissen Anteil, da wir ein Tiermodell entwickeln konnten, in dem Hämolyseprodukte im Subarachnoidalraum zuverlässig Ischämien in der Hirnrinde induzieren. In diesem Modell wird eine langsame vasospastische Reaktion erzeugt, der sich CSDs überlagern, die nicht, wie physiologischerweise, zu einer Vasodilatation mit anschließender milder Vasokonstriktion, sondern zu einer akuten, extremen, langandauernden Vasokonstriktion führen (Cortical Spreading Ischaemia). D.h. es handelt sich um ein von uns neu entdecktes Ischämieprinzip, bei dem eine neuronale Aktivierung eine Ischämie induziert, und zwar als Folge einer invertierten Kopplung zwischen neuronaler Depolarisation und Blutfluß. Aus diesem pathophysiologischen Konzept heraus leitet sich pathogenetisch eine mögliche zentrale Bedeutung von CSDs bei der Entstehung der verzögerten ischämischen Schlaganfälle nach SAB ab sowie klinisch ein möglicherweise erhöhtes Risiko für Migränepatienten, DINDs zu entwickeln. In der vorletzten Antragsperiode haben wir die Cortical Spreading Ischaemia (CSI) zunächst mit Hilfe der kraniellen Fenstertechnik sowie elektrophysiologischer Methoden beschrieben und sie als Modell für DINDs vorgestellt (Dreier et al 1998). Weiterhin konnten wir zeigen, daß CSI zu ähnlichen corticalen, teils glockenförmigen, teils laminären Hirninfarkten führt wie DINDs beim Menschen (Dreier et al 2000). Wir konnten außerdem nachweisen, dass CSI, die durch einen NO-Synthase-Inhibitor ausgelöst wurde durch einen NO-Donor und in geringerem Umfang auch durch den NO-unabhängigen Vasodilatator Papaverin in eine fast normale CSD mit assoziierter Blutflussteigerung zurückverwandelt werden konnte (Dreier et al 2001).

Auf die pathophysiologischen und klinischen Aspekte, welche im Hinblick auf die "Cortical Spreading Ischaemia" und die "Cortical Spreading Depression" in unserem SFB-Projekt im Zeitraum 2002-2004 untersucht wurden, möchten wir im Folgenden eingehen:

1. Die Funktion, über die eine erhöhte K^+ -Baseline Konzentration CSI bzw. CSD auslöst, besteht wahrscheinlich in einer Herabregulation der Na, K-ATPase
2. Die zur Prophylaxe von DINDs eingesetzten therapeutischen Massnahmen (Nimodipin und mässige hypervolämische Hämodilution) verwandeln die CSI in eine fast normale CSD mit assoziierter Hyperämie zurück
3. Endothelin-1 induziert ebenso wie eine erhöhte K^+ -Baseline Konzentration CSD
4. Die Kombination von Endothelin-1 mit NO-Senkung führt zur CSI. Endothelin-1 verursacht ebenso wie eine erhöhte K^+ -Baseline Konzentration eine Herabregulation der Na, K-ATPase
5. Die corticalen Läsionen, die in Autopsien von Patienten nach SAB das typische pathomorphologische Korrelat von DINDs darstellen, lassen sich zwar nicht mit der Computer-, aber mit der Kernspintomographie darstellen
6. Wirkung des NO-Spiegels auf Cortical Spreading Ischemia und Cortical Spreading Depression. Modulation von Ionenkanälen durch NO. Synthese von NO in akuten Hirnschnitten während Cortical Spreading Depression
7. Migränepatienten haben wahrscheinlich ein erhöhtes Risiko dafür, ein DIND nach SAB zu entwickeln
8. Adenosin kann die Spreading Ischaemia partiell in eine fast normale CSD mit Hyperämie revertieren

2 Angewandte Methoden

Soweit die angewandten Methoden auch im Fortsetzungsantrag erläutert sind, sind sie hier verkürzt dargestellt.

Spezies, Narkose, Präparation

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an Ratten durchgeführt.

Die Versuche erfolgten unter zwei unterschiedlichen Anästhesieprotokollen: Thiopental (100 mg / kg KG i.p., bei Bedarf Nachinjektion) und Halothan/N₂O.

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

Kranielle Fenstertechnik

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 besteht die Möglichkeit der Superfusion von Pharmaka, Hämoglobin oder der Änderung des ionalen Milieus.

Im folgenden werden die Untersuchungstechniken kurz beschrieben:

Elektrophysiologie (ionensensitive Mikroelektroden)

Die ionensensitiven Elektroden mit Spitzendurchmessern von 2 – 3 µm wurden nach der Methode von Lux und Neher (1973) gebaut. Dabei wird ein Ionenaustauscher verwendet, eine ölige Flüssigkeit, die für das Meßion spezifische Carriermoleküle enthält, so daß ein selektiver Transport zwischen den Elektrolyten zu beiden Seiten des Austauschers stattfinden kann. Ist das Meßion zu beiden Seiten des Austauschers unterschiedlich konzentriert, kommt es zu einer Diffusion des Meßions, die einen Nettostrom antreibt. Infolge der Ladungsverschiebung wird über den Austauscher ein Potential aufgebaut, das der Ionenverteilung entgegenwirkt. Im Gleichgewicht dieser Kräfte gilt dann die Nernstsche Gleichung, aus der das Verhältnis der Konzentrationen des Meßions zu beiden Seiten der Membran berechnet werden kann. Auf diese Weise konnten die absoluten, extrazellulären Konzentrationsänderungen von K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ und pH bestimmt werden, da ihre Baselinewerte bekannt sind.

Laser-Doppler Blutflußmessung (LDF)

Die LDF-Methode ist für die Messung relativer Veränderungen des lokalen Blutflusses im Rattencortex unter Kontroll- und Ischämiebedingungen validiert (Dirnagl et al 1989). Sie ist zusätzlich mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops und elektromagnetischer Flußmessungen validiert (Barfod et al 1997). Es wurde der Laser Doppler-Flußmonitor Periflux System 5000 der Firma Perimed verwendet.

Hirnschnittuntersuchungen bei der Ratte

Die Präparation von kombinierten temporalen Cortex-Schnitten erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Dreier und Heinemann (1991). Zusätzlich wurden coronare neocorticale Schnitte aus der occipitoparietalen Region verwendet. Zur Messung extrazellulärer Feldpotentiale und Kaliumkonzentrationsänderungen wurden ionensensitive Mikroelektroden eingesetzt.

Hirnschnittuntersuchungen beim Menschen

Es wurden humane Neocortexschnitte von Patienten verwendet, die an einer pharmakoresistenten Form einer mesialen Temporallappenepilepsie leiden. Nach einem Aufklärungsgespräch wurde die Einwilligung des Patienten in die Studie eingeholt. Die Studie erfolgte mit dem Einverständnis der lokalen Ethikkommission. Das Gewebe wurde noch im OP in kalter (4 °C), mit Carbogen angereicherter spezieller ACSF

A1 Dreier/Einhäupl

inkubiert. Die Na^+ -Konzentration dieser Transport-ACSF war reduziert, um einen Hypoxie-induzierten Einstrom von Natrium in Neurone zu verhindern. Die eigentliche Messung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den Hirnschnittuntersuchungen der Ratte.

Messung intrinsischer optischer Signale im Hirnschnitt

Für die Messungen wurden die Hirnschnitte von unten mit Hilfe einer Halogenlampe durchleuchtet. Die Hirnschnitte wurden durch ein aufrechtes binokulares Mikroskop betrachtet, an das eine digitale Kamera angeschlossen war. Das erhaltene digitalisierte optische Signal wurde im PC gespeichert. Das Ziel der Untersuchungen war, Änderungen des intrinsischen optischen Signals während CSD zu erfassen. Dieser Technik liegt die bekannte Eigenschaft der CSD zugrunde, zu einer Schrumpfung des Extrazellulärums und so zu einer Abnahme transmittierten Lichts zu führen. Zur Erfassung der Transmissionsänderungen diente das erste Bild einer Serie (vor Beginn einer CSD) als Kontrolle, die von jedem folgenden Bild subtrahiert wurde. Die Subtraktionsbilder zeigten dann an, in welchem Areal des Hirnschnitts sich die Lichttransmission über die Zeit änderte. Somit diente die Methode einer nichtinvasiven optischen Darstellung der CSD mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung.

Messung der Aktivität der corticalen Na, K-ATPase

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

Messung der relativen freien intrazellulären Calciumkonzentration in kultivierten corticalen Neuronen

Für die Messung wurden corticale Rattenneuronen (Embryonaltag 18) nach einem etablierten Protokoll kultiviert (Braun et al 2002). Die Messung der Änderungen der relativen freien intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte mittels spektroskopischer Bestimmung der Fluoreszenzänderungen des Calcium-Markers Fluo-4.

Messung von NO in Hirnschnitten der Ratte

Zur Bestimmung des Gesamt-NO, das während einer CSD in akuten Hirnschnitten der Ratte freigesetzt wird, wurde der NO-sensitive Farbstoff Diaminoanthraquinon (DAQ) verwendet. DAQ reagiert mit NO zu einem fluoreszierenden Präzipitat, das im Hirnschnitt mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden kann. Darüberhinaus kann die NO-Bildung im Hirnschnitt durch Photographie der Hirnschnitte und nachfolgende Digitalisierung abgeschätzt werden. In einem zweiten methodischen Ansatz werden die Schnitte mit dem intrazellulären NO-Indikator Diaminofluoreszein-Diazetat (DAF-DA) geladen. Mit dieser Methode können durch immunhistologische Kolo-kalisierung die Zelltypen identifiziert werden, die für die NO-Produktion während der CSD verantwortlich sind.

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

3.1 Die Funktion einer erhöhten K^+ -Baseline-Konzentration bei der Auslösung von CSD und CSI ist wahrscheinlich eine Herabregulation der Na, K-ATPase

Untersucht wurde der kombinierte Effekt des Na, K-ATPase Inhibitors Ouabain und einer Erniedrigung der corticalen NO-Konzentration ($[\text{NO}]$) auf den regionalen cerebralen Blutfluß (CBF) und das subarachnoidale und intracorticale DC-Potential sowie die extrazelluläre K^+ -Konzentration *in vivo* bei der Ratte (Petzold et al. in Vorbereitung). Die NO-Konzentration wurde entweder durch Hemmung der NO-Synthese mit Nitro-L-Arginin (L-NNA) oder subarachnoidale Applikation des NO-Scavengers Oxyhämoglobin (Oxy-Hb) gesenkt. Eine geschlossene kraniale Fenstertechnik wurde verwendet. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen eine CSD generiert wird, die nicht, wie physiologischerweise, zu einer "spreading hyperaemia" gefolgt von "spreading oligoemia" führte, sondern zu einem dramatischen Abfall des CBF in den ischämischen Bereich, in dem der CBF prolongiert verblieb und sich erst langsam wieder

erholte. Dies sind die typischen Charakteristika der Cortical Spreading Ischaemia. Eine neuronale Aktivierung durch direkte corticale elektrische Stimulation führte unter Ouabain und NO-Senkung nicht zu einer Umkehrung der Blutflussantwort, sondern nur zu einer deutlichen Verzögerung des Blutflussanstiegs. D.h., die Invertierung der Kopplung zwischen neuronalem Metabolismus und CBF unter Ouabain und NO-Senkung gilt spezifisch für die Spreading Depression als einer Form neuronaler Aktivierung. Mit Hilfe eines gekoppelten Enzym-Assays für die Na, K-ATPase haben wir zusätzlich nachweisen können, daß eine erhöhte Baseline K^+ -Konzentration die Aktivität der Na, K-ATPase vermindert. Da die einzelnen Isoformen der Alpha-Untereinheiten der Na, K-ATPase unterschiedliche Ouabain-Affinitäten besitzen, konnten wir mit Hilfe unterschiedlicher Ouabain-Konzentrationen im Assay darüberhinaus zeigen, daß die Aktivitätsminderung vor allem die Alpha-2- und Alpha-3-Fraktion der Aktivität betrifft. Dies ist von besonderem Interesse, da diese Isoformen im ZNS von Gliazellen und Neuronen exprimiert werden. Weiterhin haben wir die Eigenschaften von CSDs unter physiologischen Bedingungen, unter einer erhöhten Baseline K^+ -Konzentration und unter Ouabainapplikation *in vivo* und in Hirnschnitten miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß im Vergleich zu physiologischen Bedingungen die Repolarisation unter Ouabainapplikation verzögert ist. Da wir diesen Effekt auch in Hirnschnitten der Ratte und des Menschen nachweisen konnten, ist davon auszugehen, daß vor allem die neuronalen/astroglialen Formen der Na, K-ATPase für die Repolarisation nach CSD verantwortlich sind.

3.2 Revertierung der “Cortical Spreading Ischaemia” in eine “Cortical Spreading Depression” bei der Ratte mit Hilfe von Nimodipin und mässiger hypervolämischer Hämodilution

Es ist bekannt, daß Schwere und Frequenz von DINDs durch prophylaktische Therapie mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Antagonisten Nimodipin gesenkt werden können. Außerdem wirkt sich ein hochnormaler Volumenstatus günstig aus. Wir konnten zeigen, dass diese Faktoren CSI, die durch Oxy-Hb und erhöhte extrazelluläre K^+ Baselinekonzentration ausgelöst wird, wieder in eine fast normale CSD mit assoziierter Hyperämie retransformiert (Dreier et al 2002a).

3.3 Induktion von Cortical Spreading Depressions durch topische Gabe des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 in der Hirnrinde der Ratte

Es wird vermutet, daß das Peptid Endothelin-1 an der Entstehung des Vasospasmus nach SAB beteiligt sein könnte. Diese Annahme beruht darauf, (1) daß Endothelin-1 der stärkste bekannte Vasokonstriktor der cerebralen Zirkulation ist (Yanagisawa et al 1988), (2) daß seine Produktion in Endothelzellen durch Oxy-Hb stimuliert wird (Cocks et al 1991) (3) daß erhöhte Endothelinspiegel im Liquor cerebrospinalis nach SAB bei Mensch und Tier gemessen wurden (Zimmermann und Seifert 1998) und (4) daß Endothelin-Antagonisten den Vasospasmus nach SAB in Tierexperimenten antagonisieren konnten (Wanebo et al 1998). Applikation von Endothelin-1 auf die A. cerebri media oder direkt auf den Cortex induziert in Tierexperimenten in einem höheren Konzentrationsbereich Infarkte (Macrae et al 1993; Fuxe et al 1997). Uns interessierte, welche Potentialantworten Endothelin-1 im Cortex *in vivo* auslöst (Dreier et al. 2002b). Wir fanden, daß Endothelin-1 unterhalb der Schwelle, die zu signifikanten Infarzierungen führt, CSDs induzierte und charakterisierten die Endothelin-1-induzierten CSDs mit Hilfe von *in vivo*- und *in vitro*-Methoden. Dabei zeigte sich, daß Endothelin-1 *in vivo* der stärkste bisher bekannte Auslöser von CSD ist. Im Gegensatz dazu konnten selbst hohe Konzentrationen keine CSD in Hirnschnitten der Ratte auslösen, was vermuten lässt, daß Endothelin-1 eine lokale corticale Minderperfusion verursacht und so zur CSD führt.

3.4 Endothelin-1 und [NO]-senkende Substanzen induzieren Cortical Spreading Ischaemia

In dieser Studie gingen wir der Frage nach, ob die Kombination von Endothelin-1 und [NO]-senkenden Substanzen CSI auslöst. Wir konnten nachweisen, dass sowohl Oxy-Hb als auch der NO-Synthase-Inhibitor L-NNA in Kombination mit Endothelin-1 CSI triggern. Um zu klären, inwiefern direkte modulatorische Einflüsse von Endothelin-1 auf das neuronale/astrogliale Netzwerk eine Rolle spielen, haben wir mit einer ex-vivo-Methodik nachweisen können, dass cortical appliziertes Endothelin-1 die Aktivität der Na, K-ATPase inhibiert, und zwar besonders die Aktivität der neuronalen und astroglialen Isoenzyme. Um zu untersuchen, ob endogen während einer CSI synthetisiertes Endothelin-1 zur Vasokonstriktion bei CSI beiträgt, haben wir die Wirkung von Endothelin-Rezeptorantagonisten auf CSI untersucht, die durch erhöhte Baseline K^+ Konzentration und L-NNA hervorgerufen wurde. Zusammenfassend zeigten sich nur sehr

A1 Dreier/Einhäupl

geringe Änderungen der Parameter sowohl unter Endothelin_A-Rezeptor- als auch unter Endothelin_B-Rezeptor-Blockade (Petzold et al 2003b). Diese Studie konnte somit zeigen, daß Endothelin-1 in Kombination mit [NO]-Senkern CSI auslöst und daß dieser Effekt vor allem auf der Fähigkeit von Endothelin-1 beruht, die Aktivität der Na, K-ATPase zu senken. Diese Ergebnisse sind deswegen interessant, da die beide Faktoren – Endothelin-1 und Oxy-Hb – nach einer SAB freigesetzt werden (Juvela 2002; Pluta et al 1998). Für beide Faktoren sind in mehreren Arbeiten Schlüsselrollen bei der DIND-Entstehung postuliert worden. Darüber sind derzeit mehrere klinische und präklinische Studien geplant und in der Durchführung, die Endothelin-Rezeptor-Antagonisten als Mittel zur DIND-Prävention untersuchen (Chow et al 2002).

3.5 Das typische pathomorphologische Substrat von DINDs beim Menschen lässt sich nicht mit der Computertomographie, wohl aber mit dem Kernspintomogramm nachweisen und ähnelt dem Infarktmuster des Migräne-induzierten Infarkts

Autopsie-Studien haben gezeigt, dass das typische pathomorphologische Substrat von DINDs beim Menschen weitverteilte glockenförmige oder laminäre Infarkte in der Hirnrinde sind. In der Regel ist die Auflösung der Computertomographie in der Hirnrinde zu gering, um diese Infarkte sichtbar zu machen. Wir konnten dieses Infarktmuster jedoch mit Hilfe der Kernspintomographie prinzipiell belegen (Dreier et al 2002c). Darüber hinaus konnte ein morphologisch sehr ähnliches kortikales Infarktmuster kernspintomographisch beim Migräne-induzierten Schlaganfall dargestellt werden (Petzold et al 2003a).

3.6 Wirkung des NO-Spiegels auf Cortical Spreading Ischemia und Cortical Spreading Depression. Modulation von Ionenkanälen durch NO. Synthese von NO in akuten Hirnschnitten während Cortical Spreading Depression

In initialen Versuchen konnten wir nachweisen, dass eine NO-Synthase-Blockierung in akuten Hirnschnitten der Ratte keinen Einfluss auf die Dauer des DC-Potentials hat (Dreier et al 2001). Dies deutet darauf hin, dass der erniedrigte NO-Spiegel während einer CSI hauptsächlich vaskuläre Effekte hat, da akute Hirnschnitte kein funktionierendes Gefäßsystem besitzen. Andererseits ist bekannt, dass NO unabhängig von seiner vaskulären Funktion das neuronal/astrogliale Netzwerk direkt beeinflussen kann. So weiß man, dass NO durch Nitrosylierung direkt die Aktivität von NMDA-Rezeptoren und anderen Ionenkanälen beeinflusst (Choi et al 2000).

In dieser Antragsperiode gingen wir daher den Fragen nach, (1) welche elektrophysiologischen Änderungen während CSI resp. CSD auf eine direkte Wirkung von NO auf das neuronal/astrogliale Netzwerk zurückzuführen sind, (2) welche Wechselwirkungen von NO mit neuronalen Ionenkanälen für diese Effekte verantwortlich sein könnten, (3) in welchem Umfang und mit welcher räumlichen Verteilung NO während CSD freigesetzt wird und (4) welche Zellen für die Synthese von NO während CSD verantwortlich sind (Petzold et al in Vorbereitung).

Mittels Applikation aufsteigender Kaliumkonzentrationen in kraniellen Fensterpräparationen *in vivo* konnten wir nachweisen, dass die Kalium-Schwelle zur Auslösung einer CSD wesentlich höher lag als die Kalium-Schwelle zur Auslösung einer CSI, d. h. wenn Kalium und L-NNA oder Oxy-Hb koappliziert wurden. In akuten Hirnschnitten der Ratte und des Menschen (Gewebeentnahme bei pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie) konnten wir zeigen, dass die Kalium-Schwelle zur Entstehung von CSD durch Koapplikation von L-NNA signifikant gesenkt wurde. Die Messung der CSD geschah sowohl mittels K⁺-sensitiver Mikroelektroden als auch durch die direkte Messung der Änderungen von durch den Hirnschnitt transmittierten Lichts während CSD (intrinsic optical signalling). Darüber hinaus konnte dieser Schwelleneffekt durch gleichzeitige Gabe des NO-Donors NO/Spermine revertiert werden. Die Schwellenänderung durch L-NNA konnte durch Gabe des cGMP-Antagonisten ODQ nicht reproduziert werden. Zusätzlich fand sich auch keine Schwellenänderung nach Applikation des cGMP-Analogons 8-Bromo-cGMP. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Senkung des NO-Spiegels die Schwelle für CSD senkt, daß dieser Effekt cGMP-unabhängig ist und auf eine direkte Wirkung von NO auf das neuronale/astrogliale Netzwerk zurückzuführen ist. In einem zweiten experimentellen Ansatz konnten wir zeigen, dass der NO-Spiegel die direkten elektrophysiologischen (Dauer des DC- und Kaliumsignals) und optischen Eigenschaften der CSD in akuten Hirnschnitten der Ratte und des Menschen nicht beeinflusst, was unsere initialen Untersuchungen bestätigt (Dreier et al. 2001).

Es ist bekannt, daß die Schwelle zur Auslösung einer CSD entscheidend vom Calcium-Einstrom über neuronale spannungsabhängige Calciumkanäle (VGCC) und über N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- Re-

zeptoren beeinflusst wird (Lauritzen und Hansen 1992; Ayata et al 2000; Richter et al 2002). Wir untersuchten daher die Wirkung von NO auf die relativen Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentrationen (fluorimetrisch gemessen mit dem intrazellulären Calcium-Indikator Fluo-4-AM) in corticalen Neuronenkulturen der Ratte nach K^+ -induzierter Depolarisation. Es zeigte sich, daß im Vergleich zur Kontrolle die intrazelluläre Calcium-Konzentration unter L-NNA stärker und unter dem NO-Donor SNAP schwächer anstieg. Darüber hinaus konnten wir durch den Einsatz von VGCC- und NMDA-Rezeptor-Antagonisten nachweisen, daß dieser Einfluss des NO-Spiegels auf die Calcium-Konzentration hauptsächlich auf die Modulation der Aktivität des NMDA-Rezeptors und des P/Q-Calciumkanals durch NO zurückzuführen ist.

Aus Versuchen mit NO-sensitiven Elektroden ist seit Längerem bekannt, dass NO während CSD synthetisiert wird (Read und Parsons 2000). Die unmittelbare Darstellung von NO und seine räumliche Verteilung während CSD waren bisher nicht erfolgt. Mit dem extrazellulären NO-sensitiven Farbstoff Diaminoanthraquinon (DAQ) konnten wir nachweisen, daß die Freisetzung von NO eng mit den räumlichen Grenzen der CSD in akuten Hirnschnitten der Ratte korreliert. Der Großteil des DAQ-Signals konnte in unmittelbarer Umgebung von Blutgefäßen und Neuronen nachgewiesen werden. Quantitativ war die NO-Freisetzung vergleichbar mit der Wirkung des NO-Donors NO/Spermine (100 μ M). Mittels eines Versuchsaufbaus, der auf einem gekoppelten Exzitations-Detektions-System beruht (Laser/Optische Glasfaser), gelang es uns, die Bildung von NO während CSD mit hoher zeitlicher Auflösung direkt zu messen. Die Korrelation des gemessenen NO-Anstiegs zur Depolarisation des Hirnschnittes gelang über die gleichzeitige optische Darstellung (intrinsische optische Signale) und elektrophysiologische Messung (ionensensitive Elektrode) der CSD. Es zeigte sich dabei, daß die NO-Bildung bereits wenige Sekunden nach Eintreffen der neuronalen/astroglialen CSD-Wellenfront einsetzt. Zur Identifizierung der NO-synthetisierenden Zellen verwendeten wir einen rein intrazellulären NO-Marker, Diaminofluoreszeindiazetat (DAF-DA). Nach einer CSD wurden die Schnitte fixiert, in dünnere Schnitte unterteilt und dann mit zellspezifischen Antikörpern markiert, die wiederum mit sekundären fluoreszierenden Antikörpern visualisiert wurden. Es zeigte sich, daß NO während CSD hauptsächlich von kortikalen Neuronen und von zerebralen Endothelzellen gebildet wird.

3.7 Retrospektive Fallkontrollstudie zur Migräne als möglichem Risikofaktor für DINDs nach SAB

Da CSD als pathophysiologisches Korrelat der Migräneaura gilt (Lauritzen 1994) und die CSI möglicherweise das pathophysiologische Korrelat von DINDs darstellt, könnte Migräne ein Risikofaktor für die Entstehung von DINDs nach SAB sein (Dreier et al 1998; 2000). Daher untersuchten wir in einer retrospektiven klinischen Studie in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Valdueza und der neurologischen Abteilung des Klinikums Hamburg Eppendorf, ob Migräne ein signifikanter Risikofaktor für die Entstehung von DINDs ist (Valdueza et al eingereicht). Es ergab sich, daß die Migräneprävalenz bei 40 Patienten mit Zustand nach DIND im Vergleich zu einer alters- und geschlechtsgematchten Gruppe mit SAB ohne DIND signifikant höher war (43% im Vergleich zu 23%). Dies unterstützt die Annahme, daß Migräne ein Risikofaktor für DINDs sein könnte.

3.8 Adenosin kann die Spreading Ischaemia partiell in eine fast normale CSD mit Hyperämie revertieren

Adenosin ist einer der wichtigsten Kandidaten als Mediator für die neurovaskuläre Kopplung. Ebenso wie andere Vasodilatoren kann Adenosin die SI partiell in eine SD mit Hyperperfusion zurückverwandeln. Möglicherweise ist endogenes Adenosin wichtig, um die Dauer der CSI zeitlich zu begrenzen (Dreier et al 2004).

Zitierte Literatur

- 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* 160:123-132
- Beaulieu C, Busch E, de Crespigny A, Moseley ME (2000) Spreading waves of transient and prolonged decreases in water diffusion after subarachnoid hemorrhage in rats. *Magn Reson Med* 44:110-116

A1 Dreier/Einhäupl

- Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, Weber JR (2002) Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest.* 109:19-27
- Busch E, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME (1998) Diffusion MR imaging during acute subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 29:2155-2161
- Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* 3:15-21
- Chow M, Dumont AS, Kassell NF (2002) Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. *Neurosurgery* 51:1333-1341
- Cocks T, Malta E, King S, Woods R, Angus J (1991) Oxyhaemoglobin increases the production of endothelin-1 by endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol* 196:177-182.
- Dietrich HH, Dacey RG Jr (2000) Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 46:517-530
- 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
- Dreier JP, Heinemann U (1991) Regional and time dependent variations of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp Brain Res* 87:581-596
- Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhäupl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1998) Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:978-990
- Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhäupl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg* 93:668-676
- Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2001) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol* 531:515-526
- Dreier JP, Sakowitz O, Dirnagl U, Petzold G, Benndorf G, Einhäupl KM, Lanksch WR, Unterberg AW, Valdueza J (2001) Migrainous aura-like symptoms starting several minutes after the onset of subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 57:1344-1345
- Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmuller O, Orzechowski HD, Lindauer U, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2002) Endothelin-1 potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain* 125:102-112
- Fisher CM, Kistler JP, Davis JM (1980) Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6:1-9
- Fuxe K, Bjelke B, Andbjør B, Grahn H, Rimondini R, Agnati LF (1997) Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport.* 8:2623-2629
- Hansen AJ, Lauritzen M (1984) The role of spreading depression in acute brain disorders. *An Acad Brasil Ciênc* 56:457-479
- Hubschmann OR, Kornhauser D (1980) Cortical cellular response in acute subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 52:456-462
- Hubschmann OR, Kornhauser D (1982) Effect of subarachnoid hemorrhage on the extracellular microenvironment. *J Neurosurg* 56:216-221
- Juvela S (2002) Plasma endothelin and big endothelin concentrations and serum endothelin-converting enzyme activity following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 97:1287-1293
- Kaoutzanis M, Yokota M, Sibilio R, Peterson JW. Neurologic evaluation in a canine model of single and double subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods* 50:301-307
- Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, Jane JA, Adams HP, Kongable GL (1990) The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg* 73:18-36

- Kohl M, Lindauer U, Dirnagl U, Villringer A (1998) Separation of changes in light scattering and chromophore concentrations during cortical spreading depression in rats. *Opt Lett* 23:555-557
- Lashley KS (1941) Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch Neurol Psychiat* 46:331-339
- Leão AAP (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390
- Leão AAP, Morison RS (1945) Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 8:33-45
- MacDonald RL, Weir BKA (1991) A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22:971-982
- Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J (1993) Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, timecourse, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:276-284
- Megyesi JF, Vollrath B, Cook DA, Findlay JM (2000) In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery* 46:448-60
- Nedergaard M, Cooper AJL, Goldman S (1995) Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *J Neurobiol* 28:433-444
- Neil-Dwyer G, Lang DA, Doshi B, Gerber ChJ, Smith PWF (1994) Delayed cerebral ischaemia: the pathological substrate. *Acta Neurochir (Wien)* 131:137-145
- Ohta O, Osaka K, Siguma M, Yamamoto M, Shimizu K, Toda N (1983) Cerebral vasospasm following ruptured intracranial aneurysms, especially some contributions of potassium ion released from subarachnoid hematoma to delayed cerebral vasospasm, in: Bevan JA (ed): *Vascular Neuroeffector Mechanisms*, New York, Raven Press, pp 353-358
- Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Andersen AR, Lassen NA, Hansen PE, Karle A (1993) Ischaemia-induced (symptomatic) migraine attacks may be more frequent than migraine-induced ischaemic insults. *Brain* 116:187-202
- 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
- Petzold GC, Klingebiel R, Einhäupl KM, Arnold G, Valdueza JM, Dreier JP (2003a) Migraine-induced stroke in a patient with migraine-related epilepsy. *Headache* 43:694-696.
- Petzold GC, Einhäupl KM, Dirnagl U, Dreier JP (2003b) Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Ann Neurol* 54:591-598
- Pluta RM, Afshar JK, Boock RJ, Oldfield EH Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 88:557-561
- Sarrafzadeh AS, Unterberg AW, Lanksch WR (1999) Bedside-microdialysis for early detection of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Case report and review of the literature. *Zentralbl Neurochir* 59: 269-273, 1999
- 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
- Valdueza J, Kremer C, Dreier JP, Lammers G, Lohmann F, Dirnagl U, Hansen HC Is migraine a risk factor for delayed ischemic neurological deficit after subarachnoid hemorrhage? *Lancet* (submitted)
- Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C (1997) Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:1981-1992
- Vermeulen M, Lindsay KW, Murray GD, Cheah F, Hijdra A, Muizelaar JP, Schannong M, Teasdale GM, van Crevel H, van Gijn J (1984) Antifibrinolytic treatment in subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med* 311:432-7
- Victorov IV, Prass K, Dirnagl U (2000) Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res Brain Res Protoc* 5:135-139

A1 Dreier/Einhäupl

- Wanebo JE, Arthur AS, Louis HG, West K, Kassel NF, Lee KS, Helm GA (1998) Systemic administration of the endothelin-A receptor antagonist TBC 11251 attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: dose study and review of endothelin-based therapies in the literature on cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 43:1409-1418
- Wijman CA, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Beiser AS (1998) Migrainous visual accompaniments are not rare in late life: the Framingham Study. *Stroke* 29:1539-1543
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1998) A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322:411-415
- Zimmermann M, Seifert V (1998) Endothelin and subarachnoid hemorrhage: An overview. *Neurosurgery* 43:863-876

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die Cortical Spreading Ischaemia (Dreier et al 1998) hat besonders im Forschungsbereich Vasospasmus und SAB Aufsehen erregt. Unsere Befunde wurden eingehend in zwei Reviews über mikrozirkulatorische Veränderungen nach SAB besprochen (Asano 1999; Dietrich und Dacey 2000). Mehr als 10 Zitierungen in internationalen Zeitschriften erreichten bisher folgende Arbeiten im Rahmen unseres Projekts: Die NO-Abhängigkeit der Kalium-induzierten Blutflußantwort *in vivo* bei der Ratte (Dreier et al 1995); die Darstellung von Spreading Depression mit Hilfe der Nahinfrarotspektroskopie (Wolf et al 1996), die Untersuchung des freien Radikalmusters bei Ischämie (Peters et al 1998) und die Beschreibung der Cortical Spreading Ischaemia als Modell für DINDs nach SAB (Dreier et al. 1998). Die tierexperimentelle Studie zur Revertierung der CSI durch Nimodipin und Triple-H-Therapie (Dreier et al 2002) ist in der Ausgabe des Journals von vier renommierten US-amerikanischen SAB-Experten diskutiert worden und sehr positiv kommentiert worden. Darüber hinaus ist dieselbe Arbeit im Rahmen einer tierexperimentellen Arbeit mit dem Ratten-SAB-Modell zitiert worden (Sun et al 2003). Unsere Entdeckung und die damit verbundenen Implikationen, dass Endothelin-1 CSD auslöst (Dreier et al 2001), ist zum zentralen Thema eines Reviews (Parsons und Strijbos 2003) gemacht und dort ausführlich diskutiert worden. Die in dieser Originalarbeit geäußerte Hypothese, dass Endothelin-1 ein vaskulärer Triggerfaktor der CSD sein könnte, wurde kürzlich in einer großen klinischen Studie aufgegriffen (Kruit et al 2004), was die unmittelbare klinische Relevanz unserer Arbeit unterstreicht.

Asano T (1999) Oxyhemoglobin as the principal cause of cerebral vasospasm: a holistic view of its actions. *Crit Rev Neurosurg* 9:303-318

Dietrich HH, Dacey Rg jr (2000) Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 46:517-530

Sun BL, Zhang SM, Xia ZL, Yang MF, Yuan H, Zhang J, Xiu RJ (2003) The effects of nimodipine on regional cerebral blood flow, brain water and electrolyte contents in rats with subarachnoid hemorrhage. *Clin Hemorheol Microcirc* 29:337-344

Parsons AA, Strijbos PJ (2003) The neuronal versus vascular hypothesis of migraine and cortical spreading depression. *Curr Opin Pharmacol* 3:73-77

Kruit MC, van Buchem MA, Hofman PA, Bakkers JT, Terwindt GM, Ferrari MD, Launer LJ (2004) Migraine as a risk factor for subclinical brain lesions *JAMA* 291:427-434

5 Offene Fragen

Der Cortical Spreading Ischaemia liegt eine Ischämie zugrunde, die durch neuronale Aktivierung ausgelöst wird. Damit einher geht eine prolongierte Depolarisation des neuronalen Netzwerks. Die geringen Effekte einer Kombination von Kaliumerhöhung und NO-Senkung *in vitro* auf die CSD zeigten uns, daß an der Entstehung der Cortical Spreading Ischaemia *in vivo* ganz wesentlich vaskuläre Mechanismen beteiligt sind. Allerdings beobachteten wir auch *in vitro* eine gewisse Verzögerung der Repolarisation nach CSD, die auf die erhöhte Kaliumkonzentration zu beziehen war. Aus einer Studie ist bekannt, daß eine langdauernde Kaliumerhöhung in kultivierten Astrozyten zu einer Herabregulation der Natriumpumpe führt (Hajek et al. 1996). Wir testeten daher, ob eine direkte Hemmung der Natriumpumpe mit Oua-

bain in Kombination mit NO-Senkung *in vivo* auch zu einer Cortical Spreading Ischaemia führt. Es zeigte sich, daß dies der Fall ist. Mit Hilfe eines gekoppelten Enzym-Assays ergab sich weiterhin die Hypothese, dass die Erhöhung der K⁺-Baselinekonzentration vor allem den Alpha-2- und den Alpha-3-Anteil der Na, K-ATPase herabreguliert. Mit Hilfe von heterozygoten Mäusen, bei denen ein Allel für das Alpha-2-Isoenzym ablatiert ist ($\alpha 2^{+/-}$ -Mäuse), wollen wir nun untersuchen, ob dem Alpha-2-Isoenzym hierbei eine besondere Bedeutung zukommt. Das Alpha-2-Isoenzym der Na, K-ATPase ist auch aus dem Grund besonders interessant, da eine Mutation in diesem Gen bei Menschen zur sogenannten familiären hemiplegischen Migräne Typ 2 führt, der wahrscheinlich eine Herabsetzung der Schwelle für Spreading Depression zugrundeliegt.

Desweiteren haben wir in der zurückliegenden Antragsperiode auch die Veränderung der extrazellulären Ionenkonzentrationen (K⁺, Ca²⁺, Na⁺, H⁺) während Cortical Spreading Ischaemia unter Oxy-Hb und erhöhter K⁺-Baselinekonzentration gemessen. Wir wollen diese Studie nun komplementieren, indem wir testen, ob es in der isolierten A. cerebri media durch die *in vivo* gemessenen Ionenänderungen in Abhängigkeit von der Abwesenheit von NO zur Vasokonstriktion kommt.

Weiterhin wollen wir der Frage nachgehen, ob *in vivo* sowie *in vitro* in akuten Hirnschnitten von Ratten und Menschen, die Wirkung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf die CSD von der extrazellulären K⁺-Baselinekonzentration abhängt. CSD, die mittels K⁺-Mikroinjektion unter normokaliämischen Bedingungen ausgelöst wurde, kann sowohl durch 2-APV als auch durch MK-801 blockiert werden. Wir wollen untersuchen, ob diese Blockierung durch beide Antagonisten nicht mehr gegeben ist, wenn CSD durch Anhebung der extrazellulären K⁺-Baselinekonzentration ausgelöst wurde und in einem Millieu erhöhter K⁺-Baselinekonzentration wandert.

Wir möchten auch testen, ob eine Hemmung der Guanylatcyclase *in vivo* ebenfalls zur CSI führt. Außerdem möchten wir untersuchen, ob in der Penumbra einer fokalen Ischämie CSI-artige Blutflussabfälle ausgelöst werden, wenn die NO-Konzentration erniedrigt ist.

Weiterhin soll ein SAB-Modell bei der Ratte etabliert werden. Wir möchten untersuchen, in wieweit in einem solchen Modell veränderte Blutflussantworten auf CSD auftreten.

In mehreren Studien ist gezeigt worden, daß ein Kationeneinstrom in apikalen Dendriten wichtig für die Entstehung der CSD zu sein scheint. In einem weiteren Projekt möchten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Heinemann daher die Bedeutung von Calcium-aktivierten nicht-selektiven Kationenkanälen in akuten Hirnschnitten der Ratte untersuchen.

Weiterhin möchten wir in einem Kooperationsprojekt mit der Neurochirurgischen Klinik (Dr. med. Sarrafzadeh) der Frage nachgehen, ob die extrazelluläre Kaliumkonzentration bei Patienten mit SAB während der Entstehung von DINDs ansteigt. Aus einer bereits durchgeführten klinischen Studie zur Mikrodialyse, an der wir beteiligt waren (Sakowitz et al 2001) existiert noch hinreichend Material, um die extrazellulären Ionenkonzentrationen, insbesondere die extrazelluläre Kaliumkonzentration bei Patienten mit und ohne DIND mit Hilfe einer HPLC und Konduktivitätsmessung zu bestimmen.

Schließlich möchten wir an einer internationalen multizentrischen Studie teilnehmen (CO-OPERATIVE STUDY ON BRAIN INJURY DEPOLARISATIONS [COSBID]) und elektrophysiologisch untersuchen, ob es bei Patienten nach SAB zu SD-artigen Depolarisationen kommt.

Literatur

Eigene Originalarbeiten in peer review Journalen mit direktem Bezug zum A1-Projekt (ISI Impactfactor in Klammer)

Dreier J, Körner K, Görner A, Weih M, Villringer A, Dirnagl U (1995) Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium J Cereb Blood Flow Metab 15:914-191 (IF=5,7)

Wolf T, Obrig H, Dreier J, Back T, Villringer A, Dirnagl U (1996) Systemic nitric oxide synthase (NOS) inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression (CSD) in rats: A non-invasive near infrared spectroscopy (NIRS) and laser Doppler flowmetry (LDF) study. J Cereb Blood Flow Metab 16:1100-1107 (IF=5,7)

Reuter U, Weber JR, Gold L, Arnold G, Wolf T, Dreier J, Lindauer U, Dirnagl U (1998) Locally triggered release of neurotransmitters from perivascular nerves contributes to cortical spreading depression associated hyperemia in rats. Am J Physiol 274:H1979-H1987 (IF=2,7)

A1 Dreier/Einhäupl

- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased formation of reactive oxygen species following permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196-205 (IF=5,7)
- Dreier JP, Körner K, Ebert N, Görner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhäupl KM, Lauritzen M, Dirnagl U (1998) Nitric oxide scavenging by 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* 18:978-990 (IF=5,7)
- Gold L, Back T, Arnold G, Dreier J, Einhäupl KM, Reuter U, Dirnagl U (1998) Cortical spreading depression associated hyperemia in rats: Involvement of serotonin. *Brain Res* 783:188-193 (IF=2,3)
- Dreier, J.P., Ebert, N., Priller, J., Megow, D., Lindauer, U., Klee, R., Reuter, U., Imai, Y., Einhäupl, K.M., Victorov, I., Dirnagl, U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space induce cortical spreading ischemia and focal necrosis in rats, a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg* 93:668-676 (IF=3,3)
- Dreier, J.P., Petzold, G., Tille, K., Lindauer, U., Arnold, G., Heinemann, U., Einhäupl, K.M., Dirnagl, U (2001) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol* 531:515-526 (IF=4,6)
- Sakowitz OW, Wolfrum S, Sarrafzadeh AS, Stover JF, Dreier JP, Dendorfer A, Benndorf G, Lanksch WR, Unterberg AW (2001) Relation of cerebral energy metabolism and extracellular nitrite and nitrate concentrations in patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1067-1076 (IF 5.9)
- Dreier JP, Sakowitz OW, Unterberg AW, Benndorf G, Einhäupl KM, Valdueza JM (2001) Migrainous aura starting several minutes after the onset of subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 57:1344-1345 (IF 4.8)
- Dreier JP, Sakowitz OW, Harder A, Zimmer C, Dirnagl U, Valdueza JM, Unterberg AW (2002) Focal laminar cortical MR-signal abnormalities after subarachnoid hemorrhage: report of two cases. *Ann Neurol* 52:825-829 (IF 8.5)
- Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2002) Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine or moderate volume expansion/hemodilution in rats. *Neurosurgery* 51:1457-1467 (IF 2.8)
- Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmüller O, Orzechowski H-D, Lindauer U, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2002) Endothelin-1 potently induces Leão's cortical spreading depression in vivo in the rat: A model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain* 125:102-112 (IF 7.3)
- Dreier JP, Tille K, Dirnagl U (2004) Partial antagonistic effect of adenosine on inverse coupling between spreading neuronal activation and cerebral blood flow in rats. *Neurocrit Care* 1:85-94 (Journal der Neurocritical Care Society, in Pub Med gelistet, Erstausgabe, daher noch kein IF)
- Petzold GC, Einhäupl KM, Dirnagl U, Dreier JP (2003) Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Ann Neurol* 55:286-290 (IF 8.5)
- Valdueza JM, Kremer C, Dreier JP, Lammers G, Lohmann F, Dirnagl U, Schreiber SJ, Hansen HC Does Migraine Increase the Risk of Delayed Ischemic Neurological Deficits after Subarachnoid Hemorrhage? *Headache* eingereicht
- Petzold GC, Klingebiel R, Einhäupl KM, Arnold G, Valdueza JM, Dreier JP (2003) Migraine-induced stroke in a patient with migraine-related epilepsy. *Headache* 43:694-696 (IF 2.8)

Projektassoziierte Buchbeiträge

- Wolf T, Arnold G, Dreier JP, Back T, Villringer A, Dirnagl U (1995) Noninvasive detection of hemoglobin oxygenation changes during cortical spreading depression in the rat brain, in: Olesen J, Moskowitz MA (eds) *Experimental headache models*, New York, Raven Press Ltd, pp 107-112
- Dirnagl U, Dreier J (1997) Regulation of cerebral blood flow by ions, in: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B (eds) *Primer on cerebrovascular disease*, San Diego, Academic Press, pp.75-77
- Dirnagl U., Wiegand, F. (1999) Pathophysiologie der zerebralen Ischämie; in: *Neurologie, Band I*. Hrsg.: Hopf, Deuschl, Diener, Reichmann. Thieme Verlag Stuttgart, pp 330-336

- Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2002) Ischemia caused by inverse coupling between neuronal activation and cerebral blood flow in rats, in: Brain activation and CBF control (Tomita M, Kanno I, Hamel E, eds), Amsterdam, Elsevier, pp 487-492
- Arbeiten in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (sofern noch nicht oben aufgeführt)*
- Angstwurm C, **Weber** J, Segert A, Bürger W, Weih M, Freyer D, Einhäupl KM, Dirnagl U (1995) Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rat. *Neurosci Lett* 190:1-4 (IF=2,1)
- Weber** J, Angstwurm K, Bürger W, Einhäupl KM, Dirnagl U (1995) Anti ICAM-1 monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J.Neuroimmunol* 63: 63-68 (IF=3,2)
- Lindauer** U, Dreier J, **Angstwurm** K, Villringer A, Einhäupl KM, Dirnagl U (1996) Role of nitric oxide synthase inhibition in leukocyte- endothelium interaction in the rat pial microvasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1143-1153 (IF=5,7)
- Weber** JR, Angstwurm K, Bove GM, Bürger W, Einhäupl KM, Dirnagl U, Moskowitz MA (1996) The trigeminal nerve augments regional cerebral blood flow during experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1319-1325 (IF=5,7)
- Weber** JR, Rosenkranz T, Angstwurm W, Lindauer U, Freyer D, Bürger W, Einhäupl K, Dirnagl U (1997) Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis. *Neurosci Lett* 226:17-20 (IF=2,1)
- Weber** JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Freyer D, Bürger W, Busch C, Einhäupl KM, 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* 17:1221-1229 (IF=5,7)
- Angstwurm K, Freyer D, Dirnagl U, Hanisch UK, Schumann RR, Einhäupl KM, **Weber** JR (1998) Tumour necrosis factor alpha induces only minor inflammatory changes in the central nervous system, but augments experimental meningitis. *Neuroscience* 86:627-634 (IF=3,9)
- Dreier JP, Zhang CL, **Heinemann** U (1998) Phenytoin, phenobarbital, and midazolam fail to stop status epilepticus-like activity induced by low magnesium in rat entorhinal slices, but can prevent its development. *Acta Neurol Scand.* 98:154-60 (IF=1,3)
- Schulz JG, Megow D, Reszka R, Villringer A, Einhäupl KM, **Dirnagl** U (1998) Evidence that glypican is a receptor mediating beta-amyloid neurotoxicity in PC12 cells. *Eur J Neurosci* 10:2085-2093 (IF 4.1)
- Valdúeza JM, Draganski B, Hoffmann O, **Dirnagl** U, Einhäupl KM (1999) Analysis of CO₂ vasomotor reactivity and vessel diameter changes by simultaneous venous and arterial Doppler recordings. *Stroke* 30:81-86 (IF 5.1)
- Zipp** F, Weil JG, Einhäupl KM (1999) No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination. *Nat Med* 5:964-965 (IF 28.7)
- Harms H, Wiegand F, Megow D, Prass K, Einhäupl KM, **Dirnagl** U (2000) Acute treatment of hypertension increases infarct sizes in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport* 11:355-359 (IF 2.2)
- Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, **Dirnagl** U, **Lindauer** U (2001) The cerebrovascular response to elevated potassium - role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett* 306:61-64 (IF 2.1)
- Lindauer** U, Kunz A, Schuh-Hofer S, Vogt J, Dreier JP, **Dirnagl** U (2001) Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arteriolar pH reactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1353-H1363 (IF 3.2)
- Lindauer** U, Vogt J, Schuh-Hofer S, Dreier JP, **Dirnagl** U (2003) Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca²⁺-activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1227-1238 (IF 5.3)
- Kleeberg J, Petzold GC, Major S, **Dirnagl** U, Dreier JP (im Druck) Endothelin-1 induces cortical spreading depression via activation of the ETA receptor/phospholipase C pathway in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (IF 3.4)

A1 Dreier/Einhäupl

Liste der sonstigen Veröffentlichungen der Antragsteller, die in den vergangenen 3 Jahren erschienen sind, also 2001/2002/2003 (nicht unmittelbar Projekt assoziiert)

- Kinze S, Clauss M, Reuter U, Wolf T, Dreier JP, Einhäupl KM, Arnold G (2001) Valproic acid is effective in migraine prophylaxis at low serum levels: a prospective open-label study. *Headache* 41:774-778 (IF 2.7)
- Doepp F, Schreiber SJ, Dreier JP, Einhäupl KM, Valdueza JM (2003) Migraine aggravation caused by cephalic venous congestion. *Headache* 43:96-98 (IF 2.8)
- Petzold GC, Dreier JP, Einhäupl KM, Arnold G (2003) Cluster-like headache time-locked to the menstrual cycle. *Neurology* 60:1049 (IF 4.8)
- Trottenberg T, Meissner W, Kabus C, Arnold G, Funk T, Einhäupl KM, Kupsch A (2001) Neurostimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus in inherited myoclonus-dystonia syndrome. *Mov Disord* 16:769-771 (IF 2.8)
- Doege CA, Tavakolian R, Kerskens CM, Romero BI, Lehmann R, Einhäupl KM, Villringer A (2001) Perfusion and diffusion magnetic resonance imaging in human cerebral venous thrombosis. *J Neurol* 248:564-571 (IF 3.3)
- Doepp F, Hoffmann O, Schreiber S, Lammert I, Einhäupl KM, Valdueza JM (2001) Venous collateral blood flow assessed by Doppler ultrasound after unilateral radical neck dissection. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110:1055-1058 (IF 0.9)
- Meissner W, Trottenberg T, Klaffke S, Paul G, Kuhn AA, Arnold G, Einhäupl KM, Kupsch A (2001) Apomorphine therapy versus deep brain stimulation. Clinical and economic aspects in patients with advanced Parkinson disease. *Nervenarzt* 72:924-927 (IF 0.8)
- Schuh-Hofer S, Reuter U, Kinze S, Einhäupl KM, Arnold G (2002) Treatment of acute cluster headache with 20 mg sumatriptan nasal spray-an open pilot study. *J Neurol* 249:94-99 (IF 3.3)
- Einhäupl KM (2002) Science council replies to neutron claims. *Nature* 418:479 (IF 30.4)
- Doepp F, Schreiber SJ, Dreier JP, Einhäupl KM, Valdueza JM (2003) Migraine aggravation caused by cephalic venous congestion. *Headache* 43:96-98 (IF 2.7)
- Rückert JC, Sobel HK, Gohring S, Einhäupl KM, Müller JM (2003) Matched-pair comparison of three different approaches for thymectomy in myasthenia gravis. *Surg Endosc* 17:711-715 (IF 0.7)
- Kupsch A, Kuehn A, Klaffke S, Meissner W, Harnack D, Winter C, Haelbig TD, Kivi A, Arnold G, Einhäupl KM, Schneider GH, Trottenberg T (2003) Deep brain stimulation in dystonia. *J Neurol* 250 Suppl 1:147-52 (IF 3.3)
- Holtkamp M, Masuhr F, Harms L, Einhäupl KM, Meierkord H, Buchheim K (2003) The management of refractory generalised convulsive and complex partial status epilepticus in three European countries: a survey among epileptologists and critical care neurologists *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003 74:1095-1099 (IF 2.9)
- Petzold GC, Einhäupl KM, Valdueza JM (2003) Persistent bitter taste as an initial symptom of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:687-688 (IF 2.9)
- Dreier JP, Endres M Statin-associated rhabdomyolysis triggered by grapefruit consumption. *Neurology in press* (IF 4.8)
- Petzold GC, Valdueza JM, Zimmer C (2004) Cerebral metastasis of renal carcinoma mimicking venous hemorrhagic infarction: diagnostic delay of five years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:477 (IF 2.9)
- Petzold GC, Marcucci M, Butler MH, van Landeghem FK, Einhäupl KM, Solimena M, Valdueza JM, De Camilli P (2004) Rhabdomyolysis and paraneoplastic stiff-man syndrome with amphiphysin autoimmunity. *Ann Neurol* 55:286-290 (IF 8.5)
- Petzold GC, Westner I, Bohner G, Einhäupl KM, Kretzschmar HA, Valdueza JM False-positive pulvinar sign on MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* (IF 4.8)

Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs (s. Publikationen)

Prof. Dirnagl (A5)

PD Dr. Priller (A5)

PD Dr. Lindauer (A6)

Prof. Weber (B6)

Prof. Heinemann (C3)

Kooperationen außerhalb des SFBs bestanden mit:

Prof. M. Lauritzen (Dpt. of Medical Physiology, University of Copenhagen, Denmark) (Dreier et al 1998)

Prof. I. Victorow (Brain Research Institute, Moskau) (Dreier et al 2000)

Prof. A. Villringer (Klinische Forschergruppe, Neurologie, Charité)

PD Dr. J.M. Valdueza (Neurologie Charité)

PD Dr. T.N.Lehmann (Neurochirurgie Charité)

PD Dr. A. Sarrafzadeh (Neurochirurgie Charité)

Dr. T. Obrenovitch (Pharmacology, University of Bradford, U.K.)

Dr. R. Pluta (Neurochirurgie, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.)

Habilitationen

PD Dr. J. Dreier

Abgeschlossene Promotionen

Dr. med. N. Ebert

Dr. med. K. Tille

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/A5 2002-2004

Ulrich Dirnagl und Josef Priller:

Rolle hämatogener Zellen und residenter Mikroglia bei der zerebralen Ischämie

Während der letzten Förderungsperiode sollte der differentielle Beitrag von einwandernden Blutzellen und ortständigen Gliazellen bei der zerebralen Ischämie untersucht werden. Als Modell fand eine chimäre Maus Anwendung, bei der Stammzellen des Knochenmarks und zirkulierende Blutzellen das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren (Priller et al., 2001a). Das Modell der GFP-Knochenmarkschimäre wurde in unserer Arbeitsgruppe während der ersten Förderungsperiode etabliert.

Charakterisierung der GFP-Knochenmarkschimäre

In den GFP-Chimären konnte die Kinetik der Einwanderung von immunologisch aktiven Monozyten/Makrophagen in die perivaskulären Räume des Gehirns erstmals quantifiziert werden (Bechmann et al., 2001; Bechmann, Priller et al., 2001). Überraschenderweise fand sich auch eine signifikante Differenzierung von Knochenmarkszellen zu ramifizierten Mikroglia des zentralen Nervensystems (Priller et al., 2001a,b). Dieser Befund wurde inzwischen auch von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen erhoben (Vallières und Sawchenko, 2003; Asheuer et al., 2004). Vereinzelt konnten GFP⁺ Interneurone und Purkinjezellen entdeckt werden (Priller et al., 2001b; Priller et al., 2003). Nach neueren Erkenntnissen handelt es sich bei diesen Zellen am ehesten um das Produkt einer Fusion von ortständigen Nervenzellen mit eingewanderten GFP⁺ Zellen aus dem transplantierten Knochenmark (Alvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003). In peripheren Organen, wie z.B. der Lunge, differenzierten sich Knochenmarkszellen zu Pneumozyten (Fig. 1; Grove et al., 2002).

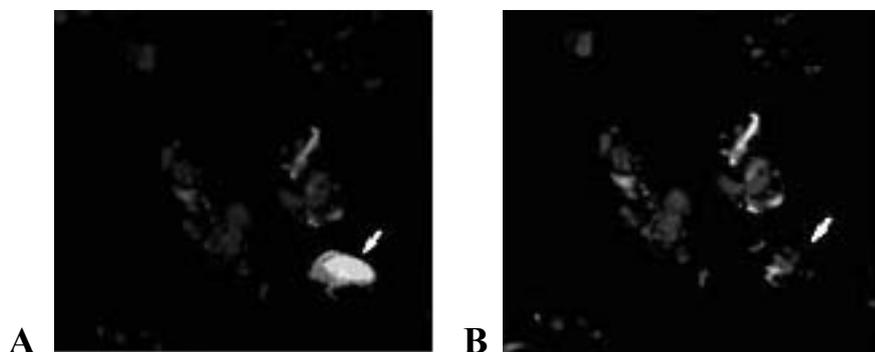


Fig. 1 Pneumozyten identifiziert durch Zytokeratinimmunreaktivität exprimieren GFP 11 Monate nach der Transplantation von GFP⁺ Knochenmark. Die GFP⁺ Zelle in der Lunge (Pfeil in A) ist Zytokeratin⁺ (A,B).

Charakterisierung der Reaktion von ortständigen und einwandernden Zellen nach zerebraler Ischämie

Nach einer Schädigung des zentralen Nervensystems (ZNS), z.B. als Folge einer zerebralen Ischämie, fand sich eine signifikant erhöhte Rekrutierung von Mikroglia in das Gehirn (Priller et al., 2001a). In unserem Modell wurde die lokale Mikrogliareaktion nach Ischämie innerhalb von drei Tagen massiv durch Monozyten/Makrophagen aus dem Blut unterstützt (Potas et al., Manuskript in Vorbereitung). Ähnliche Befunde konnten auch kürzlich von anderen Arbeitsgruppen erhoben werden (Beck et al., 2003; Tanaka et al., 2003; Hill et al., 2004). Auch in der Studie von Schilling et al. (2003) exprimierten nach 4 Tagen 40% der Makrophagen im Infarkt GFP. Im Gegensatz zum Vorbefund von Hess et al. (2002) fanden wir 1-7 Tage nach Ischämie keine Differenzierung von Knochenmarkszellen zu NeuN⁺ neuronalen Phänotypen. Allerdings beobachteten wir eine Phagozytose von NeuN-immunreaktivem Material durch Phagozyten aus dem transplantierten Knochenmark (Fig. 2; Potas et al., Manuskript in Vorbereitung).

hier kommt noch figure rein wenn jason wieder da ist. gresse wird so sein wie hier die box

Auch die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu *glial fibrillary acidic protein* (GFAP)-exprimierenden Astrozyten (Eglitis et al., 1999) konnten wir im ischämischen Infarkt in unserem Modell nicht beobachten (Wehner et al., 2003). Diese negativen Befunde sind in Einklang mit den Untersuchungsergebnissen von Beck et al. (2003) und Tanaka et al. (2003).

Allerdings findet nach zerebraler Ischämie eine Angiogenese statt, an der sich auch Zellen aus dem Knochenmark beteiligen können. Drei Arbeitsgruppen haben bislang eine Vaskulogenese, d.h. eine Neovaskularisation unter Beteiligung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, nach zerebraler Ischämie in der Maus beschrieben (Zhang et al., 2000; Hess et al., 2002; Beck et al., 2003). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Nickenig (Homburg) und PD Dr. Endres (Projekt A9) konnten wir zeigen, dass endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden können und beschädigte Endothelien der A. carotis zu regenerieren vermögen (Fig. 3A; Werner, Priller et al., 2002; Strehlow et al., 2003). Um die Vaskulogenese nach milder zerebraler Ischämie zu studieren, haben wir Wildtypmäuse mit Knochenmarksstammzellen rekonstituiert, die β -Galaktosidase unter dem endothelialen Tie2-Promoter exprimieren (Tie2-LacZ-Chimären). Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Endres fand eine vermehrte Anzahl von β -Galaktosidase⁺ gefässassoziierten Zellen (Fig. 3B) im ischämischen Striatum dieser Tiere. In unseren Untersuchungen konnten wir aber immunhistochemisch keine Differenzierung von Knochenmarkszellen zu reifen vaskulären Endothelzellen im ischämischen Hirninfarkt der Maus beobachten (Potas et al., Manuskript in Vorbereitung). Diese Befunde lassen sich gut mit den Ergebnissen von Machein et al. (2003) und Ziegelhoeffer et al. (2004) bei der Tumovaskularisation und Extremitätenischämie vereinbaren, die keinen wesentlichen Hinweis auf Vaskulogenese ergaben. Wir untersuchen gegenwärtig den Beitrag von Knochenmarkszellen zur Population der perivaskulären Zellen und Perizyten nach zerebraler Ischämie in der Maus, da von diesen Zelltypen eine Regulation der Angiogenese durch Wachstum von Kollateralgefäßen ausgehen kann.

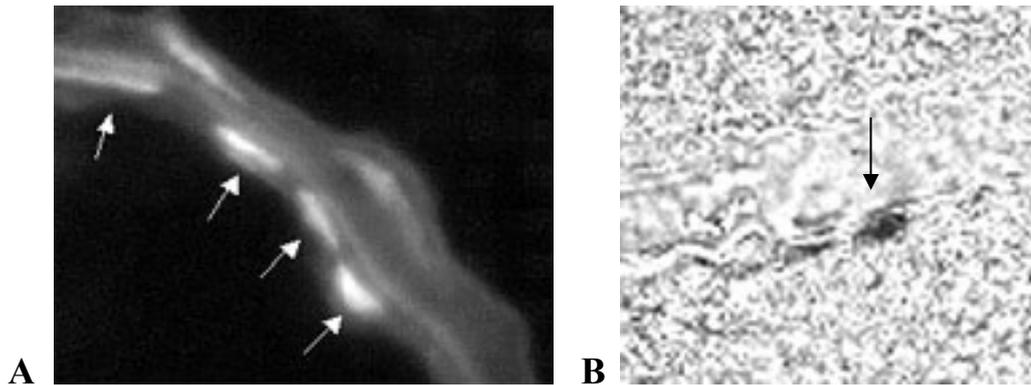


Fig. 3 Nach mechanischer Endothelschädigung repopulieren GFP⁺ Knochenmarkszellen (Pfeile) das vonWillebrand-Faktor⁺ Endothel der A. carotis (A). Wenige Tage nach Verschluss der A. cerebri media (MCAO) finden sich in Tie2-LacZ-Chimären β -Galaktosidase⁺ perivaskuläre Zellen (B).

Zerebrale Ischämie in *inducible nitric oxide synthase* (iNOS)-defizienten Mäusen

Iadecola et al. (1997) fanden 1-2 Tage nach zerebraler Ischämie eine Induktion der iNOS und schrieben diesem Enzym einen wesentlichen Beitrag zum verzögerten ischämischen Schaden zu, da iNOS-defiziente Mäuse 96 Stunden nach MCAO signifikant kleinere Infarkte als Wildtyp-Kontrollen aufwiesen. Die Autoren gingen davon aus, dass die Expression von iNOS auf infiltrierende Leukozyten beschränkt war, aber bereits in einer nachfolgenden Studie liess sich eine gliale Expression feststellen (Loihl et al., 1999). Um die differentielle Funktion der iNOS in einwandernden Blutzellen und ortständigen Gliazellen nach fokaler zerebraler Ischämie zu bestimmen, transplantierten wir Knochenmark aus iNOS-defizienten Mäusen (Laubach et al., 1997) in Wildtyp-Mäuse und umgekehrt. Mit Hilfe von quantitativer RT-PCR konnten wir den Rekonstitutionserfolg in den Chimären dokumentieren. Darüber hinaus wurden Knochenmarkszellen aus iNOS-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen vor der Transplantation retroviral mit GFP markiert. Die FACS-Analyse des peripheren Blutes dieser Tiere ergab, dass mehr als 70% der zirkulierenden Leukozyten nach 4 Wochen GFP⁺ waren, so dass durch die Kreuztransplantation Chimären generiert wurden, die iNOS präferentiell in ortständigen Gliazellen oder in zirkulierenden Blutzellen exprimierten (Fig. 4).

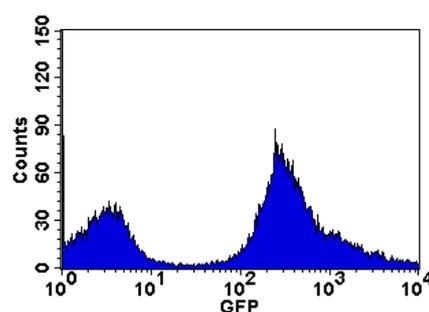


Fig. 4 Expression von GFP in zirkulierenden Leukozyten vier Wochen nach der Transplantation von GFP⁺ Knochenmark.

Entgegen bisheriger Befunde konnten wir keinen Einfluss der iNOS auf die Infarktgrösse nach zerebraler Ischämie beobachten, unabhängig davon ob das Enzym in Zellen des ZNS, des peripheren Blutes oder in beiden Kompartimenten exprimiert wurde (Fig. 5; Priller et al., Manuskript in Vorbereitung).

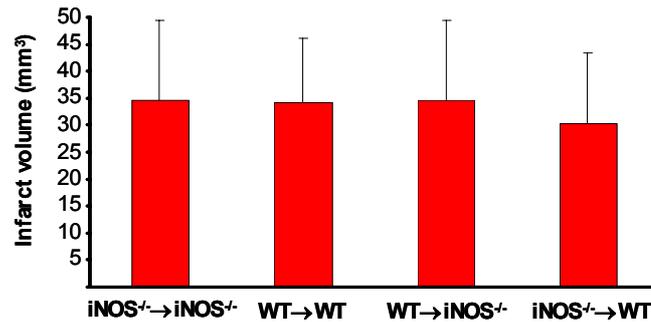


Fig. 5 Vergleich der direkten Infarkt volumina (+Standardabweichung) 96 Stunden nach MCAO in Chimären nach Transplantation von Knochenmark aus iNOS-defizienten Mäusen (iNOS^{-/-}) oder Wildtyp-Mäusen (WT)

In Übereinstimmung mit den Befunden von Iadecola et al. (1997) war die Einwanderung von Entzündungszellen in das Infarktgebiet in iNOS-defizienten GFP-Chimären unbeeinträchtigt (Fig. 6).

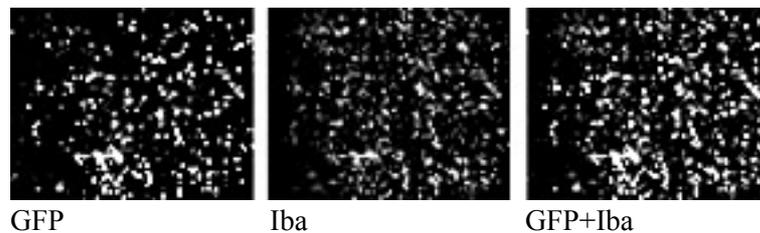


Fig. 6 Vier Tage nach MCAO finden sich im Infarktkern einer iNOS^{-/-}_{GFP} → iNOS^{-/-} Chimäre zahlreiche GFP⁺ Zellen, die den Makrophagenmarker Iba exprimieren.

Die Befunde werfen die Frage auf, ob iNOS tatsächlich einen wesentlichen Beitrag zum verzögerten ischämischen Schaden nach zerebraler Ischämie liefert. In Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe und von Schroeter et al. (2003) fand sich weder eine nennenswerte Induktion von iNOS mRNA noch von iNOS-Immunreaktivität nach MCAO in der Maus. Wir führen diese Untersuchungen derzeit zum Abschluss durch iNOS-Aktivitätsmessungen im Hirngewebe und durch immunhistochemische Untersuchungen mit Affinitäts-gereinigten Antikörpern.

Literatur

- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973.
- Asheuer M, Pflumio F, Benhamida S, Dubart-Kupperschmitt A, Fouquet F, Imai Y, Aubourg P, Cartier N (2004) Human CD34⁺ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3557-3562.
- Beck H, Voswinckel R, Wagner S, Ziegelhoeffer T, Heil M, Helisch A, Schaper W, Acker T, Hatzopoulos AK, Plate KH (2003) Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:709-717.
- Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM (1999) Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 10:1289-1292.

- Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W (2004) Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res (im Druck)*
- Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J (2002) Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33:1362-1368.
- Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ (2004) SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:84-96.
- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17:9157-9164.
- Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, Sherman PA. (1995) Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10688-10692.
- Loihl AK, Asensio V, Campbell IL, Murphy S (1999) Expression of nitric oxide synthase (NOS)-2 following permanent focal ischemia and the role of nitric oxide in infarct generation in male, female and NOS-2 gene-deficient mice. *Brain Res* 830:155-164.
- Machein MR, Renninger S, de Lima-Hahn E, Plate KH (2003) Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas. *Brain Pathol* 13:582-597.
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183:25-33.
- Schroeter M, Kury P, Jander S (2003) Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: differences between rats and mice. *Mol Brain Res* 117:1-7.
- Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T (2003) Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 117:531-539.
- Vallieres L, Sawchenko PE (2003) Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci* 23:5197-5207.
- Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM (2003) Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 5:959-966.
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M (2002) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 90:284-288.

Projekt-assoziierte Veröffentlichungen der Antragsteller seit 2001:

- Bechmann I*, Priller J*, Kovac A, Böntert M, Wehner T, Klett FF, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R (2001) Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* 14:1651-1658. (*gleichberechtigter Erstautor)
- Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simburger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R (2001) Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol* 168:242-249.
- Grove JE, Lutzko C, Priller J, Henegariu O, Theise ND, Kohn DB, Krause DS (2002) Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium. *Am J Resp Cell Mol Biol* 27:645-651.
- Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001a) Targeting of gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of the green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:1356-1361.
- Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U (2001b) Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells *in vivo*. *J Cell Biol* 155:733-738.
- Priller J (2003) Grenzgänger: adult bone marrow cells populate the brain. *Histochem Cell Biol* 120:85-91.
- Priller J (2004) Can adult bone marrow stem cells help repair the brain? *ACNR* 3:11-13.

A5 Dirnagl/Priller

- Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G (2003) Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 107:3059-3065.
- Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, Wiegand F, Meisel A, Rosenthal A, Dirnagl U (2002) Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 22:5879-5888.
- Wehner T, Böntert M, Eyüpoglu I, Prass K, Prinz M, Fernández Klett F, Heinze M, Bechmann I, Nitsch R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Dirnagl U, Priller J (2003) Bone marrow-derived cells expressing GFP under the control of the *glial fibrillary acidic protein* promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23:5004-5011.
- Werner N*, Priller J*, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G (2002) Endothelial progenitor cells modulate vascular re-endothelialization and neointima formation. Effect of HMG CoA reductase inhibition. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 22:1567-1572. (*gleichberechtigter Erstautor)

Buchkapitel

- Priller J, Dirnagl U (2002) Inflammation in stroke - a potential target for neuroprotection? In: Kettenmann H, Burton GA, Moenning UJ, Hrsg. *Neuroinflammation- from bench to bedside*. Ernst Schering Research Foundation Workshop 39, Heidelberg: Springer, pp. 133-157
- Dirnagl U, Priller J (2004) Focal cerebral ischemia: The multifaceted role of glial cells. In: Kettenmann H, Ransom BR, Hrsg. *Neuroglia*. 2nd Edition. Oxford: Oxford University Press (im Druck)
- Dirnagl U (2004) Inflammation in stroke: the good, the bad, and the unknown; in: *Neuroinflammation in Stroke*. Ernst Schering Research Foundation Workshop Series Vol 47;Eds.: Dirnagl U, Elger B; Springer New York pp 88-99
- Priller J (2004) From Marrow to Brain. In: Turksen K, Hrsg. *Adult Stem Cells*. Totowa: Humana Press (im Druck)

Sonstige Veröffentlichungen der Antragsteller seit 2001:

- Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabo C, Endres M (2001). Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med* 7:255-260.
- Bauer M, Alda M, Priller J, Young LT, IGSLI (2003) Implications of the neuroprotective effects of lithium for the treatment of bipolar and neurodegenerative disorders. *Pharmacopsychiatry* 36 S250-S254.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26:248-254.
- Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmüller O, Orzechowski H-D, Lindauer U, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2002) Endothelin-1 potently induces Leão's cortical spreading depression *in vivo* in the rat: A model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain* 125:102-112.
- Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2001). Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol* 531:515-526.
- Dreier JP, Sakowitz OW, Harder A, Zimmer C, Dirnagl U, Valdueza JM, Unterberg AW (2002). Focal laminar cortical MR signal abnormalities after subarachnoid hemorrhage. *Ann Neurol* 52:825-829.
- Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2002). Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion/hemodilution in rats. *Neurosurgery* 51:1457-1465.
- Dreier JP, Tille K, Dirnagl U (2004) Partial antagonistic effect of adenosine on inverse coupling between spreading neuronal activation and cerebral blood flow in rats. *Neurocrit Care* 1:85-95
- Endres M, Dirnagl U (2002). Ischemia and stroke. *Adv Exp Med Biol* 513:455-473.
- Endres M, Fan G, Meisel A, Dirnagl U, Jaenisch R (2001). Effects of cerebral ischemia in mice lacking DNA methyltransferase 1 in post-mitotic neurons. *Neuroreport* 12:3763-3766.

- Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schrock H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U (2003). Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 54:582-590.
- Gerlach M, Braak H, Hartmann A, Jost WH, Odin P, Priller J, Schwarz J (2002) Current state of stem cell research for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* 249 Suppl 3:III/33-35.
- Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M (2003). Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 34:551-557.
- Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, Freyer D, Kapinya K, Herwig U, Megow D, Dirnagl U, Weber JR, Hörtnagl H (2001). Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J Neurosci* 21:2600-2609.
- Harms C, Bösel J, Fink K, Braun JS, Lautenschlager M, Hoertnagl H, Dirnagl U, Endres M (2004) Neuronal Gelsolin Prevents Apoptosis by Enhancing Actin Depolymerization. *Mol Cell Neurosci* (im Druck)
- Harms H., Prass K., Dirnagl U., Meisel A. (2004) Therapierrelevante Pathophysiologie des akuten ischämischen Schlaganfalls: Was ist gesichert? *Akt Neurol* (im Druck)
- Hoffmann O, Dirnagl U, Weber JR (2001). The trigeminovascular system in bacterial meningitis. *Microsc Res Tech* 53:188-192.
- Hoffmann O, Keilwerth N, Bille MB, Reuter U, Angstwurm K, Schumann RR, Dirnagl U, Weber JR (2002). Triptans reduce the inflammatory response in bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:988-996.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Dirnagl U, Andreeva NA, Manuhova L, Vorobjev VS, Sharonova IN, Skrebitsky VG, Victorov IV, Katchanov J, Weih M, Zorov DB (2002). Neuroprotective effects of the antifungal drug clotrimazole. *Neuroscience* 113:47-53.
- Kandere-Grzybowska K, Gheorghe D, Priller J, Esposito P, Huang M, Gerard N, Theoharides TC (2003) Stress-induced dura vascular permeability does not develop in mast cell-deficient and neurokinin-1 receptor knockout mice. *Brain Res* 980:213-220.
- Kannbley U, Kapinya K, Dirnagl U, Trendelenburg G (2003). Improved protocol for SAGE tag-to-gene allocation. *Biotechniques* 34:1212-1214, 1216-1219.
- Kapinya KJ, Harms U, Harms C, Blei K, Katchanov J, Dirnagl U, Hörtnagl H (2003). Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in the progression of neuronal cell death in vitro and following cerebral ischaemia in vivo. *J Neurochem* 84:1028-1039.
- Kapinya KJ, Löwl D, Futterer C, Maurer M, Waschke KF, Isaev NK, Dirnagl U (2002). Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 33:1889-1898.
- Kapinya KJ, Prass K, Dirnagl U (2002). Isoflurane induced prolonged protection against cerebral ischemia in mice: a redox sensitive mechanism? *Neuroreport* 13:1431-1435.
- Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Brück W, Hörtnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2001) Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci*. 21:5045-5053.
- Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Brück W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003). Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* 13:452-464.
- Kleeberg J, Petzold GC, Major S, Dirnagl U, Dreier JP. (2004) Endothelin-1 induces cortical spreading depression via activation of the ETA receptor/phospholipase C pathway in vivo. *Am J Physiol* (im Druck)
- Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Böhm M, Nickenig G, Endres M (2002). Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942:23-30.
- Lindauer U, Gethmann J, Kuhl M, Kohl-Bareis M, Dirnagl U (2003). Neuronal activity-induced changes of local cerebral microvascular blood oxygenation in the rat: effect of systemic hyperoxia or hypoxia. *Brain Res* 975:135-140.

A5 Dirnagl/Priller

- Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, Vogt J, Dreier JP, Dirnagl U (2001). Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity. *Am J Physiol* 283:H1353-1363.
- Lindauer U, Roysl G, Leithner C, Kuhl M, Gold L, Gethmann J, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U (2001). No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation. *Neuroimage* 13:988-1001.
- Lindauer U, Vogt J, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U (2003). Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca²⁺-activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1227-1238.
- Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert J-M, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P (2002) Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 8:831-840.
- Meisel C, Prass K, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, Halle E, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A (2003). Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke* 35:2-6.
- Petzold GC, Einhäupl KM, Dirnagl U, Dreier JP (2003). Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space. *Ann Neurol* 54:591-598.
- Prass K, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Megow D, Priller J, Scharff A, Dirnagl U, Meisel A (2002) Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:520-525.
- Prass K, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A (2003). Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* 34:1981-1986.
- Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, Aguzzi A (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:919-924.
- Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A (2002) Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model. *J Neurosci* 22:10291-10301.
- Schuh-Hofer S, Boehnke C, Reuter U, Siekmann W, Lindauer U, Arnold G, Dirnagl U (2003). A fluorescence-based method to assess plasma protein extravasation in rat dura mater using confocal laser scanning microscopy. *Brain Res Protoc* 12:77-82.
- Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U (2001). The cerebrovascular response to elevated potassium--role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett* 306:61-64.
- Schulz J, Bösel J, Stockel M, Megow D, Dirnagl U, Endres M (2004) HMG-CoA reductase inhibition causes neurite rarefaction by interfering with geranylgeranyl-pyrophosphate synthesis. *J Neurochem* (im Druck)
- Sittler A, Lurz R, Lueder G, Priller J, Hayer-Hartl MK, Hartl FU, Lehrach H, Wanker EE (2001) Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10:1307-1315.
- Weih M, Amberger N, Wegener S, Dirnagl U, Reuter T, Einhäupl K (2001). Sulfonylurea drugs do not influence initial stroke severity and in-hospital outcome in stroke patients with diabetes. *Stroke* 32:2029-2032.
- Weih M, Prass K, Ruscher K, Trendelenburg G, Dirnagl U, Riepe MW, Meisel A (2001). Ischemia tolerance; model for research, hope for clinical practice? *Nervenarzt* 72:255-260.
- Weih M, Schmitt M, Gieche J, Harms C, Ruscher K, Dirnagl U, Grune T (2001). Proteolysis of oxidized proteins after oxygen-glucose deprivation in rat cortical neurons is mediated by the proteasome. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1090-1096.
- Winter B, Bert B, Fink H, Dirnagl U, Endres M (2004). Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. *Stroke* 35:191-195.

Zabel C, Chamrad DC, Priller J, Woodman B, Meyer HE, Bates GP, Klose J (2002) Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's Disease. *Mol Cell Proteomics* 1:366-375.

Buchkapitel

Dirnagl U, Edvinsson L, Villringer A (2002) Measuring cerebral blood flow and metabolism. In: *Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2. Auflage, Hrsg: Edvinsson L, Drause D. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore S. 371-383

Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhäupl KM, Dirnagl U (2002) Ischemia caused by inverse coupling between neuronal activation and cerebral blood flow in rats. *International Congress Series* 1235: 487-492

Endres M, Dirnagl U (2001) Ischämischer Hirninfarkt: Ätiologie und Pathogenese. In "Schlaganfall", Rote Reihe. Hrsg: Hamann GF, Siebler M, von Scheid W. Ecomed-Verlag, S. 77-99

Endres M, Dirnagl U (2002) Neuroprotective strategies in animal and in vitro models of neuronal damage : Ischemia and stroke. In: *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*. Hrsg: Alzheimer C. Landes Bioscience, Georgetown TX, S. 455 - 473

Lindauer U, Royl G, Leithner C, Kühl M, Gethmann J, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U (2002) Neuronal activation induced changes in microcirculatory hemoglobin oxygenation: To dip or not to dip. *International Congress Series* 1235: 137-144

Meisel A, Prass K, Wolf T, Dirnagl U (2004) Neurological disorders – epidemiology, clinical overview, and model systems: Stroke; In: *Neuroprotection – Models, mechanisms, therapies*. Hrsg.: Bähr M. Wiley -VCH.

Neeb L, Ruscher K, Dirnagl U, Meisel A (2004) Endogenous protection against hypoxia/ischemia in the brain via erythropoietin. In: *Maturation phenomenon in cerebral ischemia V*. Hrsg.: Buchan AM, Ito U, Colourne F, Kuroiwa T, Klatzo I. Springer Berlin Heidelberg New York. S. 177-187

Prass K, Meisel C, Wolf T, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A (2002) Striking the immune system: Stroke induced immune suppression. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia 2002*, Hrsg.: Kriegelstein J, Klumpp S. Medpharm Scientific Publishers Stuttgart; S. 217-221

Priller J, Meierkord H (2002) Chorea Huntington. In: *Demenzen - Grundlagen und Klinik*. Hrsg.: Beyreuther/Einhäupl/Förstl/Kurz, Stuttgart: Thieme, S. 289-303.

Spies C , Schönfeld H, Dirnagl U, Kox WJ, Rommelspacher H. (2002) Neuroimmunology. In: *Textbook of Biological Psychiatry*. Hrsg: D'haenen H, den Boer JA, Westenberg H, Willner P. S. 435-466

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/A6 2002-2004

PD Dr. Ute Lindauer

Rolle der endothelialen NO Synthase bei zerebraler Gefäßreaktivität: Beeinflussung der Enzymaktivität mittels HMG-CoA Reduktase-Inhibition und Einfluß auf die Infarkt volumenenentwicklung bei fokaler zerebraler Ischämie**1. Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung**

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass zerebrale Gefäße über einen physiologischen vasodilatatorischen Tonus verfügen, als dessen wichtigster Vermittler das Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) zu nennen ist. Der basale NO-Gewebespiegel wird zu signifikantem Anteil über die Bereitstellung einer basalen cGMP-Konzentration in der glatten Gefäßmuskelzelle vermittelt. Bisherige Untersuchungen meiner Arbeitsgruppe zeigten, dass dieser basale NO Spiegel im Gewebe funktionell von Bedeutung ist (Lindauer et al., 1999). So ist für eine Reihe von vasodilatatorischen Stimuli (Hyperkapnie, funktionelle somatosensorische Stimulation im zerebralen Kortex) das Vorhandensein des basalen NO / cGMP Spiegels im Gewebe wichtige Voraussetzung für eine physiologische Reaktion der Gefäße. Evozierte neuronale Aktivität selbst scheint aber vom NO-Spiegel unabhängig zu sein (Lindauer et al., 1996). Im Rahmen der neurovaskulären Kopplung und während systemischer Hyperkapnie ist Stickstoffmonoxid ein wichtiger Modulator der Vasodilatation, der eigentliche Mediator ist in vielen Fällen bisher nicht bekannt. Andere vasoaktive Stimuli dagegen (Acetylcholin, Bradykinin, funktionelle Stimulation des Parallelfasersystems im Zerebellum) bedienen sich des NO Systems im Sinne einer echten Mediatorfunktion durch Erhöhung der Aktivität der NO Synthase (Kelm et al., 1988; Akgoeren et al., 1996; Iadecola and Zhang, 1996).

Die Untersuchung des Mechanismus der NO Modulation des vaskulären Systems stand zunächst im Vordergrund der laufenden Antragsphase. Die modulatorische Wirkung von NO konnten wir auch für die Vasodilatation auf Azidose in isolierten Zerebralarterien nachweisen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Kaliumkanäle glatter Muskelzellen durch NO oder dessen wichtigsten second messenger cGMP moduliert werden können. Wir konzentrierten uns daher zunächst auf die Frage nach der Rolle von Kaliumkanälen bei der Azidose-vermittelten Dilatation zerebraler Gefäße. Liesse sich diese nachweisen, wäre die Frage einer NO Abhängigkeit der Vasodilatation auf spezifische Kanalöffner in unserem System naheliegender. Darüberhinaus widmeten wir uns in unseren Untersuchungen der Frage, inwieweit die für die Azidose-Dilatation postulierte Beteiligung von Kaliumkanälen auch für die Vasodilatation auf moderat sowie stark erhöhte extraluminale Kaliumkonzentrationen von Bedeutung ist. Zusätzlich wurde begonnen, die in vitro erhaltenen Ergebnisse auf die in vivo Situation in der Ratte zu übertragen.

Weiterhin wurden die in der vergangenen Antragsphase begonnenen Untersuchungen zu einer möglichen Beeinträchtigung vaskulärer Reaktivität in vitro nach Ablauf einer cortical spreading depression (CSD) in vivo weitergeführt.

In einem dritten Komplex stand die Frage nach der Bedeutung der endothelialen NO Synthase Aktivität für zerebrovaskuläre Reaktivität im Mittelpunkt. Bisherige Befunde deuteten darauf hin, dass unter physiologischen Bedingungen NO aus neuronaler NOS perivaskulärer Nervenendigungen für den basalen NO Spiegel von Bedeutung ist, und das Endothel eine eher untergeordnete Rolle spielt. Hierzu wurden zum einen Untersuchungen an der Ratte mit dem Ziel durchgeführt, mittels Hochregulation der eNOS Expression durch 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase Inhibition infolge chronischer Statin-Applikation (Endres et al., 1998; Yamada et al., 2000) mögliche veränderte Gefäßreaktivitäten aufzudecken. Weitere Untersuchungen an der Maus wurden in enger Kooperation mit Herrn PD. Dr. Matthias Endres aus unserer Abteilung durchgeführt. Hierbei stand zunächst die Frage eines möglichen schädlichen Effektes auf die Schlaganfallentwicklung infolge des Absetzens einer chronischen Statin-Therapie im Vordergrund. Neben Statinen kann auch körperliche Aktivität zu einer Hochregulation der eNOS führen. Auch hierzu führten wir in Kooperation mit Herrn Endres zur weiteren Aufklärung einer möglichen protektiven Rolle der endothelialen NOS Untersuchungen am Schlaganfallmodell der Maus sowie am Modell der isolierten Arterie durch.

A6 Lindauer

2 Angewandte Methoden

Folgende in der Arbeitsgruppe etablierte Modelle und Methoden kamen zum Einsatz:

Modelle zur Untersuchung zerebrovaskulärer Reaktivität

- kraniale Fenstertechnik an der Ratte in vivo – Messung des regionalen zerebralen Blutflusses mittels Laser-Doppler Blutflußmessung
- Modell der isolierten Zerebralarterie (MCA) der Ratte in vitro
- Modell der isolierten Zerebral- bzw. Femoral-Arterie der Maus in vitro

Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

- Quantitative Analyse der Expression von eNOS, nNOS und iNOS in Hirngewebe, Aorta und isolierten Zerebralarterien mittels real time PCR nach Etablierung einer geeigneten Methode zur raschen Probenentnahme ohne Blutverunreinigung.

Modelle zur Pathophysiologie

- Modell der cortical spreading depression in der Ratte in vivo, weitere Untersuchungen in vivo bzw. an der anschließend entnommenen Zerebralarterie in vitro
- Modell der fokalen zerebralen Ischämie an der Maus (middle cerebral artery occlusion nach (Hata et al., 1998))

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

3.1 Vasodilatation auf Azidose oder / und extraluminal erhöhtes K^+

a) Modulatorrolle des NO

Die modulatorische Wirkung des NO / cGMP Systems auf NO-abhängige vasodilatatorische Stimuli konnten wir auch in der isolierten Zerebralarterie am Beispiel der Vasodilatation auf Azidose nachweisen. Die Vasodilatation auf Azidose läßt sich mittels unspezifischer sowie spezifisch neuronaler NOS Blockade signifikant reduzieren, diese Vasodilatation ist mittels NO bzw. cGMP Zugabe unter fortdauernder NOS Inhibition vollständig rekonstituierbar. Die NO unabhängigen Vasodilatoren Papaverin und Nimodipin haben keinen Effekt. Bereitgestellt wird der basale NO Spiegel nicht, wie zunächst erwartet, vom Endothel der zerebralen Gefäße, sondern vielmehr durch Aktivität von nNOS in Zellen des Parenchyms, die in engem Kontakt zur glatten Gefäßmuskulatur stehen. Chronische Denervierung der Nervenfasern, die vom Ganglion sphenopalatinum kommen und somit parasympathischen Ursprungs sind, führt zu einem Verlust der NOS haltigen, perivaskulären Nervenendigungen grösserer pialer Gefäße. Diese Arterien zeigen, vergleichbar mit dem Effekt nach NOS Inhibition im Akutversuch, eine deutlich verringerte Azidose-Reaktivität, wohingegen die Dilatation auf 20 mM Kalium bzw. auf den endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin unverändert ist. Zugabe von geringen Mengen zellgängigem cGMP führt neben einer leichten Dilatation unter Ruhebedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der Dilatation auf Azidose, die nun der Reaktivität sham-operierter Tiere gleicht. In den grossen pialen Gefäßen wird somit die Bereitstellung des basalen NO Spiegels über die Grundaktivität neuronaler NOS von perivaskulären Nervenendigungen, die extrazerebralen Ursprungs sind, geleistet (Lindauer et al., 2001).

Neben der Reduktion der Vasodilatation auf Azidose attenuiert eine unspezifische NOS Blockade auch die Dilatation auf extraluminal erhöhtes Kalium ab einer Konzentration von 40mM, und die Vasokonstriktion auf weiter erhöhte Kaliumkonzentrationen wird erheblich verstärkt. Auch der Hemmstoff der löslichen Guanylatzyklase ODQ vermag die Vasodilatation auf 40 mM Kalium signifikant zu vermindern, wobei die Reaktion auf 12 und 20 mM Kalium sowohl durch NOS- als auch Guanylatzyklase-Inhibition unbeeinflusst bleibt. Unsere Untersuchungen zur Interaktion von Kalium und NO während der Kaliumvermittelten Reaktion der isolierten Zerebralarterie zeigen somit eine deutliche NO / cGMP Abhängigkeit der Vasoreaktivität ab einer Konzentration von 40 mM. Darüberhinaus konnten wir auch zeigen, daß diese Beeinflussung der Kaliumreaktivität durch NO / cGMP von modulatorischer Qualität ist (Schuh-Hofer et al., 2001). Anders als für die modulatorische Rolle des NO / cGMP Systems bei der Vasodilatation auf Azidose gilt aber für die Modulation der Reaktivität auf erhöhte Kaliumkonzentrationen, dass eine par-

tielle Restitution der Vasodilatation auch nach Wiederherstellung des Ruhedurchmessers durch Applikation der NO unabhängigen Vasodilatoren Papaverin und Nimodipin erfolgt.

b) Beteiligung von Kaliumkanälen und deren mögliche Beeinflussung durch NO/cGMP

Da aus der Literatur bekannt ist, dass hyper- oder hypopolarisierend wirkende Kaliumkanäle prinzipiell durch NO oder cGMP in ihrer Leitfähigkeit moduliert werden können, war es naheliegend, eine mögliche Beteiligung von Kaliumkanälen bei der Vasodilatation auf Azidose bzw erhöhte extraluminale Kaliumkonzentration zu erwarten.

Für die Vasodilatation auf Azidose lagen sehr widersprüchliche Befunde zur Beteiligung von Kaliumkanälen vor. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es im Rahmen der vaskulären Antwort der MCA der Ratte auf extraluminale Azidose zu einer gleichzeitigen Aktivierung von ATP-sensitiven- und Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanalfamilien kommt. Diese wirken wechselseitig redundant, dass heisst bei alleiniger Blockade des einen übernimmt der andere Kanaltyp die Funktion, sodass nur eine gleichzeitige Blockade zu einer Aufhebung der Dilatation führt. Darüberhinaus konnten wir einen weiteren funktionellen Hinweis auf eine NO-Modulierung dieser Kanalfamilien zeigen: Unter NOS-Inhibition ist die Vasodilatation auf den spezifischen Öffner der K_{ATP} -Kanäle Pinacidil zu ca. 50% reduziert und auf den spezifischen Öffner der K_{Ca} -Kanäle NS1619 sogar vollkommen aufgehoben (Lindauer et al., 2003). In weiterführenden Experimenten haben wir Hinweise auf eine permissive Wirkung des NO während der Dilatation auf Pinacidil bzw NS1619 erhalten, wobei der K_{ATP} -Kanal primär über cGMP moduliert wird, während die Modulation des K_{Ca} -Kanals eine cGMP-unabhängige Wirkung des NO zu sein scheint. Hier werden zusätzliche Untersuchungen unter Verwendung des Inhibitors der löslichen Guanylatzyklase weiterführende Erkenntnisse liefern.

Während bereits seit längerem bekannt war, dass die Vasodilatation auf mässig und eher physiologisch erhöhtes K^+ (12 bis 20 mM) alleinig durch den einwärtsgerichtenden Kaliumkanal (K_{IR}) vermittelt wird, gab es bisher keine systematischen Untersuchungen zu einer Kaliumkanalbeteiligung bei eher pathophysiologisch erhöhten Kaliumkonzentrationen > 20 mM. Unsere Untersuchungen zeigen, dass eine gleichzeitige Aktivierung des K_{IR} , des K_{Ca} - und des K_{ATP} -Kanaltyps für die Vasodilatation auf 40 mM K^+ verantwortlich ist. Diese Beteiligung erfolgt nicht wie bei der Azidose streng redundant. Während die alleinige bzw gemeinsame Blockade des K_{Ca} - bzw des K_{ATP} -Kanals zu keiner Veränderung der Dilatation auf 40 mM K^+ führte, reduzierte sich unter K_{IR} -Kanal Blockade die Dilatation um ca 20 %. Diese Reduktion verstärkte sich auf 70% unter zusätzlicher Blockade des K_{ATP} -Kanals, und die gemeinsame Blockade von K_{IR} -, K_{ATP} - und K_{Ca} führte zu einer Aufhebung der Dilatation. Weiterhin scheint im Gegensatz zur Dilatation auf mässig erhöhtes K^+ eine endotheliale Beteiligung an der Dilatation auf 40 mM K^+ vorzuliegen (Lindauer et al., Manuscript in preparation). Welche endothelialen Mechanismen hierfür von Bedeutung sind, ist nicht bekannt und Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen eine zentrale Rolle der Kaliumkanäle glatter Gefässmuskelzellen während der Vasodilatation auf diverse Stimuli. Eine Modulierung der K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanalfamilien durch NO / cGMP scheint wahrscheinlich.

c) Das vaskuläre Korrelat der Cortical Spreading Ischemia (CSI) in vitro

Kooperation mit TP A1, Dreier, Einhäupl: Unsere Befunde zeigen, dass das Phänomen der CSI, das Gegenstand des Projektes A1 ist, eine wesentliche vaskuläre Komponente beinhaltet. Im Modell der isolierten Zerebralarterie wird die Vasodilatation auf extraluminale Milieuveränderung, wie sie bei der CSD bzw. CSI im Gewebe auftritt, alleinig durch Blockade der konstitutiven NOS in eine starke Vaskokonstriktion, dem vaskulären Korrelat der CSI, überführt. Somit dürfte es uns gelungen sein, einen wichtigen Beitrag zur Klärung einer der grossen Kontroversen zur Entstehung der Ischämie im Rahmen der CSI geleistet zu haben. Dieser Befund wird in Kürze in einer gemeinsamen Arbeit veröffentlicht werden.

3.2 Veränderungen der Gefäßreaktivität in vitro nach cortical spreading depression (CSD) in vivo

Unsere Untersuchungen zur Reaktivität isolierter Zerebralarterien, die Tieren entnommen wurden nachdem eine einzelne CSD über den zerebralen Kortex propagierte, dienen der Aufklärung des Mechanismus der reduzierten Gefäßreaktivität unter pathophysiologischen Bedingungen. CSDs und CSD-ähnliche Episoden werden im Rahmen der Pathophysiologie zahlreicher neurologischer Erkrankungen diskutiert, wobei hier die Migräne mit Aura sowie die fokale zerebrale Ischämie im Mittelpunkt stehen. Für beide Erkrankungen ist bekannt, dass die vaskuläre Reaktivität zumindest zeitweise stark beeinträchtigt ist.

A6 Lindauer

Zerebralarterien aus CSD-Tieren zeigen eine bis zu 50% ige Reduktion der Reaktivität auf Azidose und auf moderat bzw mittelstark erhöhte Kaliumkonzentrationen sowie eine signifikante Vasokonstriktion auf stark pathophysiologisch erhöhte Kaliumkonzentration (Seitz et al., 2004). Da aus unseren sonstigen Untersuchungen abzuleiten ist, dass v.a. K_{IR} -, K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanäle glatter Gefäßmuskelzellen eine zentrale Rolle im Rahmen der zerebrovaskulären Reaktivität spielen, liegt der Schluss nahe, dass es im Rahmen der CSD zu einer relativ unspezifischen, aber effektiven Beeinträchtigung der Funktion von glattmuskulären Kaliumkanälen kommt. Darüberhinaus zeigen unsere Befunde, dass diese Beeinträchtigung das Gefäß selbst betrifft und nicht dem Einfluss eines aus dem Parenchym tonisch freigesetzten Mediators unterliegt. Welcher Mechanismus im Rahmen der CSD aber zu reduzierter vaskulärer Reaktivität führt, ist bislang nicht bekannt. Mechanismen, die zu einer erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates führen, erscheinen aber wahrscheinlich und sind Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

3.3 Rolle der endothelialen NO Synthase und weitere Hinweise einer vaskulären Ursache für Neuroprotektion beim Schlaganfall

a) Endotheliale NO-Synthase:

Bisherige Befunde zeigen, dass primär neuronale NOS perivaskulärer Nervenendigungen für den basalen NO Spiegel verantwortlich ist, und NO aus dem Endothel eine eher untergeordnete Rolle spielt. Ziel dieses Teilprojektes war es, mögliche Veränderungen der Gefäßreaktivität nach Hochregulation der eNOS Expression durch HMG-CoA Reduktase Inhibition infolge chronischer Statin-Applikation (Endres et al., 1998; Yamada et al., 2000) aufzudecken. Hierzu war es zunächst notwendig, eine Gewebeentnahmetechnik zu etablieren, die eine Verunreinigung der Proben mit Blut so weit als möglich ausschließt. In nativen Tieren konnten wir nach Etablierung zeigen, dass das Hirnparenchym ca. 3 mal so viel nNOS aufweist wie der Hauptstamm der MCA, während das Verhältnis sich für eNOS gegenteilig darstellt. Umfangreiche molekularbiologische Untersuchungen zeigten dann aber, dass im Gegensatz zur Spezies Maus bei der Ratte eine Hochregulation der eNOS nur inkonsistent erfolgt. Verabreichung von Atorvastatin über das Futter (50mg/kgKGW/d über 30 Tage) führte weder bei Ratten des Stammes Wistar noch bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) bzw deren Kontrollstamm WKY zu einer Veränderung der eNOS Expression in zerebralen Arterien oder Hirnparenchym. Subkutan-Injektion von Atorvastatin (10mg/kg KGW/d über 14 Tage) dagegen führte zu einer ca 50%-igen Erhöhung der eNOS Expression in WKY-Ratten und zu einer 150%-igen Erhöhung in SHR-Tieren, wobei die eNOS Expression in Vehikel-injizierten SHR-Ratten nur ca 65% der eNOS Expression in Vehikel-behandelten WKY Tieren betrug. Interessanterweise kam es neben einer eNOS Hochregulation auch zu einer deutlichen, bis zu 2-fachen Hochregulation der nNOS in zerebralen Gefäßen. Wie dieser Befund im Rahmen der Physiologie und Pathophysiologie einzuordnen ist, muss weiter untersucht werden. Zusammenfassen muss also davon ausgegangen werden, dass in der Spezies Ratte die Verabreichung eines Statins über das Futter zu keiner befriedigenden Beeinflussung der eNOS Expression führt und die Subkutaninjektion die Methode der Wahl darstellt. Da es uns aber mittlerweile nicht mehr möglich ist, Reinsubstanz des Atorvastatins zur Injektion zu erhalten, wird zur Zeit in weiterführenden Untersuchungen unter Verwendung von Mevastatin der Fa. Sigma die Expressionsstudie wiederholt und bei erfolgreicher eNOS Hochregulation die Veränderung der nNOS Expression und deren Einfluss auf die Gefäßreaktivitäten untersucht.

Parallel zu den Untersuchungen in der Ratte wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. Matthias Endres Untersuchungen zur Wirkung der Statin-Therapie im Rahmen des Schlaganfallgeschehens an der Maus durchgeführt. Hier konnten wir zeigen, dass eine 2-wöchige Atorvastatin-Applikation zu einer ca 40%-igen Reduktion des Schlaganfallvolumens sowie einer Reduktion von Thrombusentwicklung, ein akutes Absetzen der Statin-Therapie aber zu einem raschen Verlust der Protektion beim Schlaganfall und zu einer Normalisierung der Thrombusentwicklung führt. Die Hochregulation der eNOS während Statin-Therapie bei der Maus wird nach dem Absetzen des Statins nicht nur rückgängig gemacht, es kommt innerhalb der ersten Tage sogar zu einer deutlichen Reduktion der eNOS Expression unter das Ausgangsniveau, und erst zum Tag 4 nach Absetzen sind die eNOS Werte wieder mit der Kontrollsituation vergleichbar. Diese experimentellen Befunde müssen in Hinblick auf ein mögliches schlechteres outcome von Schlaganfallpatienten bei Unterbrechung einer bestehenden Statintherapie bei Klinikaufnahme diskutiert werden (Gertz et al., 2003).

Neben HMG-CoA-Reduktase Inhibition führt auch regelmässiges körperliches Training zu einer Hochre-

gulation der eNOS in peripheren Gefäßen. Wir konnten zeigen, dass Training bei Mäusen auch zu einer eNOS-abhängigen Reduktion des Schlaganfallvolumens führt. Darüberhinaus ist die eNOS Hochregulation vaskulär-funktionell von Bedeutung: die endothelabhängige NO-medierte Dilatation der Femoralarterie der Maus auf Acetylcholin wie auch der zerebrale Blutfluss ist nach chronischem Lauftraining signifikant erhöht. Diese Untersuchungen stellen einen wichtigen Beitrag zur Bedeutung von regelmäßiger körperlicher Aktivität auf kardiovaskuläre Risikofaktoren dar (Endres et al., 2003).

b) Weitere Hinweise einer vaskulären Ursache für Neuroprotektion beim Schlaganfall:

In einem weiteren Projekt in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Priller (Teilprojekt A5) und Herrn Dr. Prass (Exp. Neurologie, Charité; in Kooperation mit dem Institut für Zell- Biologie, ETH Zürich sowie der Abtlg. für Neonatologie und allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Wien) haben wir den Einfluss einer bei neurodegenerativen Erkrankungen bereits aus der Literatur als protektiv bekannten präventiven oralen Kreatin-Supplementation auf das outcome bei fokaler zerebraler Ischämie untersucht. Trotz deutlicher Verringerung des Schlaganfallvolumens konnten wir, entgegen anderslautender Befunde aus der Literatur, keine Erhöhung von Kreatin, Phosphokreatin oder ATP im Hirngewebe von behandelten Mäusen finden. Die Dilatation zerebraler Arterien auf Veränderungen des extraluminalen Milieus, wie sie bei Ischämie im Hirngewebe vorkommt, war aber in Arterien aus Kreatin-gefütterten Mäusen deutlicher ausgeprägt als in Kontrollarterien. Diesen Befund werten wir als wichtigen Hinweis auf eine verbesserte Perfusion v.a. im Ischämie-Randbereich, die wesentlich zur Protektion der Kreatin-Supplementierung im Rahmen der Schlaganfallpathophysiologie beitragen dürfte. Die Befunde sind zur Publikation eingereicht (Prass et al., submitted).

Volatile Anästhetika sind in der Lage, Schutzmechanismen gegenüber ischämischen Ereignissen des Gehirns zu induzieren. Wir konnten kürzlich zeigen, dass der akuten Protektion durch volatile Anästhetika eine Phase der verzögerten Toleranz folgt (Kapinya et al., 2002a; Kapinya et al., 2002b). So kommt es nach Beendigung einer 3-stündigen Isofluran-Applikation zur Ausbildung eines über mehr als 24 h nach Beendigung der Anästhetika-Applikation anhaltenden Schutzes vor ischämischen Ereignissen. In ersten Untersuchungen zur Aufklärung von frühen Mechanismen Isofluran-induzierter Toleranz konnte ich im Rahmen des Projektes in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kapinya (Mitarbeiter der Abteilung Experimentelle Neurologie bis Sommer 2003) nun zeigen, dass der akute toleranzinduzierende Effekt von Isofluran signifikant von der Dauer der Isofluran-Applikation abhängt. Während eine 200-300 minütige Isofluran-Anästhesie direkt vor der Induktion fokaler Ischämie zu einer deutlichen Reduktion des Infarktolumens führt, induzieren kürzere Isofluran-Applikationszeiten keine Toleranz, und längere Applikation führt zu einem Verlust der Protektion. Messungen des regionalen zerebralen Blutflusses mittels Laser Doppler flowmetry (LDF) haben nun ergeben, dass Tiere nach optimal neuroprotektiver Isofluran-Behandlung eine verbesserte relative Reperfusion in der Penumbra-Region aufweisen. Einschränkend muss allerdings beachtet werden, dass mittels LDF lediglich die Beurteilung relativer Veränderungen des Blutflusses möglich ist und keine Aussage über den Blutfluss in absoluten Werten getroffen werden kann. Dennoch lassen unsere bisherigen Befunde den Schluss zu, dass eine akute neuroprotektive Vorbehandlung mit Isofluran mit verbesserter Reperfusion in der Penumbra-Region einherzugehen scheint. Somit erscheint ein vaskulär basierter neuroprotektiver Mechanismus der Isofluran-Präkonditionierung plausibel (siehe unter abstracts: Kapinya et al., 2004).

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Im Rahmen der Präsentation unserer Befunde auf wissenschaftlichen Kongressen konnten wichtige Kooperationen mit renommierten Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der Rolle des NO bei der neurovaskulären Kopplung und deren Störung unter pathophysiologischen Bedingungen weitergeführt werden:

- Die bereits langjährige enge Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Martin Lauritzen (Kopenhagen, Dänemark) ist durch unsere Befunde zur Rolle des Kalium als wichtigen Vasodilatator intensiviert worden. Hier steht zur Diskussion, inwieweit das Kalium einen möglichen Mediator der neurovaskulären Kopplung darstellen könnte.
- Die offensichtliche Parallelität vorliegender Befunde zur Beeinträchtigung der vaskulären Reaktivität nach CSD zu Untersuchungen der Gefäßreaktivitätsstörung nach fokaler zerebraler Ischämie aus der Arbeitsgruppe um Prof. R.M. Bryan (Houston, Texas) (Marrelli et al., 1998) hat die Überlegungen

A6 Lindauer

zu einer möglichen gemeinsamen pathophysiologischen Kaskade im Rahmen der CSD und der Periinfarktdepolarisation beim Schlaganfall neu belebt.

- Etabliert hat sich darüberhinaus eine sehr effektive Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Matthias Endres (Exp. Neurologie, Charité, Berlin) zu vielen Aspekten der Blutflussregulation im Rahmen von Therapie und Prävention der zerebralen Ischämie.
- Die Veröffentlichungen Lindauer et al. 2001 und 2003 zur Rolle von NO bei der Azidose-induzierten Dilatation haben neben einer exzellenten Bewertung zu einer inhaltlich sehr anregenden Korrespondenz mit Herrn Prof. William Rosenblum (Department of Pathology, Division of Neuropathology, Medical College of Virginia, Richmond, USA) geführt. Herr Prof. Rosenblum arbeitet seit vielen Jahren als anerkannter Wissenschaftler zum Thema der Blutflussregulation des Gehirns.

5 Offene Fragen

1. Die Mechanismen und Mediatoren der neurovaskulären Kopplung sind nach wie vor nicht im Detail bekannt. Gesichert ist allerdings, dass das NO / cGMP System eine wichtige modulatorische Rolle innehat. Die zentrale Bedeutung der Kaliumkanäle für zerebrovaskuläre Reaktivität legt nahe, im Rahmen der neurovaskulären Kopplung einen Mechanismus zu fordern, der an der glatten Gefäßmuskulatur über Kaliumkanalaktivität vermittelt wird. Ob ein solcher Mechanismus allerdings über Astrozyten oder Interneuronen initiiert wird, oder ein S-Nitroso-Hämoglobin vermittelter Mechanismus (Stamler et al., 1997) eine Rolle spielt, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.
2. Es ist ebenfalls nicht vollständig geklärt, ob es im Rahmen pathophysiologischer Prozesse beim Schlaganfall zu einer funktionellen Beeinträchtigung von Kaliumkanälen kommt, oder ob die gestörte vaskuläre Funktion in erster Linie durch Änderungen der Kaliumkanalexpression verursacht wird. Nach CSD ist wegen des raschen Einsetzens der Störung (innerhalb weniger Minuten) eher eine funktionelle Beeinträchtigung anzunehmen. Auch hier sind die Mechanismen aber nicht bekannt und bedürfen weiterer Untersuchung.
3. Im Rahmen der Präkonditionierung durch Inhalationsanästhetika kommt es zu einer deutlichen Schlaganfall-Protektion (Kapinya et al., 2002a). Erste Befunde lassen die Hypothese eines vaskulären Mechanismus zu. Im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung am Herzen werden K_{ATP} -Kanal-abhängige Mechanismen diskutiert (Gross and Peart, 2003; Gross et al., 2003). Es stellt sich somit die Frage, inwieweit eine Verbesserung der Kaliumkanal-abhängigen vaskulären Funktion für die Schlaganfall-Protektion nach ischämischer bzw. inhalationsanästhetischer Präkonditionierung verantwortlich gemacht werden kann.

6 Veröffentlichungen:

Eigene Originalarbeiten mit direktem Bezug zum SFB-Projekt (ab 2001)

Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schröck H, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U (2003): Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 54: 582-590. (IF2002: 8.603)

Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M (2003): Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 34: 551-557. (IF2002: 5.176)

Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, Vogt J, Dreier JP, Dirnagl U (2001): Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity. *Am J Physiol* 281: H1353-H1363. (IF2002: 3.369)

Lindauer U, Vogt J, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U (2003): Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca^{2+} -activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 1227-1238. (IF2002: 5.297)

Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U (2001): The cerebrovascular response to elevated potassium – role of nitric oxide in the in vitro model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett* 306: 61-64. (IF2002: 2.100)

Schuh-Hofer S, Boehnke C, Reuter U, Siekmann W, Lindauer U, Arnold G, Dirnagl U (2003): A fluorescence-based method to assess plasma protein extravasation in rat dura mater using confocal laser scanning microscopy. *Brain Res Protocols* 12: 77-82. (IF2002: 1.109)

Seitz I, Dirnagl U, Lindauer U (2004): Impaired vascular reactivity of isolated rat middle cerebral artery following cortical spreading depression in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* (in press). (IF2002: 5.297)

Manuskripte in Vorbereitung bzw eingereicht:

Lindauer U, Lobsien E, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U: Involvement of potassium channels and vascular endothelium during vasodilation of rat middle cerebral artery to increased concentrations of extraluminal potassium. (in preparation)

Prass K, Lindauer U, Megow D, Wallimann T, Stöckler-Ipsiroglu S, Dirnagl U, Priller J: Neuroprotective effects of creatine in a mouse model of stroke. (submitted)

Originalarbeiten mit direktem Bezug zu Kooperationen im SFB (ab 2001)

Dreier JP, Kleeberg J, Petzold J, Priller J, Windmüller O, Orzechowski H-D, Lindauer U, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2002): Endothelin-1 potently induces Leão's cortical spreading depression in vivo in the rat. A model for an endothelial trigger of migrainous aura ? *Brain* 125: 102-112. (IF2002: 7.122)

Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2001) Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol London* 531.2:515-526. (IF2002: 4.650)

Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2002): Ischemia triggered by red blood cell products in the subarachnoid space is inhibited by nimodipine administration or moderate volume expansion / hemodilution in rats. *Neurosurgery* 51: 1457-1467. (IF2002: 2.869)

Übersichtsartikel, Buchbeiträge (ab 2001)

Dreier JP, Windmüller O, Petzold G, Lindauer U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2002) Ischemia caused by inverse coupling between neuronal activation and cerebral blood flow in rats. In: *Brain Activation and CBF control*, Excerpta Medica International Congress Series 1235, ed.: Tomita M, Kanno I, Hamel E, Elsevier, Amsterdam, p.487-492.

Lindauer U, Roysl G, Leithner C, Kühl M, Gethmann J, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U (2002) Neuronal activation induced changes in microcirculatory hemoglobin oxygenation: To dip or not to dip. In: *Brain Activation and CBF control*, Excerpta Medica International Congress Series 1235, ed.: Tomita M, Kanno I, Hamel E, Elsevier, Amsterdam, p.137-144.

Lindauer U (2004) Cerebral microvascular blood oxygenation and neuronal activity. In: *Encyclopedia Of The Microvasculature*, ed.: Shepro D, Elsevier Academic Press (in press)

Habilitationsschrift, Dissertationen von Mitarbeitern (ab 2001)

Kunz A (2003) Untersuchung der Rolle von Stickstoffmonoxid und der Bedeutung von Kalium-Kanälen im Rahmen der Vasodilatation der Arteria cerebri media der Ratte bei Azidose im In-vitro-Modell. Dissertationsschrift zum Dr.med.

Lindauer U (2001) Mechanismen und Mediatoren der neurovaskulären Kopplung im Gehirn. Habilitationsschrift für das Fach Experimentelle Neurologie.

Vogt J (2003) Rolle der Kaliumkanäle und des cGMP bei der Dilatation der perfundierten A. cerebri media der Ratte auf Azidose. Dissertationsschrift zum Dr.med.

Sonstige eigene Originalarbeiten (ab 2001)

Lindauer U, Gethmann J, Kühl M, Kohl-Bareis M, Dirnagl U (2003): Neuronal activity induced changes of local cerebral microvascular blood oxygenation in the rat: effect of systemic hyperoxia or hypoxia. *Brain Res* 975: 135-140. (IF2002: 2.409)

Lindauer U, Roysl G, Leithner C, Kuehl M, Gold L, Gethmann J, Kohl M, Villringer A, Dirnagl U (2001): No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation. *Neuroimage* 13: 988-1001. (IF2002: 5.624)

A6 Lindauer

Projektassoziierte abstracts (ab 2001, chronologisch)

- Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Dirnagl U, Lindauer U (2001): Nitric oxide prevents vasoconstriction of isolated rat middle cerebral artery to high extraluminal potassium concentrations. *Soc Neurosci Abstr* 27
- Lobsien E, Schuh-Hofer S, Dirnagl U, Lindauer U (2001): Vasodilator application prevents vasoconstriction of the isolated middle cerebral artery (MCA) to high extraluminal potassium concentrations following nitric oxide (NO) synthase inhibition. *European Students Conference Berlin 2001*.
- Seitz I, Dirnagl U, Lindauer U (2001): Cerebrovascular reactivity following cortical spreading depression (CSD) in the isolated middle cerebral artery (MCA). *European Students Conference Berlin 2001*.
- Lindauer U, Seitz I, Vogt J, Gethmann J, Schuh-Hofer S, Dirnagl U (2002): Cerebrovascular reactivity following cortical spreading depression (CSD). *Berlin Neuroscience Forum 2002*
- Lindauer U, Vogt J, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U (2002): Cerebrovascular reactivity to acidosis: potassium channels and nitric oxide (NO) / cyclic GMP (cGMP). *Soc Neurosci Abstr*. 28
- Schuh-Hofer S, Reuter U, Boehnke C, Offenhauser N, Arnold G, Lindauer U, Dirnagl U (2002): A new approach to assess plasma protein extravasation in rat dura mater using confocal laser microscopy. *Soc Neurosci Abstr*. 28
- Lindauer U, Dirnagl U (2003) The basis for brain imaging – cerebrovascular regulation: say YES to NO. *Imaging Symposium Helsinki*
- Lindauer U, Seitz I, Gethmann J, Dirnagl U (2003) Impaired cerebrovascular reactivity following cortical spreading depression (CSD). *J Cereb Blood Flow Metab* 23: S89.
- Rohrer B, Sellien H, Leithner C, Megow D, Dirnagl U, Lindauer U (2003): Cerebral blood flow under hyperbaric oxygenation. *European Students Conference Berlin 2003*.
- Kapinya K, Lindauer U, Dirnagl U (2004) Histological outcome and reperfusion after focal cerebral ischemia is determined by the length of anesthetic pretreatment. *Stroke* 35: 276 (P122)
- Lindauer U, Lobsien E, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U (2004) Cerebrovascular reactivity to pathophysiologically enhanced extraluminal potassium. *Berlin Neuroscience Forum 2004*
- Lindauer U, Leithner C, Sellien H, Rohrer B, Roysl G, Megow D, Kohl-Bareis M, Dirnagl U (2004) Hemoglobin deoxygenation induced allosteric release of nitric oxide is not a mechanism of neurovascular coupling. *Berlin Neuroscience Forum 2004*

Im Text zitierte eigene Literatur vor 2001 bzw. fremde Literatur

- Akgoeren N, Dalgaard P, Lauritzen M (1996) Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis. *Brain Res* 710:204-214
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8880-8885
- Gross ER, Peart JN, Hsu AK, Grover GJ, Gross GJ (2003) K(ATP) opener-induced delayed cardioprotection: involvement of sarcolemmal and mitochondrial K(ATP) channels, free radicals and MEK1/2. *J Mol Cell Cardiol* 35:985-992
- Gross GJ, Peart JN (2003) KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H921-H930
- Hata R, Mies G, Wiessner C, Fritze K, Hesselbarth D, Brinker G, Hossmann KA (1998) A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:367-375
- Iadecola C, Zhang F (1996) Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol* 271:R990-1001
- Kapinya KJ, Lowl D, Futterer C, Maurer M, Waschke KF, Isaev NK, Dirnagl U (2002a) Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 33:1889-1898

- Kapinya KJ, Prass K, Dirnagl U (2002b) Isoflurane induced prolonged protection against cerebral ischemia in mice: a redox sensitive mechanism? *NeuroReport* 13:1431-1435
- Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J (1988) Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154:236-244
- Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U (1999) Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol* 277:H799-H811
- Lindauer U, Megow D, Schultze J, Weber JR, Dirnagl U (1996) Nitric oxide synthase inhibition does not affect somatosensory evoked potentials in the rat. *Neurosci Lett* 216:207-210
- Marrelli SP, Johnson TD, Khorovets A, Childres WF, Bryan RM, Jr. (1998) Altered function of inward rectifier potassium channels in cerebrovascular smooth muscle after ischemia/reperfusion. *Stroke* 29:1469-1474
- Stamler JS, Jia L, Eu JP, 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
- Yamada M, Huang Z, Dalkara T, Endres M, Laufs U, Waeber C, Huang PL, Liao JK, Moskowitz MA (2000) Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:709-717

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/A7 2002-2004**Rolle der Microglia im Eisenstoffwechsel des Gehirns - Schädigung Eisen bindender Proteine bei radikalischer Belastung**

Dr. Tilman Grune

Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Aufm Hennekamp 50

40225 Düsseldorf

Tel.: (0211) 3389 297

FAX: (0211) 3389 222

E-mail: Tilman.Grune@uni-duesseldorf.de

vorher:

Neurowissenschaftliches Forschungszentrum

Medizinische Fakultät (Charité)

Humboldt-Universität Berlin

Schumannstr. 20/21

10098 Berlin

E-mail: tilman.grune@charite.de

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

Das Gehirn benötigt eine ständige Zufuhr von Eisen, aber Eisen ist in seiner freien Form toxisch. Aus diesem Grunde hat sich im Laufe der Evolution ein Apparat herausgebildet, der Eisen in bioverfügbarem Zustand hält, jedoch die Toxizität dieses Elements weitgehend einschränkt. Der wesentliche intrazelluläre Eisenspeicher ist das Ferritin. Die Aufnahme von Eisen in die Zelle erfolgt hauptsächlich über Transferrin-Bindung und den Transferrin-Rezeptor (TfR). Eine zentrale Rolle in der intrazellulären Regulation der Proteine des Eisenstoffwechsels spielen die IRPs (iron regulatory proteins): IRP-1 und IRP-2. Bei Eisenmangel sind diese in der Lage, an ein "iron-responsive element" (IRE) einiger mRNAs zu binden und die Translation zu inhibieren bzw. zu verstärken. IRP-1 ist ein relativ stabiles Protein, über dessen Abbau nichts bekannt ist. Es ist scheinbar nicht essentiell, da Zelllinien ohne IRP-1 existieren. IRP-1 kann auch durch NO aktiviert werden. Oxidativer Stress dagegen scheint eine Oxidation der cytosolischen Aconitase/IRP-1 hervorzurufen, die zu keinem funktionierenden Enzym führt, sondern Formen erzeugt, die durch das Proteasom abgebaut werden.

Wie das Eisen regulierende System der Makrophagen auf oxidativen Stress, eine Zellaktivierung bzw. auf eine Eisenbelastung unter hypoxischen Bedingungen reagiert, ist bislang wenig geklärt. Hypoxie und Reoxygenierung gehen mit oxidativem Stress und Zellschädigung einher. Ein wesentlicher Faktor, der die Eisenumverteilung und die Eisenfreisetzung beeinflusst, ist die katalytische Zersetzung von Häm. Diese erfolgt vor allem durch die induzierbare Hämoxygenase-1. Das freiwerdende Eisen muß schnell von der Microglia aufgenommen werden, um eine oxidative Belastungen auszuschließen. Dazu muß auf funktionelle Reserven zurückgegriffen werden oder der TfR und Ferritin-Proteingehalt erhöht werden. Über die Veränderung von TfR, Ferritin, IRP-1 und IRP-2 in Makrophagen bei und nach Hypoxie gibt es unterschiedliche Befunde. Ziel dieses Projektes war es, den Eisenstoffwechsel funktionell zu untersuchen und zu prüfen, ob sich die so gewonnenen Ergebnisse klinisch-pathologisch anwenden lassen.

A7 Grune

1.2 Ziele der vergangenen Antragsperiode

Die Untersuchungen im bearbeiteten Bewilligungszeitraum sollten die Arbeiten der vorhergehenden Antragsperiode beenden und vervollständigen. Ziel der Bearbeitung war es, weitere Aufschlüsse über die Mechanismen der Regulation des Eisenstoffwechsels durch die Microglia unter Normoxie und Hypoxie zu erhalten. Dabei standen die Aufnahme von freiem Eisen und Transferrin gebundenem Eisen sowie die Regulation Eisen-bindender Proteine vor, während und nach Hypoxie im Mittelpunkt des Interesses.

Folgende Hypothesen wurden untersucht:

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

2 Angewandte Methoden

Biologische Modelle

Zellkultur permanenter Linien

- BV-2
- RAW264.7
- OLN 93

Primärzellen:

- Microglia
- Neuronen

Methoden der Zellkultur:

- Vitalitätstests (Trypanblau, Neutralrot, MTT)
- Immunofärbung (FACS und Mikroskopie)
- Belastung der Zellen durch radikalischen Stress und Hypoxie/Reoxygenierung
- Aktivierung microglialer Zellen
- Messung des "oxidative burst"
- Freisetzung von NO und Cytokinen
- Einsatz von Antioxidantien und Eisenchelatoren

Oxidation isolierter Proteine und Bestimmung ihrer proteolytischen Suszeptibilität

- Isolation des Proteasoms
- Oxidation von isolierten Proteinen
- Bestimmung des Abbaus oxidiertes isolierter Proteine
- Abbau oxidiertes Proteine in der Zellkultur

Messung der proteolytischen Systeme in Zellen

- Bestimmung der Aktivität (Proteasom und Cathepsine)
- Bestimmung des Proteasengehaltes durch Immunoblots
- Protein-Turnover und Abbau

Bestimmung der Eisenfreisetzung und der Proteinoxidation

- Bestimmung der Eisenkonzentration
- Einsatz von Fluoreszenz-Farbstoffen zur Eisenbestimmung in Zellen
- Messung der Proteinoxidation

Bestimmung Eisen bindender Proteine

- Untersuchung des Proteingehaltes
- Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Aconitase
- Ferritin-Turnover
- Untersuchung der mRNA

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

- **Aktivierete Microglia hat eine erhöhte Fähigkeit zur Eisenaufnahme und -speicherung durch eine Erhöhung des Ferritin- und TfR-Gehaltes.**

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden primäre microgliale Zellen, BV-2-Zellen und RAW264.7-Zellen mit dem Eisen-bindenden Protein Transferrin, mit niedrigmolekularem Eisen und mit anderen extrazellulären Proteinen inkubiert. Danach wurden die Aufnahmerate, der weitere Verbleib und der Aufnahmemechanismus untersucht. Diese Parameter haben eine klare Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad der Microglia. Es kommt bei verschiedenen oxidierten Proteinen und sogar bei apoptotischen Partikeln zu einer verstärkten Aufnahme durch aktivierte Microglia. Die Aufnahme ist weiterhin gesteigert, wenn die Proteine in oxidiertem Zustand vorliegen. Es ist deshalb interessant, dass wir zeigen konnten, dass die Aufnahme von Eisen aus oxidiertem Transferrin langsamer verläuft als aus nicht oxidiertem. In beiden Fällen waren wir in der Lage zu zeigen, dass das aufgenommene und nun intrazelluläre Eisen im Ferritin abgelagert wird. Die Rate der Aufnahme von oxidierten und nicht oxidierten Proteinen durch primäre microgliale Zellen sinkt mit dem Alter der Spendertiere. Die Stimulierbarkeit der Microglia durch verschiedene Faktoren nimmt im Alter ab. Der Gehalt an Ferritin steigt bei Aktivierung der microglialen Zellen. Diese Induktion wird durch oxidativen Stress reduziert, während die NOS eine Rolle bei der Induktion spielt.

Microgliale Zellen sind somit in der Lage, im aktivierten Zustand mehr Eisen aufzunehmen und es im Ferritin abzulagern. Die Aufnahme des Eisens über das Transferrin hängt vom Schädigungsgrad dieses Proteins ab. Der Ferritingehalt der Microglia ist abhängig vom Aktivierungsstatus.

Die Arbeiten zu diesem Themenabschnitt sind in den Publikationen: 6, 7, 10, 11, 12 belegt.

- **Der Anstieg des Ferritin- und TfR-Gehaltes erfolgt über Regulation auf Translationsebene durch IRP-1 und IRP-2.**

Oxidative Belastung microglialer Zellen ruft eine Schädigung endogener Proteine hervor. Diese ist ebenfalls vorhanden bei einem mit einer Aktivierung verbundenem 'oxidativen Burst'. Durch oxidative Schädigung werden das Ferritinmolekül und das IRP-1 Protein ebenfalls geschädigt. Diese Oxidation ist durch verschiedene Antioxidantien zu verhindern. Diese Proteinoxidation führt zu einem erhöhten Abbau der oxidativ geschädigten Proteine und zur Erhöhung der Proteolyse, wie das auch für andere Proteine gezeigt wurde. Zu solch einer proteolytischen Antwort kommt es sowohl im Cytosol (und hier für die Eisenbindenden Proteine) als auch im Zellkern. Wir haben unter solchen Stressbedingungen den Ferritin-

A7 Grune

Turnover gemessen und konnten zeigen, dass die Veränderungen im Ferritin-Pool vor allem durch eine Verringerung der Poolgröße bedingt durch einen erhöhten proteolytischen Abbau gekennzeichnet sind. Diese wird nachfolgend auf Translationsebene vor allem durch IRP-1 vermittelt wieder kompensiert. Das IRP-1 scheint ebenfalls einer Schädigung zu unterliegen, da es nach oxidativem Stress nicht nur zu einer Aktivierung des IRP-1 kommt, sondern ebenfalls zu einer Neusynthese.

Der Ferritingehalt der Microglia wird auch unter Bedingungen des oxidativen Stresses auf Translationsebene reguliert. Es kommt zu einer zeitweiligen Verringerung des Ferritingehaltes durch einen erhöhten proteolytischen Abbau.

Die Arbeiten zu diesem Themenabschnitt sind in den Publikationen: 1, 2, 7, 8, 9, 19, 20, 21 belegt.

- **Microglia ist nach hypoxischer Belastung in der Lage schnell die Eisenaufnahme zu steigern. Dies gilt sowohl für Transferrin-gebundenes Eisen als auch für niedermolekulares Eisen.**

Unter hypoxischer Belastung und in der Reoxygenierungsphase wurde von uns die Aufnahme niedermolekularen Eisens durch Microglia gemessen. Microgliale Zellen sind in einer nicht-letalen Hypoxie in der Lage mehr Eisen aufzunehmen als unter normoxischen Kontrollbedingungen. Im Gegensatz dazu verringert sich die Aufnahme von Eisen in der posthypoxischen Reoxygenierungsphase. Damit konnte unsere initiale Hypothese nicht bestätigt werden. Wir testeten die Eisenfreisetzung aus Ferritin in Hypoxie und posthypoxischer Phase und konnten feststellen, dass es zu keinem Unterschied in der Hypoxie, aber zu einer deutlichen Senkung in der Reoxygenierung kommt.

Die Eisenaufnahme durch Microglia ist in der Hypoxie gesteigert. Andererseits ist der Eisenaustausch aus dem Ferritin-Pool in der posthypoxischen Reoxygenierung stark eingeschränkt.

Weiterhin testeten wir unter oxidativen Bedingungen die Aufnahme von Eisen aus Transferrin. Microgliale Zellen sind in der Lage Transferrin-gebundenes Eisen aufzunehmen. Diese Aufnahme hängt stark vom Aktivierungsgrad der Microglia und dem Oxidationsgrad des Transferrins ab. Unter den Bedingungen von Aktivierung, oxidativem Stress und Hypoxie/Reoxygenierung kommt es zu einer Veränderung der Aktivität des proteasomalen Systems in Microglia und auch in Neuronen. Dieses führt zu Veränderungen in der Prozessierung Eisen-bindender Proteine.

Microglia nimmt Transferrin-gebundenes Eisen in Abhängigkeit vom Oxidationsgrad und Aktivierung auf.

Die Arbeiten zu diesem Themenabschnitt sind in den Publikationen: 5, 16, 17, 18 belegt.

- **Der posthypoxisch verstärkte Eisenaufnahme liegt ein translationell regulierter Anstieg des Ferritin und TfR zu Grunde.**

Da es in der frühen posthypoxischen Phase zu keinem Anstieg der Eisenaufnahme kommt, testeten wir die translationelle Regulation Eisen-bindender Proteine nach oxidativem Stress. Oxidativer Stress ist gefolgt durch eine starke selektive Oxidation einzelner Proteine. Eines dieser Proteine ist das Ferritin. Solche Oxidationsprozesse können sowohl am isolierten Ferritin als auch in Zellen durch Antioxidantien verhindert werden. Zu einer vergleichbaren Proteinoxidation kommt es während der posthypoxischen Reoxygenierung. Es kommt während der Belastungsphase zu einer verringerten Synthese des Ferritins und durch die andauernde Oxidation des Proteins zu einer Steigerung des Abbaus. Dies führt zu einer Verkleinerung des Ferritin-Pools. Nach der Schädigung kommt es in der Wiedererholungsphase zu einer Re-Synthese dieses Proteins, die translationell vermittelt ist.

Ein translationell vermittelter Anstieg der Ferritinsynthese findet in microglialen Zellen nach der Schädigungsphase statt.

Die Arbeiten zu diesem Themenabschnitt sind in den Publikationen: 5, 7, 11, 13, 14, 19 belegt.

- **Microgliale Zellen sind im Gewebeverband für die Beseitigung des extrazellulären Eisens verantwortlich. Dies wird durch verstärkte Ferritin- und TfR-Expression gewährleistet.**

Eine der weiteren Aufgaben des Projektes war die Untersuchung der microglialen Funktion im Eisenstoffwechsel im Gewebeverband. Diese Aufgabe war für den letzten Zeitraum der Bearbeitung des Projektes gedacht. Durch den Wechsel des Projektleiters an das Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf kam es zum Ausscheiden aus dem SFB (Februar 2004).

Damit konnte diese letzte Fragestellung nicht mehr ausführliche bearbeitet werden. Die geplanten Versuche mit slice-Kulturen sind nicht mehr begonnen worden. Im Rahmen dieses Projektes wurde getestet inwieweit microgliale Zellen durch Eisenoxidpartikel, wie sie im molekularen Magnetresonance-Imaging verwendet werden, eine oxidative Schädigung microglialer Zellen hervorrufen können. Eindeutig kommt es zu einer transienten Erhöhung des oxidativen Stresses, die mit dem Eisen-Chelator Desferal und Antioxidantien zu verhindern ist. Es wird in abschliessenden Versuchen getestet ob solch ein oxidativer Stress ebenfalls bei Transplantation dieser Zellen eine Rolle spielt und ob es zu einer Induktion von Eisenbindenden Proteinen kommt.

Eisenoxidpartikel wie sie im MRT verwendet werden erzeugen einen transienten oxidativen Stress, der durch Chelatoren oder Antioxidantien verhindert werden kann.

Die Arbeiten zu diesem Themenabschnitt ist in der Publikation: 15 belegt.

- **Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen:**

Neben intensiven Diskussionen mit anderen Arbeitsgruppen wurden einige Untersuchungen mit anderen Teilprojekten durchgeführt. Mit der Arbeitsgruppe Dirnagl (TP A5) wurden Untersuchungen zur Bildung von oxidierten Proteinen und zum Proteinturnover bei Hypoxie durchgeführt. Die Regulation des nukleären Proteasoms in BV-2 Zellen bei Aktivierung wurden mit Herrn Dr. Ullrich (TP C6) und Prof. Nitsch (TP B11) untersucht.

Einige Untersuchungen wurden mit dem zum SFB gehörenden 2-Photonen-Mikroskop durchgeführt. Dazu gehören unter anderem die Studien zur Aufnahme von extrazellulärem Material durch die Microglia.

Weitere Kooperationen gab es mit verschiedenen Arbeitsgruppen im In- und Ausland.

Die Zusammenarbeiten mit anderen Arbeitsgruppen sind in den Publikationen: 1, 5, 15 (innerhalb des SFB) und 3, 4, 7, 8, 11, 19, 21 belegt.

- **Weitere Arbeiten im der Arbeitsgruppe im Zeitraum der Bearbeitung des Projektes**

Neben der direkten Bearbeitung der oben genannten Teilaufgaben wurden einige Publikationen zur Etablierung von Methoden oder zur Abklärung grundlagen-wissenschaftlicher und biochemischer Fragestellungen mit Unterstützung des SFB bearbeitet. Diese Fragestellungen wurden in die Teilaufgaben des SFB TP A7 mit eingearbeitet und sind in eine Vielzahl der Publikationen mit eingeflossen.

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereiches und Reaktion der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Einige der Ergebnisse zum Turnover Eisen-bindender Proteine und zur Aufnahme von extrazellulärem Material durch die Microglia wurden auf internationalen Tagungen und Konferenzen vorgestellt. Dort wurden sie lebhaft diskutiert und boten Anknüpfungspunkte für weitere Zusammenarbeiten. Insbesondere die Fähigkeit der microglialen Zellen selektiv oxidierte Proteine zu erkennen und die Rolle oxidiertes Proteine bei der Aufnahme apoptotischer Vesikel war Gegenstand mehrerer Diskussionen.

Die Fragestellung nach Veränderung der proteasomalen Aktivität und Regulation bei oxidativem Stress und der Aktivierung microglialer Zellen wird von meiner Arbeitsgruppe seit einiger Zeit bearbeitet und ist Gegenstand zahlreicher Diskussionen über die Rolle von 20S und 26S Proteasom beim Abbau oxidiertes Proteine.

Seit einiger Zeit wird Proteinoxidation, nicht zuletzt als Resultat unserer Arbeiten, nicht mehr als randomisierter und genereller Prozess angesehen. Dazu haben unsere Arbeiten aus dem Bereich der Ferritinoxidation, die im SFB bearbeitet wurden, ebenfalls beigetragen. In der breiten Diskussion der Ergebnisse wurden erste theoretische Ansätze zur Protektion von Proteinen durch Antioxidantien erarbeitet und praktisch umgesetzt.

5 Offene Fragen

Im TP A7 konnte gezeigt werden, dass eine aus Aktivierung und Hypoxie/Reoxygenierung resultierende Ferritinoxidation mit einer Erhöhung des Ferritinabbaus und einer translationell bedingten Neusynthese verbunden ist. Eine Oxidation von Ferritin ist mit einer Eisenfreisetzung verbunden. Solche eine Ferritinoxidation kann durch Antioxidantien effektiv verhindert werden. Es kommt nach einer radikalischen Belastung zu einer adaptiven Erhöhung des Ferritins in der intakten Microglia. Microgliale Zellen sind in

A7 Grune

der Lage Eisen, Eisen-bindende und oxidierte Proteine aus dem Extrazellularraum aufzunehmen und zu verarbeiten.

Es ist ungeklärt, inwieweit die Microglia im Gewebeverband ebenfalls diese Funktionen übernehmen kann. Hier spielt vor allen das Ausmass des oxidativen Stresses, Menge und Konzentration des freigesetzten Eisens und der Schädigungsgrad der microglialen Zellen selbst eine Rolle. Weiterhin unklar ist, ob unter verschiedenen pathologischen Zuständen residierenden microglialen Zellen oder einwandernden Makrophagen die entscheidende Funktion zukommt. Besonderheiten in der Regulation des Transferrin-Rezeptors und des Ferritins in microglialen Zellen sind weiterhin ungeklärt. So z.B. warum es unter Umständen eine gleichläufige Regulation beider Proteine in der Microglia im Gegensatz zu anderen Zellen gibt. Die Frage der Regulation des Transferrin-Rezeptors unter hypoxischen Bedingungen in der Microglia ist ebenfalls ungeklärt.

Weitere Fragen ergeben sich aus der Funktionalität des proteasomalen Systems sowie seiner Regulation unter pathologischen Bedingungen im Gehirn.

Publikation der Ergebnisse:

Publikationen, die in der vergangenen Antragsperiode beendet wurden:

1. Ullrich, O., A. Diestel, I. Bechmann, M. Homberg, **T. Grune**, R. Hass, R. Nitsch: Turnover of damaged nuclear proteins in BV-2 microglial cells is linked to their activation state by poly(ADP-ribose)polymerase. *FASEB J. express*, 10.1096 (27. 04. 2001).
2. Gieche, J., J. Mehlhase, A. Licht, T. Zacke, N. Sitte, **T. Grune**: Protein oxidation and proteolysis in RAW264.7 macrophages: effects of PMA activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1538 (2001) 321-328.
3. **Grune, T.**, L.-O. Klotz, J. Gieche, M. Rudeck, H. Sies: Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxyxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1243-1253.
4. Mertsch, K., I. Blasig, **T. Grune**: 4-Hydroxynonenal impairs the permeability of an in vitro rat blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* 314 (2001) 135-138.
5. Weih, M., M. Schmidt, J. Gieche, C. Harms, K. Ruscher, U. Dirnagl, **T. Grune**: Proteolysis of oxidized proteins after oxygen-glucose deprivation in rat cortical neurons is mediated by the proteasome. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 21 (2001) 1090-1096.
6. Stolzing, A., A. Wegner, **T. Grune**: Degradation of oxidized extracellular proteins by microglia. *Arch. Biochem. Biophys.* 400 (2002) 171-179.

Publikationen der vergangenen Antragsperiode:

7. **Grune, T.**, T. Reinheckel, J.A. North, R. Li, P.B. Bescos, R. Shringarpure, K.J.A. Davies: Ezrin turnover and cell shape changes catalyzed by proteasome in oxidatively stressed cells. *FASEB J.* 16 (2002) 1602-1610.
8. Horáková, L., M. Jakstadt, G. Sandig, Z. Duracková, **T. Grune**: Prevention of protein oxidation by antioxidants: Inhibition of ferritin oxidation. *Free Rad. Res. Supplement* 1 (2002) 40-42.
9. Mehlhase, J., **T. Grune**: Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Biol. Chem.* 383 (2002) 559-567.
10. Stolzing, A., **T. Grune**: Impairment of protein homeostasis and decline of proteasome activity in microglial cells from adult Wistar rats. *J. Neurosci. Res.* 71 (2003) 264-271.
11. **Grune, T.**, K. Merker, G. Sandig, K.J.A. Davies: Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 709-718.
12. Stolzing, A., **T. Grune**: Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *FASEB J. express* (2004), 10.1096/fj.03-0374fje.
13. Ernst, A., A. Stolzing, G. Sandig, **T. Grune**: Antioxidants efficiently prevent oxidation-induced protein damage in OLN 93 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 421 (2004) 54-60.
14. Ernst, A., A. Stolzing, G. Sandig, **T. Grune**: Protein oxidation and the degradation of oxidized proteins in the rat oligodendrocyte cell line OLN 93 – antioxidative effect of the intracellular spin trapping agent PBN. *Mol. Brain Res.* (2004) in press

15. Stroh, A., C. Zimmer, C. Gutzeit, M. Jakstadt, F. Marschinke, T. Jung, H. Pilgrim, **T. Grune**: Iron-oxide-particles for molecular magnetic-resonance-imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* (2004) in press.

Zur Zeit eingereichte oder vor der Einreichung stehende Publikationen:

16. Thomas Zacke, Grit Sandig, Anke Licht, Tilman Grune: Activation dependent loss of 26S proteasomal activity in macrophagial cells. In Vorbereitung.
17. Alexandra Stozing, Rebecca Widmer, Tilman Grune: Uptake and degradation of normal and oxidatively damaged transferrin by primary microglial cells – the storage of iron. In Vorbereitung.
18. Rebecca Widmer, Alexandra Stolzing, Tilman Grune: Iron uptake by microglial cells under hypoxic and posthypoxic conditions. In Vorbereitung.
19. Jana Mehlhase, Kostas Pantopoulos, Tilman Grune: H₂O₂ effect on the ferritin turnover in microglia/macrophages. In Vorbereitung.
20. Grit Sandig, Deborah Horn, Tilman Grune: IRP-1 and IRP-2 expression in microglial cells during oxidative stress. In Vorbereitung.
21. Grit Sandig; Lubica Horakova, Manuela Jakstadt, Tilman Grune: Prevention of ferritin oxidative damage by antioxidants: proteolytic recognition by the proteasome. In Vorbereitung.

PROJEKTBEREICH B
Zerebrale Ischämie/Hypoxie
(Projektbereichsleiter: Prof. Dr. R. Nitsch)

- B6** Inflammation der Blut-Hirn-Schranke (BHS) – Ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis
Weber/Braun
- B9** Thrombin als Stimulus und Modulator mikroglialer Aktivierung
Hanisch
- B11** Die Beteiligung von autoantigenspezifischen T-Zellen bei Protektion und Reorganisation des entorhinal-hippocampalen Systems
Nitsch
- B12** Die Rolle von oligodendroglialen Chemokinrezeptoren bei der Myelinisierung und Demyelinisierung - funktionelle in vitro-in vivo Korrelationen
Brück/Stangel
- B14** Expression und funktionelle Bedeutung des TRAIL-Systems für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose
Zipp
- B15** Interaktionen zwischen Entzündungsprozessen im ZNS und dem peripheren Immunsystem: Untersuchungen zum Infektionsrisiko und -prävention bei einer ZNS-vermittelten systemischen Immunsuppression am Ratten-Modell
Woiciechowsky/Volk

Zusammenfassender Bericht des Projektbereiches

Innerhalb des Bereiches B haben sich die Projekte mit Mechanismen der akuten und chronischen Entzündung und ihren funktionellen Auswirkungen beschäftigt. Dabei gelang es im Projekt B 6 (Weber) zu zeigen, dass bakterielle Toxine und Zellwandkomponenten über bisher nicht bekannte molekulare Mechanismen unter Beteiligung des „innate“ Immunsystems zur Zellschädigung führen können. Hierdurch ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze gelegt worden. Im Projekt B 9 (Hanisch) gelangt es zu zeigen, dass Mikrogliazellen neben proteaseaktivierten Rezeptoren auch alternative Thrombin-bindende Oberflächenmoleküle exprimieren. Die Mikrogliazelle als primärer Entzündungsmediator im Zentralen Nervensystem kann dadurch nicht durch Thrombin, sondern auch durch andere Proteine, wie dem IGM, in spezifischer Weise in ihrer Zytokin- und Chemokinifreisetzung reguliert werden. Mechanismen, die der Beteiligung von Glia- und Immunzellen bei Protektion und Reparatur im Zentralen Nervensystem zugrunde liegen, sind im Projekt B 11 (Nitsch) untersucht worden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass spezifische T-Zellsubpopulationen direkt einen mechanisch induzierten neuronalen Primärschaden in seiner weiteren Entwicklung eindämmen können. Von besonderem Interesse ist, das T-Zellen selber (über lösliche Faktoren) das Auswachsen von axonalen Fortsätzen aus zentralnervösem Gewebe regulieren können. Dabei setzen sie sowohl wachstumsstimulierende als auch Leitmoleküle (guidance cues) frei. Die regenerative Kapazität von Gliazellen, in diesem Falle von Oligodendrozyten Predecessor Zellen, ist im Projekt B 12 (Brück/Stangl) untersucht worden. Hierbei ist die Rolle von Chemokinrezeptoren untersucht worden. Analyse des Expressionsmusters, die Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration, sowie Vorgänge der Proliferation und Migration konnten dabei als abhängig von spezifischen Chemokinrezeptoren nachgewiesen werden. Sowohl immunregulatorische Prozesse als auch de-

B

strukture Effektormechanismen von T-Zellen sind im Projekt B 14 (Zipp) untersucht worden. Hierbei gelang es zu zeigen, dass im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der EAE es zu einem neuronalen Zelluntergang kommt. Unter Einsatz der 2-Photonenmikroskopie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass dabei ein direkter T-Zell-Neuronkontakt eine Rolle spielen kann. Die Bedeutung von apoptoseinduzierenden Systemen wie dem TRAIL sowohl als Therapieindikator als auch direkt verantwortlich für neuronalen Zelltod wurde untersucht. Abgeschlossen wurde dieser Projektbereich vom Projekt B 15 (Woiczikowsky/Volk). Untersuchungen zur akuten Reaktion des Organismus auf einen inflammatorischen Reiz als Stressreaktion konnten zeigen, dass ohne inflammatorischen Reiz eine systemische Immunsuppression auftritt und diese zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt.

Die Arbeiten in diesem Projektbereich sind durchgängig erfolgreich publiziert worden. Die Wegberufung von Herrn Brück und Herrn Hanisch nach Göttingen und der Weggang von Herrn Stangl nach Hannover unterstreichen die erfolgreichen Arbeiten innerhalb dieses Projektbereiches.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/B6 2002-2004

Inflammation der Blut-Hirn-Schranke (BHS) – Ein Schlüsselmechanismus in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis

Prof. Dr. Jörg R. Weber
PD Dr. Johann S. Braun
Neurologische Klinik und Poliklinik
Charité – Universitätsmedizin Berlin
10098 Berlin
Tel.: 030 450 560104
Fax: 030 450 560942
Email: joerg.weber@charite.de

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragsstellung und Ausgangsfragestellung

Die durch *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufene Meningitis ist die schwerste Form der bakteriellen Hirnhautentzündung. Mit der Einführung der Haemophilus Typ b Impfung und dem signifikanten Rückgang dieser Erkrankung ist nunmehr die Pneumokokkenmeningitis sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter die häufigste Form der bakteriellen Meningitis (Schuchat et al., 1997). Die Aktivierung und der sodann folgende Zusammenbruch der BHS sind von zentraler Bedeutung in der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis und durch folgende Schritte gekennzeichnet.

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

Eine wesentliche neue Beobachtung war, dass Pneumokokkenzellwände (PCW) in der Lage sind, schon in geringen Konzentrationen (Äquivalent von 10^3 CFU) TNF- α in mikrovaskulären Endothelzellen (BMEC) zu exprimieren und freizusetzen (Freyer et al., 1999). Diese inflammatorische Aktivierung ist die Voraussetzung für die Invasion von Pneumokokken in BMEC durch Transzytose. Ca. 20 % der Pneumokokken überwinden durch diesen PAF-Rezeptor abhängigen Mechanismus konfluierende zerebrale Endothelzellen ohne mit „tight junctions“ zu interferieren (Ring et al., 1998). Untersuchungen der zu Grunde liegenden „signaling pathways“ zeigten, dass Pneumokokkenzellwände zur Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wie der extrazellulär signalregulierten Proteinkinase 1 (erk-1) und 2 sowie von p38 führen. Diese Aktivierung ist zumindest teilweise CD 14 abhängig (Schumann et al., 1998).

Bei der Pneumokokkenmeningitis wurde bei Patienten und in experimentellen Modellen im Hippokampus neuronale Apoptose beobachtet (Nau et al., 1999). Diese Apoptose ist experimentell zum einen durch Inhibition der Leukozyteninvasion, zum anderen auch durch die intrazisternale Verabreichung von zVAD-fmk, einem Breitspektrum Caspasehemmer, um 50% vermindert (Braun et al., 1999). Dies hat zur Hypothese geführt, dass zum einen die entzündliche Antwort des Körpers, aber möglicherweise auch direkte bakterielle Faktoren an dieser Schädigung beteiligt sein könnten.

Daraus hatten wir bei der letzten Antragstellung folgende Ziele formuliert: 1. Identifikation der molekularen Mechanismen, die zur entzündlichen Aktivierung der BHS führen, und Entwicklung protektiver Interventionen. 2. Aufklärung der Mechanismen, die zur Apoptose von zerebralen Endothelzellen führen, und Entwicklung möglicher protektiver Interventionsstrategien.

2 Angewandte Methoden

Zellkulturen primärer zerebraler mikrovaskulärer Endothelzellen (Ratte) und eine humane Zelllinie mikrovaskulärer Endothelzellen, primäre Mikroglia (Ratte, Maus) und primäre kortikale und hippocampale Neuronen (Ratte), HEK 293 Zelllinie. Diese Zelllinie haben wir TLR2 und TLR4 Rezeptoren transfiziert sowie mit einem entsprechenden Reporter ausgestattet (Weber et al., 2003; Schroder et al., 2003). Zur Messung transendothelialer Widerstände haben wir ein Doppelkammersystem mit konfluierenden Endothelzelllayern auf einer Membran verwendet und die Widerstände mit Endohm gemessen (Endohm Tissue Resistance Measurement Chambers, WPI, Berlin).

Signaltransduktion: Methoden zur Erfassung der MAP Kinasen Aktivierung und p38 Aktivierung sind im Labor etabliert. Die erk1/erk2 Kinasen werden mittels Western Blot erfasst, wobei diese mit einem pan-Ak dargestellt werden. Der aktive Zustand wird mit einem spezifischen „phosphorylation site“-Ak nachgewiesen (Biosource Europe, Belgien). Die tatsächliche Phosphorylierung erfassen wir durch die spezifische Fähigkeit von erk1/erk2, den Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP an des myelinbasierte Protein zu katalysieren (Biotrak MAPK Assay, Schumann et al., 1998).

Zytokine/ Entzündungsmediatoren: Zusätzlich maßen wir eine Palette pro- und antiinflammatorischer Zytokine etc., wobei PCR, ELISA (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) sowie der Nachweis von biologisch aktiven TNF- α (Hanisch et al., 2001; Hausler et al., 2002) angewandt wurden.

„Tight junction“ Proteine: Wir haben einen Western Blot zum Nachweis von ZO-1 (anti-ZO-1 Ak, Zymed San Francisco, USA) und Occludin (anti-occludin Ak, Zymed) etabliert. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen werden densitometrisch quantifiziert.

Tierexperimentelle Modelle der Meningitis: Entsprechend der Fragestellung und um speziesspezifische Effekte zu vermeiden haben wir Meningitis in der Ratte, Maus und im Kaninchen die Entzündung mit Pneumokokkenzellwänden oder *S. pneumoniae* D39 und entsprechenden Mutanten induziert. Die Vorteile dieser Modellvielfalt wird durch die erfassten Parameter deutlich, die vom Hirnödem über Blutflussveränderungen bis zur Histologie und molekularen Fragen im Liquor gehen. Diverse histologische Methoden einschließlich *in situ* Hybridisierung und Elektronenmikroskopie wurden verwendet.

Apoptose: Diverse Methoden zur Erfassung des Zelltodes nach morphologischen Kriterien ergänzt durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, Messung der Caspaseaktivität, Proteinmessungen mit Western Blot von Caspase 3, Fodrin, PARP, AIF und Cytochrom C etc.

Pneumokokken und Pneumokokkenzellwände: *S. pneumoniae* D39 Kapseltyp 2 und R6 das unbekapselte Derivat (Rockefeller University, New York, NY, USA) sind gut charakterisierte Pneumokokken, die von verschiedenen Laboren weltweit eingesetzt werden. Wir verwenden zusätzlich eine Pneumolysin-negative Mutante *plnA*⁻ (Dr. D. Briles, University of Alabama, Birmingham, AL, USA), die Pyruvat Oxidase Mutante *spxB*⁻ (defizient in der H₂O₂ Produktion), eine choline binding protein A Mutante *cbpA*⁻ mit einem Adhäsionsdefekt (Dr. E.I. Tuomanen, Memphis, TN, USA) und die von uns hergestellte *plnA*⁻/*spxB*⁻ Doppelmutante (Braun et al., 2002).

Neben den lebenden Bakterien verwenden wir eine standardisierte Zellwandpräparation, die aus den unbekapselten R6 hergestellt wird (Weber et al., 2003).

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

Entsprechend den formulierten Zielen sind uns in 3 wesentlichen Fragestellungen deutliche Fortschritte gelungen.

- a) Erstmalige Identifikation bakterieller Faktoren (H₂O₂ und Pneumolysin), die unabhängig von der Immunantwort des Wirtes Zelltod verursachen können.

Wir untersuchten neurotoxische Wirkungen bakterieller Toxine *in vivo* und *in vitro*, wobei wir hier Mechanismen und mögliche Unterschiede zwischen Neuronen im Kortex und im Hippokampus bearbeiteten (Braun et al., 2001).

Erstmalig ist dabei die Identifikation bakterieller Faktoren (H₂O₂ und Pneumolysin), die unabhängig von Immunantwort des Wirtes Zelltod verursachen können, gelungen (Braun et al., 2002). Dies konnten wir auch im Kaninchenmodell zweifelsfrei zeigen. Ein wesentlicher Diskussionspunkt an unserer Arbeit, die den Effekt von bakteriellen H₂O₂ und Pneumolysin gezeigt hat, ist die Frage, wie diese Toxine den anatomisch entfernten Hippokampus erreichen. Histopathologisch ist eine Invasion von Bakterien in das Hirnparenchym in dieser Region nicht und in anderen Teilen des Gehirnes nur selten anzutreffen. Zwischenzeitlich haben wir am im letzten Antrag als Hypothese formulierten Konzept, von zwei, einmal

durch Toxine und einmal über den TLR2 Rezeptor vermittelten Zelltod gearbeitet. Nicht nur der Induktionsweg ist unterschiedlich sondern auch der Exekutionsweg der Zellen ist völlig different. Pneumokokken sind damit in der Lage Zellen sowohl über einen klassischen Apoptoseweg als auch über einen zur „large tail DNA fragmentation“ führenden Weg zu schädigen. Diese an BMECs durchgeführten Untersuchungen sind zur Publikation eingereicht.

- a) Identifikation des Pneumokokkenzellwandrezeptors und Etablierung von LBP (LPS bindendes Protein) als „general recognition molecule“.

In diesem SFB haben wir in den letzten Jahren unsere Modelle konsequent weiter entwickelt und mit der Etablierung eines Meningitismodells in der Maus und der Verwendung primären Endothelzellen des Rattenhirns Voraussetzungen geschaffen, um grundlegende Mechanismen der Immunerkennung Gram-positiver Bakterien zu studieren. Dabei ist es uns gelungen, LBP (LPS-bindendes Protein), das historisch gesehen nur bei der Erkennung Gram-negative Bakterien eine Rolle spielte, als „general recognition molecule“ zu identifizieren. Zudem konnten wir den TLR2 Rezeptor als Rezeptor für die Erkennung der Pneumokokkenzellwand beschreiben (Weber et al., 2003).

- b) Interventionen zur Protektion der BHS durch Interaktionen in die Signaltransduktion und Neuropeptidfreisetzung.

Wir haben uns ausführlich mit Signaltransduktion sowie der Induktion von Botenstoffen durch PCW beschäftigt. Die Arbeiten sind teilweise in einer intensiven Kooperation innerhalb des SFBs mit der Arbeitsgruppe Hanisch (B 2) und Kettenmann (C 8) entstanden. Schwerpunkte waren hier Interventionsmöglichkeiten in den Signalwegen *in vitro* (Hanisch et al., 2001) und *in vivo* (Angstwurm et al., 2004) zu testen, sowie den gegenseitigen Einfluss von Zytokinen auf Zytokin- und Chemokinexpressionsmuster zu untersuchen (Hausler et al., 2002).

Ausgehend von dem klinischen Befund, dass Neuropeptide, insbesondere CGRP, im Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis signifikant erhöht sind, haben wir tierexperimentell die mögliche proinflammatorische Rolle dieser Schmerzmediatoren untersucht. 5HT₁ Agonisten reduzieren den Anstieg von regionalem zerebralen Blutfluß und intrakraniell Druck sowie den Leukozyteneinstrom in den Liquor. Die Induktion der Meningitis führt tatsächlich zur Depletion von CGRP in perivaskulären C-Fasern, die durch 5HT₁ Agonisten verhindert werden kann. 5HT_{1B/D} Rezeptoren sind an diesem Vorgang wesentlich beteiligt (Hoffmann et al., 2002).

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereiches und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die unspezifische Entzündungsinhibition durch Dexamethasone als erste geprüfte adjuvante Therapie bei bakterieller Meningitis hat eine Reihe wichtiger Fragen aufgeworfen (de Gans and van de Beek, 2002). Primäres Ziel muss es nun sein die molekulare Induktion des Entzündungsvorganges im Detail zu verstehen (Lutsar et al., 2003). Dabei ist sowohl der Effekt lebender Bakterien (Situation vor Antibiotika) als auch der Zellwandbestandteile und sonstiger bakterieller Faktoren (Situation nach Antibiotika) von größter Bedeutung.

Andere Arbeitsgruppen haben in verschiedenen Modellen wichtige Fragestellungen wie Effekte von oxidativen Stress (Schaper et al., 2002) bearbeitet und sich mit der Rolle relevanter Entzündungsmediatoren wie Matrixmetalloproteasen (Leib et al., 2001; Winkler et al., 2001; Bottcher et al., 2003) oder IL-1 (Zwijnenburg et al., 2003b; Koedel et al., 2002) und Il-18 (Zwijnenburg et al., 2003a) beschäftigt. Zudem wurden die Rolle der vorwiegend durch die Leukozyteninvasion und Entzündungsreaktion induzierte Caspaseaktivierung (von Mering et al., 2001; Gerber et al., 2001) *in vivo* untersucht.

Hervorzuheben als Reaktionen der internationalen Öffentlichkeit sind Einladungen als Keynote Sprecher (JRW) zum ICID (International Conference on Infectious Diseases) 2002 in Singapur, zum DFG Schwerpunkt „Entzündung und Endothel“ 2003 in Dresden und zum ISSPD (International Symposium on *S. pneumoniae* and Pneumococcal Diseases) 2004 in Helsinki. Hervorzuheben sind noch ein Preview bzw. Editorial Comment zu unseren Arbeiten in den renommierten Journalen *Journal of Clinical Investigation* und *Immunity*.

5 Offene Fragen

Die Identifikation molekularer Ziele zur Beeinflussung der Entzündungskaskade auf Rezeptor oder „Pattern“-Ebene ist für uns ein vorrangiges Ziel. Wir arbeiten gerade an der Übertragung eigener Erkenntnisse auf andere relevante Strukturen des Gehirnes sowie der BHS.

Zitierte Literatur

(eigene Arbeiten 2001-2004 s.u. Liste der Veröffentlichungen der Mitarbeiter des SFBs)

- Bottcher, T., Spreer, A., Azeh, I., Nau, R., and Gerber, J. (2003). Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs host defense mechanisms against *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model of bacterial meningitis. *Neurosci. Lett.* 338, 201-204.
- Braun, J.S., Novak, R., Herzog, K.H., Bodner, S.M., Cleveland, J.L., and Tuomanen, E.I. (1999). Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat. Med.* 5, 298-302.
- de Gans, J. and van de Beek, D. (2002). Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1549-1556.
- Freyer, D., Manz, R., Ziegenhorn, A., Weih, M., Angstwurm, K., Döcke, W.D., Meisel, A., Schumann, R. R., Schönfelder, G., Dirnagl, U., and Weber, J. R. (1999) Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and upregulate iNOS and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J. Immunol.* 1789-97
- Gerber, J., Bruck, W., Stadelmann, C., Bunkowski, S., Lassmann, H., and Nau, R. (2001). Expression of death-related proteins in dentate granule cells in human bacterial meningitis. *Brain Pathol.* 11, 422-431.
- Koedel, U., Winkler, F., Angele, B., Fontana, A., Flavell, R.A., and Pfister, H.W. (2002). Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. *Ann. Neurol.* 51, 319-329.
- Leib, S.L., Clements, J.M., Lindberg, R.L., Heimgartner, C., Loeffler, J.M., Pfister, L.A., Tauber, M.G., and Leppert, D. (2001). Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain* 124, 1734-1742.
- Lutsar, I., Friedland, I.R., Jafri, H.S., Wubbel, L., Ahmed, A., Trujillo, M., McCoig, C.C., and McCracken, G.H., Jr. (2003). Factors influencing the anti-inflammatory effect of dexamethasone therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 651-655.
- Nau, R., Soto, A., and Brück, W. (1999). Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 265-274.
- Ring, A., Weiser, J.N., and Tuomanen, E.I. (1998). Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.* 102, 347-360.
- Schaper, M., Gergely, S., Lykkesfeldt, J., Zbaren, J., Leib, S.L., Tauber, M.G., and Christen, S. (2002). Cerebral vasculature is the major target of oxidative protein alterations in bacterial meningitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 605-613.
- Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J.D., Harrison, L.H., Farley, M., Reingold, A.L., Lefkowitz, L., and Perkins, B.A. (1997). Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N. Engl. J. Med.* 337, 970-976.
- Schumann, R.R., Pfeil, D., Bürger, W., Lamping, N., Kirschning, C.J., Goebel, U., and Weber, J.R. (1998). Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p 38 in astrocytes. *Glia* 22, 295-305.
- von Mering, M., Wellmer, A., Michel, U., Bunkowski, S., Tlustochowska, A., Bruck, W., Kuhnt, U., and Nau, R. (2001). Transcriptional regulation of caspases in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Pathol.* 11, 282-295.
- Winkler, F., Koedel, U., Kastenbauer, S., and Pfister, H.W. (2001). Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J. Infect. Dis.* 183, 1749-1759.
- Zwijnenburg, P.J., van der, P.T., Florquin, S., Akira, S., Takeda, K., Roord, J.J., and van Furth, A.M. (2003a). Interleukin-18 gene-deficient mice show enhanced defense and reduced inflammation during pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol.* 138, 31-37.

Zwijnenburg,P.J., van der,P.T., Florquin,S., Roord,J.J., and van Furth,A.M. (2003b). IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J. Immunol.* *170*, 4724-4730.

Liste der Veröffentlichungen der Mitarbeiter des Teilprojektes B6 SFB 507

(Antragsteller fett gedruckt, SFB-Projektmitarbeiter/Kooperationspartner unterstrichen)

a) direkt Projekt-assoziiert

Originalarbeiten:

Hoffmann,O., Reuter,U., Masuhr,F., Holtkamp,M., Kassim,N., and **Weber,J.R.** (2001). Low sensitivity of serum procalcitonin in bacterial meningitis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* *33*, 215-218.

Hanisch,U.K., Prinz,M., Angstwurm,K., Hausler,K.G., Kann,O., Kettenmann,H., and **Weber,J.R.** (2001). The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2104-2115.

Braun,J.S., Novak,R., Murray,P.J., Eischen,C.M., Susin,S.A., Kroemer,G., Halle,A., **Weber,J.R.**, Tuomanen,E.I., and Cleveland,J.L. (2001). Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J. Infect. Dis.* *184*, 1300-1309.

Hoffmann,O., Dirnagl,U., and **Weber,J.R.** (2001). The trigeminovascular system in bacterial meningitis. *Microsc. Res. Tech.* *53*, 188-192.

Braun,J.S., Sublett,J.E., Freyer,D., Mitchell,T.J., Cleveland,J.L., Tuomanen,E.I., and **Weber,J.R.** (2002). Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* *109*, 19-27.

Hausler,K.G., Prinz,M., Nolte,C., **Weber,J.R.**, Schumann,R.R., Kettenmann,H., and Hanisch,U.K. (2002). Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 2113-2122.

Hoffmann,O., Keilwerth,N., Bille,M.B., Reuter,U., Angstwurm,K., Schumann,R.R., Dirnagl,U., and **Weber,J.R.** (2002). Triptans reduce the inflammatory response in bacterial meningitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *22*, 988-996.

Weber,J.R., Moreillon,P., and Tuomanen,E.I. (2003). Innate sensors for Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 408-415.

Weber,J.R., Freyer,D., Alexander,C., Schroder,N.W., Reiss,A., Kuster,C., Pfeil,D., Tuomanen,E.I., and Schumann,R.R. (2003). Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* *19*, 269-279.

Angstwurm,K., Hanisch,U.K., Gassemi T., Bille M.B., Prinz M., Dirnagl U., Kettenmann H., **Weber J.R.** Tyrosine kinase inhibition reduces inflammation in the acute stage of experimental pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* *in press*

Buchkapitel:

Weber J.R., Tuomanen E.I. (2001) Transcytosis and signaling of pneumococci at the blood brain barrier. **Blood-Brain Barriere** Eds Kobilier, Lustig, Shapira. Kluwer Academic Publishers New York:169-76.

Weber J.R. (2004) Pathogenesis of Meningitis. **The Pneumococcus**. Eds Tuomanen, Morrison, Mitchell, Spratt. ASM press Chicago: *in press*

Originalarbeiten in Revision:

ZweignerJ., Jackowski S., Smith S.H., van der Merwe M., **Weber J.R.**, Tuomanen E.I. Bacterial inhibition of phosphatidylcholine synthesis: determinant role in apoptosis in brain. *J. Exp. Med.* *in revision*

B6 Weber/Braun

b) sonstige

- Bruck,W., Neubert,K., Berger,T., and **Weber,J.R.** (2001). Clinical, radiological, immunological and pathological findings in inflammatory CNS demyelination--possible markers for an antibody-mediated process. *Mult. Scler.* 7, 173-177.
- Ganten,D. and **Weber,J.R.** (2001). JMM, past and present. Meningitis cerebro-spinalis epidemica. *J. Mol. Med.* 79, 159-160.
- Harms,C., Lautenschlager,M., Bergk,A., Katchanov,J., Freyer,D., Kapinya,K., Herwig,U., Megow,D., Dirnagl,U., **Weber,J.R.**, and Hortnagl,H. (2001). Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J. Neurosci.* 21, 2600-2609.
- Holtkamp,M., Zschenderlein,R., Bruck,W., and **Weber,J.R.** (2001). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with histologically proven optic neuritis. *Acta Neuropathol. (Berl)* 101, 529-531.
- Holtkamp,M., Buchheim,K., Unterberg,A., Hoffmann,O., Schielke,E., **Weber,J.R.**, and Masuhr,F. (2001). Hemispherectomy in elderly patients with space occupying media infarction: improved survival but poor functional outcome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 226-228.
- Angstwurm,K., Schielke,E., Zimmer,C., Kivelitz,D., and **Weber,J.R.** (2002). Superficial siderosis of the central nervous system: response to steroid therapy. *J. Neurol.* 249, 1223-1225.
- Braun,J.S.**, Novak,R., Torzewski,M., and Soehngen,D. (2002). Intracerebral hemorrhages, fibrinolysis, and prostate carcinoma. *J. Neurol.* 249, 478-479.
- Herzog,K.H., **Braun,J.S.**, Han,S.H., and Morgan,J.I. (2002). Differential post-transcriptional regulation of p21WAF1/Cip1 levels in the developing nervous system following gamma-irradiation. *Eur. J. Neurosci.* 15, 627-636.
- Hoffmann,O.**, Klingebiel,R., **Braun,J.S.**, Katchanov,J., and Valdueza,J.M. (2002). Diagnostic pitfall: atypical cerebral venous drainage via the vertebral venous system. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 23, 408-411.
- Ring,A., **Braun,J.S.**, Pohl,J., Nizet,V., Stremmel,W., and Shenep,J.L. (2002). Group B streptococcal beta-hemolysin induces mortality and liver injury in experimental sepsis. *J. Infect. Dis.* 185, 1745-1753.
- Lassmann,H., Reindl,M., Rauschka,H., Berger,J., Aboul-Enein,F., Berger,T., Zurbriggen,A., Lutterotti,A., Bruck,W., **Weber,J.R.**, Ullrich,R., Schmidbauer,M., Jellinger,K., and Vandeveldelde,M. (2003). A new paraclinical CSF marker for hypoxia-like tissue damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 126, 1347-1357.
- Prass,K., Meisel,C., Höflich, C., **Braun,J.S.**, Halle,E., Wolf,T., Ruscher,K., Victorov,I.V., Priller,J., Dirnagl,U., Volk,H.D., and Meisel, A. (2003) Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation - reversal by post-stroke Th1-like immunostimulation. *J. Exp. Med.:* 198, 725-736.
- Schroder,N.W., Morath,S., Alexander,C., Hamann,L., Hartung,T., Zahringer,U., Gobel,U.B., **Weber,J.R.**, Schumann,R.R. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.* 278, 15587-15594.
- Harms,C., Bösel,J., Lautenschlager,M., Harms,U., **Braun,J.S.**, Hörtnagl,H., Dirnagl,U., Kwiatkowski,D.J., Fink,K., and Endres,M. (2004) Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol. Cell. Neurosci.:* 25, 69-82.
- Meisel,C., Prass,K., **Braun,J.S.**, Victorov,I.V., Wolf,T., Megow,D., Halle,E., Volk,H.D., Dirnagl,U., and Meisel,A. (2004) Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke:* 35, 2-6.

Buchkapitel:

- Angstwurm K., **Weber J.R.** (2002) Neurologische Defektsyndrome. **Repetitorium Intensivmedizin.** Eds Eckart, Forst, Buchardi. EcoMed Verlagsgesellschaft Landsberg. II-6, 11-12.
- Angstwurm K., **Weber J.R.** (2003) Koma mit Fokalneurologie. **Repetitorium Intensivmedizin.** Eds Eckart, Forst Buchardi. EcoMed Verlagsgesellschaft Landsberg. III-8, 57-64.
- Wetzel K., Schielke E., **Weber J.R.** (2004) Enzephalitis, Myelites, Neuritis. **Die Infektiologie.** Eds Adam, Doerr, Link, Lode. Springer Berlin, Heidelberg, New York. 404-410.

Wetzel K., Schielke E., **Weber J.R.** (2004) Infektionskrankheiten des zentralen Nervensystems. **Infektionskrankheiten** Eds Suttorp, Mielke, Kiekl, Stück. Thieme Stuttgart. 351-378.

Promotionen und Habilitationen:

Promotionen: Stefanie Reuss. (2001) Induzierte Hypothermie bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis in der Ratte. *summa cum laude*

Andreas Ziegenhorn (2001) Zytokintranskription und -expression durch Zellen des Zentralnervensystems nach Stimulation durch Wandbestandteile von *Streptococcus pneumoniae* - eine kinetische Studie in einem In-vitro-Modell der bakteriellen Meningitis. *magna cum laude*

Holger Flick (2001) Bedeutung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase und der Leukozyten-Endothel-interaktion in der Schadenskaskade der Pneumokokkenmeningitis. *summa cum laude*

Ute Stefanie Sehmsdorf (2002) Einfluss von „Calcitonin Gene-Related Peptide“ und „Substance P“ auf die Zytokin mRNA Expression und Freisetzung von kultivierten zerebralen Kapillarendothelzellen, einem wesentlichen zellulären Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, bei Stimulation mit Zellwandbestandteilen von *Streptococcus pneumoniae* - ein *in-vitro* Modell. *magna cum laude*

Daniela Bermppohl (2003) Nachweis und Charakterisierung der Pneumokokkenzellwand- induzierten Apoptose zerebraler mikrovaskulärer Endothelzellen. *summa cum laude*

Habilitation Dr. med. Johann Braun (2003) Hirnschädigung der Pneumokokkenmeningitis: Trigger, Mechanismen und Protektion.

Preise:

E.K. Frey-Preis der Deutschen Gesellschaft für Internistische und Allgemeine Intensivmedizin, (JSB, 2002)

Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (JSB, ED, JRW 2003)

Gastwissenschaftler und Kollaborationen:

Dr. Christian Alexander, Borstel

Dr. Michiel van der Flier, Utrecht, Niederlande

Dr. Axel Ring, Heidelberg

Dr. Ute Stephanie Sehmsdorf, München

Prof. Elaine Tuomanen, Memphis, USA

Kongressbesuche (jeweils nur aktive Teilnahme der gelisteten Mitarbeiter):

J. Braun, C. Schwarzbach (Doktorand), Berlin Neuroscience Forum 2002, Liebenwalde

Anja Reiss (Doktorandin), European Society for Paediatric Research 2002, Utrecht, Niederlande

O. Hoffmann, C. Schwarzbach (Doktorand), Neuroscience Meeting 2002, Orlando, USA

J. Weber, Kollaborationstreffen 2002 Memphis, USA

J. Weber, Nobel Symposium on Sepsis 2003, Stockholm, Schweden

O. Hoffmann, Neuroscience Meeting 2003, New Orleans, USA

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/B9 2002-2004

Thrombin als Stimulus und Modulator mikroglialer Aktivierung

Leiter: Prof. Dr. Uwe-Karsten Hanisch

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (Gastwissenschaftler)
Zelluläre Neurowissenschaften

Robert-Rössle-Straße 10
13092 Berlin-Buch

Fachhochschule Lausitz
Bio-, Chemie- und Verfahrenstechnik

Großenhainer Straße 57
01968 Senftenberg

Telefon: (03573) 85817
Telefax: (03573) 85809

E-Mail: uhanisch@fh-lausitz.de

Der Leiter hat einen Ruf auf eine Professur für Experimentelle Neurobiologie an die Universität Göttingen erhalten. Als Antrittstermin ist der 1. April 2004 vorgesehen. Das Projekt wird bis Ende 2004 auslauffinanziert. Es wird daher hier zunächst lediglich ein Zwischenbericht gegeben. Der Abschlussbericht wird zum 1. Oktober 2004 vorgelegt.

Zusammenfassung

Die als Koagulationsfaktor bekannte Serinprotease Thrombin kann durch proteolytische Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) auch in Neuronen und Glia verschiedene Funktionen beeinflussen. Wir hatten dies für Mikroglia beschrieben. Die Induktion mikroglialer Zyto- und Chemokine durch Thrombin wies jedoch PAR-untypische Eigenschaften auf. Hier zeigen wir nun, dass Mikroglia neben PARs auch alternative Thrombin-bindende Oberflächenmoleküle exprimiert. Allerdings wurde festgestellt, dass weder PARs oder alternative Rezeptoren, noch proteolytische oder Ligand-Eigenschaften des Thrombins eine Rolle bei der Induktion spielen. Systematische Studien ergaben, dass nicht Thrombin (in α - oder γ -Form), sondern eine in geringsten Mengen assoziierte hochmolekulare Protein-Fraktion in Thrombin-Präparationen Träger der Zyto/Chemokin-induzierenden Aktivität ist. Die Fraktion ließ sich einerseits auf Thrombin zurückführen, vermutlich als Ergebnis einer (Auto)Proteolyse und Aggregation. Andererseits wurden in den aktiven Fraktionen zwei weitere Serum-Faktoren identifiziert, die bei Gewebeerletzung oder Blut-Hirn-Schranken-Störung — wie für Thrombin diskutiert — an der Aktivierung der Mikroglia beteiligt sein könnten. Für eines dieser Proteine, IgM, konnte die dem Thrombin zugewiesene Zyto/Chemokin-Induktion tatsächlich bestätigt werden. Damit resultiert ein Hinweis auf die Mikroglia-regulierende Wirkung von IgM sowie weiterer, teilweise erst kürzlich identifizierter Serum-Komponenten. Es ergibt sich aber auch eine notwendige Korrektur der Zuordnung entzündungsfördernder Aktivitäten zum Funktionsspektrum des Gerinnungs- und Wachstumsfaktors Thrombin mit klinischer Relevanz.

1 Kenntnisstand bei Antragsstellung und Ausgangsfragestellung

Thrombin ist eine zentrale Serin-Protease der Blutgerinnungskaskade (Faktor IIa). Ihre proteolytische Funktion ist dabei aber nicht auf Fibrinogen-Spaltung beschränkt. Mit der Identifizierung Protease-aktivierter Rezeptoren (PAR) wurde in den neunziger Jahren ein Mechanismus entdeckt, der einer Protease über limitierte Proteolyse erlaubt, direkt Einfluss auf Zellen zu nehmen. Durch Abspaltung eines N-terminalen PAR-Fragments wird einem intramolekularen Liganden die Aktivierung des Rezeptors ermöglicht. Nachgeschaltete zytosolische Signalwege (z.B. G-Protein-, PLC- oder Proteinkinase-Aktivierungen) setzen die Proteolyse in zelluläre Konsequenzen um (Abb. 1). Thrombin steuert damit proliferative, chemotaktische und adhäsive Eigenschaften von Blutplättchen, Granulozyten oder Gefäßmuskelzellen.

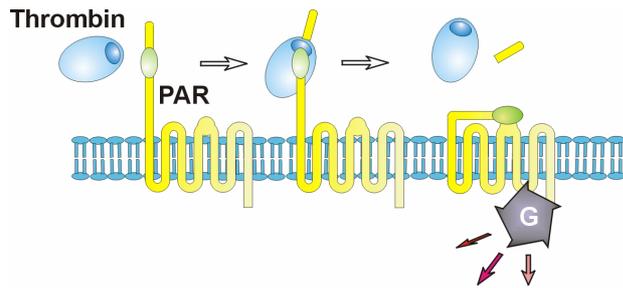


Abb. 1: Aktivierung eines Protease-aktivierten Rezeptors (PAR) durch die Protease Thrombin. Limitierte Proteolyse legt dabei eine neue N-terminale Sequenz im PAR-Protein frei, die den Rezeptor als intramolekularer Ligand autostimuliert. Im Zellinnern werden dadurch G-Protein-vermittelte und weitere Signalkaskaden angestoßen.

Während eine Rolle als Gefäßwachstums- bzw. Wundheilungsfaktor im Zusammenhang mit Koagulation auf ein Spektrum protektiver und regenerationsfördernder Wirkungen orientiert, stehen Thrombin und andere Serum-Proteasen zunehmend im Verdacht, bei Störungen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) an ZNS-Gewebeschädigungen beteiligt zu sein. Obwohl der Beitrag von Proteasen an posttraumatischen, postischämischen oder entzündlichen Schadenskaskaden als erheblich angesehen wird, sind die tatsächlichen molekularen und zellulären Mechanismen weitgehend ungeklärt. Inzwischen wurde nachgewiesen, dass PARs selbst auf Neuronen vorkommen und neben den Vorstufen relevanter Serum-Proteasen (u.a. Prothrombin) auch spezifische Protease-Inhibitoren (Serpine) im ZNS exprimiert sind. Es zeichnet sich ein komplexes Bild ab, in dem bestimmte Proteasen und deren Rezeptoren nicht nur bei BHS-Störungen Zugang zu ZNS-Zellen erhalten, sondern während der Ontogenese an der Hirngewebereifung sowie später als Signal-System an neurophysiologischen Prozessen teilnehmen.

Zum Zeitpunkt der Antragstellung hatten wir gerade experimentelle Befunde dafür erhalten, dass Thrombin in Mikroglia-Zellen zytosolische Signalkaskaden aktiviert und neben Proliferation auch die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen induziert (Möller et al., *J Neurochem* **75**: 1539-1547, 2000). Vermutlich könnte Thrombin somit bei BHS-Störungen oder Gefäßverletzungen als unmittelbares Trauma-Signal für die Makrophagen-ähnlichen Zellen dienen. Die Induktion neuro- und immunoregularischer Zytokine und Chemokine fügte sich sowohl in das für Mikroglia bekannte Profil zellulärer Funktionen, als auch in das für Thrombin diskutierte Bild ein. Letztlich wurden für Thrombin entzündungsrelevante Aktivitäten und Zytokin-Induktionen beschrieben.

Allerdings stießen wir bei Untersuchungen zur Kinetik mikroglialer PAR-Aktivierung durch Thrombin auf Hinweise, die gegen eine ‚klassische‘ Rekrutierung der Rezeptoren während der Zyto/Chemokin-Induktion sprachen. In weiteren Experimenten wurde rasch deutlich, dass Thrombin dabei eher einen nichtproteolytischen Aktivierungsmechanismus, vielleicht sogar alternative Rezeptoren nutzt. Damit stellte sich für das Projekt die Aufgabe, den PAR- bzw. Nicht-PAR-vermittelten Mechanismus mikroglialer Aktivierung durch Thrombin aufzuklären.

2 Angewandte Methoden

Als zentrales zelluläres Modell wurden primäre Maus-Mikroglia-Kulturen, in gewissem Umfang Zelllinien eingesetzt. Der Nachweis von Zytokin-Induktionen, Rezeptor-Expressionen oder Kinase-Aktivierung erfolgte auf mRNA- bzw. Protein-Ebene mittels RT-PCR, ELISA, FACS, Immunpräzipitation, SDS-PAGE, Western-Blot und Immunzytochemie. Zur Trennung bzw. Reinigung von Proteinen wurden chromatografische Verfahren (FPLC) und Differentialfiltration eingesetzt. Die Identifizierung von Proteinen erfolgte u.a. über Massenspektrometrie. Proteolytische Aktivitäten wurden mit spezifischen chromogenen Peptidsubstraten gemessen bzw. über Western Blot-Analysen verfolgt. Für verschiedene funktionelle Charakterisierungen wurden immobilisierte Proteasen, Protease- und Kinase-Inhibitoren, synthetische Peptide (PAR-Agonisten, Thrombin-Domänen-Analoga) und verschiedene Interaktionspartner des Thrombins verwendet (ausführliche Angaben folgen im Abschlussbericht).

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

Befunde zur Thrombin-Regulation mikroglialer Zytokin- und Chemokin-Freisetzungen

Präparationen von α -Thrombin verschiedener Spezies und Herkunft waren in der Lage, in Mikroglia die Synthese und Freisetzung verschiedener Zyto- und Chemokine zu induzieren (IND, Abb. 2). In bereits aktivierter Mikroglia bewirkt Thrombin eine Modulation (MOD) der Freisetzungsfähigkeit. So wurde die

durch bakterielles Lipopolysaccharide (LPS) induzierbare Zyto/Chemokin-Freisetzung inhibiert (Abb. 2). Mehrere unabhängige Befunde sprachen bei IND und MOD für unterschiedliche Mechanismen.

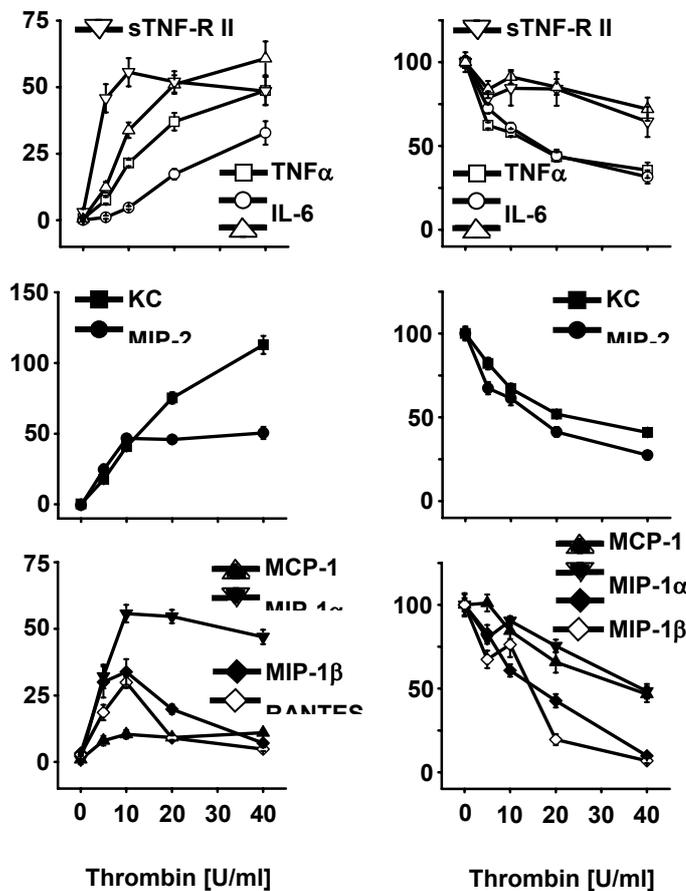


Abb. 2: (Links) Induktion mikroglialer Zyto- und Chemokin-Freisetzung (Release) durch Thrombin. Kulturen wurden für 18 h mit verschiedenen Konzentration (Aktivität in Units/ml) einer Thrombin-Präparation behandelt und danach die Mengen an freigesetzten Zyto- und Chemokinen im Überstand bestimmt. (Rechts) Modulation LPS-induzierter Zytokin- und Chemokin-Freisetzung in Mikroglia. Zellen wurden parallel mit LPS und Thrombin behandelt. Nach 18 h wurden Zyto- und Chemokine im Überstand gemessen. Der modulatorische (hier inhibitorische) Einfluss wird vermutlich über mRNA-Destabilisierung oder Effekte auf die Translation realisiert. In Abhängigkeit vom primären Stimulus können Thrombin-Präparationen auch freisetzung-verstärkenden Effekt zeigen. Als Kontrolle dienten Stimulationen mit LPS. Der dabei erhaltene Release wurde als 100% definiert.

Zyto- und Chemokin-Induktionen (IND) zeigen untypische Kinetik

Unsere Annahme, dass IND-Effekte des Thrombins in Mikroglia über PARs vermittelt werden, wurde durch Expressionsnachweis der relevanten PAR1, PAR3 und PAR4 sowie des PAR2 (Trypsin-Rezeptor) gestützt. Die PARs ließen sich auf mRNA und Protein-Ebene in primären Kulturen und Zelllinien — wenn auch in Mengen variierend — darstellen. Allerdings zeigten kinetische Untersuchungen an, dass keine ‚klassische‘ PAR-Rekrutierung beteiligt sein konnte (Abb. 3, nachfolgend werden nur ausgewählte Arbeiten zur IND-Aktivität besprochen).

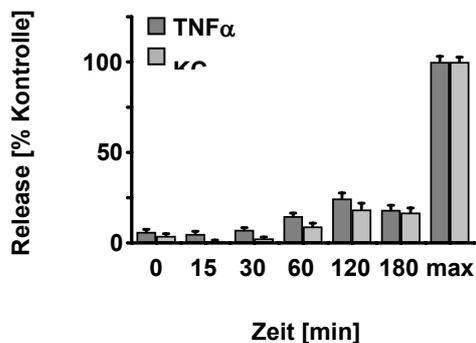


Abb. 3: Induktion von TNF α und KC in Mikroglia durch transiente Stimulation mit einer Thrombin-Präparation. Nach 15 bis 180 min wurde der Überstand entfernt, die Zellen gewaschen und die durch die kurze Stimulation über insgesamt 18 h resultierende Freisetzung des Zyto- und des Chemokins im Vergleich zu einer kontinuierlichen (18-stündigen) Thrombin-Behandlung gemessen (max). Im Gegensatz zum MOD-Phänomen, das sich schon nach 15 min Thrombin-Einwirkung auf die Zellen in voller Intensität nachweisen ließ, benötigte die IND-Wirkung weitaus länger, als es sich für einen PAR-Mechanismus erwarten ließ.

Zyto- und Chemokin-Induktionen (IND) sind PAR-unabhängig

PARs lassen sich durch synthetische Agonisten-Peptide, deren Sequenzen den intramolekularen Ligand-Motiven entsprechen, auch ohne Proteolyse aktivieren. Wir haben eine komplette Serie solcher Agonisten allein und in Kombination mit Thrombin-Präparationen auf Zytokin-Induktion in Mikroglia getestet. Keine der Strukturen zeigte Induktionseffekt (Abb. 4). Auch Experimente mit γ -Thrombin, einer durch Domänen-Spaltung (*exosite I'* u.a. für Fibrinogen-, Hirudin-, Thrombomodulin-Erkennung) zu PAR-Interaktionen partiell nicht mehr fähigen Protease-Form, und PAR-kompetitiven Strukturen (z.B. Hirudin) ließen erkennen, dass (bekannte) PARs nicht an der Vermittlung der Thrombin-Effekte beteiligt sein können.

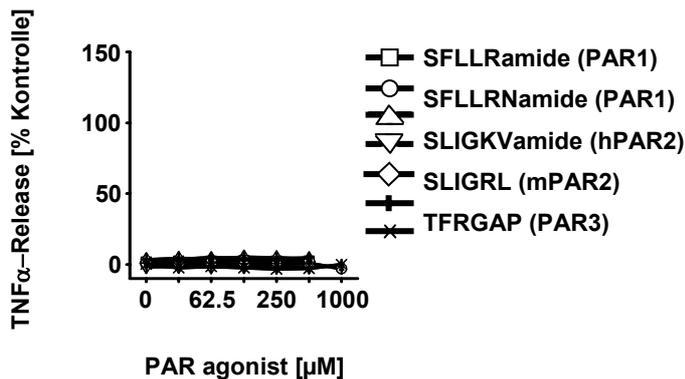


Abb. 4: Effekt von PAR-Agonisten auf die TNF α -Induktion in Mikroglia. Peptide mit entsprechenden Ligand-Sequenzen wurden den Zellen wie Thrombin zugesetzt und TNF α im Überstand gemessen. Weder allein noch in Kombination mit Thrombin (nicht dargestellt) zeigte sich dabei eine Wirkung (Daten zur MOD sind hier nicht dargestellt, ergaben jedoch keine Anhaltspunkte für PAR1, 3 und 4).

Alternative Rezeptoren sind ebenfalls nicht an der IND-Aktivität des Thrombins beteiligt

PARs sind nicht die einzigen Strukturen, die als Thrombin-Rezeptoren dienen könnten. Tatsächlich konnten wir in Mikroglia GP-Komplexe (CD42) nachweisen, die mit dem *exosite II'* (u.a. Heparin-, Glycocalacin-Bindung) interagieren. Dabei ließen sich die entsprechenden GP-Komponenten GPII β , Ib β , IX und V über ihre mRNA und den Proteinkomplex selbst (CD42) darstellen (Abb. 5). Funktionelle Studien (u.a. unter Einsatz verschiedener Heparin-Formen) sprachen jedoch gegen eine Rolle des GP-Komplexes bei der Thrombin-vermittelten Zytokin- und Chemokin-Release-Induktion.

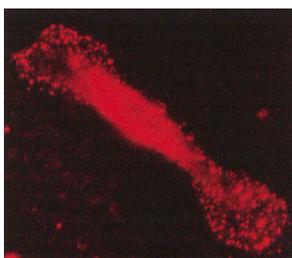


Abb. 5 : CD42b-Expression in Mikroglia. Der für Thrombin-Bindung aus Blutplättchen bekannte GP-Komplex ließ sich über Immunfluoreszenz darstellen.

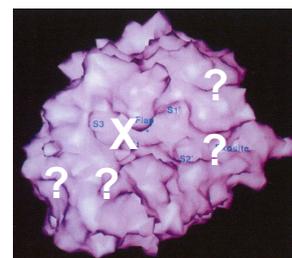


Abb. 6: Thrombin-Modell mit dem aktivem Zentrum (X) und weiteren funktionell relevanten Molekül-Anteilen (?).

Zyto/Chemokin-Induktionen erfordern nicht die proteolytische Aktivität des Thrombins

Nachdem proteolytische Aktivierungen bzw. Interaktionen mit relevanten PARs und GPs als unwahrscheinliche Mechanismen ausgeschieden waren, stellte sich die Frage nach jeglicher Beteiligung enzymatischer Aktivität am Induktionsphänomen. Es zeigte sich dann in mehreren Experimenten, dass auch eine vollständige Inhibition der proteolytischen Aktivität keinen Einfluss auf das Induktionspotential hat. Einzig eine Ligand-Wechselwirkung des Thrombins mit unbekanntem Mikroglia-Strukturen verblieb als nächste zu testende Hypothese (Abb. 6).

IND-Aktivität wird nicht über alternative funktionelle Domänen des Thrombins vermittelt

Nachdem sich proteolytische Aktivierungen bzw. Interaktionen mit relevanten PARs und GPs als unerheblich für die mikrogliale Zyto/Chemokin-Induktion erwiesen hatten, wurde die evtl. Beteiligung weiterer Thrombin-Molekülanteile geprüft, für die sich funktionelle Hinweise in anderen Studien finden ließen. Dazu wurden Thrombin-Fragmente hergestellt (die ‚F14‘-, ‚B loop‘- und ‚TP508‘-Regionen) und auf IND-Aktivität sowie potentielle Einflüsse auf Thrombin-vermittelte IND-Aktivität hin untersucht.

Zusätzlich wurde der Versuch unternommen, das komplette Protease-Molekül zu ‚verpacken‘, um jegliche Wechselwirkung zu verhindern. Die Ergebnisse ließen keinen Beitrag erkennen. Damit stellte sich die Frage, ob Thrombin als Enzym oder Protein überhaupt IND vermittelt oder die Aktivität auf einer assoziierten Nicht-Protein-Komponente beruht, beispielsweise auf einem Lipid.

IND-Aktivität ist an eine thermosensitive hochmolekulare Fraktion gebunden

In Studien zur Thermostabilität erwies sich die IND-Aktivität in Thrombin-Präparationen als Temperatursensitiv (Abb. 7). Rasche Inaktivierung bei 100 und 70 °C deuteten auf eine Protein-Natur des verantwortlichen Faktors. Differentialfiltrationen ergaben auch Hinweise auf die Molekülgröße. Die IND-aktive Komponente musste dabei ein deutlich größeres Molekulargewicht (MW) besitzen, als reifes Thrombin oder auch Prothrombin. Andererseits hatten die SDS-PAGE-Analysen verschiedenster Thrombin-Präparate auch in offensichtlich hochreinen Produkten (nach Protein- bzw. Anti-Thrombin-Färbungen und Angaben zur spezifischen Enzym-Aktivität) keine Hinweise auf Hoch-MW-Fractionen gegeben (Abb. 7). Erst eine systematische FPLC-gestützte Fraktionierung von Thrombin-Präparationen mit Protein-Detektion, Messung proteolytischer Thrombin-Aktivität und Testung der Zyto- und Chemokin-Induktion zeigte, dass die IND-Aktivität nur in einer hochmolekularen Protein-Fraktion residiert, die keine thrombische Aktivität trägt. Damit schied Thrombin selbst als IND-Faktor aus. Die eigentliche Mikroglia-aktive Komponente war einerseits schon in geringsten Konzentrationen wirksam. Andererseits entzog sie sich bedingt durch ihr hohes MW (> 700 kD) dem Nachweis durch konventionelle SDS-PAGE/Western Blot-Charakterisierungen (Abb. 7).

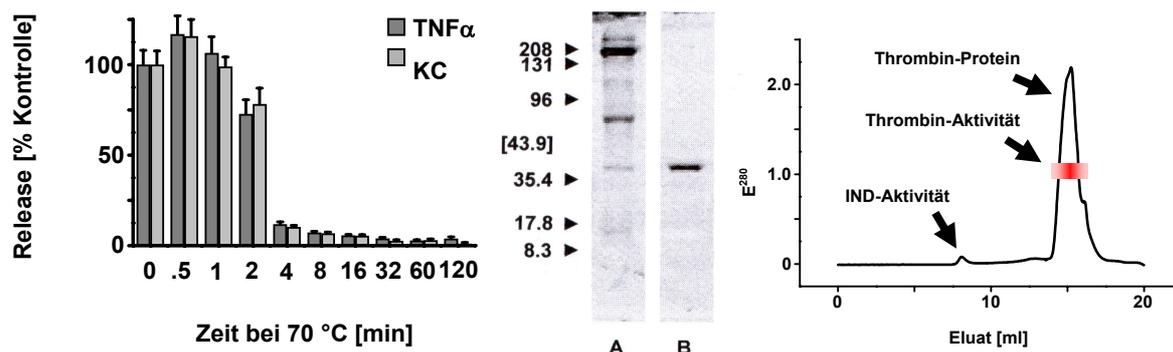


Abb. 7: (Links) Thermostabilität von Thrombin. Die Protease-Präparation wurde für unterschiedliche Zeit bei 70 °C inkubiert und nachfolgend die Fähigkeit zur Zyto- und Chemokin-Induktion in Mikroglia bestimmt. Das experimentelle Design ermöglichte exakte Zeiten und Temperatur-Einstellungen. (Mitte) SDS-PAGE-Analyse zweier Thrombin-Präparate. Ein Präparat geringer (A) und ein Produkt mit sehr hoher spezifischer Aktivität (B) wurden auf Vorliegen weiterer Protein-Fractionen hin untersucht. Reifes Thrombin hat dabei ein MW von ca. 38 kD. (Rechts) FPLC-gestützte Gelfiltration eines Thrombin-Präparates mit Protein-Detektion (E²⁸⁰). Während die enzymatische Aktivität nur im Thrombin-Peak lokalisiert war (Balken), fand sich die Induktionsaktivität (IND) lediglich in einer hochmolekularen Fraktion.

Die hochmolekulare Fraktion enthält Thrombin-Peptide und weitere Serum-Proteine

Wir konnten die hochmolekulare Fraktion (HMW) als Träger der IND-Aktivität nicht nur in zahlreichen Thrombin-Präparationen nachweisen, sondern auch das Fehlen einer solchen Aktivität in einigen Präparationen mit der Abwesenheit oder Nicht-Detektierbarkeit der Proteine korrelieren. Obwohl die HMW-Gesamtprotein-Mengen sehr gering waren bzw. bei Annahme eines großen Proteins bzw. Polypeptides (MW >700 kD) die molaren Mengen extrem gering sein würden, wurde in mehreren Ansätze die Identifizierung des HMW-Materials vorgenommen. Massenspektrometrische Untersuchungen isolierten mehrere Peptid-Fragmente des reifen Thrombins (Abb. 8). Aus der Kombination mit Stabilitätsuntersuchungen (Autoproteolyse und tryptischer Fremdverdau) sowie Western Blot-Analysen vermuten wir, dass Thrombin nach Fragmentierung Aggregate bilden kann, die dann an den mikroglialen Wirkungen zumindest beteiligt sein könnten. Thrombin als reifes Protease-Molekül jedoch ist dazu nicht in der Lage. Ein direkter Beweis dafür wurde von uns inzwischen unter Verwendung eines rekombinanten Thrombins erbracht.

MAHVRLQLP GCLALAALCS LVHSQHVFLLA PQQARSLLR VRRANTFLEE VRKGNLEREC
VEETCSYEEA FEALESSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL AACLEGNAE GLGTNYRGHV
NITRSGIECQ LWRSRYPHKP EINSTTHPGA DLQENFCRNP DSSTTGPWCY TTDPTVRRQE
CSIPVCGQDQ VTVAMTPRSE GSSVNLSPPL EQCVPDRGQQ YQGR LAVTTH GLPCLAWASA
QAKALSKHQD FNSAVQLVEN FCRNPDGDEE GVWCYVAGKP GDFGYCDLNY CEEAVEEETG
DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFNPRTFG SGEADCGLRP LFEKKSLEDK TERELLESYI
DGRIVEGSDA EIGMSPWQVM LFRKSPQELL CGASLISDRW VLTAACHLLY PPWCKNFTEN
DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH PRYNWRENLD RDIALMKLKK PVAFSDYIHP
VCLPDRETAA SLLQAGYKGR VTGWGNLKET WTANVGKGQP SVLQVVNLPI VERPVCKDST

Abb. 8: Aminosäuresequenz des humanen (Pro)Thrombin mit per Massenspektrometrie identifizierten Peptiden (unterstrichen) der leichten und schweren Ketten des reifen Proteins.

Darüber hinaus wurden im HMW-Material zwei weitere Serum-Proteine identifiziert, die bedingt durch ihre Natur durchaus als Mikroglia/Makrophagen-aktivierende Faktoren in Frage kommen. Bei einem dieser Proteine handelt es sich um Immunglobulin der M-Klasse (IgM). Die direkte Prüfung auf Zyto/Chemokin-Induktion mit hochreinen Präparationen zeigte, dass IgM (und IgA, nicht jedoch IgG) auch in Abwesenheit entsprechender Antigene zur IND-Aktivität befähigt sind. Die mikroglialen Reaktionen sind dosisabhängig und beachtlich, gemessen am Release-Potential der Zellen bei Standardstimulationen (mit z.B. LPS). Mikroglia verfügt dabei auch über die erforderlichen Rezeptor-Strukturen. Inzwischen haben wir auch Serien von Experimenten abgeschlossen, in denen über die IND-Aktivität hinaus weitere dem Thrombin zugeschriebene Wirkungen für die Ig-Typen getestet wurden. Für das zweite identifizierte Protein (hier nicht näher benannt) stehen umfangreichere Untersuchungen noch aus, bevor eine Rolle als Mikroglia-aktivierender Faktor bestätigt werden kann. Zusätzlich werden entsprechende Release-modulierende Effekte des IgM und weiterer Serum-Protein-Kandidaten allein und in Kombination mit Thrombin bzw. Thrombin-Fragmenten/Aggregaten geprüft.

Das Mikroglia-aktivierende Potential des Thrombins und anderer Serum-Faktoren

Zusammen genommen konnte in dem Projekt gezeigt werden, dass die Annahme einer Zyto/Chemokin-Release-induzierenden Wirkung des Thrombins (zunächst für Mikroglia) revidiert werden muss. Das könnte u.a. auch Konsequenzen für die neurologische sowie neurochirurgische Praxis besitzen. Danach stellt sich die Protease jetzt als ein multifunktionelles Enzym mit Koagulations- und Wachstums- bzw. Wundheilungseffekten, jedoch ohne direkten Beitrag zur Freisetzung proinflammatorischer Zyto- und Chemokine (aus Mikroglia) dar. Für die Mikroglia ist dagegen eine ganze Reihe von Serum-Faktoren äußerst interessant, wie eben vermutlich die Immunglobuline M und A. Es verbleiben mehrere Fragen für die weitere Forschung. Kann eine Zyto/Chemokin-Induktion durch Thrombin für andere Zelltypen (z.B. Monozyten, periphere Makrophagen oder Astrozyten) ebenfalls ausgeschlossen werden? Zu welchen Mikroglia-regulierenden Einflüssen sind Thrombin, enzymatisch inaktives Thrombin, aggregiertes Thrombin oder Thrombin-Vorstufen bzw. -Fragmente fähig? Welche Rolle könnten Proteasen, wie Thrombin, innerhalb des ZNS bei intakter BHS spielen. Welche weiteren Faktoren im Serum spielen in Szenarien gestörter BHS-Integrität eine ähnliche Rolle als *„immediate trauma signal“*? Wir haben in diesem Zusammenhang vor, laufende Arbeiten bis zum Abschlussbericht voranzutreiben, um erste Ergebnisse über den Rahmen der ursprünglichen Aufgabenstellung hinaus vorstellen zu können.

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des SFB und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Auf diesen Punkt wird im Abschlussbericht eingegangen. Im Moment verfolgen andere Arbeitsgruppen für Zellen des ZNS lediglich PAR-vermittelte Wirkungen. Die Existenz alternativer Mechanismen für die Effekte von Thrombin-Präparationen wurde bislang nicht berücksichtigt. Ursache für die damit heterogene Datenlage ist einerseits die variable Reinheit kommerzieller (auch zertifizierter) Thrombine bei nahezu nicht-detektierbarer HMW-Beimengung bzw. die mangelnde (fehlende) Verfügbarkeit einer rekombinanten Protease. Andererseits hat das Dogma der PAR-Vermittlung thrombinischer Zelleffekte schon einmal früher publizierte Hypothesen zu alternativen Wirkmechanismen (Ligand-Wirkung von Thrombin-Domänen) aus dem Blickfeld verdrängt. Die vorliegenden Ergebnisse wurden in Kooperation mit Protein-Experten am MDC Berlin (insbesondere Dr. Klaus Gast) sowie Forschungspartnern an der University of Washington (insbesondere Prof. Thomas Möller, Seattle, USA) und der University of Kuopio (insbeson-

dere Prof. Jari Koistinaho, Kuopio, Finnland) erarbeitet, darüber hinaus jedoch u.a. mit zahlreichen Fachkollegen unterschiedlicher Expertise (so auch auf dem Gebiet von Proteasen/Koagulationsfaktoren) diskutiert. Die positiven Reaktionen hatten uns darin bestärkt, die Ergebnisse zum Thrombin bzw. zu den PARs erst nach Identifizierung zumindest einer der HMW-Komponenten zu veröffentlichen.

5 Offene Fragen

Neben den im Ergebnis-Teil schon aufgeführten gegenwärtig noch zu bearbeitenden Fragestellungen sollen innerhalb der Auslauffinanzierungsphase klärende Untersuchungen zu folgenden Aspekten durchgeführt bzw. teilweise abgeschlossen werden:

Werden die MOD-Effekte ebenfalls von den für IND-Effekte verantwortlichen Fraktionen getragen? Nach Zuweisung der Zyto/Chemokin-induzierenden Wirkungen (IND) von Thrombin-Präparationen zu IgM (und IgA) steht noch offen, ob die freisetzungsmulierenden (inhibierenden) Wirkungen (MOD) ebenfalls komplett von (a) den Immunglobulinen, (b) auch von anderen relevanten (im HMW-Material gefundenen) Proteinen oder (c) nur in einem Zusammenwirken dieser vermittelt werden.

Welche Gene bzw. Proteine werden tatsächlich durch (a) enzymatisch aktives bzw. (b) enzymatisch inaktives Thrombin in Mikroglia induziert oder modifiziert? Dazu liegen erste Daten aus einem Affymetrix-MicroArray-Ansatz bzw. einer Proteom-Analyse vor, die jedoch nun durch einen Panorama Antibody MicroArray ergänzt und bestätigt werden müssen.

Welches mikrogliale Wirkungsspektrum haben die z.B. in der neurochirurgischen Praxis verwendeten Thrombin-haltigen Präparate bzw. Materialien?

Längerfristig soll das im Teilprojekt bearbeitete Thema in einem breiter angelegten Themenkomplex ‚Protease-vermittelte Modulation glialer und neuronaler Zellen‘ eine Fortführung erfahren. Dabei sollen Effekte hochreiner bzw. rekombinanter Thrombin-Präparationen auch *in vivo* charakterisiert werden. Parallel dazu sollen die (mikro)glialen (und später auch neuronalen) Reaktionen auf die Serum-Faktoren betrachtet werden, die im Verlauf der Projektarbeit als weitere Kandidaten eines Trauma-Signals nominiert wurden.

6 Veröffentlichungen

Berücksichtigt wurden Publikationen seit der (letzten bzw. erstmaligen) Antragstellung des Teilprojektes. Es wird auch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass zur Aufdeckung des Mechanismus, wie in der Themenstellung angekündigt, nicht nur eindeutige Nachweise der Rolle bzw. Nichtbeteiligung des Thrombins und seiner PARs an der zentralen Mikroglia-Funktion der Zyto- und Chemokin-Freisetzung erbracht werden mussten, sondern sich die molekulare Identifizierung der tatsächlich verantwortlichen Faktoren erforderlich machte. Wir hatten daher die vorzeitige Publikation von Teilbefunden vermieden, um erst nach funktioneller Bestätigung erster Kandidaten (IgM) die Ergebnisse in einer Reihe von Arbeiten zu veröffentlichen. Im Abschlussbericht werden diese als zumindest eingereichte Publikationen gelistet.

Veröffentlichen mit Bezug zur Thrombin- bzw. Mikroglia-Thematik

van Rossum D, **Hanisch UK**, Microglia. *Metabol Brain Dis* (im Druck).

van Rossum D, **Hanisch UK**, Microglia and the cerebral defense system. In: *Brain damage and repair: From molecular research to clinical therapy* (Delgado-Garcia JM, Privat A, Herdegen T, eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (im Druck).

Balcaitis S, Xie Y, Weinstein JR, Andersen H, **Hanisch UK**, Ransom BR, Möller T (2003) Expression of proteinase-activated receptors in mouse microglial cells. *NeuroReport* **14**: 2373-2377.

Boucsein C, Zacharias R, Färber K, Pavlovic S, **Hanisch UK**, Kettenmann H (2003) Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation *in vitro*. *Eur J Neurosci* **17**: 2267-2276.

Hoffmann A, Kann O, Ohlemeyer C, **Hanisch UK***, Kettenmann H* (2003) Elevation of basal intracellular calcium concentration as a central event in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J Neurosci* **23**: 4410-4419. *gleichrangige Beiträge

B9 Hanisch

- Häusler KG, Prinz M, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002) Interferon- γ differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 16: 2113-2122.
- Hidding U, Mielke K, Waetzig V, Brecht S, Hanisch U, Behrens A, Wagner E, Herdegen T (2002) The c-Jun N-terminal kinases in cerebral microglia: immunological functions in the brain. *Biochem Pharmacol* 64: 781-788.
- Hanisch UK**, Kohsaka S, Möller T (2002) Editorial. *Special Issue Microglia* (Hanisch UK, Kohsaka S, Möller T, guest eds), *Glia* 40: 131-132.
- Hanisch UK** (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Special issue Microglia* (Hanisch UK, Kohsaka S, Möller T, guest eds), *Glia* 40: 140-155.
- Hanisch UK** (2002) Microglia as a source and target of cytokine activities in the brain. In: *Microglia in the degenerating and regenerating CNS* (Streit WJ, ed), Springer Verlag, New York, 79-124.
- Hanisch UK** (2001) Mikrogliale Aktivierung während bakterieller Konfrontationen: Beeinflussung durch Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibition. *Immunologie Aktuell (Modern Aspects of Immunobiology)* 2: 67-69.
- Hanisch UK**, Prinz M, Angstwurm K, Häusler KG, Kann O, Kettenmann H, Weber JR (2001) The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur J Immunol* 31: 2104-2115.
- Prinz M, Häusler KG, Kettenmann H, **Hanisch UK** (2001) β -adrenergic receptor stimulation selectively inhibits IL-12p40 release in microglia. *Brain Res* 899: 264-270.
- Mertsch K, **Hanisch UK**, Kettenmann H, Schnitzer J (2001) Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system. *J Comp Neurol* 431: 217-227.

Weitere Publikationen

- Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Brecht S, Lucius R, **Hanisch UK**, Herdegen T, c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate inflammatory activation of microglia (eingereicht).
- Angstwurm K, **Hanisch UK**, Bastholm-Bille M, Gassemi T, Dirnagl U, Kettenmann H, Weber JR, Tyrosine kinase inhibition reduces inflammation in the acute stage of experimental pneumococcal meningitis (eingereicht).
- Kann O, Hoffman A, Schumann RR, Weber JR, Kettenmann H, **Hanisch UK**, The tyrosine kinase inhibitor AG126 restores receptor signalling and blocks release functions in activated microglia (brain macrophages) by preventing a chronic rise in the intracellular calcium level (eingereicht).
- Häusler KG, Pavlovic S, Mertsch K, Kettenmann H, **Hanisch UK**, Cytokine and chemokine release regulation in mixed astro/microglial populations: cell type-specific contributions, reciprocal influences and coordinated control by interferon- γ (eingereicht).
- Prinz M, **Hanisch UK**, Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine, In: *Cytokines and the brain, Neuro-immune biology 7* (Korneva E, Phelps C, vol eds), Elsevier (eingereicht).
- Schroeter ML, Müller S, Lindena J, Wiesner B, **Hanisch UK**, Wolf G, Blasig IE (2001) Astrocytes induce manganese superoxide dismutase in brain capillary endothelial cells. *Neuroreport* 12: 2513-2517.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke C, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33: 72-86.
- Hanisch UK** (2001) Effects of interleukin-2 and interferons on the nervous system. In: *Psychoneuroimmunology*, 3rd edition (Ader R, Felten DL & Cohen N, eds), Academic Press, San Diego, 585-631.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/B11 2002-2004**Die Beteiligung von autoantigenspezifischen T-Zellen bei Protektion und Reorganisation des entorhinal-hippocampalen Systems**

Prof. Dr. med. Robert Nitsch

1. Kenntnisstand und Ausgangsfragestellung

Reorganisationsprozesse im ZNS nach traumatischer Schädigung verlaufen unter Beteiligung von Astrozyten und Mikrogliazellen ab, die degenerierendes Material phagozytieren und einwandernden T-Zellen Antigene präsentieren. Im Gefolge einer Schädigung des Tractus perforans, der als myelinisierter Fasertrakt den entorhinalen Cortex und den Hippocampus miteinander verbindet, kommt es dabei zu astrozytäre und mikrogliale Proliferation, Phagozytose, Antigenpräsentation sowie einer spezifische Expression von kostimulatorischen Molekülen, was insgesamt zu einer nicht destruktiven Interaktion mit einwandernden T-Zellen führt. Untersuchungen am Nervus opticus sowie im Rückenmark *in vivo* haben gezeigt, daß Makrophagen und T-Zellen auch protektive Funktionen bei neuronalem Primärschaden übernehmen. Unter Einsatz von in unserem Labor etablierten axonalen Auswachsassays sowie der organotypischen Schnittkultur haben wir nun die Mechanismen dieser protektiven Effekte von Gliazellen und T-Zellen im entorhinal-hippocampalen Modellsystem analysiert. Dabei haben wir untersucht, welche Mechanismen und Moleküle an der Reduktion des neuronalen Zellschadens durch T-Zellen beteiligt sind, ob tatsächlich autoantigenspezifischer T-Zellen bei Auswachsvorgängen eine Rolle spielen und inwieweit solche nicht-neuronal vermittelte Mechanismen bei axonalen Reorganisationsprozessen und der Neubildung von Synapsen sowie Protektion von Dendriten nach partieller Deafferenzierung relevant sind.

2. Angewandte Methoden

- Einsatz der entorhinal-hippocampalen Komplexschnittkultur (mit vormarakiertem Tractus perforans, anterograd bzw. retrograd)
- Durchführung unterschiedlicher Läsionen in der der entorhinal-hippocampalen Komplexschnittkultur
- Entorhinale Kortex-Läsion *in vivo*
- Charakterisierung verschiedener T-Zellen (ELISA + FACS)
- Einsatz verschiedener T-Zellen im Streifenassay (membrangebundene Faktoren) und im Kokulturasay (lösliche Faktoren)
- Untersuchung der T-Zell-Mikroglia-Interaktion im fixierten Slice (Expression von Oberflächenmolekülen) und im 2-Photonenmikroskop.
- Kombinatorischer Einsatz mit Mikrogliazellen und/oder Astrozyten
- Retrogrades Tracing zur Analyse der neuangewachsenen Fasern, Analyse im fixierten Slice licht- und elektronenmikroskopisch sowie im 2-Photonenmikroskop.
- Einsatz inhibitorischer Antikörper

3. Ergebnisse und ihre Bedeutung:

Gemäß Projektplan erfolgt die Darstellung entsprechend den zu erreichenden Zielen:

1 Ziel:

Aufklärung der Mechanismen und Moleküle, die an der Reduktion des neuronalen Zellschadens durch MBP-spezifische und Ovalbumin-spezifische T-Zellen beteiligt sind.

Experimentelle Fragestellungen:

- Ist die neuronale Protektion durch antigenspezifische T-Zellen abhängig von der Art der Schädigung (mechanisch vs. exzitotoxisch)?
- Spielt die T-Zell Spezifität (Th1 vs. Th2) eine Rolle?
- Sind der Zell-Zell-Kontakt und/oder lösliche Faktoren für die Protektion verantwortlich?
- Welche Wachstumsfaktoren sowie pro- und antiinflammatorische Zytokine spielen eine Rolle?
- Welche Rolle spielen Mikrogliazellen und die Antigenpräsentation?

Wir haben unter Einsatz der organotypischen Schnittkultur die Interaktionen zwischen MBP-spezifischen autoimmunen TH1- bzw. TH2-Zellen mit Mikrogliazellen untersucht (Gimsa et al, 2001; Wolf et al, 2001). Die Bindung des kostimulatorischen Moleküls B7 auf Mikrogliazellen an CD28/CTLA-4 auf T-Zellen gilt als elementar für den Beginn und den Verlauf der Multiplen Sklerose (MS) und deren Tiermodell der Experimentellen autoimmune Encephalomyelitis (EAE). Da es bisher unklar war, welchen Effekt einwandernde T-Zellen auf die Expression von B7-Molekülen auf Mikrogliazellen haben, studierten wir in der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur die mikrogliale B7-1- und B7-2-Expression unter dem Einfluss von zuvor aktivierten, Myelin basic protein (MBP)- oder Ovalbumin (OVA)-spezifischen TH1- und TH2-Zellen. Wir konnten zeigen, dass TH1-Zellen die konstitutive Expression von B7-2 herunterregulieren und B7-1-Expression induzieren im Gegensatz zu TH2-Zellen. Der Hauptunterschied zwischen OVA- und MBP-spezifischen T-Zellen wurde in Kokultur-Experimenten deutlich, in welchen TH1-Zellen direkten Kontakt zu antigen-präsentierenden Zellen aber nicht zu Hirngewebe hatten. Im Gegensatz zu MBP-spezifischen T-Zellen benötigten OVA-spezifische TH1-Zellen Antigenkontakt, um B7-1 hochzuregulieren und B7-2 runterzuregulieren. Wenn die Zellen hingegen Kontakt mit Hirngewebe hatten verschwand dieser Unterschied zwischen OVA- und MBP-spezifischen T-Zellen (Gimsa et al, 2001).

Diese Modulation der B7-Expression auf Mikrogliazellen deutet auf eine weitergehende Beeinflussung von Mikrogliazellen durch unterschiedliche TH-Subtypen hin. Dementsprechend untersuchten wir den Einfluss von TH1- und TH2-Zellen auf die mikroglialen inflammatorischen Markermoleküle CD40 und Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Wir konnten zeigen, dass beide TH-Subtypen die Expression von CD40 auf Mikroglia-Zellen induzieren. Im Gegensatz dazu sind aber nur TH1-Zellen in der Lage, ICAM-1 auf Mikrogliazellen hochzuregulieren. Interessanterweise sind TH2-Zellen aber in der Lage, diese ICAM-1-Hochregulation zu verhindern oder sogar rückgängig zu machen. D.h., TH2-Zellen sind in der Lage, TH1-induzierte inflammatorische Mikroglia-Reaktionen zu reduzieren und unterstützen damit den „Ruhezustand“ von Mikroglia (Gimsa et al, 2001). Dies könnte ein zentraler neuroprotektiver Mechanismus von TH2-Zellen sein, der die Remission neuroinflammatorischer Prozesse wie der EAE oder der MS einleitet. Dies ist von besonderer Bedeutung im Rahmen der sekundären Schädigung neuronaler Zellen durch Mikroglia, die nach Aktivierung zum Ort einer neuronalen Schädigung migrieren und u. a. grosse Mengen freier Radikale produzieren, welche wiederum für die sekundäre Schädigung neuronaler Zellen als auch Schädigung der Mikrogliazelle selbst verantwortlich sein könnte. Wir konnten zeigen, dass aktivierte Mikrogliazellen aktiv vor oxidativen Schaden geschützt werden (Ullrich et al, 2001a) und dass Mikroglia spezifisch kontrolliert wird durch die Expression des Integrins CD11a. Dieses Integrin CD11a wird wiederum reguliert durch das nukleäre Enzym Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) durch die Formation eines nukleären PARP-NF-kappaB-Proteinkomplexes. Herunterregulation von PARP oder CD11a durch Transfektion mit Antisense-DNA führte zu einer fast vollständigen Unterbindung der Mikroglia-Migration und schützte wiederum die Neurone vor sekundärer Schädigung (Ullrich et al, 2001b).

Auf diesen Ergebnissen aufbauend untersuchten wir, ob auch T-Zell-induzierte Neuroprotektion vom TH-Subtyp abhängig ist. In der entorhinalen-hippocampalen Schnittkultur untersuchten wir den neuronalen Schaden in der Gegenwart von OVA- oder MBP-spezifischen TH1- bzw. TH2-Zellen (Wolf et al, 2002). MBP-spezifische TH2-Zellen zeigten den stärksten neuroprotektiven Effekt in diesem Kultursystem und induzierten am deutlichsten das neuronale Überleben und eine Unterdrückung der sekundären Degeneration. Dies deutet darauf hin, dass der TH2-induzierte neuroprotektive Effekt durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Dies ist der erste formale Beweis, dass TH2-Zellen neuroprotektiv wirken (Wolf et al, 2002).

2 Ziel:

Analyse der Beteiligung autoantigenspezifischer T-Zellen bei Auswachs Vorgängen.

Experimentelle Fragestellungen:

- Stimulieren verschiedene T-Zellen (antigenspezifisch, TH1/Th2) das Auswachsen von Neuriten aus entorhinalen Explantatkulturen unterschiedlich?
- Sind membrangebundene Faktoren und/oder lösliche Faktoren daran beteiligt?
- Ist die Interaktion von Mikrogliazellen und T-Zellen sowie die spezifische Antigenpräsentation von Bedeutung?
- Sind Astrozyten, Mikrogliazellen oder T-Zellen Produzenten von Wachstumsfaktoren?
- Welche Moleküle werden membrangebunden angeboten bzw. welche freigesetzt?

Wir haben bei diesen Untersuchungen ein klassisches neurobiologisches Kokulturmodell modifiziert, welches ursprünglich dazu verwendet wurde, um die repulsiven oder attraktiven Eigenschaften eines Faktors zu untersuchen, der von transfizierten Zellen im Überschuss sezerniert wird (Steup et al, 1999; 2000). Dazu wurde ein Kokulturverfahren entwickelt, welches uns erlaubt, polarisierte autoimmune TH-Zellen in einen Kollagentropfen einzubetten und diesen mit entorhinalen Kortexexplantaten zu kokultivieren. Die dem TH-Zell-Tropfen anliegenden Explantate werden nun mit einem weiteren Kollagen-Tropfen überdeckt, sodass die auswachsenden Axone in eine dreidimensionale Kollagen-Gel-Matrix einwachsen und in Bezug auf die Länge und die axonale Dichte quantitativ ausgewertet werden können.

Die Auswertung von Kollagen-Kokulturen ergab sowohl für MBP-spezifische T-Zellen mit einem B10.PL-Hintergrund als auch für OVA-spezifische T-Zellen mit einem Balb/C-Hintergrund eine statistisch signifikante Inhibition (um ca. 50%) des axonalen Auswachsens entorhinaler Kortexexplantate in der Gegenwart von TH1-Zellen, während TH2-Zellen die axonale Dichte der Explantate signifikant stimulierte.

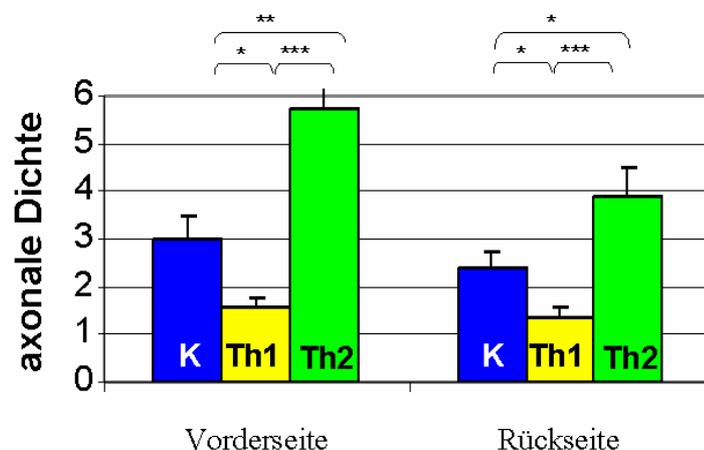
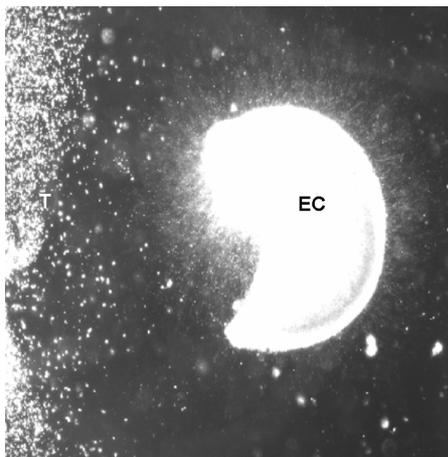


Abb. 1A: Kokultur eines entorhinalen Kortex-Explantats (EC) mit T-Helferzellen in einem Kollagentropfen.

Abb. 1B: Quantitative Auswertung der axonalen Dichte kultivierter EC-Explantate unter dem Einfluss von T-Helferzellen Typ 1 (Th1) oder Typ 2 (Th2) im Vergleich zu Kontroll-Explantaten (K).

B11 Nitsch

D.h., es handelt sich um einen Effekt, der sowohl mit autoimmunen MBP-spezifischen TH-Zellen als auch mit nicht-autoimmunen OVA-spezifischen TH-Zellen und in den Mauslinien B10.PL und Balb/C beobachtet wird. Der Effekt scheint also weder vom Antigen noch vom Mausstamm-Hintergrund abzuhängen. Diese Daten werden untermauert, durch die Untersuchung des direkten Einflusses von TH1-Zellen auf neuronalen Zelltod mit Hilfe der 2-Photonen-Mikroskopie (Nitsch et al, submitted). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten wir zeigen, dass auch der direkte, T-Zell-vermittelte neuronale Zelltod antigen-*unabhängig* induziert wird, da OVA- und MBP-spezifische die gleichen Effekte zeigen (Nitsch et al, submitted).

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse lag es nahe, die verwendeten autoimmunen, MBP-spezifischen TH-Zellen auf die Sekretion der TH-Markerzytokine und auf die klassischen neurotrophen Faktoren aus der Neurotrophin-Familie zu untersuchen. Folgende Neurotrophine wurden auf der mRNA- und Protein-Ebene untersucht: Nerve Growth Factor (NGF), Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4 (NT-4) und Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). In der Tat konnten wir nachweisen, dass TH2-Zellen im Gegensatz zu TH1-Zellen nicht nur die klassischen Markerzytokine IL-4 und IL-10 wie erwartet deutlich vermehrt produzieren sondern auch viel höhere Level der Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4. BDNF konnten wir weder auf der mRNA- noch auf der Protein-Ebene nachweisen. ELISA-Analysen T-Zell-freier Explantate zeigten große Mengen aller vier Neurotrophine im Überstand. Um nun zu überprüfen, ob die vermehrte Neurotrophin-Sekretion der TH2-Zellen kausal für deren Stimulation des axonalen Wachstums in der Kollagen-Kokultur verantwortlich ist, haben wir Inhibierungsexperimente mit funktionsblockierenden Antikörpern durchgeführt im Vergleich zu nicht-spezifischen Antikörpern. Die Blockierungsexperimente ergaben, dass die TH2-Stimulation des axonalen Auswachsens bereits durch die Blockierung eines einzelnen Neurotrophins (NGF, NT-3 oder NT-4) vollständig eliminiert werden kann. Eine Koinhibierung aller drei Neurotrophine (d.h. also gleichzeitige Blockierung von NGF, NT-3 und NT-4) eliminierte auch die TH2-Stimulation des axonalen Auswachsens und zeigte einen leicht synergistischen Blockierungseffekt im Vergleich mit der Einzelblockierung. Um zu überprüfen, ob die sezernierten T-Zell-Neurotrophine auch an ihre adäquaten Neurotrophin-Rezeptoren im entorhinalen Kortex binden können und so die axonale Stimulation vermitteln können, wurden Cryo-Schnitte von entorhinalen Explantaten angefertigt und mit spezifischen Antikörpern gegen die Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und p75 immunhistologisch untersucht. Die Doppelfärbung mit Anti-Neurofilament-Antikörpern (als Marker für neuronale Zellen) und mit Anti-GFAP-Antikörpern (als Marker für Astrozyten) ergab, dass die überwältigende Mehrheit der Neurotrophin-Rezeptor-positiven Zellen auch Neurofilament-positiv waren, während sich in der Doppelfärbung mit GFAP nur vereinzelt eindeutig doppelt gefärbte Zellen finden liessen. D.h., die Majorität der neuronalen Zellen des entorhinalen Kortex besitzen Rezeptoren für die T-Zell-Neurotrophine NGF, NT-3 und NT-4. Dies ist der erste formale Beweis, dass TH-Zellen einen direkten und aktiven Einfluss auf axonales Auswachsen haben können (Müller-Röver et al., 2003). Interessanterweise sind Astrozyten nicht nur in der Lage, die antigenabhängige T-Zell-Aktivierung durch Induktion des inhibitorischen Proteins CTLA-4 zu reduzieren (Gimsa et al, 2004), umgekehrt wird auch die astrozytäre NGF-Produktion in der Kokultur durch TH2-Zellen stimuliert (Øren et al, 2004). Dies könnte ein indirekter Mechanismus sein, über den TH-Zellen axonales Auswachsen kontrollieren.

In Erweiterung unseres beantragten Projektes charakterisierten wir zur Untersuchung der T-Helferzell-Effekte auf axonales Auswachsen und neuronale Regeneration im *peripheren* Nervensystem die Entwicklung des kutanen Nervensystems der C57BL/6-Maus (Peters et al, 2002). Zur Entwicklung eines reliablen Läsionsmodells für Hautnerven charakterisierten wir ferner das präzise Timing des physiologischen Umbaus neonataler und adoleszenter Maushaut (Müller-Röver et al, 2001; Magerl et al, 2001), da die kutane neuronale Plastizität untrennbar mit der Morphogenese und dem Umbau der Maushaarfollikel assoziiert ist (Peters et al, 2002). Auf der Grundlage dieser Arbeiten sind wir nun in der Lage, die physiologischen Umbauprozesse der Haut und der damit verbundenen neuronalen Plastizität im Rahmen einer peripheren Läsion als reliables Läsionsmodell zu etablieren und die Re-Innervation denervierter Hautareale unter dem Einfluss lokaler TH1- bzw. TH2-Zellen zu untersuchen.

3. Ziel:

Analyse der Beteiligung autoantigenspezifischer T-Zellen bei axonalen Reorganisationsprozessen.

Experimentelle Fragestellungen:

- Führt die Invasion von autoantigenspezifische T-Zellen zu einer Protektion von entorhinalen Ursprungsneuronen nach Durchschneidung ihrer Axone in der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur?
- Kann diese Invasion Neuauswachsen von Axonen und Reinnervation induzieren?
- Sind dabei Astrozyten, Mikrogliazellen oder T-Zellen Produzenten von Wachstumsfaktoren?

Zur Analyse der Beteiligung autoantigenspezifischer T-Zellen bei axonalen Reorganisationsprozessen untersuchten wir *in vivo* im Modell der entorhinalen Kortex-Läsion (ECL), welche Faktoren einer protektiven oder zumindest nicht-destruktiven Autoimmunität zugrunde liegen (Bechmann + Nitsch, 2001; Kwidzinski et al, 2001). In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die unterschiedlichen Immunantworten gegen Myelin im Rahmen der EAE/MS im Vergleich zu mechanischer Läsion des ZNS (z.B. in der ECL) nicht auf einen Mangel an infiltrierenden T-zellen oder einen Mangel an MHC-Klasse-II-Molekülen zurückzuführen ist. Der entscheidende Unterschied zwischen neuroinflammatorischen Erkrankungen und mechanischer Läsion besteht offensichtlich darin, dass Myelin nicht über MHC-II/B7-1, sondern über MHC-II/B7-2 präsentiert wird. Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, dass B7-1 mit destruktiver Autoimmunität assoziiert ist, während B7-2 eher protektive bzw. weniger schädliche Autoimmunität induziert. Daher ist unser Ergebnis, dass Myelin-phagozytierende Mikrogliazellen einen MHC-II+/B7-2+/B7-1- Phänotyp zeigen, ein interessanter Hinweis darauf, weshalb axonale Degeneration nicht zwangsläufig zu destruktiver Autoimmunität führt, obwohl Myelin-Epitope präsentiert werden. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass wir noch lange nach der Läsion T-Zellen nachweisen konnten, die aber keine Mikroglia-Aktivierung induzierten. Auf der anderen Seite zeigte die Mikroglia eine ramifizierte Morphologie und exprimierte MHC-II und B7-2 in der Gegenwart CD-4+ T-Zellen (Bechmann et al, 2001). Dies deutet darauf hin, dass auf diesem Wege über B7-2 eine Aktivierung der Mikroglia verhindert wird.

Ein neuronaler Primärschaden induziert die Aktivierung von Mikroglia u. a. durch Interleukin-1 β - Hochregulation. Wird die Mikroglia-Aktivierung z. B. durch den immunomodulatorisch wirkenden Transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) abgemildert, so führt dies zu einem vermehrten axonalen Auswachsen im entorhinalen Kortex (Eyüpoglu et al, 2002).

Um die Prozesse des axonalen Auswachsens und der Re-Innervation nach Läsion im Detail studieren zu können, haben wir begonnen, komplexe Kombinations-Kokulturen zu entwickeln, in welchen der entorhinale Kortex verschiedener GFP-positiver transgener Mäuse mit Wildtyp-Hippocampi kombiniert wird. Dazu begannen wir die Zucht von drei verschiedenen transgenen Mauslinien, die GFP unter unterschiedlichen Promotoren und somit mit unterschiedlichem Expressionsmuster. Die erste Mauslinie (β -Actin-GFP) exprimiert GFP unter dem beta-Aktin-Promoter, sodaß jede kernhaltige Zelle einschließlich neuronaler und glialer Zellen grün fluoreszieren. In Kombinations-Kokulturen zeigen dementsprechend alle einwachsenden Axone und alle einwandernden Mikroglia-Zellen ein zytoplasmatisches Fluoreszenz-muster (siehe Abb.):

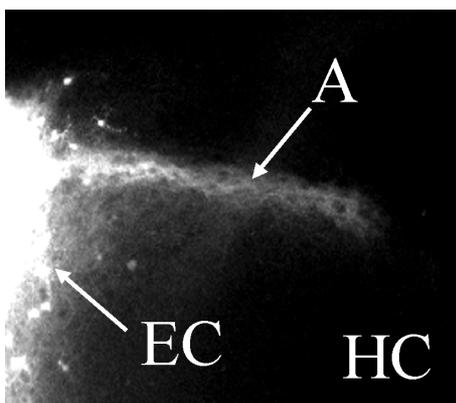


Abb. 2:

Kombinations-Kokultur eines β -Aktin-GFP-positiven entorhinalen Kortex (EC) – Explantats mit einem Wildtyp-Hippocampus (HC). Die einwachsenden Axone (A) sind im nicht fluoreszierenden HC deutlich an ihrer grünen Fluoreszenz zu erkennen.

Die zweite Mauslinie exprimiert GFP unter dem TAU-Promoter (TAU-GFP; in Kollaboration mit Dr. Kerry Tucker, FMI, Basel, Schweiz), sodass nur postmitotische Axone ein zytoplasmatisches GFP-Expressionsmuster zeigen. Die dritte Mauslinie exprimiert GFP unter dem Thy-1-Promoter (Thy-1-GFP; in Kollaboration mit Prof. Pico Caroni, FMI, Basel, Schweiz). Dies führt zu einer membranständigen GFP-Expression auf vereinzelt Axonen. Die β -Actin-GFP-Linie dient als Modell für Masseneinwachsen von Axonen unter der Einfluss kokultivierter TH1- oder TH2-Zellen. Mit Hilfe der TAU-GFP-Mäuse kann das präzise Einwachsen zum Zielort (Pathfinding) analysiert werden. Die einzelnen Thy-1-GFP+ Axone schliesslich dienen der Untersuchung, ob es unter dem Einfluss von TH1- oder TH2-Zellen zu unterschiedlicher Synapsenbildung kommt.

4. Ziel:

Bestimmung der Rolle autoantigenspezifischer T-Zellen bei der Protektion von Dendriten nach partieller Deafferenzierung.

Experimentelle Fragestellungen:

- Führt die Invasion von autoantigenspezifischen T-Zellen zu einer Protektion der dendritischen Arborisation hippocampaler Zielneurone nach Durchschneidung ihrer Afferenzen in der entorhinal-hippocampalen Schnittkultur?
- Kommt es zur Ausbildung neuer synaptischer Kontakte?

Aufbauend auf den oben beschriebenen Ergebnissen, war es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob eine funktionelle Blockierung der Mikrogliazellen tatsächlich zu einer Verminderung des sekundären neuronalen Schadens führt (Eyüpoglu et al, 2002).

Wir konnten zeigen, dass es in CXCR3-defizienten Mäusen zu einer verminderten Rekrutierung von T-Zellen durch mikrogliale Zellen kommt. Dies wiederum führt zu einem deutlichen Schutz der Dendriten und einer Verminderung des dendritischen Sekundärschadens.

Primäre neuronale Zerstörung im ZNS löst zügige Veränderungen in der Morphologie und Funktion glialer Zellen aus, in deren Anschluss die aktivierten Mikrogliazellen eine wichtige Rolle in der sekundären Degeneration neuronaler Zellen spielen (Ullrich et al, 2001b; Eyüpoglu et al, 2002). Wir konnten zeigen, dass nach einer entorhinalen Kortex-Läsion die Aktivierung von Mikrogliazellen – aber nicht die Aktivierung anderer Gliazellen – zu massiven sekundären Veränderungen von Dendriten der deafferenzierten hippocampalen Neurone führt (Eyüpoglu et al, 2002). Wir verwendeten TGF β 1 zur Inhibierung der Mikroglia-Aktivierung, LLME zur Eliminierung von Mikroglia und AG126 zur Inhibierung glialer Proliferation. Diese funktionelle Blockierung von Mikrogliazellen reduzierte diesen sekundären neuronalen Schaden deutlich. Im Gegensatz dazu führte die Blockierung von Astrozyten oder Oligodendglia nicht zu substantiellen neuronalen Veränderungen (Eyüpoglu et al, 2002).

Die hier präsentierten Daten passen zu dem Konzept, dass Mikroglia-Aktivierung einen schädigenden Einfluss auf Dendriten nach Deafferenzierung hat, da die drei blockierenden Komponenten einen direkten Effekt auf Mikroglia hatten und die Dendriten effektiv vor sekundärer Degeneration schützten. Alle drei Komponenten hatten keinerlei Effekt in der neuronalen Einzelzellkultur, sodass ein nicht-mikroglial-vermittelter, direkter Effekt unwahrscheinlich ist.

Der Primärschaden induziert die Hochregulation von Interleukin-1 β , die durch TGF β 1 abgemildert wird, (Eyüpoglu et al, 2002). Daraus folgt, dass die therapeutische Beeinflussung der mikroglialen Aktivität nach Denervierung des Hippocampus Dendriten vor sekundärer Degeneration schützen und Reinnervation induzieren kann.

Eigene Veröffentlichungen der Antragsteller (2001-2003)

a) direkt assoziierte Veröffentlichungen

1. Kwidzinski E, Mutlu LK, Kovac AD, Bunse J, Goldmann J, Mahlo J, Aktas O, Zipp F, Kamradt T, Nitsch R, Bechmann I (2003) Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. **J Neural Transm** 65:29-49
2. Bechmann I, Steiner B, Gimsa U, Mor G, Wolf S, Beyer M, Nitsch R, Zipp F (2002) Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. **J Neuroimmunol** Nov; 132(1-2): 60-5.
3. Eyüpoglu I, Bechmann I, Nitsch R (2002) Modification of microglia function protects from lesion-induced neuronal alterations and promotes sprouting in the hippocampus. **FASEB J** 10.1096/fj.02-0825fje
4. Peters EMJ, Botchkarev VA, Müller-Röver S, Moll I, Rice FL, Paus R (2002) Development of back skin and hair follicle innervation: a comprehensive study of several neuronal related structural proteins, enzymes, and peptides during murine hair follicle morphogenesis. **J Comp Neurol** 448:28-52
5. Wolf SA, Fisher J, Bechmann I, Steiner B, Kwidzinski E, Nitsch R (2002) Neuroprotection by T cells depends on their subtype and activation state. **J Neuroimmunol** 133:72-80
6. Bechmann I and Nitsch R. (2001) Plasticity following lesion: Harm and help from the immune system. **Restorative Neurology** 19:189- 198
7. Bechmann I, Peter SA, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R (2001) Presence of B 7-2 (CD 86) and lack of B 7-1 (CD 80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo. **FASEB J** 15: 1086-1088
8. Gimsa U, Peter SA, Haas D, Bechmann I and Nitsch R (2001) Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain. **J Neuroimmunol** 119: 73-80
9. Magerl M, Tobin DJ, Müller-Röver S, Lindner G, Hagen E and Paus R (2001) Patterns of proliferation and apoptosis during murine hair follicle morphogenesis. **J Invest Dermatol** 116:947-55
10. Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R (2001) A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. **J Invest Dermatol** 117:3-15
11. Ullrich O, Bechmann I, Diestel A, Homberg M, Grune T, Hass R, Nitsch R (2001) Turnover of oxidatively-damaged proteins in BV-2 microglia cells is linked to its activation state by poly-ADP-ribose polymerase. **FASEB J** 15: 1460-1462
12. Ullrich O, Diestel A, Eyüpoglu I, and Nitsch R (2001) Regulation of microglial integrin-expression by PARP-1. **Nat Cell Biol** 3: 1035-1042
13. Wolf S A, Gimsa U, Bechmann I and Nitsch R (2001) Differential expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. **Glia** 36: 414-420
14. Gimsa U, Øren A, Pandiyan P, Teichmann DB, I, Nitsch R, and Brunner-Weinzierl M (2004) Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). **J Mol Med**, in press
15. Øren A, Falk K, Röttschke O, Bechman I, Nitsch R, and Gimsa U (2004) Production of Neuroprotective NGF in Astrocyte – T Helper Cell Co-Cultures is Upregulated Following Antigen Recognition. **J Neuroimmunol**, in press
16. Nitsch R, Pohl E, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F. Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue, **J Neuroscience**, in press
17. Müller-Röver S, Sallach S, Brandt C, Lüdecke D, Kwidzinski E, Schwanzar D, Heimrich B, Nitsch R. T helper cell type 2 stimulate axonal outgrowth, submitted

b) Veröffentlichungen in Kooperationen innerhalb des SFB

18. Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, Dörr J, Seeger B, Prozorovski T, Sallach S, Endres M, Brocke S, Nitsch R, Zipp F (2003) Treatment of Relapsing Paralysis in Experimental Encephalomyelitis by Targeting Th1 Cells through Atorvastatin. **J Exp Med** 197: 725-733

B11 Nitsch

19. Wehner T, Böntert M, Eyüpoglu I, Prass K, Prinz M, Klett F, Heinze M, Bechmann I, Nitsch R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Dirnagl U, Priller J (2003) Bone Marrow-Derived Cells Expressing Green Fluorescent Protein under the Control of the Glial Fibrillary Acidic Protein Promoter Do Not Differentiate into Astrocytes *In Vitro* and *In Vivo*. **J Neurosci** 23(12):5004-5011
 20. Diestel A, Aktas O, Hackel D, Häke I, Meier S, Raine CS, Nitsch R*, Zipp F*, Ullrich O* (2003) Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. **J Exp Med**, in press *equal contribution as senior author
 21. Dörr J, Bechmann I, Wendling U, Grieger U, Walczak H, Krammer PH, Nitsch R*, Zipp F* (2002) Lack of TRAIL but presence of its receptors in the human brain. **J Neurosci** 22:RC209 (1-5) *equal contribution as senior author
 22. Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simbürger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R (2001) Turnover of rat brain perivascular cells. **Exp Neurol** 168: 242-249
 23. Bechmann I, Priller J, Böntert M, Wehner T, Fernandez Klett F, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R (2001) Immune surveillance of brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. **Eur J Neurosci** 14: 1651-1658
- c) sonstige Veröffentlichungen
24. Bräuer AU, Savaskan NE, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R (2003) Cholecystokinin expression after hippocampal deafferentiation: molecular evidence revealed by differential display-reverse transcription-polymerase chain reaction. **Neuroscience** 121:111-121
 25. Bräuer AU, Savaskan N, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R (2003) Identification of a novel lipid phosphate phosphatase PRG-1 (plasticity related gene-1) involved in axonal outgrowth and regenerative sprouting. **Nat Neurosci** 10.1038/Nn1052
 26. Dohmen P, Ozaki S, Nitsch R, Yperman J, Flameng W, Konertz W (2003) A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model. **Med Sci Monit** 9(4): BR97-104
 27. Eyüpoglu I, Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R, Heimrich B (2003) Identification of neuronal cell death in a model of degeneration in the hippocampus. **Brain Res Protoc** 11: 1-8
 28. Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. **J Neurochem** 85: 115-122
 29. Ma L, Liu J, Wu T, Plikus M, Jiang TX, Bi O, Liu YH, Müller-Röver S, Peters H, Sundberg J, Maxson R, Maas RL, Chuong CM (2003) Cycling alopecia in MSX2 mutants: Defects in hair cycling and hair shaft differentiation. **Development** 130:379-389
 30. Meier S, Bräuer AU, Heimrich B, Schwab ME, Nitsch R, Savaskan NE (2003) Molecular analysis of Nogo gene expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. **FASEB J**. 10.1096/fj.02-0453fje
 31. Müller FB, Müller-Röver S, Korge BP, Kapas S, Philpott MP (2003) Adrenomedullin: expression and possible role in human skin and hair growth. **Br J Dermatol** 148:30-38,
 32. Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R (2003) Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the PRG family. **Eur J Neurosci**, in press
 33. Bechmann I, Diano S, Warden C H, Bartfai T, Nitsch R, Horvath T L (2002) Brain Mitochondrial Uncoupling Protein 2 (UCP2): Protective stress signal in neuronal injury. **Biochem Pharmacol** 64: 363-7
 34. Bull JJ, Müller-Röver S, Chronnell CMT, Paus R, Philpott MP, McKay IA (2002) Contrasting Expression Patterns of CCAAT/Enhancer-Binding Protein Transcription Factors in the Hair Follicle and at Different Stages of the Hair Growth Cycle. **J Invest Dermatol** 118: 17 – 24
 35. Coy JF, Wiemann S, Bechmann I, Bächner D, Nitsch R, Kretz O, Christiansen H, Poustka A (2002) Pore membrane and/or filament interacting like protein 1 (POMFIL1) is predominantly expressed in the nervous system and encodes different protein isoforms. **GENE** 290: 73-94
 36. Kovac AD, Grammig J, Mahlo J, Steiner B, Roth K, Nitsch R, Bechmann I (2002) Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (GLD), CD95-Deficient (LPR) and non-deficient mice. **Euro J Neurosci** 16: 159-163

37. Ohm TG, Münch S, Schönheit B, Zarski R, Nitsch R (2002) Transneuronally altered dendritic processing of tangle-free neurons in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol** 103: 437-443
38. Savaskan N E, Bräuer A U, Kühbacher M, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, Behne D, Nitsch R (2002) Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate induced excitotoxicity. **FASEB J** 17: 112-114
39. Savaskan N E, Alvarez-Bolado G, Glumm R, Nitsch R, Skutella T, Heimrich B (2002) Impaired postnatal development of hippocampal neurons and axon projections in the Emx2^{-/-} mutants. **J Neurochem** 83: 1196-1207
40. Stahnisch F W, Nitsch R (2002) Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. **Trends Neurosci** 25 (11): 589
41. Bräuer AU, Savaskan NE, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R (2001) Perforant path lesion induces upregulation of stathmin messenger RNA, but not SCG10 messenger RNA, in the adult rat hippocampus. **Neuroscience** 102: 515-526
42. Bräuer A, Savaskan NE, Kole MHP, Plaschke M, Monteggia LM, Nestler EJ, Simbürger E, Deisz RA, Ninnemann O, Nitsch R (2001) Molecular and functional analysis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion. **FASEB J** 15: 2689-2701
43. Bull JJ, Müller-Röver S, Patel SV, Chronnell CMT, McKay IA, Philpott MP (2001) Contrasting Localization of c-Myc with other Myc Superfamily Transcription Factors in the Human Follicle and during the Hair Growth Cycle. **J Invest Dermatol** 116:617-622
44. Chronnell CM, Ghali L, Quinn AG, Ali R, Bull JJ, McKay IA, Philpott MP, Müller-Röver S (2001) Human beta defensin-1 and -2 expression in human hair follicles and upregulation in acne vulgaris lesions. **J Invest Dermatol**, 117:1120-1125
45. Savaskan NE and Nitsch R (2001) Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus after perforant path lesion. **Rev Neurosci** 12: 195-215
46. Simbürger E, Plaschke M, Fritschy JM, Nitsch R. (2001) Localization of two major GABA_A receptor subunits in the dentate gyrus of the rat and cell type specific upregulation following entorhinal cortex lesion. **Neuroscience** 102: 789-803
47. Skutella T and Nitsch R. (2001) New molecules for hippocampal development. **Trends Neurosci** 24: 107-113

4 **Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten,**

Das Konzept einer regenerativen Kapazität von T-Zellen bei neurotraumatischen Prozessen wird zunehmend diskutiert. Hierbei sind es nicht nur experimentelle Arbeiten, die zeigen, dass eine Immunantwort im ZNS ein neuroprotektives und möglicherweise auch regeneratives Potential hat (Hauben et al., 2003, Stoll et al., 2002; Schwartz and Kipnis, 2002). Auch klinische Konzepte nehmen zunehmend Bezug auf ein solches Potential (Waubant, 2003). Andererseits wird aber auch deutlich, dass die Einbindung des Immunsystems bei der Schädigung des ZNS nur protektiven bzw. regenerativen Charakter hat (Jones et al., 2002). Vollkommen unklar bleibt bis heute, inwieweit tatsächlich eine Immunantwort auf eine Schädigung im ZNS auch strukturelle Reparaturvorgänge im Sinne des axonalen Sproutings und der Etablierung neuer synaptischer Kontakt induzieren kann.

- Hauben E, Gothilf A, Cohen A, Butovsky O, Nevo U, Smirnov I, Yoles E, Akselrod S, Schwartz M. (2003) Vaccination with dendritic cells pulsed with peptides of myelin basic protein promotes functional recovery from spinal cord injury. *Neurosci.* 24;23(25):8808-19.
- Jones TB, Basso DM, Sodhi A, Pan JZ, Hart RP, MacCallum RC, Lee S, Whitacre CC, Popovich PG. (2002) Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J Neurosci.* 22(7):2690-700.
- Schwartz M, Kipnis J. (2002) Multiple sclerosis as a by-product of the failure to sustain protective autoimmunity: a paradigm shift. *Neuroscientist.* 8(5):405-13.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. (2002) Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 513:87-113

B11 Nitsch

Waubant E. (2003) Emerging disease modifying therapies for multiple sclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 8(1):145-61.

Die im Rahmen des SFB 507 veröffentlichten Arbeiten (seit 2001, siehe oben) weisen zwischenzeitlich 120 Zitationen im Science Citation Index auf.

Robert Nitsch ist im Jahr 2003 zur Gordon Conference on Glial Biology (zum Thema des SFB-Projektes) eingeladen worden.

5 Offene Fragen

Es ist im Moment völlig ungeklärt, über welche Mechanismen das regenerative und inhibierende Potential unterschiedlicher T-Zellpopulationen vermittelt wird. Es muß verstanden werden, ob TH2-Zell-Neurotrophine kausal für neuroregenerative Effekte von T-Zellen verantwortlich sind und/oder ob diese Effekte durch eine Beeinflussung der astrozytären Neurotrophin-Sekretion hervorgerufen werden, um das regenerative Potential von T-Zell/Glia-Interaktionen bei neuronaler Schädigung therapeutisch nutzbar zu machen.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/B12 2002-2004

Die Rolle von oligodendroglialen Chemokinrezeptoren bei der Myelinisierung und Demyelinisierung - funktionelle in vitro-in vivo Korrelationen

Brück/Stangel

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

Die Demyelinisierung im zentralen Nervensystem (ZNS) ist ein wesentliches Merkmal der Läsionen bei der Multiplen Sklerose (MS). Die Remyelinisierung, d.h. die Neubildung von Markscheiden in MS-Plaques, ist insbesondere in frühen Krankheitsstadien häufig zu finden [1]. Allerdings ist diese meist unvollständig und es ist unklar, welche Faktoren dafür verantwortlich sind. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren kann die Proliferation, Migration und Differenzierung von OPC *in vitro* und *in vivo* beeinflussen [2;3]. Die Myelinisierung und Remyelinisierung erfordert ein exaktes, zeitlich genau determiniertes Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren, die in charakteristischer Weise unterschiedliche Stadien der Oligodendrozytenentwicklung beeinflussen. Diese zeitliche Sequenz ist notwendig, um die ungestörte Entwicklung von der Vorläuferzelle zum reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten zu gewährleisten. Allerdings sind die exakten Abläufe und alle nötigen Faktoren für eine erfolgreiche Remyelinisierung, insbesondere auch unter pathologischen Bedingungen, noch nicht definiert [3].

In den letzten 10 Jahren wurde eine Gruppe von kleinen Proteinen (8-10 kD), den sogenannten Chemokinen, charakterisiert, die strukturell und funktionell verwandt sind und die Rekrutierung von Entzündungszellen bei Immunreaktionen bewirken. Mittlerweile sind mehr als 50 Chemokine beschrieben. Sie werden entsprechend dem Abstand von Cysteinen im N-Terminus des Moleküls in 4 Gruppen unterteilt: Die CXC- oder α -Chemokine, CC- oder β -Chemokine, C- oder γ -Chemokine und ein CX₃C- oder δ -Chemokin. Entsprechend sind eine Reihe von Chemokin-Rezeptoren bekannt, wobei eine große Redundanz in der Bindungsfähigkeit herrscht [4]. Eine Reihe verschiedener Chemokine kann an einen Rezeptor binden und umgekehrt ein Chemokin der Ligand für mehrere Rezeptoren sein. Ebenso wie bei immunologischen Abwehrreaktionen, scheinen Chemokine auch bei der MS eine Rolle zu spielen, wo sie in Läsionen nachgewiesen wurden [5].

Zur Chemokinrezeptorexpression von Oligodendrozyten sind bisher noch keine systematischen Untersuchungen durchgeführt worden. Indirekte Evidenz für eine Bedeutung dieser Rezeptoren wurde in Experimenten gezeigt, bei denen die Wirkung des Chemokins growth related oncogene-alpha (GRO- α , CXCL1) untersucht wurde. Dabei kam es zusammen mit PDGF zu einer Steigerung der Proliferation von OPC, wobei Astrozyten der zelluläre Ursprung des GRO- α zu sein scheinen [6;7]. Der Chemokinrezeptor CXCR2 ist der Ligand für dieses Chemokin und scheint damit eine besondere Bedeutung für die Proliferation von OPC zu haben. Da CXCL1 auch bei der EAE exprimiert wird [8], ist eine Interaktion zwischen Immunreaktion und OPC über Chemokine wahrscheinlich. Eine der wesentlichen Aufgaben von Chemokinen ist die Rekrutierung von Zellen, somit könnten sie auch Einfluß auf die Migration und Proliferation von OPC haben und eine Remyelinisierung fördern. Eigene Arbeiten konnten zeigen, daß OPC neben dem CXCL1 Rezeptor CXCR2 auch weitere Chemokinrezeptoren exprimieren, die auch funktionell sind. Kürzlich wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass Chemokine auch *in vivo* bei der physiologischen Myelinisierung eine Rolle spielen [9]. In CXCR2 defizienten Mäusen ist das Muster der OPC Migration während der embryonalen Myelinisierung verändert. Der Ligand CXCL1 vermittelt dabei ein Stop-Signal. Somit wurde demonstriert, dass Chemokine neben ihren anderen Funktionen auch das Verhalten von OPC modulieren können. Unklar bleibt aber die Rolle bei der Remyelinisierung und in einem entzündlichen Umfeld. Zur Rolle der Chemokinrezeptoren in experimentellen Modellen der De- und Remyelinisierung sowie zur Expression der Rezeptoren in humanen MS-Läsionen lagen zum Zeitpunkt der Antragstellung keine Daten vor.

2 Angewandte Methoden

Im in vitro-Teil der Experimente werden Zellkulturen primärer Oligodendrozyten angewandt. Mittels Ca²⁺-Imaging werden funktionelle Experimente durchgeführt. Die Zellproliferation wird mittels BrdU-Inkorporation und die Migration im Boydenchamber-Assay quantifiziert. An Tiermodellen werden die experimentell autoimmune Enzephalomyelitis sowie das Cuprizone-Modell der De- und Remyelinisierung angewandt. Das MS-Gewebe wird immunhistochemisch sowohl konventionell als auch konfokal auf Expression der Chemokinrezeptoren charakterisiert.

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

3.1 Expression von Chemokinrezeptoren auf Oligodendrozytenvorläuferzellen:

Die Expression von Chemokinrezeptoren wurde zunächst auf RNA-Ebene mittels RT-PCR in der OPC Zelllinie CG4 ermittelt. Hierfür wurden für alle bis dahin bekannten Sequenzen von Chemokinrezeptoren in der Ratte spezifische Primer hergestellt und validiert. Das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren ist in Tab. 1 zu sehen. Dort, wo entsprechende Antikörper verfügbar waren, wurde die Expression auf Proteinebene mittels Immunzytochemie verifiziert. Um ein Artefakt der Zelllinie auszuschließen, wurde das Expressionsmuster in OPC aus Primärkulturen aus neugeborenen Ratten bestimmt. Hierfür wurde ein Protokoll zur Aufreinigung von OPC etabliert (positive Selektion mit A2B5 Antikörper, negative Selektion mit anti-RAN (Astrozyten) und anti-CD11b (Mikroglia)), so dass die Kulturen keine Kontaminationen mit Astrozyten oder Mikroglia enthielten.

Tabelle 1:

Expression von Chemokinrezeptoren in oligodendroglialen CG4 Zellen und OPC aus Primärkulturen

| Chemokinrezeptor | CG4 | | Primärkultur OPC | |
|-------------------------|---------------|------------|-------------------------|------------|
| | RT-PCR | ICC | RT-PCR | ICC |
| CXCR1 | + | k. Ak. | - | k. Ak. |
| CXCR2 | + | + | + | + |
| CXCR3 | + | k. Ak. | - | k. Ak. |
| CXCR4 | + | k. Ak. | + | k. Ak. |
| CCR1 | + | + | - | - |
| CCR2 | + | k. Ak. | - | k. Ak. |
| CCR3 | + | + | + | |
| CCR4 | - | | - | |
| CCR5 | - | | - | |
| CCR7 | - | | - | |
| CCR10 | - | | + | k. Ak. |
| CX3CR1 | + | + | + | + |

ICC: Immunocytochemie; k.Ak.: Kein spezifischer Antikörper für Ratte verfügbar

Die Rezeptoren CXCR2, CXCR4, CCR3 und CX3CR wurden sowohl an CG4 Zellen als auch an primären OPC gefunden. CXCR1, CXCR3, CCR1 und CCR2 wurden nur in der Zelllinie exprimiert und nicht in Primärzellen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich hier um ein Artefakt handelt. CCR10 dagegen wurde nur in Primärzellen gefunden.

3.2 Funktionelle Untersuchungen

Ca²⁺-Imaging:

Chemokinrezeptoren führen als G Protein-gekoppelte Rezeptoren nach Bindung eines Liganden zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg. Daher wurde Ca²⁺-Imaging mit FURA als Screeningmethode eingesetzt, um die Funktionalität der Chemokinrezeptoren zu untersuchen. Ein besonderer Augenmerk wurde auf den Rezeptor CXCR2 gelegt. Untersucht wurden die CXCR2-Liganden GRO α , LIX, MIP2 sowie IL-8, welches hauptsächlich an CXCR1 bindet. Die Untersuchung wurde wieder sowohl an CG4 Zellen als auch an primären OPC durchgeführt. Hierbei zeigten sich im wesentlichen identische Ergebnisse (Abb. 1). Lediglich mit IL-8 wurde kein intrazellulärer Ca²⁺-Anstieg beobachtet. Dies könnte an einer Speziesdifferenz gelegen haben (rekombinantes IL-8 der Ratte steht nicht zur Verfügung). Andererseits kann IL-8 dadurch als strukturähnliches Protein zu den anderen Chemokinen als Negativkontrolle dienen. Insgesamt konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR2 auf OPC nicht nur exprimiert wird, sondern auch funktionell ist.

Proliferation

Nachdem gezeigt wurde, dass die Chemokinrezeptoren funktionell sind und zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg führen, wurde mittels weiterer funktioneller Assays untersucht, welche Zellfunktionen durch die Rezeptoren beeinflusst werden. Im wesentlichen wurden Proliferationsassays (BrdU-Inkorporation) und Migrationsassays (Boyden-Chamber) eingesetzt. Zu Beginn der Untersuchungen war bekannt, dass GRO α (CXCL1) in einer Konzentration von 0,5 ng/ml die Proliferation von OPC steigern kann, wenn der Wachstumsfaktors PDGF vorhanden ist. Wir konnten einen ähnlichen Effekt an der OPC Zelllinie CG4 zeigen, bei der die Proliferation in Differenzierungsmedium bei 0,5 ng/ml CXCL1 gesteigert wurde (Abb. 2 A). Somit sind CG4 Zellen als Modell für funktionelle Untersuchungen geeignet. MIP2 (CXCL2), ein weiterer CXCR2-Ligand, hatte einen ähnlichen, wenn auch nicht so ausgeprägten Effekt (Abb. 2 B). Im Gegensatz dazu führte die dritte getestete CXCR2-Ligand LIX (CXCL5) zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Proliferation.

Migration

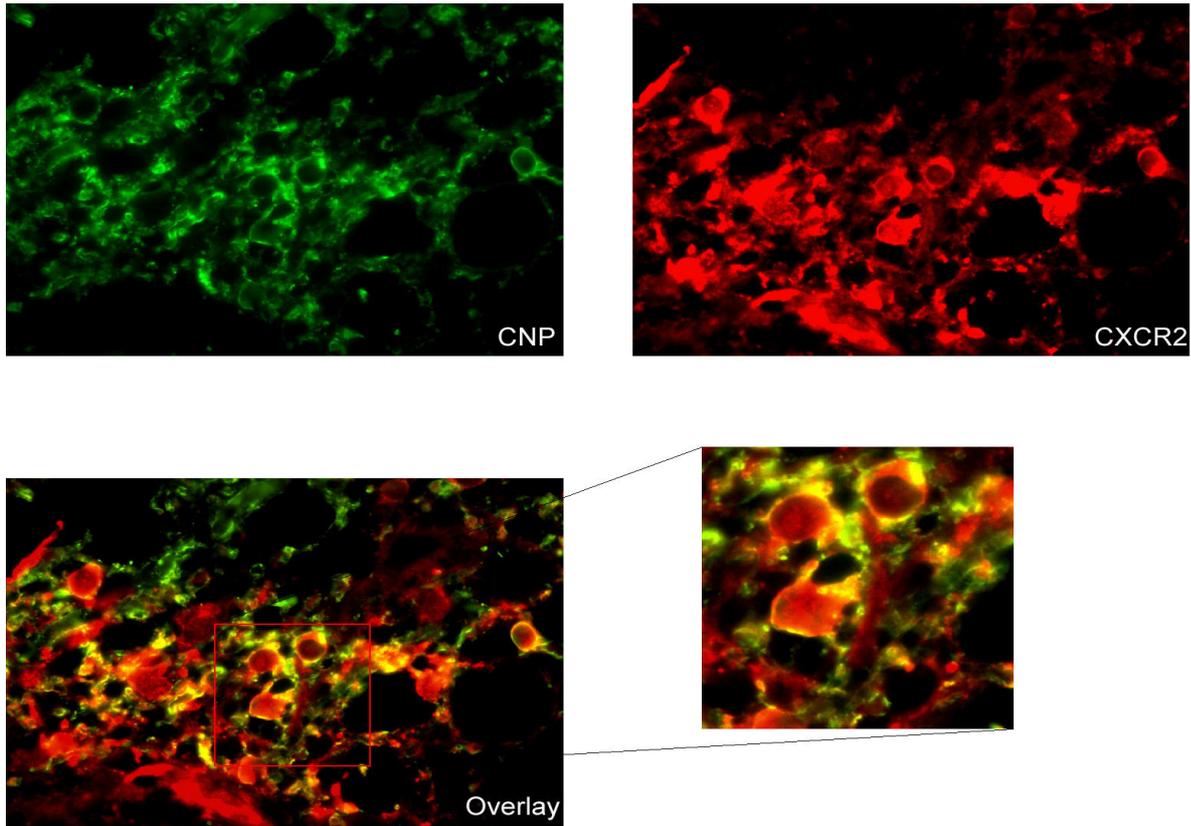
Die Migration von OPC (CG4 Zellen) unter verschiedenen Konzentrationen der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL5 (GRO α , MIP2, LIX), wurde mit der Boyden-Kammer untersucht (Abb. 3). Hier zeigte sich bei allen CXCR2 Liganden eine Hemmung der Migration bei einer Konzentration von 10 ng/ml (CXCL1) und 25 ng/ml (CXCL2 und CXCL5).

3.3 Expression von Chemokinrezeptoren während der Myelinisierung und Remyelinisierung

Bezüglich der Myelinisierung wurde im Institut für Neuropathologie Gewebe von Feten und Neugeborenen detailliert hinsichtlich der Stadien der Myelinisierung charakterisiert. Dies wurde durch das Expressionsmuster eines breiten Panels von Myelinproteinen (MOG, MAG, PLP, CNP, MBP) bewerkstelligt. Zur Zeit wird dieses Gewebe hinsichtlich der Chemokinrezeptorexpression analysiert.

Zur Remyelinisierung bei der Multiple Sklerose wurden detaillierte immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl in der sog. normal erscheinenden weißen Substanz als auch in remyelinisierenden MS-Läsionen eine Subpopulation von Oligodendrozyten den Chemokinrezeptor CXCR2 exprimiert. Abbildung 1 zeigt die Expression des Chemokinrezeptors CXCR2 durch CNP-positive Oligodendrozyten in einem remyelinisierenden MS-Plaques. Diese Ergebnisse dürften Bedeutung für die Remyelinisierungskapazität bei der MS haben.

Abbildung 1



3.4 Expression von Chemokinrezeptoren in Tiermodellen

Die MOG-Peptid induzierte experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis sowie das Modell der Cupri-zone-induzierten De- und Remyelinisierung sind im Institut für Neuropathologie etabliert worden. Als erster Kandidatenrezeptor wurde CXCR2 ausgewählt. Entsprechende CXCR2-defiziente Mäuse werden z.Z. auf den C57BL-Hintergrund rückgekreuzt, um die entsprechenden in vivo Experimente durchzuführen.

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des SFB

Seit Beginn des Projektes wurde eine Untersuchung zur physiologischen Myelinisierung bei Mäusen, die keinen CXCR2 tragen, veröffentlicht (Tsai et al., Cell 2002;110:373). Hier wurde gezeigt, dass die Myelinisierung in einem leicht veränderten zeitlichen Muster abläuft, wobei das Myelin bei adulten Tieren normal ausgebildet ist. In vitro Untersuchungen zeigten ebenso wie unsere Ergebnisse eine Hemmung der Migration von OPC. Zur Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Myelinisierung und Remyelinisierung in experimentellen Modellen sowie der Multiple Sklerose liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten vor. Die im SFB 507 begonnenen Arbeiten werden nach dem Wechsel der Antragsteller nach Göttingen (Brück) bzw. Hannover (Stangel) nach erfolgreicher Begutachtung seit dem 1.4.2004 im SFB566 in Hannover weitergeführt.

5 Offene Fragen

Die funktionelle Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Myelinisierung und Remyelinisierung ist weiterhin unklar. Diese Fragen sollen in den kommenden Jahren detailliert bearbeitet und beantwortet werden.

Literatur

1. Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003) Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206:181-185.
2. Stangel M (2002) [Transplantation of myelinating cells as regenerative therapy for multiple sclerosis - experimental basis and present state of clinical studies]. *Nervenarzt* 73:937-945.
3. Franklin RJ (2002) Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3:705-714.
4. Ransohoff RM (2002) The Chemokine System in Neuroinflammation: An Update. *J Infect Dis* 186:S152-S156.
5. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM (1999) Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 103:807-815.
6. Wu Q, Miller RH, Ransohoff RM, Robinson S, Bu J, Nishiyama A (2000) Elevated levels of the chemokine GRO-1 correlate with elevated oligodendrocyte progenitor proliferation in the jimpy mutant. *J Neurosci* 20:2609-2617.
7. Robinson S, Tani M, Strieter RM, Ransohoff RM, Miller RH (1998) The chemokine growth-regulated oncogene- α promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation. *J Neurosci* 18:10457-10463.
8. Glabinski AR, Ransohoff RM (1999) Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* 5:3-12.
9. Tsai HH, Frost E, To V, Robinson S, Ffrench-Constant C, Geertman R, Ransohoff RM, Miller RH (2002) The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* 110:373-383.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB 507/B12 2002-2004

Expression und funktionelle Bedeutung des TRAIL-Systems für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose

Prof. Dr. Frauke Zipp

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

Funktionelle Charakterisierung und Bedeutung des TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems für Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose:

Zur Zeit der Antragstellung unter dem genannten Titel war bekannt, dass sich das *Tumor necrosis factor (TNF) alpha related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)/TRAIL-Rezeptor-System von den anderen Familienmitgliedern der TNF-Familie in Expression und Funktion unterscheidet. Es gibt membranständige Apoptose-vermittelnde und -blockierende TRAIL-Rezeptoren. Wir hatten bereits zeigen können, dass alle Rezeptoren auf T-Zellen exprimiert und humane Antigen-spezifische T-Zellen resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sind. Weiterhin war das Ergebnis eigener Arbeiten, dass TRAIL im ZNS Apoptose induzieren kann. Ziel war nun, die Rolle des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Signalwegs in der Neuroinflammation zu verstehen. Dazu sollten 1) Beteiligung und Anteil des TRAIL-Systems an den T-Zell-Effektormechanismen im ZNS in Kokulturen aus akuten Hirnschnitten und autologen Antigen-spezifischen T-Zellen geklärt, 2) Apoptose-unabhängige Funktionen dieses Systems in humanen T-Zell-Kulturen analysiert, 3) die Expression von TRAIL und den verschiedenen Rezeptoren im ZNS und Liquor von MS-Patienten charakterisiert und 4) die therapeutisch relevante Modulation TRAIL-vermittelter Apoptose im ZNS sowie in den humanen ZNS/T-Zell-Kokulturen untersucht werden.

2 Angewandte Methoden

- Antigen-spezifische T-Zell-Linien mit unterschiedlicher Antigen-Spezifität und unterschiedlichem T-Helfer-Profil
- Proliferation mittels ³H-Thymidin-Einbau
- Apoptose-Assays (z.B. Caspase-Aktivierungs-Assays, DNA-Fragmentierung, Kristallviolett)
- „realtime“ RT-PCR mit der Taqman Methode
- Durchflußzytometrie
- ELISA
- Hirnschnitt-Kultur und Kokultivierung von Hirnschnitt mit autologen humanen Antigen-spezifischen T-Zellen
- Biopsie-Material von MS-Patienten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. W. Brück, Neuropathologie Charité
- Immunzytochemie

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

1) Beteiligung und Anteil des TRAIL-Systems an den T-Zell-Effektormechanismen im ZNS in Kokulturen aus akuten Hirnschnitten und autologen Antigen-spezifischen T-Zellen *und* 4) therapeutisch relevante Modulation TRAIL-vermittelter Apoptose im ZNS sowie in den humanen ZNS/T-Zell-Kokulturen:

Die Arbeiten zu diesen Punkten sind noch nicht vollkommen fertiggestellt. Zunächst konnten wir zeigen, dass Myelin-spezifische T-Zellen in der Lage sind, Gliomzellen aus ZNS-Ursprung, TRAIL-vermittelt zu schädigen (Dörr et al. 2002b). Die T-Zellen benutzen den TRAIL-Signalweg also als Effektormechanismus. In diesem Zusammenhang ist uns mittlerweile mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie in Kooperation

B14 Zipp

mit der Arbeitsgruppe um Prof. R. Nitsch gelungen zu zeigen, dass Antigen-spezifische T-Zellen in der Lage sind, Neurone direkt zu anzugreifen und zu schädigen (Nitsch et al. 2004). Der Nachweis, dass T-Zellen tatsächlich TRAIL-vermittelt neuronalen Zelltod induzieren, steht noch aus. Die humanen T-Zell-Hirn-Kokultur-Experimente hierzu sind noch nicht abgeschlossen. Der *in vivo*-Teil im Tiermodell der Multiplen Sklerose war nicht Gegenstand des bisherigen Antrags, ist jedoch in unserem Fortsetzungsantrag enthalten.

Zur Frage der therapeutischen Modulation haben wir zunächst Experimente in der Hirnschnittkultur durchgeführt. Wir haben im Rahmen dieser Experimente unsere Methode zur Quantifizierung von Zelltod in den humanen Hirnschnitten auf der Basis von Metamorph® weiterentwickelt, um der im humanen Schnitt im Unterschied zum murinen vorhandenen Autofluoreszenz Rechnung zu tragen. Es werden mittels Grün- und Rotfilter mit dem Fluoreszenzmikroskop zwei Aufnahmen gemacht und dann hernach mit dem entwickelten Programm die Autofluoreszenz von der Fluoreszenz durch Propidiumjodid subtrahiert. Weiterhin werden zu große und zu kleine und damit artefizielle Signale ausgeschlossen. Diese Methode ist nun in einem ersten Manuskript enthalten (Dörr et al., eingereicht). Wir haben TRAIL-induzierten Zellschaden in den humanen Hirnschnitten quantifiziert und fanden Dosis-abhängigen Zelltod, darunter insbesondere neuronalen Zelltod, den wir durch Vorbehandlung mit Flupirtin-Maleat, einem als Schmerzmittel oral eingesetzten Medikament, blockieren konnten. Flupirtin-Maleat war bereits eine antiapoptotische und möglicherweise neuroprotektive Rolle zugeschrieben worden. Wir konnten nun erstmalig zeigen, dass TRAIL-induzierter Zelltod von humanen Neuronen im lebenden und intakten Hirngewebe mit Flupirtin-Maleat verhindert werden kann.

2) Apoptose-unabhängige Funktionen dieses Systems in humanen T-Zell-Kulturen:

Hierzu konnten wir zeigen, dass TRAIL direkt in den T-Zell-Zyklus eingreift. Der Todesligand induziert keine Apoptose in T-Zellen, sondern blockiert *Calcium release-activated calcium* (CRAC)-Kanäle (Lünemann et al. 2002). TRAIL wird durch die Interferon-beta-Therapie bei MS-Patienten hochreguliert (Wandinger et al. 2003). Dies konnten wir auf RNA- und Protein-Ebene zeigen. Die antiproliferative Wirkung von TRAIL erklärt möglicherweise das bessere Ansprechen auf die Therapie von Patienten, die von vornherein einen hohen TRAIL-Protein-Spiegel zeigen. Es ließ sich in Kooperation mit unseren Biometrikern durch eine sogenannte ROC-Analyse ein Cut-Off-Level bestimmen, der eine Unterscheidung von Therapie-*Respondern* und *Non-Respondern* erlaubt.

Diese Arbeiten zum TRAIL im Bereich des T-Zell-Zyklus und der Interferon-beta-Therapie haben noch einmal die T-zelluläre Regulation als ein therapeutisches Ziel herausgestellt. Daher haben wir diese therapeutische Strategie weiter verfolgt. Es war uns so recht rasch möglich, den Wirkmechanismus einer Substanz, nämlich eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors aufzuklären, der ebenfalls antiproliferativ auf T-Zellen wirkt und die Symptome in der EAE zu verringern vermag. Das hierfür in humanen Antigen-spezifischen T-Zellen untersuchte Atorvastatin greift ebenso wie TRAIL in den T-Zell-Zyklus ein. Es blockiert jedoch nicht wie TRAIL den Calcium-Einstrom, sondern reguliert die Expression von p27^{kip1} herauf, welches durch ein GTP-bindendes Protein Rho reguliert wird und in der Induktion von T-Zell-Anergie eine Rolle spielt (Aktas et al. 2003).

3) Expression von TRAIL und den verschiedenen Rezeptoren im ZNS und Liquor von MS-Patienten:

Alle vier membranständigen TRAIL-Rezeptoren werden im adulten humanen ZNS exprimiert (Dörr et al. 2002a). Dies konnten wir auf RNA- und Protein-Ebene zeigen. Der Ligand selbst wird jedoch nicht im ZNS exprimiert, während man ihn in der Plazenta, einem anderen immunprivilegierten Organ findet. Dies spricht für die Beteiligung TRAIL-vermittelter Apoptose an den Schadensmechanismen im ZNS und nicht an der Elimination von T-Zellen aus dem ZNS.

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die fehlende Expression von TRAIL im ZNS wurde parallel auch von einer neuroonkologisch arbeitenden Gruppe im Tumorrandgebiet gefunden. Unsere Arbeiten zur immunregulatorischen Rolle von TRAIL im Humanen entspricht tierexperimentellen Befunden in der EAE. Auch die in dem Zusammenhang entstandene Arbeit zum Eingriff in den T-Zell-Zyklus durch Statine wurde national und international auf Konferenzen beachtet und hat zu vielfältigen nationalen und internationalen Kooperationen geführt.

TRAIL als potentieller Marker für das Ansprechen auf Interferon-beta-Therapie hat ein großes Interesse unter den Neuroimmunologen gefunden, da dieser Befund von großem Wert für die Klinik ist. Unsere Serie von Arbeiten zum TRAIL-System wurde international wahrgenommen, es resultierten viele Einladungen, u.a. auf eine FASEB-Konferenz in den USA, sowie Preise.

5 Offene Fragen

In der EAE ist in vivo eine Exazerbation der Erkrankung durch die Inhibition eines TRAIL-Rezeptors gezeigt worden. Dies entspricht unseren Beobachtungen zur peripheren Immunregulation durch TRAIL (Lünemann et al. 2002, Wandinger et al. 2003). Die in vivo-Relevanz der beobachteten Schadensmechanismen von TRAIL im ZNS ist noch nicht geklärt.

6 Eigene Veröffentlichungen 2001-2003

a) direkt Projekt-assoziierte eigene Veröffentlichungen:

1. Dörr J., I. Bechmann, S. Waiczies, O. Aktas, H. Walczak, P.H. Kramer, R. Nitsch, F. **Zipp**. Lack of TRAIL but presence of its receptors in the human brain. *Journal of Neuroscience* 2002a, 22: RC209 1-5
2. Dörr, J., S. Waiczies, U. Wendling, B. Seeger, F. **Zipp**. Induction of TRAIL-mediated glioma cell death by human T cells. *Journal of Neuroimmunology* 2002b, 122: 117-124

Diese beiden Arbeiten sind Teil einer Doktorarbeit von Jan Dörr (Dr. med. "Magna cum laude").

1. Lünemann, J.D., S. Waiczies, S. Ehrlich, U. Wendling, T. Kamradt, B. Seeger, F. **Zipp**. Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. *Journal of Immunology* 2002, 168: 4881-8
2. Aktas, O., S. Waiczies, A. Smorodchenko, J. Dörr, B. Seeger, T. Prozorovski, S. Sallach, M. Endres, S. Brocke, R. Nitsch, F. **Zipp**. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th 1 cells through atorvastatin. *Journal of Experimental Medicine* 2003, 197: 711-723

Diese Arbeit ist Teil einer Doktorarbeit von Sonia Waiczies (Dr. rer. medic. „Summa cum laude“).

3. Ehrlich, S., C. Infante-Duarte, B. Seeger, F. **Zipp**. Differential regulation of soluble and surface-bound TRAIL. *Cytokine* 2003, 24: 244-253
4. Wandinger, K.P., J. Lünemann, O. Wengert, J. Bellmann-Strobel, A. Orhan, A. Weber, E. Grundström, E. Ehrlich, K.D. Wernecke, H.D. Volk, F. **Zipp**. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for IFN-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet* 2003, 361: 2036-2043
5. Nitsch, R., E. Pohl, A. Smorodchenko, C. Infante-Duarte, O. Aktas, F. **Zipp**. Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *Journal of Neuroscience* 2004, in press

Eingereicht:

6. Dörr, J., K. Roth, U. Zurbuchen, R. Deisz, T.-N. Lehmann, R. Nitsch, F. **Zipp**. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated death of neurons in living human brain tissue is inhibited by flupirtine-maleate.

b) sonstige eigene Veröffentlichungen:

7. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG). Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis – 1. Supplement. *Nervenarzt* 2001, 72: 150-157
8. Aktas, O., U. Wendling, U. Grieger, S. Waiczies, R. Zschenderlein, F. **Zipp**. Polyspecific immunoglobulins ("IVIg") suppress proliferation of human (auto)antigen-specific T cells without inducing apoptosis. *Journal of Neuroimmunology* 2001, 114: 160-167
9. Lünemann, J.D., O. Aktas, P. Gniadek, R. Zschenderlein, F. **Zipp**. Downregulation of transforming growth factor-beta 1 in interferon-beta 1a treated MS patients. *Neurology* 2001, 57: 1132-4
10. **Zipp**, F. und K.P. Wandinger. Current concepts on vaccinations in multiple sclerosis. *Nervenarzt* 2001, 72: 802-806

B14 Zipp

11. **Zipp**, F., C. Windemuth, J. Dichgans, T. Wienker, R. Martin, C. Müller. Peripheral blood cell bulk cultures are not suitable for the analysis of the genetic control of T cell cytokine function. *Immunological Letters* 2001, 78: 21-7
12. Bechmann, I., B. Steiner, U. Gimsa, G. Mor, S. Wolf, M. Beyer, R. Nitsch, F. **Zipp**. Astrozyte-induced T cell apoptosis is CD95 ligand dependent. *Journal of Neuroimmunology* 2002, 132: 60-65
13. Kuhlmann T., M. Glas. C. zum Bruch, W. Müller, A. Weber, F. **Zipp**, W. Brück Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 gene polymorphisms in multiple sclerosis *Journal of Neuroimmunology* 2002, 126: 213-220
14. Kuhlmann, T., U. Wendling, C. Nolte, F. **Zipp**, B. Maruschak, C. Stadelmann, H. Siebert, W. Brück. Differential regulation of myelin phagocytosis by macrophages/microglia, involvement of target myelin, Fc receptors and activation by intravenous immunoglobulins. *Journal of Neuroscience Research* 2002, 167: 185-190
15. Lünemann, J.D., B. Schwarzenberger, N. Kassim, R. Zschenderlein, F. **Zipp**. Rhabdomyolysis during interferon- β 1a treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2002, 72: 274
16. Rieckmann P, K.V. Toyka. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG). Immunomodulatory staged therapy of multiple sclerosis. New aspects and practical applications. *Nervenarzt* 2002, 73: 556-563
17. Waiczies, S., A. Weber, J.D. Lünemann, U. Wendling, R. Zschenderlein, F. **Zipp**. Elevated Bcl-X_L levels correlate with T cell survival in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2002, 126: 213-20
18. **Zipp**, F. und K.P. Wandinger. Current recommendations for vaccination in multiple sclerosis. *Nervenarzt* 2002, 73: 384
19. Aktas, O., **Zipp**, F. Regulation of self-reactive T cells by human immunoglobulins. *Current Pharmaceutical Design* 2003, 9: 245-256
20. Diestel[§], A., O. Aktas[§], D. Hackel, I. Häke, S. Meier, C.S. Raine, R. Nitsch*, F. **Zipp***, O. Ullrich*. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *Journal of Experimental Medicine* 2003, 198: 1729-1740 ^{§*}equally contributing first/senior authors
21. Gniadek, P., O. Aktas, A. Weber, U. Wendling, H. Obert, F. **Zipp**. Systemic IFN- β treatment induces peripheral apoptosis in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2003, 137: 187-196
22. Kwidzinski, E., L. Mutlu, A.D. Kovac, J. Bunse, J. Goldmann, O. Aktas, F. **Zipp**, T. Kamradt, R. Nitsch, I. Bechmann. Self-Tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *Journal of Neural Transmission* 2003, 65: 29-49
23. Weber, A., C. Infante-Duarte, S. Sawcer, E. Setakis, J. Bellmann-Strobl, A. Hensiek, S. Rueckert, C. Schoenemann, D. Clayton, A. Compston, F. **Zipp**. A genome-wide German screen for linkage disequilibrium in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2004, in press
24. Würfel, J., J. Bellmann-Strobl, P. Brunecker, O. Aktas, H. McFarland, A. Villringer, F. **Zipp**. Changes in cerebral perfusion precede plaque formation in Multiple Sclerosis - A longitudinal Perfusion MRI study. *Brain* 2004, 127: 111-119

BERICHT TEILPROJEKT B15**PD Dr. Christian Woiciechowsky**

Klinik für Neurochirurgie, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Hans-Dieter Volk

Institut für Medizinische Immunologie, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Interaktionen zwischen Entzündungsprozessen im ZNS und dem peripheren Immunsystem: Untersuchungen zum Infektionsrisiko und -prävention bei einer ZNS-vermittelten systemischen Immunsuppression am Ratten-Modell**Förderung des Teilprojektes im Rahmen des Sonderforschungsbereichs**

| Haushalts- jahr | Personalkosten | Sächl. Verw.- ausgaben | Investitionen | gesamt |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------|
| 2001 | 106,8 TDM | 25 TDM | | 131,8 TDM |
| 2002 | 50.397 € | 12.781 € | | 63.178 € |
| 2003 | 57.600 € | 12.782 € | | 70.382 € |
| 2004 | 58.800 € | 12.782 € | | 71.582 € |

1. Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

In der zurückliegenden Antragsphase konnten wir am Modell der intracerebralen Zytokininfusion verschiedene Mechanismen einer ZNS-gesteuerten systemischen anti-inflammatorischen Reaktion bzw. Immunsuppression entschlüsseln. Dabei zeigte sich, daß durch eine IL-1-bedingte Aktivierung des sympathischen Nervensystems ein erhöhter IL-10-Release in der Peripherie erzeugt wird, der mit Propranolol - einem β 2-Blocker - inhibiert werden kann. Dieser sympathogene Pathway einer Neuroimmunomodulation wurde in weiteren Untersuchungen bestätigt. Zudem konnten wir tierexperimentell und in klinischen Studien darlegen, dass eine Erhöhung des intrakraniellen Drucks mit einer IL-10-Ausschüttung über einen vergleichbaren Mechanismus (Sympathicusaktivierung) einhergeht.

Somit läßt sich zusammenfassen, daß wir in der zurückliegenden Antragsphase die Kaskade Hirnläsion (Infektion/SHT) → Hirndruckanstieg/lokaler Zytokinrelease → Sympathicusaktivierung → Adrenalin-/Noradrenalinrelease → systemische Immunveränderungen gut charakterisiert haben, wobei sich herausstellte, daß die Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels über β -Rezeptoren für die IL-10-Ausschüttung von wesentlicher Bedeutung sind.

Ausgehend von den klinischen Erfahrungen, wo Patienten mit einer nachgewiesenen ZNS-vermittelten Immunsuppression (hohes Plasma-IL-10) ein erhöhtes Infektionsrisiko haben, ergab sich die Frage, ob ein solches Szenario an Tiermodell simuliert werden kann.

Dazu wurden folgende Ansätze verfolgt:

- Untersuchung der biologischen Relevanz einer ZNS-bedingten Immunsuppression im Ratten-Pneumonie-Modell.
- Untersuchungen zur Infektionsprävention bei einer ZNS-bedingten Immunsuppression im Ratten-Pneumonie-Modell durch Blockade der cerebralen Transmission (IL-1ra, Anti-CRF) und Blockade der Rezeptoren auf Immunzellen (Propranolol, RU 486).
- Untersuchungen zur Infektionsprävention bei einer ZNS-bedingten Immunsuppression im Ratten-Pneumonie-Modell durch Applikation von Immunmodulatoren (DHEA, G-CSF, IFN- γ).

2. Angewandte Methoden

Tiermodelle

1. Chronische intracerebro-ventrikuläre Zytokinapplikation über ALZET-Minipumpen für 48 Stunden und intratracheale Applikation/Inhalation von Streptococcus pneumoniae bzw. Klebsiella pneumoniae.

Es wurde unsererseits nachgewiesen, dass infolge einer intraventrikulären Applikation von IL-1 eine lokale inflammatorische und eine systemische anti-inflammatorische Reaktion ausgelöst wird. Durch Gehirnentnahme und immunhistochemische Untersuchungen sollte die lokale inflammatorische Reaktion weiter klassifiziert und die Mechanismen einer lokalen IL-1-induzierten Zellinfiltration untersucht werden. Durch eine Exposition der Tiere gegenüber Pneumonieerregern sollte überprüft werden inwieweit die ausgelöst Immunsuppression mit einem tatsächlichen erhöhtem Infektionsrisiko verbunden ist.

2. Intraperitoneale Applikation von LPS zum Studium der der Aktivierung inhibitorischer ZNS-Pathways bei systemischer Imflammation.

Zur Darstellung des „inflammatorischer Reflexes“ welcher über das vegetative Nervensystem vermittelt wird wurden unsererseits Untersuchungen verschiedener pro- und anit-inflammatorischer Zytokine im Plasma nach intraperitonealer LPS-Applikation durchgeführt.

Die möglichen Pathways der systemischen ZNS-gesteuerten anti-inflammatorischen Reaktion im Rahmen des „inflammatory reeflex“ wurde einzeln durch folgende Ansätze untersucht:

- sympathische β 2-Rezeptorblockade durch Applikation von Propranolol zur Beurteilung des Einflusses des sympathischen Nervensystems
- chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) zur zusätzlichen Depletion von Noradrenalin.
- Hypophysektomie und Adrenalektomie zur Beurteilung des Einflusses der Hypophyse-nebennieren-.
- Subdiaphragmale Vagotomie zur Beurteilung des Einflusses des N. vagus

Histologie und Immunhistologie

1. Histologie

- zur Beurteilung der Lage der Kanüle im Cerebrum.
- Zur Beurteilung der Pneumonie am histologischen Schnitt.

2. Immunhistologie unter Einsatz der nachfolgenden Antikörper

- ED1 zur Markierung von Gewebsmakrophagen,
- MRC OX-6 zur Markierung von Ratte I-A-Antigen (entspricht MHC Klasse II-Antigenen) auf antigenpräsentierenden Zellen,
- MRC OX-52 zur Markierung von T-Lymphozyten,
- HIS-48 zur Markierung von Granulozyten,
- 1A29 zur Darstellung der ICAM-1-Expression auf Endothelzellen,
- Anti-GFAP zur Markierung von reaktiv veränderten Astrozyten,

Die immunhistologischen Ergebnisse wurden quantitativ mit dem System Image-Pro Plus 1.3, Media Cybernetics L.P., Carlsbad, USA quantitativ ausgewertet.

Blut- und Liquoruntersuchungen

1. Liquor

- Leukozytenzahl
- Bestimmung von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α)

2. Blut

- Leukozytenzahl/Differentialblutbild
- Bestimmung von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α)

Ex vivo LPS-induzierte TNF- α /IL-10-Sekretionskapazität

Durchflußzytometrie zur Bestimmung der IL-10-, TNF- α - und IFN- γ Produktion in CD3 und CD11b/c positiven Zellen 0, 6, 12, 18 und 24 St. nach Zugabe von IL-1.

2. Ergebnisse und ihre Bedeutung

2.1. Die intracerebrale Zytokinapplikation führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion

Schöning B, Elepfandt P, Daberkow N, Rupprecht S, Stockhammer F, Stoltenburg G, Volk HD, Woiciechowsky C: Differences in immune cell invasion into the cerebrospinal fluid and brain parenchyma resulting during cerebral infusion of interleukin-1 β . **Neurol Sci** 23:211-218, 2002.

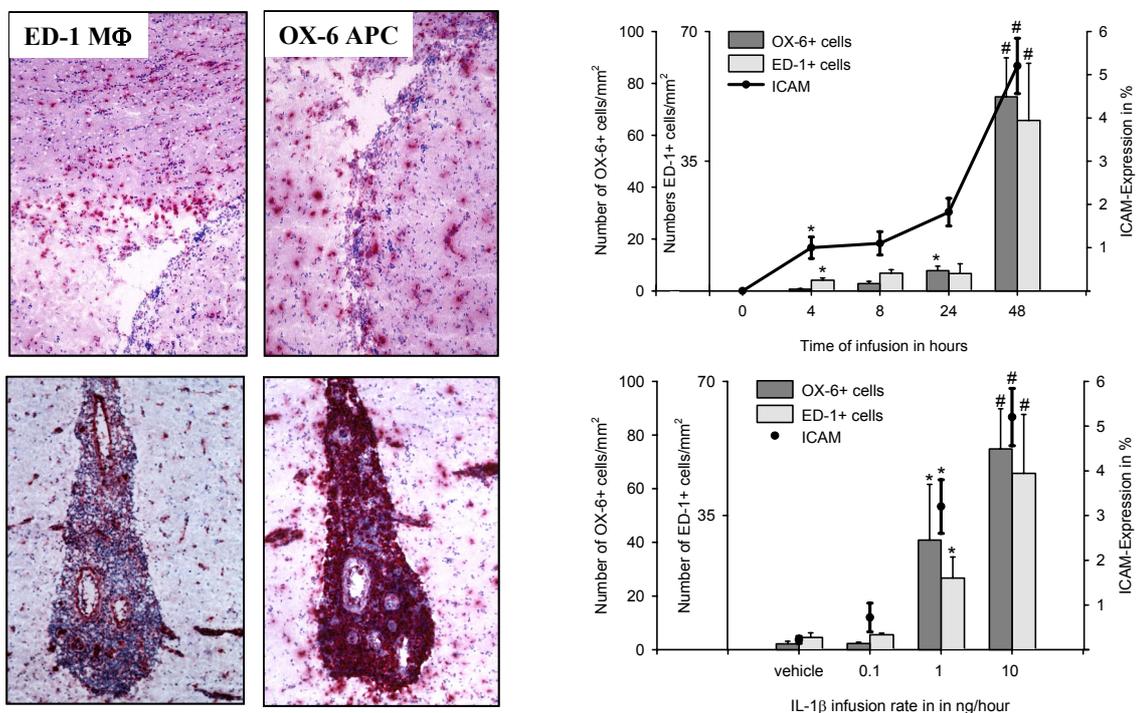


Abb.1 Links. Immunhistologie mit Darstellung der Infiltration des Gehirns mit ED-1 und OX-6 positiven Zellen 48 Stunden nach Beginn der intracerebralen IL-1-Infusion. *Rechts.* Darstellung der Expression von ICAM in Abhängigkeit von der Zeit- und der infundierten IL-1-Konzentration. Es zeigte sich, dass eine maximale ICAM-Expression sich nach 40 Stunden zeigte bei einer IL-1-Infusionsrate von 10 ng/Stunde. Dieser Peak korrespondierte gut zur immunhistologischen quantifizierten Zellzahlen im Gewebe.

Die Untersuchungen zu den Mechanismen einer intracerebralen Zellinvasion konnten zeigen, wie Immunzellen in das so genannte immunprivilegierte Gehirn eindringen können. Dabei scheinen proinflammatorische Zytokine und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen von Bedeutung zu sein

2.2. Eine systemische pro-inflammatorische Reaktion führt über den „inflammatory reflex“ zu einer schnellen anti-inflammatorischen Gegenreaktion

Rupprecht S*, Woiciechowsky C*, Strohmeyer JC, Blume C, Hummel M, Hoeflich C, Volk T, Kotsch K, Konertz W, Kox W, Reinke P, Hetzer R, Volk HD: Postoperative infectious complications are related to immunodepression mediated by the "inflammatory reflex" following endotoxin translocation - synergistic action of efferent vagus, sympathetic nerves, and adrenal gland (submitted).

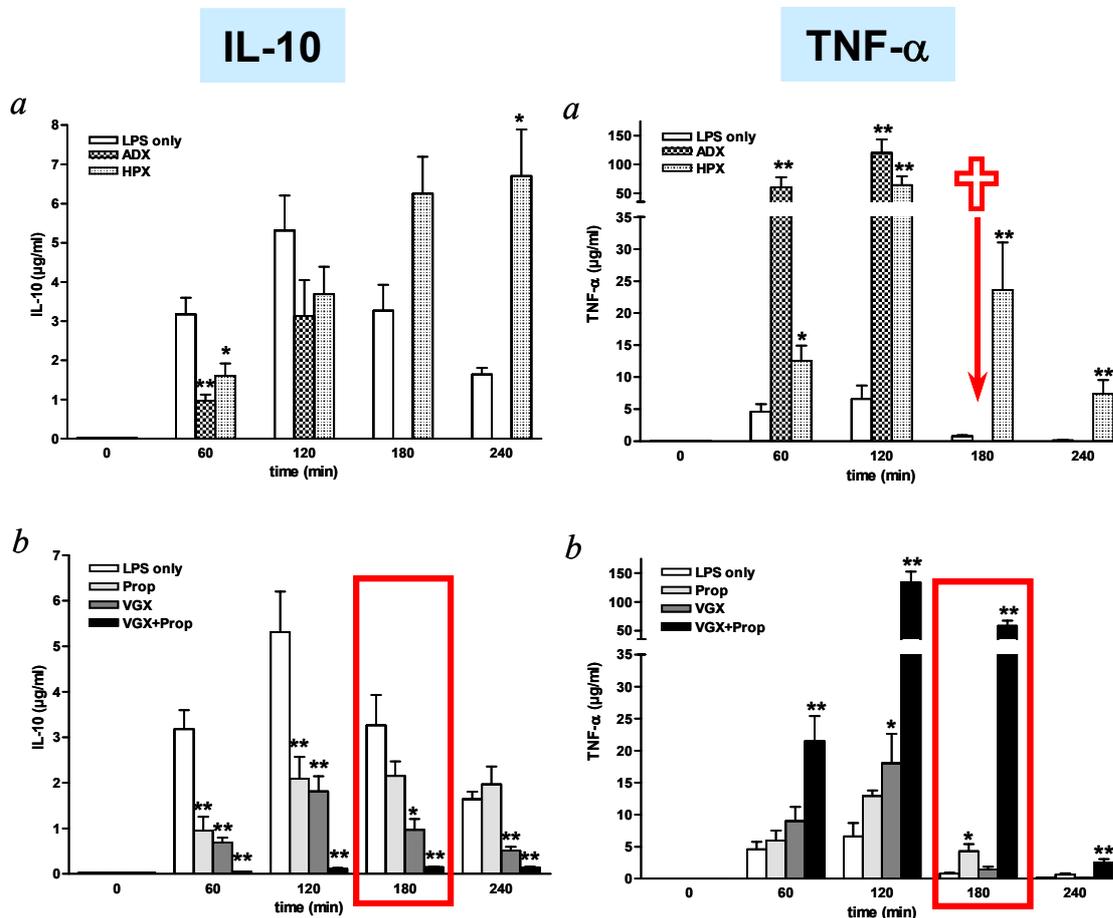


Abb.2 Auswertung der Zytokinkonzentrationen im Plasma nach intraperitonealer Applikation von LPS. Es zeigte sich, dass bereits 60 Minuten nach einer pro-inflammatorischen Reaktion (TNF-α) eine Gegensteuerung mit Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10) erfolgt. Dabei spielen für diese Reaktion vor allem zentrale Mechanismen eine Rolle zu spielen. Eine Blockade des Sympathicus bzw. eine Vagotomie verhindern die anti-inflammatorische Gegenreaktion. Ebenso die Blockade der Hypophysen-Nebennieren-Achse.

Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

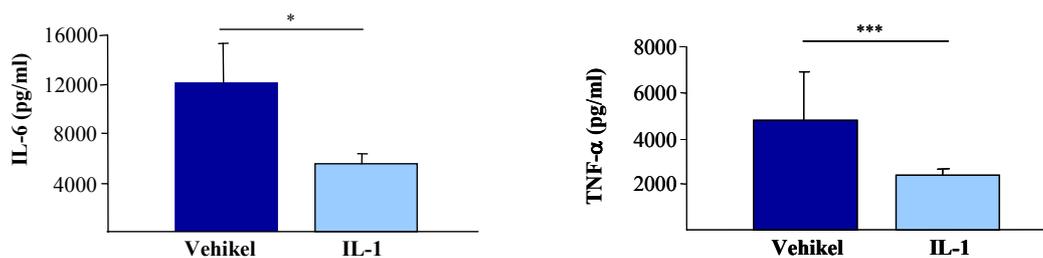
- Bei der Aktivierung des ZNS während der durch LPS induzierten Immunreaktionen spielen neben den in den systemischen Kreislauf gelangten pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1, IL-6 und TNF-α auch afferente Fasern des Nervus vagus eine wichtige Rolle.
- Die neben der Gabe des β-Rezeptorblockers Propranolol durchgeführte chemische Sympathektomie führte durch die fehlende Ausschüttung von Noradrenalin aus den terminalen Nervenendigungen und daraus ergebend durch verminderte Catecholaminproduktion der durch sie innervierten Nebennierenmarkszellen zu einer reduzierten Begrenzung des neurogenen Einflusses auf den Entzündungsvorgang mit erhöhten Zytokinkonzentrationen von TNF-α und sehr stark erniedrigten Werten des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10.
- Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse hat in der Akuten-Phase-Reaktion über die Produktion der Glucocorticoide eine wichtige Funktion bei der Verhinderung einer überschießenden

Immunreaktion durch deutliche Minderung der Serumkonzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α . Diese Eindämmung der Inflammation geschieht nur marginal über eine gesteigerte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10.

2.3: Modell der infolge cerebraler Immunsuppression induzierten Pneumonie an der Ratte.

Die chronische intracerebro-ventrikuläre Zytokinapplikation (IL-1 β) über ALZET-Minipumpen für 48 Stunden führte zu dem bereits ausführlich diskutierten Phänomen der systemischen Immunsuppression. Es wurde spekuliert, dass diese Immunsuppression zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt. Deshalb sollte ein Ratten-Pneumonie-Modell durch intratracheale Applikation von *Streptococcus pneumoniae* (Kooperation mit Dr. Gregory Bagby, LSU Section of Pulmonary/Critical Care, 533 Bolivar St., New Orleans, LA 70112, USA) etabliert werden, an dem mögliche protektive Möglichkeiten Infektionen vorzubeugen untersucht werden sollten. Leider konnte in verschiedenen Ansätzen und verschiedenen Variationen (Bakterienstamm, Dosis, Zeitpunkt) bei den verwandten Tieren keine Pneumonie induziert werden. Obwohl eine deutliche Abnahme von inflammatorischen Zytokinen (IL-6 und TNF- α) 6 Stunden nach intratrachealer Applikation von IL-1 in BALF nachgewiesen werden konnte, führte dies nicht zur erhöhten Infektionsrisiko, denn Kontroll- und IL-1-behandelte Tiere hatten vergleichbare Bakterienanzahlen in den Lungen 18 Stunden nach Bakterienapplikation.

Zytokinkonzentrationen in BALF 6 Stunden nach Bakterienapplikation



CFU in Lungenhomogenaten und WBC im Blut 18 Stunden nach Bakterienapplikation

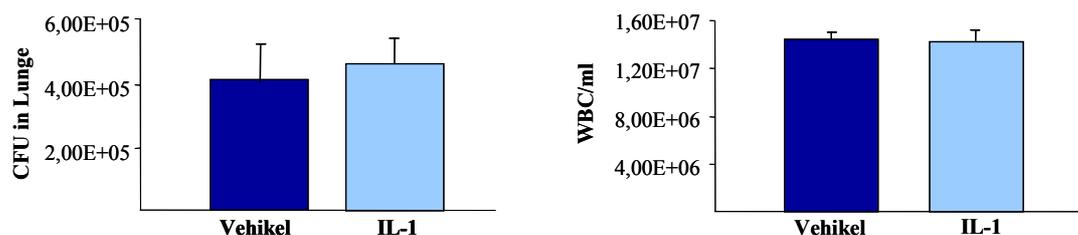


Abb. 3. Darstellung der Auswirkungen einer intratrachealen Bakterienapplikation im Modell der IL-1 induzierten cerebral gesteuerten immunsuppression.

3 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des SFB und Reaktion der wissenschaftlichen Öffentlichkeiten auf die eigenen Arbeiten

Es existieren umfangreiche Veröffentlichungen, die den sogenannten „inflammatory reflex“ beschreiben. Vor allem die Arbeiten der Arbeitsgruppe von Tracey bestätigen die Bedeutung des „inflammatory re-

B15 Woiciechowsky/Volk

flex“ für die Akutreaktion des Organismus auf einen inflammatorischen Reiz im Sinne einer Stressreaktion. Durch unsere Arbeiten konnten wir zeigen, dass wenn der „inflammatory reflex“ ausgelöst wird ohne dass ein inflammatorischer Reiz besteht, dies zu einer systemischen Immunsuppression führt und bei Patienten mit einem erhöhten Infektionsrisiko verbunden ist.

Borovikova, L.V., S.Ivanova, M.Zhang, H.Yang, G.I.Botchkina, L.R.Watkins, H.Wang, N.Abumrad, J.W.Eaton, and K.J.Tracey. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405:458

Tracey, K.J. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 19-26;420:853.

Wang, H., M.Yu, M.Ochani, C.A.Amella, M.Tanovic, S.Susarla, J.H.Li, H.Wang, H.Yang, L.Ulloa, Y.Al Abed, C.J.Czura, and K.J.Tracey. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421:3

Cao, L., N.M.Filipov, and D.A.Lawrence. 2002. Sympathetic nervous system plays a major role in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to *Listeria monocytogenes*. *J.Neuroimmunol.* 125:94.

Die Akzeptanz der erreichten Versuchsergebnisse in der wissenschaftlichen Öffentlichkeit zeigt sich in durch die Einladung an verschiedenen Büchern mitzuarbeiten, die sich mit neuroimmunologischen bzw. immunregulatorischen Fragen befassen

Volk HD, Zuckermann H, Kox W, Woiciechowsky C, Hoeflich C, Meisel C, Gruetz G, Döcke WD, Reinke P: **Immune monitoring and strategies for immune modulation**. In Serie: Molecular and Cellular Biology of Critical Care Medicine, Band: Immunology and infectious disease, Ed.: Doughty LA und Linden P, Verlag: Kluwer Academic Publishers, Norwell, S 155-186, 2003.

Woiciechowsky C and Volk HD: **Influence of brain-derived cytokines on the immune response**. In Serie: Progress in Inflammation Research, Band: Mind over Matter - Regulation of peripheral inflammation. Ed.: Parnham MJ, Verlag: Birkhäuser AG, S. 19-33, 2003.

L. Mutlu and Woiciechowsky C: **Inflammatory response after neurosurgery**. In Best Practice & Research: Clinical Anesthesiology. Ed.: H van Aken, Verlag: Elsevier (in press).

Woiciechowsky C: Role of peripheral nerves, neurogenic inflammation. In Serie: Neuroimmune Biology. Ed.: Buckingham J and Arnason B, Verlag: (in prepare).

Veröffentlichungen der Antragsteller der letzten 4 Jahre (2001, 2002, 2003, 2004)

6.1. direkt Projekt-assoziierte Veröffentlichungen

1. Woiciechowsky C, Schöning B, Cobanov, J. Lanksch WR, Volk HD Döcke WD: Early IL-6 plasma concentrations correlate with severity of brain injury and pneumonia in brain-injured patients. *J Trauma* 52:339-345, 2002.
2. Elepfandt P, Rupprecht S, Schöning-Burkhardt B, Volk HD, Woiciechowsky C: Oligodeoxynucleotides induce brain inflammation when infused intracerebroventricularly. *Neurosci Lett* 322:107-110, 2002.
3. Schöning B, Elepfandt P, Daberkow N, Rupprecht S, Volk HD, Woiciechowsky C: Differences in immune cell invasion into the cerebrospinal fluid and brain parenchyma during infusion of interleukin-1beta. *Neurol Sci* 23:211-218, 2002.
4. Volk HD, Zuckermann H, Kox W, Woiciechowsky C, Hoeflich C, Meisel C, Gruetz G, Döcke WD, Reinke P: **Immune monitoring and strategies for immune modulation**. In Serie: Molecular and Cellular Biology of Critical Care Medicine, Band: Immunology and infectious disease, Ed.: Doughty LA und Linden P, Verlag: Kluwer Academic Publishers, Norwell, S 155-186, 2003.
5. Woiciechowsky C and Volk HD: **Influence of brain-derived cytokines on the immune response**. In Serie: Progress in Inflammation Research, Band: Mind over Matter - Regulation of peripheral inflammation. Ed.: Parnham MJ, Verlag: Birkhäuser AG, S. 19-33, 2003.
6. L. Mutlu and Woiciechowsky C: **Inflammatory response after neurosurgery**. In Best Practice & Research: Clinical Anesthesiology. Ed.: H van Aken, Verlag: Elsevier (in press).

7. Prass, K., C. Meisel, C. Höflich, J. Braun, E. Halle, T. Wolf, K. Ruscher, I. V. Victorov, J. Priller, U. Dirnagl, H.-D. Volk, A. Meisel Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation *J. Exp. Med.* 2003, 5: 725-36

6.2.sonstige Veröffentlichungen der Antragsteller

1. Weller M, Schlegel and Woiciechowsky C: **Neuroonkologie**. In Neurointensivmedizin. Ed.: Schwab, Unterberg A, Werner and Hacke, Verlag : Springer, Heidelberg (in press).
2. Stockhammer F und Woiciechowsky C: Genetik von Hirntumoren. **Brainstorm** 2:14-17, 2002.
3. Kalbhenn Th, Mittelmeier T, Woiciechowsky C: Late neurological deterioration 30 years following conservative treatment of a lower cervical spine fracture – a case report. **Zentralbl Neurochir** 63:77-80, 2002.
4. Woiciechowsky C, Thomale U, Kroppenstedt S: Degenerative spondylolisthesis of the cervical spine - Surgical techniques for reposition and fusion depending on preoperative findings. **Eur J Spine** (in press).
5. Stover JF, Schöning B, Sakowitz OW, Woiciechowsky C, Unterberg AW: Effects of tacrolimus on hemispheric water content and cerebrospinal fluid levels of glutamate, hypoxanthine, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha following controlled cortical impact injury in rats. **J Neurosurg** 94:782-787, 2001.
6. Stover JF, Sakowitz OW, Schoning B, Rupprecht S, Woiciechowsky C, Unterberg AW: Norepinephrine infusion increases interleukin-6 in plasma and cerebrospinalfluid of brain-injured rats. **Med Sci Monit.** 9:BR382-8, 2003.

2001

- Hammer, M. H., Y. Zhai, M. Katori, T. Ritter, H.-D. Volk, A. J. Coito, J. W. Kupiec-Weglinski; Homing of in vitro-generated donor antigen-reactive CD4⁺ T lymphocytes to renal allografts; Is $\alpha_4\beta_1$ but not $\alpha_L\beta_2$; *J. Immunol.* 2001, 166: 596-01
- Schröder, G., M. Hammer, K. Risch, A. Flügel, J. Brock, M. Lehmann, T. Ritter, H.-D. Volk; Visualization of alloantigen-specific, EGFP-engineered T lymphocytes in a rat kidney transplantation model; *Transpl. Proc.* 2001, 33: 607-08
- Welfle, K., R. Misselwitz, R. Sabat, H.-D. Volk, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, H. Wefle; Interaction of a designed interleukin-10 epitope mimic with an antibody studied by isothermal titration microcalorimetry; *J. Mol. Recognit.* 2001, 14: 89-98
- v. Baehr, V., W. Mayer, C. Liebenthal, R. v. Baehr, W. Bieger, H.-D. Volk; Improving the in vitro antigen specific T cell proliferation assay: the use of interferon-alpha to elicit antigen specific stimulation and decrease bystander proliferation; *JIM* 2001, 251: 63-71
- Pleyer, Uwe, H. Dannowski, H.-D. Volk, T. Ritter; Corneal allograft rejection: current understanding; *Ophthalmol.* 2001, 215: 254-62
- Sabat, R., I. Kolleck, W. Wirr, H.-D. Volk, P. Sinha, B. Rüstow; Immunological dysregulation of lung cells in response to vitamin E deficiency; *Free Radic. Biol. & Med.* 2001, 30: 1145-53
- W. Lorenz, B. Stinner, A. Bauhofer, M. Rothmund, I. Celik, A. Fingerhut, M. Koller, R. H.W. Lorijn, P. O. Nyström, H. Sitter, M. Schein, J. S. Solomkin, H. Troidl, J. Wyatt, D. H. Wittmann and Lucerne Group for Consensus-assisted Development of the Study Protocol on Prevention of Abdominal Sepsis: Example G-CSF Granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of postoperative infectious complications and sub-optimal recovery from operation in patients with colorectal cancer and increased preoperative risk (ASA 3 and 4); *Inflamm. Res.* 2001, 50: 187-205
- Goebel, J., K. J. Forrest, J. Mikovits, F. Emmrich, H.-D. Volk, R. P. Lowry; Stat5 pathway: Target of anti-CD4 antibody in attenuation of IL-2 receptor Signaling^{1,2}; *Transplantation* 2001, 71: 792-96
- Volk, H.-D., N. Babel, P. Reinke; Donor or recipient origin of posttransplantation lymphoproliferative disorders: The traces of the Epstein-Barr Virus; *Transplantation* 2001, 72: 361-62

B15 Woiciechowsky/Volk

- Pleyer, U., H. Dannowski, R. Reszka, H.-D. Volk, C. Hartmann, T. Ritter; Genterapie in der Ophthalmologie; Übersicht über Perspektiven und Möglichkeiten für Erkrankungen der Kornea; *Klin. Monatsbl. Augenheilkunde* 2001, 218: 140-47
- Volk, H.-D., F. Kern; What's New – What's Hot; Insights into the specificity and function of (allo)antigen-reactive T cells; *Am. J. Transpl.* 2001, 1: 109-114
- Ke, B., X. D. Shen, J. Melinek, F. Gao, T. Ritter, H.-D. Volk, R.W. Busuttli, J. W. Kupiec-Weglinski; Heme oxygenase-1 gene therapy: A novel immunomodulatory approach in liver Allograft recipients?; *Transpl. Proc.* 2001, 33: 581-82
- Ringers, J., M. Ossevoort, K. Haanstra, R. Kroczeck, H.-D. Volk, M. Jonker; Blockade of CD154 at the time of donor-specific blood transfusion does not improve kidney graft survival in rhesus monkeys; *Transpl. Proc.* 2001, 33: 524
- Risch, K., H. P. Strelbel, R. K. Joshi, J. Lutz, J. Brock, K. Asadullah, H.-D. Volk, M. Lehman; Methylhydrogen fumarate inhibits acute and chronic rejection in rat kidneytransplantation models; *Transpl. Proc.* 2001, 33: 545-46
- Reutzel-Selke, A., S. G. Tullius, T. Zschockelt, M. Nieminen-Kelhä, U. Bachmann, S. Jonas, J. Pratschke, G. Schmidbauer, W. O. Bechstein, H.-D. Volk, P. Neuhaus; Donor pretreatment of grafts from marginal donors improves long-term graft outcome; *Transpl. Proc.* 2001, 33: 970-71
- Tullius, S. G., M. Nieminen-Kelhä, U. Bachmann, A. Reutzel-Selke, S. Jonas, J. Pratschke, W. O. Bechstein, P. Reinke, R. Buelow, P. Neuhaus, H.-D. Volk; Induction of heme-oxygenase-1 prevents ischemia/reperfusion injury and Improves long-term graft outcome in rat renal allografts; *Transpl. Proc.* 2001, 33: 1286-87
- Sabat, R., C. Höflich, W.-D. Döcke, M. Oppert, F. Kern, B. Windrich, C. Rosenberger, J. Kaden, H.-D. Volk, P. Reinke; Massive elevation of procalcitonin plasma levels in the absence of infection in kidney transplant patients treated with pan-T-cell antibodies; *Intensiv. Care Med.* 2001, 27: 987-91
- Asadullah, K., M. Friedrich, S. Hanneken, C. Rohrbach, H. Audring, A. Vergopoulos, M. Ebeling, W.-D. Döcke, H.-D. Volk, W. Sterry; Effects of Systemic Interleukin-10 therapy on psoriatic skin lesions: Histologic, immunohistologic, and molecular biology findings; *J. Invest. Dermatol.* 2001, 11: 721-27
- Volk, H.-D., K. Asadullah, G. Gallagher, R. Sabat, G. Grütz; IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic agents; *Trends Immunol.* 2001, 22: 414-17
- Zhai, Y., J. Li, M. Hammer, R. W. Busuttli, H.-D. Volk, J. W. Kupiec-Weglinski; Evidence of T cell clonality in the infectious tolerance pathway: Implications toward Identification of regulatory T cells; *Transplantation* 2001, 71: 1701-08
- Babel, N., F. Schwarzmann, N. Prang, M. Jäger, H. Wolf, F. Kern, H.-D. Volk, P. Reinke; Association between Epstein-Barr-virus infection and late acute transplant rejection in long-term transplant patients 1; *Transplantation* 2001, 72: 736-38
- Büttnerova, I., H. Baumler, F. Kern, H. Radtke, H.-D. Volk, H. Kiesewetter, W.-D. Döcke; Release of WBC-derived IL-1 receptor antagonist into supernatants of RBCs: influence of storage time and filtration; *Transfus.* 2001, 41: 67-73
- Lüdemann, J., K. L. Schulte, O. Hader, S. Brehme, H.-D. Volk, W.-D. Döcke; Leukocyte/endothelium activation and interactions during femoral percutaneous transluminal angioplasty; *Vasc. Surg.* 2001, 35: 293 –01
- Nickel, P., J. Lacha, S. Ode Hakim, B. Sawitzki, N. Babel, U. Frei, H.-D. Volk, P. Reinke; Cytotoxic effector molecule gene expression in acute renal allograft rejection: correlation with clinical outcome; histopathology and function of the allograft; *Transplantation* 2001, 72: 1158-60
- Reinke, P., N. Babel, S. Prösch, F. Kern, H.-D. Volk; Bedrohung für Transplantatempfänger durch CMV: Diagnostik, Therapie und Prophylaxe; *Dialyse* 2001, 5: 16-8
- Sawitzki, B., M. Lehmann, T. Ritter, E. Graser, J. W. Kupiec-Weglinski, H.-D. Volk; Regulatory tolerance-mediating T cells in transplantation tolerance; *Transpl. Proc.* 2001, 33: 2092-3
- Jacobi, J.M., W. Rohde, H.-D. Volk, T. Dörner, G. R. Burmester, F. Hiepe; Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls; *Ann. Rheum. Dis.* 2001, 60: 242-7

- Pratschke, J., G. Kofla, M. J. Wilhelm, A. Vergopoulos, I. Laskowski, G. D. Shaw, S. G. Tullius, H.-D. Volk, P. Neuhaus, N. L. Tilney; Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor; *Ann. Surg.* 2001, 234: 732-40
- Tullius, S. G., H.-D. Volk, P. Neuhaus; Transplantation of organs from marginal donors¹; *Transplantation* 2001, 72: 1341-9
- Zhai Y., X. D. Shen, M. Lehmann, R. Busuttill, H.-D. Volk, J. W. Kupiec-Weglinski; T cell subsets and in vitro immune regulation in „infectious“ transplantation tolerance; *J. Immunol.* 2001, 167: 4814-20
- Prösch, S., A. K. Heine, H.-D. Volk, D. H. Krüger; CCAAT/Enhancer-binding proteins alpha and beta negatively influence the capacity of tumor necrosis factor alpha to up-regulate the human cytomegalovirus IE1/2 enhancer/promoter by nuclear factor kappa B during monocyte differentiation; *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 4712-20
- Buehlow, R., S. G. Tullius, H.-D. Volk; What's New – What's Hot in Basic Science?; Protection of grafts by hemoxygenase-1 and its toxic product carbon monoxide; *Am. J. of Transpl.* 2001, 1: 313-15
- Volk, H.-D., B. Sawitzki, P. Reinke, M. Lehmann; Toleranzinduktion – Mechanismen und mögliche Anwendungen am Menschen; *Dialyse aktuell* 2001; 5. Jahrg.: 6-9
- Volk, T., M. Schmutzler, L. Engelhardt, W.-D. Döcke, H.-D. Volk, W. Konertz, W. J. Kox; Influence of aminosteriod and glucocorticoid treatment on inflammation and Immune function during cardiopulmonary bypass; *Crit. Care Med.* 2001, 29: 2137–42
- Tullius, S. G., Reutzel-Selke, A., Bachmann, U., Jurisch, A., Nieminen-Kelha, M., Pratschke, J., Jonas, S., Steinmüller, T., Volk, H.-D., Neuhaus, P.; Influence of recipient and donor age on long-term renal allograft function in an experimental model; *Transplantation* 2001, 33: 3345–46
- Tullius, S. G., Reutzel-Selke, A., Nieminen-Kelha, M., Jonas, S., Pratschke, J., Bechstein, W. O., Neuhaus, P., Volk, H.-D.; Tolerance induction by the graft itself; *Transplantation* 2001, 33: 2317–18

2002

- Asadullah, K., H.-D. Volk, W. Sterry; Novel immunotherapie for psoriasis; *Trends Immunol.* 2002, 23: 47-53
- Hammer, M. H., G. Schröder, K. Risch, A. Flügel, H.-D. Volk, M. Lehmann, T. Ritter; Antigen-dependent transgene expression in kidney transplantation: A novel approach using gene-engineered T lymphocytes; *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13: 511-18
- Ringer, J., K. G. Haanstra, R. A. Kroczeck, K. Kliem, E. M. Kuhn, J. Wubben, M. A. Ossevoort, H.-D. Volk, M. Jonker; blockade of CD40-CD154 at the time of donor-specific blood transfusion does not lead to prolonged kidney allograft survival in nonhuman primates; *Transplantation* 2002, 73: 862-66
- Sawitzki, B., M. Lehmann, K. Vogt, K. Risch, J. Brock, J. W. Kupiec-Weglinski, H.-D. Volk; Bag-1 up-regulation in anti-CD4 mAb treated allo-activated T cells confers resistance to apoptosis; *Eur. J. Immunol.* 2002, 3: 800-9
- Friedrich, M., W.-D. Döcke, A. Klein, S. Philipp, H.-D. Volk, W. Sterry, K. Asadullah; Immunomodulation by Interleukin-10 therapy decreases the incidence of relapse and prolongs the relapse-free interval in Psoriasis; *J. Invest. Dermatol.* 2002, 118: 672-77
- Amersi, F., X. D. Shen, D. Anselmo, J. Melinek, S. Iyer, D. J. Southard, M. Katori, H.-D. Volk, R. W. Busuttill, R. Buelow, J. W. Kupiec-Weglinski; Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway; *Hepatology* 2002, 35: 815-23
- Neininger, A., D. Kontoyianist, A. Kotlyarov, R. Winzen, R. Eckert, H.-D. Volk, H. Holtmann, G. Kollias, M. Gaestel; MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels; *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 3065-68
- Ritter, T., M. Lehmann, H.-D. Volk; Improvements in Gene Therapy; Averting the immune response to adenoviral vectors; *Gene Ther. Biodrugs* 2002, 16: 3-10
- Coito, A.J., Bülow, R., Shen, X. D., Amersi, F., Moore, C., Volk, H.-D., Busuttill, R. W., Kupiec-Weglinski, J. W.; Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury; *Transplantation* 2002, 74: 96-102
- Ke, B., Bülow, R., Shen, X. D., Melinik, J., Amersi, F., Gao, F., Ritter, T., Volk, H.-D., Busuttill R. W., Kupiec-Weglinski, J. W.; Heme oxygenase via carbon monoxide signaling pathway; *Hum. Gene Therap.* 2002, 13: 1189–99

B15 Woiciechowsky/Volk

- Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N., Kiecker, F., Khatamzas, E., Rudawski, I. M., Pruss, A., Gratama, J. W., Volkmert-Engert, R., Ewert, R., Reinke, P., Volk, H.-D., Picker, L. J.; Cytomegalovirus (CMV) Phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-Exposed individuals; *J. Infect. Dis.* 2002, 185: 1709–16
- Mhashikar, A. M., Doebis C., Seifert, M., Busch, A., Zani, C., Soo Hoo, J., Nagy, M., Ritter, T., Volk, H.-D., Marasco, W. A.; Intrabody-mediated phenotypic knockout of major histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and in primary human keratinocytes; *Gene Ther.* 2002, 9: 307–19
- Ordemann, J., Jacobi, C. A., Braumann, C., Schwenk, W., Volk, H.-D., Müller, J.M.; Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer; *Int. J. Colorectal Dis.* 2002, 17 : 37 – 41
- Sinha, P., Kolleck, I., Volk, H.-D., Schlame, M., Rüstow, B.; Vitamin E deficiency sensitizes alveolar type II cells for apoptosis; *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1583: 91- 98
- Doebis, C., T. Ritter, C. Brandt, B. Schönberger, H.-D. Volk, M. Seifert; Efficient in vitro transduction of epithelial cells and keratinocytes with improved adenoviral gene transfer for the application in skin tissue engineering; *Transpl. Immunol.* 2002, 9: 323–29
- Volk, H.-D.; Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection; *Crit. Care* 2002, 6: 279–81
- Sawitzki, B., M. Lehmann, K. Vogt, M. Seifert, K. Risch, J. Brock, J. W. Kupiec- Weglinski, H.-D. Volk; Bag-1 up-regulation in anti-CD4 mAb-treated allo-activation T cell confers resistance to activation-induced cell death (AICD); *Transpl. Immunol.* 2002, 9: 83 - 91
- Ke, B., X.-D. Shen, R. Buelow, J. Melinek, F. Amersi, F. Gao, T. Ritter, H.-D. Volk, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski; Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/FasL-Mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway; *Transpl. Proc.* 2002, 34: 1465-66
- Sawitzki, B., F. Amersi, T. Ritter, M. Fisser, X.D. Shen, B. Ke, R. Busuttil, H.-D. Volk, J. W. Kupiec-Weglinski; Upregulation of Bag-1 by ex vivo gene transfer protects rat livers from ischemia/reperfusion injury; *Hum. Gene Ther.* 2002, 13: 1495-04
- Asadullah, K., W. Sterry, H.-D. Volk; Analysis of cytokine expression in dermatology; *Arch. Dermatol.* 2002, 138: 1189-96
- Seifert, M., B. H. Gruenberg, R. Sabat, P. Donner, G. Grütz, H.-D. Volk, K. Wolk, K. Asadullah; Keratinocyte unresponsiveness towards interleukin-10: lack of specific Binding due to deficient IL-10 receptor 1 expression; *Exp. Derm.* 2002, 11: 46–57
- Asadullah, K., H.-D. Volk, M. Friedrich, W. Sterry; Experimental therapies for Psoriasis; *Archiv. Immunol. Therap. Exp.* 2002, 50: 411 – 20
- Tullius, S. G., M. Nieminen-Kelhä, R. Bühlow, A., A. Reutzel-Selke, P. N. Martins, J. Pratschke, U. Bachmann, M. Lehmann, D. Southard, S. Iyer, G. Schmidbauer, B. Sawitzki, P. Reinke, P. Neuhaus, H.-D. Volk; Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1; *Transplantation* 2002, 74: 591 –98
- Lehmann, M., K. Risch, H. Nizze, J. Lutz, U. Heemann, H.-D. Volk, K. Asadullah; Fumaric acid esters are potent immunosuppressants: inhibition of acute and chronic rejection in rat kidney transplantation models by methyl hydrogen fumarate; *Arch. Dermatol. Res.* 2002, 294: 399–04
- Prösch, S., R. Wuttke, D. H. Krüger, H.-D. Volk; NF-κB-A potential therapeutic target for inhibition of human cytomegalovirus (Re)activation?; *Biol. Chem.* 2002, 383: 1601–09
- Savoldo, B., M.H. Huls, Z. Liu, T. Okamura, H.-D. Volk, P. Reinke, N. Babel, J. F. Jones, J. Webster-Cyriaque, A. P. Gee, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney; Autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for the treatment of persistent active EBV-infection; *Blood* 2002, 12: 4059–66
- Laske, N., H.-D. Volk, C. Liebenthal, C.Grüber, S. Lau, C.Sommerfeld, R. Nickel, U. Wahn; Infantile natural immunization to herpes group viruses is unrelated to the development of asthma and atopic phenotypes in childhood; *JCAD* 2002, 110: 811–13

- Amersi, F., D. G. Farmer, G. D. Shaw, H. Kato, A. J. Coito, F. Kaldas, D. Zhao, C. R. Lassmann, J. Melinek, J. Ma, H.-D. Volk, J. W. Kupiec-Weglinski, R. W. Busuttil; P-selection glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig)-mediated blockade of CD62 selectin molecules protects rat steatotic liver grafts from ischemia/reperfusion injury; *Am. J. Transpl.* 2002, 7: 600–08
- von Haehling, S., S. Genth-Zotz, S.D. Anker, H.-D. Volk; Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism.; *Int. J. Cardiol.* 2002, 85: 173 – 83
- Filantenkov, A., H. Schmidt, A. Reutzel-Selke, M. Seifert, C. Doebis, A. Jurisch, J. Pratschke, P. Neuhaus, H.-D. Volk, S. G. Tullius; Initial organ engraftment with a short-term low-dose CyA treatment induces tolerance for consecutive grafts in a model of strong histoincompatibility; *Transplant Proc.* 2002, 34: 2895-96
- Schmidt, H., A. Filantenkov, A. Reutzel-Selke, M. Seifert, C. Doebis, A. Jurisch, J. Pratschke, P. Neuhaus, S.G. Tullius, H.-D. Volk; Adoptive transfer of regulatory T cells following chronic allograft rejection induces tolerance for secondary allografts; *Transplant Proc.* 2002, 34: 2893-94
- Höflich, C., H.-D. Volk; Immunomodulation in sepsis; *Chirurg.* 2002, 73: 1100-14
- Ke, B., X. D. Shen, Y. Zhai, F. Gao, R. W. Busuttil, H.-D. Volk, J. W. Kupiec-Weglinski; Heme oxygenase 1 mediates the immunomodulatory and antiapoptotic effects of interleukin 13 gene therapy in vivo and in vitro; *Hum. Gene Ther.* 2002, 10: 1845-57
- Reinke, P., M. Bevilacqua, V. Thyron, J. Cheronis, H.-D. Volk; Immune monitoring of glucocorticoid therapy; *Ernst Schering Res Found Workshop* 2002, 40: 25-37
- Tullius, S. G., U. Bachmann, C. Heidenhain, A. Reutzel-Selke, A. Jurisch, A. Filantenkov, J. Pratschke, S. Jonas, T. Steinmüller, H.-D. Volk; Early cellular markers for the prediction of chronic graft deterioration in retransplantation model; *Transplant Proc.* 2002, 34: 2357-58
- Pratschke, J., G. Kofla, M. Wilhelm, A. Vergopoulos, I. Laskowski, G. D. Shaw, S. G. Tullius, H.-D. Volk, P. Neuhaus, N. L. Tilney; Improvements in early behaviour of kidney allografts after donor treatment; *Transplant Proc.* 2002, 34: 2213-14
- Ke, B., X. D. Shen, R. Buelow, J. Melinek, F. Amersi, F. Gao, T. Ritter, H.-D. Volk, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski; Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/FasL-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway.; *Transplant Proc.* 2002, 34: 1465-66
- 2003**
- Yang, J., A. Reutzel-Selke, C. Steier, A. Jurisch, S. G. Tullius, B. Sawitzki, J. Kolls, H.-D. Volk, T. Ritter; Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression of IFN- γ accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model; *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, 14: 214-225
- Seifert, M., B. H. Grünberg, R. Sabat, P. Donner, G. Grütz, H.-D. Volk, K. Wolk, K. Asadullah; Keratinocyte unresponsiveness towards interleukin-10: lack of specific binding due to deficient IL-10 receptor 1 expression; *Exp. Derm.* 2003, 12: 137–44
- Nüssler, N. C., A. R. Müller, H. Weidenbach, A. Vergopoulos, K. P. Platz, H.-D. Volk, P. Neuhaus, A. K. Nüssler; IL-10 increases tissue injury after selective intestinal ischemia/reperfusion; *Annals Surg.* 2003, 238: 49-58
- Hoffmeister, B., F. Kiecker, I. Surel, E. Khatamzas, V. Schuster, H.-D. Volk, F. Kern; Evaluation of the frequency of virus-specific CD8+ T cells by cytokine flow cytometry; *Meth. Mol. Biol.* 2003, 215: 59–69
- Wolk, K., S. Kunz, N.E. Crompton, H.-D. Volk, R. Sabat; Multiple mechanisms of reduced MHC class II expression in endotoxin tolerance.; *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 18030-36
- L. Tesfa, H.-D. Volk, F. Kern; Comparison of proliferation and rapid cytokine induction assays for flow cytometric T-cell epitope mapping.; *Cytometry* 2003, 52 A: 36–45
- Hoffmeister, B., F. Kiecker, L. Tesfa, H.-D. Volk, L. J. Picker, F. Kern; Mapping T cell epitopes by flow cytometry; *Meth.* 2003, 29: 270–81
- Asadullah, K., W. Sterry, H.-D. Volk; Interleukin –10 therapy – Review of a new approach; *Pharmacol. Rev.* 2003, 55: 241–69

B15 Woiciechowsky/Volk

- Muthukumar, T., R. Ding, D. Dadhania, M. Medeiros, B. Li, V. K. Sharma, C. Hartono, D. Serur, S. V.Seshan, H.-D. Volk, P. Reinke, S. Kapur, M. Suthanthiran; Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts; *Transplantation* 2003, 75: 1565-70
- Strohmeier, J.-C., C. Blume, C. Meisel, W.-D. Döcke, M. Hummel, C. Hoeflich, K. Thiele, A. Unbehauen, R. Hetzer, H.-D. Volk; Standardized immune monitoring for the prediction of infections After cardiopulmonary bypass surgery in risk patients; *Cytometry* 2003, 53 B: 54–62
- W.-D. Döcke, C. Kiessling, M. Worm, M. Friedrich, A. Pruss, M. Weitz, S. Prösch, F. Kern, H.-D. Volk, W. Sterry, K. Asadullah; Clinical and Laboratory Investigations; Subclinical activation of latent cytomegalovirus (CMV) infection and anti-CMV immune response in patients with atopic dermatitis; *J. Dermatol.* 2003, 148: 954–63
- Schröder, M., C. Meisel, K. Buhl, N. Profanter, N. Sievert, H.-D. Volk, G. Grütz; Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit Cytokine-dependent IFN-gamma production: Consequences for reversal of lipopolysaccharide Desensitization; *J. Immunol.* 2003, 170: 5260-67
- Keh, D., T. Boehnke, T., S. Weber-Carstens, C. Schulz, O. Ahlers, S. Bercker, H.-D. Volk, W.-D. Döcke; Immunologic and hemodynamic effects of „low-dose“ hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study.; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 167: 512 – 20
- Reutzel-Selke A., T. Zschockelt, C. Denecke, U. Bachmann, A. Jurisch, J. Pratschke, G. Schmidbauer, H.-D. Volk, P. Neuhaus, S. G. Tullius; Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of ischemia/reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors; *Transplantation* 2003, 75: 1786–92
- Wandinger, K.-P., J. D. Lünemann, O. Wengert, J. Bellmann-Strobl, O. Aktas, A. Weber, E. Grundström, S. Ehrlich, K.-D. Wernecke, H.-D. Volk, F. Zipp; TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis; *Lancet* 2003, 361: 2036–43
- Weber, O., A. Siegling, A. Friebe, A. Limmer, T. Schlapp, P. Knolle, A. Mercer, H. Schaller, H.-D. Volk; Inactivated parapoxvirus ovis (*Orf virus*) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus; *J. Gen. Virol.* 2003, 84: 1843–52
- Wagener, F. A., H.-D. Volk, D. Willis, N. G. Abraham, M. P. Soares, G. J. Adema., C. G. Figdor; Different faces of the Heme-Heme Oxygenase system in inflammation; *Pharmacol. Rev.* 2003, 55: 551-71
- Pascher, A., C. Radke, A. Dignass, R. J. Schulz, W. Veltzke-Schlieker, A. Adler, I. M. Sauer, K. Platz, J. Klupp, H.-D. Volk, P. Neuhaus, A. R. Mueller; Successful infliximab treatment of steroid and OKT3 refractory acute cellular rejection in two patients after intestinal transplantation; *Transplantation* 2003, 76: 615–18
- Wagener, F. A. D, H.-D. Volk, D. Willis, N. G. Abraham, M.P. Soares G. J. Adema, C. G. Figdor; Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation; *Pharm. Rev.* 2003, 55: 551–71
- Ritter, T., H.-D. Volk; Gentherapie in der Transplantation. Experimentelle Ansätze zum Transfer anti-inflammatorischer und zytoprotektiver Gene zur Transplantaterhaltung; *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2003, 128: 1711 - 14
- Heidenhain, C., A. Reutzel-Selke, U. Bachmann, S. Jonas, A. Pascher, F. Ulrich, J. Pratschke, P. Neuhaus, H.-D. Volk, S. G. Tullius; The impact of immune-activating process following transplantation on chronic allograft nephropathy; *Kidney Intern.* 2003, 64: 1125-33
- Pascher, A., A. Reutzel-Selke, A. Jurisch, U. Bachmann, C. Heidenhain, P. Nickel, P. Reinke, C. Brandt, J. Pratschke, U. Frei, P. Neuhaus, H.-D. Volk, S. G. Tullius; Alterations of the immune response with increasing recipient age are associated with reduced long-term organ graft function of rat kidney allografts; *Transplantation* 2003, 76: 1560-68
- Westerholt, S., A.-K. Pieper, M. Griebel, H.-D. Volk, T. Hartung, R. Oberhoffer; Characterization of the cytokine immune response in children who have experienced an episode of typical hemolytic-uremic syndrome; *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003, 10: 1090-95
- Sass, G., M.C. P. Soares, K. Yamashita, S. Seyfried, W.-H. Zimmermann, T. Eschenhagen, E. Kaczmarek, T. Ritter, H.-D. Volk, G. Tiegs; Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice; *Hepatology* 2003, 38: 909-18

- Hoffmeister, B., T. Bunde, I. M. Rudawsky, H.-D. Volk, F. Kern; Detection of antigen-specific T cells by cytokine flow cytometry: the use whole blood may underestimate frequencies; *Eur. J. Immunol.* 2003, 33: 3484-92
- Shi, Y., A. Kotlyarov, K. Laabeta, A. D. Gruber, E. Butt, K. Marcus, H. E. Meyer, A. Friedrich, H.-D. Volk, M. Gaestel; Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination; *Mol. Cell. Biol.* 2003, 23: 7732-41
- Hareng, L., T. Meergans, S. von Aulock, H.-D. Volk, T. Hartung; Cyclic AMP increases endogenous granulocyte colony-stimulating factors formation in monocytes and THP-1 macrophages despite attenuated THF alpha formation; *Eur. J. Immunol.* 2003, 33: 2287-96
- Laske, N., F. Kern, R. Nickel, U. Wahn, H.-D. Volk; No difference in type 1 T-cell immune responses to human cytomegalovirus antigens between atopic children and nonatopic children; *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 112: 210-12
- Sharma, R., A. P. Bolger, W. Li, P. A. Davlouros, H.-D. Volk, P. A. Poole-Wilson, A. J. Coats, M. A. Gatzoulis, S. D. Anker; Elevated circulating levels of inflammatory cytokines and bacterial endotoxin in adults with congenital Heart disease; *Am. J. Cardiol.* 2003, 15: 188-93

2004

- Meisel, C., K. Prass, J. Braun, I. Victorov, T. Wolf, D. Megow, E. Halle, H.-D. Volk, U. Dirnagl, A. Meisel; Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological Outcome in a mouse model of stroke; *Stroke* 2004, 35: 2-6
- Höflich, C., R. Sabat, S. Rosseau, B. Temmesfeld, H. Slevogt, W. D. Döcke, G. Grütz, C. Meisel, E. Halle, U. B. Göbel, H.-D. Volk, N. Suttrop; Naturally occurring anti-IFN-(gamma) autoantibody and severe infection with mycobacterium chelonae and Burkholderia cocovenenans; *Blood* 2004, 103: 673-75
- Kawakami, N., S. Lassmann, Z. Li, F. Odoardi, T. Ritter, T. Ziemssen, W. E. Klinkert, J. W. Ellwart, M. Brandl, K. Krivacic, H. Lassmann, R. M Ransohoff, H.-D. Volk, H. Wekerle, C. Linington, A. Flügel; The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis; *J. Exp. Med.* 2004, 199: 185-97
- Pratschke, J., D. Paz, M. J. Wilhelm, I. Laskowski, G. Kofla, A. Vergopoulos, H. J. Mac Kenzie, S. G. Tullius, P. Neuhaus, W. W. Hancock, H.-D. Volk; Donor hypertension increases graft immunogenicity and intensifies chronic changes in long-surviving renal allografts; *Transplantation* 2004, 77: 43-48

PROJEKTBEREICH B
Neurodegeneration und Tumore
(Projektbereichsleiter: Prof. Dr. H. Kettenmann)

- C3** Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse
Heinemann
- C6** Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone: Signalwege oxidativ modifizierter Lipide
Ullrich
- C7** Physiologische Mechanismen der Lysophospholipid-vermittelten Aktivierung von Mikrogliazellen
Eder
- C8** Physiologische Eigenschaften glialer Tumore
Kettenmann
- C9** Molekulare Mechanismen der Invasion von Gliomzellen
von Deimling

Der Projektteil hat zwei thematische Schwerpunkte, zum einen die Bedeutung der Aktivierung von Mikrogliazellen für pathologische Veränderungen und zum anderen die Untersuchung zu zellbiologischen Eigenschaften von Gliomzellen. Im Projekt C3 zeigt sich die Bedeutung der Mikrogliazellen für die Pathogenese der Epilepsie. Es wird klar, dass es bei epileptischen Anfällen zu einer Bildung freier Sauerstoffradikale kommt, die die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigen. Die neuen Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass im chronisch-epileptischen Gewebe eine schwere mitochondriale Dysfunktion vorliegt. Das Projekt C6 konnte zeigen, dass mikrogliale Aktivierung bei inflammatorischen Erkrankungen 7-Ketocholesterol freisetzt, das einen inflammatorischen Schaden hervorruft. Diese Freisetzung korreliert mit einem erhöhten Spiegel von 7-Ketocholesterol im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose und scheint auch bei anderen Erkrankungen mit immunologischer Komponente eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Inhibition des Ketocholesterol induziert Aktivierung der Mikroglia und führt zu einem reduzierten neuronalen Schaden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mikrogliazellen durch ihr Aktivierungsprogramm sehr stark in pathologische Prozesse eingreifen. Im Projekt C7 steht ebenfalls die Mikrogliazelle im Zentrum der Untersuchung. In diesem Antrag wurde der Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Mikrogliazellen durch Lysophospholipide untersucht. Diese Zellen werden durch diese Substanzen aktiviert, und die Aktivierung geht mit einer Aktivierung von Ionenkanälen einher. Dabei zeigt es sich, dass die Aktivität der Ionenkanäle für die Zustandsveränderung der Zellen notwendig ist. Durch Inhibition und selektive Kationenkanäle konnten die morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen beeinflusst werden, die mit Aktivierungsparametern korrelieren. Diese Untersuchungen zeigen aber auch, über welche hochkomplexen und multiplen Signalwege die Zustandsveränderungen der Mikrogliazellen kontrolliert werden. Diese komplexen Regulationsmechanismen garantieren, daß eine überschießende Mikrogliaaktivierung normalerweise nicht stattfindet, denn sie stellt ein grosses Schadenspotential für neuronales Gewebe dar.

Die beiden Projekte, die sich mit den zellbiologischen Eigenschaften von Gliomzellen beschäftigen, haben nach Faktoren gesucht, die das Migrationsverhalten der Tumorzellen beeinflussen. Gerade die Tumordinfiltration im Nervensystem stellt eines der größten klinischen Probleme dieses Krankheitsbildes dar, da Gliomzellen das Gehirngewebe diffus penetrieren und damit nicht vollständig durch chirurgische Eingriffe zu entfernen sind.

C

Im Projekt C8 konnte gezeigt werden, dass der bei Brustkrebs bekannte Transkriptionsfaktor ETS1 eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Mikrogliawanderung spielt. In Interaktion mit dem Projekt C9 wurde ein Schnittmodell aufgebaut, das es erlaubte, die Tumorwanderung über mehrere Tage hinweg zu studieren und dabei auch zu beeinflussen. In dieser Kooperation wurde eine differentielle Genanalyse zwischen stark und wenig motilen Gliomzellen durchgeführt. Eines der zur Zeit untersuchten Kandidatengene kodiert für Ferritin. Zudem zeigte sich, dass die Anwesenheit von Mikrogliazellen Tumorwanderung positiv beeinflusst. Ein weiterer interessanter Befund ergab sich aus der Beobachtung, dass Gliomzellen neurale Stammzellen anlocken und diese den Tumor umhüllen. Die neuronalen Stammzellen wirken dabei blockierend auf das Tumorstadium und antagonisieren daher die Wirkung der Mikrogliazellen. Durch die Verlagerung des Projektes C9 in eine onkologische Förderinitiative wird das Thema Gliombiologie in der nachfolgenden Antragsperiode nicht mehr weitergeführt. Der SFB schärft damit sein Profil, in dem er sich auf „normale“ Gliazellen des zentralen Nervensystems konzentriert.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB507/C3 2002-2004

Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse

Leiter: Prof. Dr. med. Uwe Heinemann, 17.02.1944, C4

Dienstanschrift: **Johannes-Müller-Institut für Physiologie,**
AG Zelluläre Neurophysiologie und Pathophysiologie,
Universitätsklinikum Charité, Humboldt Universität,
Tucholskystrasse 2, 10117 Berlin

Tel.: (030) 450-528 152

Fax: (030) 450-528 962

e-mail: uwe.heinemann@charite.de

Mitarbeiter: Dr. med. Siegrun Gabriel
Dr. med. Oliver Kann
Petra Rook

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragsstellung und Ausgangsfragen

Pharmakoresistente Epilepsien sind zumeist Temporallappenepilepsien (TLE), die häufig durch eine Ammonshornsklerose (AHS) mit weitreichenden Nervenzellverlusten und einer fibrillären Astroglieose besonders in den Regionen CA1, CA3 und CA4 (Hilus) sowie in den mittleren Schichten des medialen entorhinalen Kortex gekennzeichnet sind (Wolf und Wiestler, 1993). Als Ursachen der TLE mit AHS werden komplizierte Fieberkrämpfe oder ein langanhaltender Status epilepticus angeführt. Auch Enzephalitiden und hypoxische Schädigungen des Hippocampus werden als Ursache diskutiert (Blümcke et al., 2002). Tatsächlich entwickeln Nager nach einem Status epilepticus, ausgelöst z.B. durch Pilocarpin, Kainat oder langanhaltende, repetitive elektrische Stimulation des Tractus perforans oder der Amygdala sowohl eine TLE als auch eine AHS (Cavalheiro, 1995).

Die Minderheit der Patienten mit TLE ist durch das Fehlen einer AHS (nAHS) gekennzeichnet. Hierbei werden Tumore und Fehlbildungen für die Epileptogenese verantwortlich gemacht (Wolf und Wiestler, 1993). Zwar treten in diesem Gewebe mit der Dauer der Erkrankung zunehmend Zellverluste auf. Es stehen jedoch bei der nAHS-TLE funktionelle Veränderungen im Gewebeverbund im Vordergrund, die transient oder persistierend sein können.

Zum Verständnis der Mechanismen, die zur AHS führen, ist es notwendig, sich mit den Prozessen auseinanderzusetzen, die einerseits zur Erregbarkeitssteigerung neuronalen Gewebes und damit zur Absenkung der Schwelle für epileptische Anfälle führen und die andererseits zelluläre Schädigungen bewirken.

1. Eine erhöhte Erregbarkeitssteigerung neuronalen Gewebes könnte durch veränderte Eigenschaften von Astrozyten zustande kommen.
2. Neuronale Zellschädigungen durch wiederholte epileptische Anfälle/Status epilepticus könnten durch eine vermehrte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und freien Sauerstoffradikalen (ROS) hervorgerufen werden.

1.1 Veränderte Eigenschaften von Astrozyten

Es gibt einige Hinweise, daß Astrozyteneigenschaften in AHS-Gewebe oder nach Läsionen verändert sind (Bordey und Sontheimer, 1998; Hinterkeuser et al., 2000). Viele Zellen weisen einen erhöhten Eingangs-

C3 Heinemann

widerstand sowie eine Herabregulation von K^+ -Einwärtsgleichrichtern auf, wahrscheinlich des Kir 4.1 Typs und der adjunkten Kir 6 Untereinheit (Steinhäuser et al., 2000). Diese Änderungen könnten mit einem Verlust oder einer Reduktion der Fähigkeit zur Aufnahme von extrazellulärem K^+ einhergehen, das während neuronaler Aktivität von 3 mM auf bis zu 12 mM akkumulieren kann (Heinemann und Lux, 1977). Zur Zeit werden fünf Mechanismen diskutiert, die an diesen Prozessen beteiligt sein könnten: ein Furosemid-sensitiver KCl Transport (Walz und Hertz, 1984), ein DIDS-sensitiver KCl Transport (Walz und Wuttke, 1999), die Aktivierung einer glialen Na^+K^+ -ATPase (Griesar et al., 1978), Umverteilung durch Diffusion und die räumliche Umverteilung von K^+ durch Astrozyten (Coles und Orkand 1983). Der zuletzt genannte Mechanismus ist besonders effizient, wenn es zu lokaler K^+ -Erhöhung kommt. Räumlich ausgedehnte Gliazellen bzw. über gap-junctions gekoppelte Astrozyten werden durch die K^+ -Akkumulation depolarisiert. Die lokale Depolarisation dissipiert im Syncytium und ist deshalb kleiner als die durch die K^+ -Akkumulation bedingte Veränderung des K^+ -Gleichgewichtspotentials. Damit entsteht eine treibende Kraft für die K^+ -Aufnahme in die Gliazellen. An entfernten Orten ist das Syncytium ebenfalls depolarisiert, obwohl dort das K^+ nicht primär erhöht ist. Es entsteht eine treibende Kraft für eine K^+ -Freisetzung. Diese Prozesse sind mit der Genese negativer Feldpotenziale am Ort großer K^+ -Akkumulation und mit der Genese positiver Potenziale am Ort der K^+ -Freisetzung assoziiert (Dietzel und Heinemann, 1986). K^+ -Aufnahme und -umverteilung durch Gliazellen verläuft sehr schnell und effizient, und eine Störung dieses Mechanismus hätte massive prokonvulsive Auswirkungen auf neuronales Gewebe, da große K^+ -Akkumulation im Extrazellulärraum die neuronale Erregbarkeit steigert und epileptische Anfälle auszulösen vermag (Traynelis und Dingledine, 1988; Schweitzer et al., 1992). Neben einwärtsgerichtenden K^+ -Kanälen sind wahrscheinlich auch Hintergrundleitfähigkeiten beteiligt, die das Ruhemembranpotential von Zellen regulieren. Die K^+ -Leitfähigkeit in Ruhe wird besonders von ‚two pore domain‘ K^+ -Kanälen bestimmt, die spannungsabhängig sind, eine nur geringe Rektifizierung aufweisen und nicht inaktivieren (Lesage und Lazdunski, 2000). Im Gehirn sind bisher KCNK 1-4, 9 und 13 nachgewiesen worden, die unterschiedlich verteilt sind (Kindler et al., 2000; Medhurst et al., 2001) und sich pharmakologisch durch ihre Sensitivität gegenüber Ba^{2+} , TEA, Quinin, Quinidin, Zn^{2+} , Na^+ , Dinitrophenol und pH unterscheiden. Ein Teil der Kanäle kann durch Arachidonsäure sowie verschiedene ungesättigte Fettsäuren reguliert werden. Einige der Leitfähigkeiten sprechen auch auf volatile Anästhetika an. Damit steht ein reichhaltiges pharmakologisches Instrumentarium zur Verfügung, mit dem zumindest ‚educated guesses‘ zur Beteiligung dieser K^+ -Kanäle an der Regulation des Ruhemembranpotentials und der Pufferkapazität für K^+ getestet werden können.

Gliazellen spielen darüber hinaus in der Bereitstellung von Glutamin und Cystein eine große Rolle für Nervenzellen (Bender et al., 2000). Diese Aminosäuren werden den Neuronen zur Synthese von Glutamat und Gluthation zur Verfügung gestellt. Sie haben daneben die Funktion, die ambienten Spiegel von Glutamat und GABA sowie anderer Neurotransmitter zu regeln. Für Glutamat gibt es zwei prinzipielle Aufnahmesysteme: die Na^+ -abhängigen Glutamatttransporter EAAT 1-5 (Tanaka, 2000) sowie die Austauscher für saure Aminosäuren. Einer dieser Austauscher, der Cystin-Glutamat-Antiporter, ist sensitiv für α -Aminoadipat (Reichelt et al., 1997), während für die Na^+ -abhängigen Transporter kompetitive und nicht-kompetitive Hemmsubstanzen zur Verfügung stehen (Bridges et al., 1999). Allerdings haben einige dieser Substanzen auch Wirkungen auf metabotrope Rezeptoren (*L-trans*-2,4-PDC) oder ionotrope Glutamatrezeptoren (Dihydrokainat). Eine sehr wirksame Substanz ist DL-TBOA, das wenig unspezifische Wirkung aufweist (Shimamoto et al., 1998). Diese Veränderungen im Expressionsmuster könnten Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit bedingen. Ihre Bedeutung für die Epileptogenese ist weitgehend ungeklärt.

1.2 Mitochondrialer Metabolismus und neuronale Zellschädigung durch Bildung von NO und ROS

Ursprünglich wurde angenommen, daß Zellschäden durch Energiemangel infolge einer Ischämie entstehen. Damit ist zunächst jedoch der Befund schwer vereinbar, daß während eines epileptischen Anfalls der zerebrale Blutfluß stark zunimmt, und erst bei Anfallserien oder im Status epilepticus eine Reduktion des ATP-Gehaltes der Zellen auftritt (Folbergrova et al., 1999). Exzitotoxische Mechanismen, wie intrazelluläre Ca^{2+} -overload, oder Aktivierung von Apoptoseprogrammen nach Öffnung mitochondrialer Transitionsproten (MTP), werden ebenfalls diskutiert (Duchen, 1999). Allerdings ist umstritten, ob exzitierende Aminosäuren auch zu einem schnellen Absterben von Astrozyten führen (Schmidt-Kastner und Ingvar, 1996). Weiterhin gibt es zunehmend Hinweise, daß es während eines Status epilepticus zu einer vermehr-

ten Bildung von NO und ROS kommt, die an der Entstehung und Progression von Zellschädigung beteiligt sein könnten (Frantseva et al., 2000). Die Bildung von ROS steigt unter anderem bei Depolarisation der Mitochondrien an. Und es wurde gezeigt, daß im Verlauf von sogenannten ‚seizure-like events‘ (SLE) in hippocampalen Hirnschnittpräparaten Mitochondrien depolarisieren, möglicherweise aufgrund einer exzessiven Akkumulation von Ca^{2+} in den Zellen (Bindokas et al., 1998). Andererseits sind mehrere Dehydrogenasen des Zitronensäurezyklus Ca^{2+} -sensitiv, und damit könnte Ca^{2+} auch das entscheidende Signal sein, mit dem die ATP-Synthese in den Mitochondrien an den metabolischen Bedarf der Zellen angepaßt wird. Eine erhöhte ATP-Synthese während eines Status epilepticus ist geradezu essentiell, um während der Anfälle in die Zelle einströmendes Na^+ und Ca^{2+} mit Hilfe von ATP-abhängigen Transportmechanismen im Zytosol wieder abzusenden.

Im Zitratzyklus generiertes NADH und FADH_2 wird von der mitochondrialen Elektronentransportkette benötigt, um ein negatives Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen. Dieses Membranpotential wird von der F_1F_0 -Synthase genutzt, um ATP zu generieren (Mitchell, 1966; Ames, 2000). Da reduziertes NADH und NADPH im Gegensatz zu den oxidierten Formen bei Anregung mit UV-Licht fluoreszieren (Aubin, 1979), steht mit der mikrofluorimetrischen Messung der NAD(P)H Fluoreszenz eine Methode zur Verfügung, „online“ den metabolischen Status von einzelnen Zellen und Geweben zu verfolgen.

1.3 Literatur zum Stand der Forschung

- Ames A 3rd. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Nov;34(1-2):42-68.
- Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem.* 1979 Jan;27(1):36-43.
- Bender AS, Reichelt W, Norenberg MD. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Int.* 2000 Aug-Sep; 37(2-3): 269-76.
- Bindokas VP, Lee CC, Colmers WF, Miller RJ. Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci.* 1998 Jun 15;18(12):4570-87.
- Blumcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* 2002 Apr; 12(2): 199-211.
- Bordey A, Sontheimer H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *Epilepsy Res.* 1998 Sep;32(1-2):286-303.
- Bridges RJ, Kavanaugh MP, Chamberlin AR. A pharmacological review of competitive inhibitors and substrates of high-affinity, sodium-dependent glutamate transport in the central nervous system. *Curr Pharm Des.* 1999 May;5(5):363-79.
- Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 1995; 16: 33-7.
- Coles JA, Orkand RK. Modification of potassium movement through the retina of the drone (*Apis mellifera* male) by glial uptake. *J Physiol.* 1983 Jul;340:157-74.
- Dietzel I, Heinemann U. Dynamic variations of the brain cell microenvironment in relation to neuronal hyperactivity. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;481:72-86.
- Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol.* 1999 Apr 1;516 (Pt 1):1-17.
- Folbergrova J, He QP, Li PA, Smith ML, Siesjo BK. The effect of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron on bioenergetic state in substantia nigra following flurothyl-induced status epilepticus in rats. *Neurosci Lett.* 1999 May 7;266(2):121-4.
- Frantseva MV, Velazquez JL, Hwang PA, Carlen PL. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2000 Apr;12(4):1431-9.
- Griesar, T, Franck, G and Schoffeniels, E. K^+ -accumulation mechanisms of the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ of bulk-isolated glia and neurons. (1978). In Schoffeniels, E. (ed.), *Dynamic properties of glial cells.* Pergamon Press, Oxford and New York, pp359-369.
- Heinemann U, Lux HD. Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Res.* 1977 Jan 21;120(2):231-49.

C3 Heinemann

- Hinterkeuser S, Schroder W, Hager G, Seifert G, Blumcke I, Elger CE, Schramm J, Steinhauser C. Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. *Eur J Neurosci.* 2000 Jun;12(6):2087-96.
- Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Nov;279(5):F793-801.
- Kindler CH, Pietruck C, Yost CS, Sampson ER, Gray AT. Localization of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1 in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000 Aug 14;80(1):99-108.
- Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kellsell RE, Gloger II, Pangalos MN. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Jan 31;86(1-2):101-14.
- Mitchell P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Glynn Research: Bodmin, UK.
- Reichelt W, Stabel-Burow J, Pannicke T, Weichert H, Heinemann U. The glutathione level of retinal Muller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience.* 1997 Apr; 77(4): 1213-24.
- Schmidt-Kastner R, Ingvar M. Laminar damage of neurons and astrocytes in neocortex and hippocampus of rat after long-lasting Status epilepticus induced by pilocarpine. *Epilepsy Res Suppl.* 1996;12:309-16.
- Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N, Nakajima T. DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol.* 1998 Feb;53(2):195-201.
- Schweitzer JS, Patrylo PR, Dudek FE. Prolonged field bursts in the dentate gyrus: dependence on low calcium, high potassium, and nonsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol.* 1992 Dec;68(6):2016-25.
- Steinhäuser C, Schröder, W, Hinterkeuser, S, Wilkin, GP, Knott, C and Seifert, G. Functional and molecular analysis of KIR channels in hippocampal astrocytes of epilepsy patients. *Eur. J. Physiol.* 2000, Suppl. 6, 439, S07-3 Abstract.
- Tanaka K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res.* 2000 May; 37: 15-9.
- Traynelis SF, Dingledine R. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol.* 1988 Jan;59(1):259-76.
- Walz W, Wuttke WA. Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue. *J Neurosci Res.* 1999 Jun 15;56(6):595-603.
- Walz W, Hertz L. Intense furosemide-sensitive potassium accumulation in astrocytes in the presence of pathologically high extracellular potassium levels. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984 Jun;4(2):301-4.
- Wolf HK, Wiestler OD. Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders. *Brain Pathol.* 1993 Oct;3(4):371-80.

2 Angewandte Methoden

2.1 Präparate

Organotypische hippocampale Hirnschnittkultur und in vitro Modelle für Status epilepticus:

Anfertigung von 400 µm dicken Hirnschnitten aus dem Hippocampus von juvenilen Ratten (Stoppini et al., 1991), Kultivierung der Schnitte auf Biopore-Membranen im Inkubator bis zu mehreren Wochen; Messungen erfolgten nach 7-10 Tagen in vitro (DIV); Auslösung epileptiformer Aktivität in der Messkammer durch Superfusion von ACSF mit einer erniedrigten Mg²⁺ Konzentration (Kovács et al., 2002); alle Messungen an organotypischen Kulturen mit begastem ACSF (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) unter ‚submerge‘ Bedingungen.

Akute Hirnschnitte von chronisch-epileptischem Gewebe aus Ratte und Mensch:

Schon in den letzten Antragsperioden hatten wir das „Pilocarpin Tiermodell“ etabliert und darüber publiziert. Hierbei wird bei jung-adulten Ratten pharmakologisch (Methyl-scopolamin-nitrat 1 mg/kg, s.c.; Pilocarpin 320-340 mg/kg, i.p.) ein Status epilepticus ausgelöst, der nach 1-2 Stunden mit Diazepam (5-10 mg/kg, i.p.) unterbrochen wird. Die Tiere werden daraufhin intensiv überwacht. Videomonitoring dient der Erfassung von Art und Dauer epileptischer Anfälle, die spontan in der zweiten und dritten

Woche nach Status epilepticus auftreten. Das Pilocarpin-Modell ist eines der am häufigsten genutzten Modelle zum Studium der TLE (Mello et al., 1993; Jefferys, 2003). Weiterhin stand uns *Resektionsgewebe von Patienten* mit Therapie-refraktärer TLE durch Kooperation mit der Klinik für Neurochirurgie der Charité zur Verfügung. Das Gewebe wurde von uns und routinemässig im Institut für Neuropathologie histologisch untersucht und klassifiziert (Gewebe ohne Ammonshorn-Sklerose, nAHS, Wyler Grade I und II; Gewebe mit Ammonshorn-Sklerose, AHS, Wyler Grade III und IV; Wyler et al., 1992). Nach operativer Entnahme wurde das Gewebe sofort in einem Transportbehälter mit stark abgekühlter, Carbogen begaster, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung unter Zugabe von α -Tocopherol in unser Institut gebracht und unmittelbar in 400 μm dicke Präparate geschnitten.

2.2 Meßmethoden

Elektrophysiologie: Mit selbstgefertigten doppelläufigen *Ionen-sensitiven Mikroelektroden* wurden Feldpotentiale und Änderungen extrazellulärer Ionenkonzentrationen erfasst (Heinemann und Arens, 1992). Diese Ableitungen erlauben ein genaues Monitoring von epileptiformer Aktivität in Hirnschnittpräparaten, einerseits über die Registrierung der Feldpotentiale, andererseits über die Anstiege des extrazellulären Kaliums (um 1-2 mM physiologisch, 6-12 mM pathophysiologisch, z.B. bei epileptiformer Aktivität („seizure-like events“, SLE)). Weiterhin kamen *Patch-clamp* Messungen zum Einsatz. Im wesentlichen setzten wir die „whole-cell“ Ableitmethode ein, bei der nach Formen einer „cell-attached“ Konfiguration die Zellmembran durch einen kurzen negativen Druck aufgebrochen wird. Dies erlaubt im „current-clamp“ Modus, Potentialveränderungen während epileptiformer Aktivität zu verfolgen, und im „voltage-clamp“ Modus, Membranströme zu analysieren. Gleichzeitig können über die Patch-Elektrode Substanzen zugeführt werden, z.B. Fluoreszenzindikatoren für confokales Imaging.

Mikrofluorimetrie und confokales Imaging: Der Monochromator des Meßplatzes für Mikrofluorimetrie und extrazelluläre Messungen erlaubt Exzitation (Ex) von Fluoreszenzindikatoren mit Wellenlängen im Bereich 300-700 nm, die emittierte Fluoreszenz wurde mit einem Photomultiplier detektiert. Der Messplatz wurde für Messungen von NAD(P)H (Ex 360 nm, mitochondrialer Metabolismus), CalciumGreen (Ex 490 nm, intrazelluläres Calcium), Rhod-2 (Ex. 530 nm, mitochondriales Calcium) und Dihydroethidium (HEt, Ex 530 nm, ROS Produktion) genutzt. Am confokalen Mikroskop (Noran Oz), das mit einer Ausstattung für „patch-clamp“ Messungen kombiniert ist, wurden Messungen mit Rhodamine 123 (mitochondriales Membranpotential) durchgeführt.

2.3 Literatur zu den angewandten Methoden

- Heinemann U, Arens J (1992) Production and calibration of ion-sensitive microelectrodes. In: Practical electrophysiological methods (Kettenmann H, Grantyn R, eds), pp 206–212. New York: Wiley-Liss.
- Jefferys JG. Models and mechanisms of experimental epilepsies. *Epilepsia*. 2003;44 Suppl 12:44-50.
- Kovacs R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol*. 2002 Dec;88(6):2909-18.
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 1993 Nov-Dec;34(6):985-95.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 1991 Apr;37(2):173-82.
- Wyler AR, Dohan Jr FC, Schweitzer JB, Berry AD. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *J. Epilepsy*. 1992; 5: 220-225.

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

3.1 Veränderte Eigenschaften von Astrozyten

Voruntersuchungen im Labor an Resektionsgewebe von Patienten mit pharmakoresistenter TLE hatten Hinweise darauf ergeben, daß die Fähigkeit zur räumlichen Umverteilung von K^+ in diesem Gewebe eingeschränkt ist (Kivi et al., 2000). Hierfür sind wahrscheinlich zwei Arten von K^+ -Kanälen verantwortlich: KIR Kanäle und ‚2-Pore-Domain‘ K^+ -Kanäle. Beide sind sensitiv gegenüber Ba^{2+} , allerdings mit

unterschiedlicher Empfindlichkeit (**Jauch et al., 2002**). Wir wollten deshalb klären, ob spezifische ‚2-Pore-Domain‘ K^+ -Kanal-Blocker die Umverteilung beeinträchtigen. Hierzu wurden Quinidin, Quinin und Bupivacaine im akuten Hirnschnittpräparat von normalen und Pilocarpin-behandelten Ratten verwendet. Es zeigte sich, daß alle verwendeten Substanzen Stimulus-induzierte (20 Hz, 10 s) Anstiege der extrazellulären K^+ -Konzentration ($[K^+]_o$) verhindern können. Iontophoretisch induzierte K^+ -Erhöhungen wurden durch Quinin und Quinidin annähernd verdoppelt. Das war zu erwarten, da die K^+ -Aufnahme in Gliazellen verhindert wird. Diese Messungen werden gegenwärtig auf humanes Gewebe mit und ohne AHS ausgedehnt. Die Umverteilung von K^+ wird durch gap junctions zwischen Astrozyten begünstigt. Die Astrozytose im AHS Gewebe ist möglicherweise durch eine verminderte Expression von Connexin 43 gekennzeichnet. Wir haben deshalb geprüft, ob die Ausbreitung epileptischer Aktivität und von ‚spreading depression‘ an astrozytär Connexin 43-defizienten Mäusen verändert ist. Es ergaben sich nur relativ kleine Veränderungen in der Ausbreitung epileptiformer Aktivität und von ‚spreading depression‘ (**Theis et al., 2003; Päsler et al., in Revision**). Intrazelluläre Messungen während Applikation von Ba^{2+} ergaben eine Depolarisation der Pyramidenzellen, die sich durch Applikation von Glutamat-Antagonisten aufheben ließ. Dies beruht vermutlich auf der starken Reduktion der Glutamat-Aufnahme in Astrozyten. Wir führen deshalb gegenwärtig Messungen mit verschiedenen Glutamattransport-Blockern durch, um zu klären, wieweit der Glutamattransport an Astrozyten im chronisch epileptischen Gewebe verändert ist. Die Befunde zu veränderter K^+ -Aufnahme führten zur Frage, ob sich durch extrazelluläre K^+ -Erhöhung epileptische Aktivität im humanen Gewebe auslösen läßt. Wir konnten zeigen, daß dies in der Tat der Fall ist. Dabei war die Schwelle zur Auslösung epileptiformer Aktivität in Gewebe mit AHS niedriger als in Gewebe von Patienten, die relativ geringe Zellverluste und keine signifikante Astrozytose aufwiesen (**Gabriel et al., in Revision**). Wir sind weiter der Frage nachgegangen, ob sich die pharmakologischen Eigenschaften dieser Anfälle mit dem bekannten pharmakologischen Profil der Patienten vergleichen lassen. Dabei zeigte sich, daß die Hirnschnittpräparate Carbamazepin-sensitiver Patienten im Experiment ebenfalls Carbamazepin-sensitiv waren, während die evozierte epileptische Aktivität am Schnittpräparat von Carbamazepin-resistenten Patienten ebenfalls Carbamazepin-resistent war. Mit der gelungenen Etablierung eines Modells, in dem sich in humanem Resektionsgewebe epileptiforme Aktivität auslösen läßt, ergibt sich zum ersten Mal die Möglichkeit, Voraussagen über das Wirkungsprofil neuentwickelter Pharmaka in Bezug auf Behandlungserfolge bei den ca. 30% von Epilepsiepatienten zu treffen, die mit den bisher verfügbaren Antiepileptika nicht anfallsfrei werden. Zusätzlich ergibt sich die Möglichkeit zu prüfen, ob durch Adjuvantien die Ansprechbarkeit gegenüber klinisch verwendeten Antikonvulsiva steigern läßt.

3.2 Mitochondrialer Metabolismus und neuronale Zellschädigung durch Bildung von NO und ROS

Nach dem skizzierten Stand der Forschung hatten wir die Hypothesen verfolgt, daß es während physiologischer und pathophysiologischer neuronaler Aktivität zu intrazellulärer und mitochondrialer Ca^{2+} -Akkumulation kommt, daß dieses Ca^{2+} Dehydrogenasen des Zitronensäurezyklus aktiviert, dadurch mehr NADH (und $FADH_2$) und letztlich vermehrt ATP zur Verfügung gestellt wird. Eine eintretende Mitochondriendepolarisation könnte die Sauerstoffverwertung beeinträchtigen und dadurch zur vermehrten Produktion von ROS führen. Intrazelluläre Ca^{2+} -Akkumulation kann auch zu einer vermehrten Produktion von NO führen, das mit ROS Peroxynitrit zu bilden vermag. Damit könnten, gerade bei massiver neuronaler Aktivität, z.B. während eines Status epilepticus, freie Radikale (NO, ROS, Peroxynitrit) in hohem Masse auftreten und Lipidperoxidation, DNA- sowie Mitochondrienschädigung hervorrufen.

In unseren Voruntersuchungen zu mikrofluorimetrischen Messungen in Hirnschnittpräparaten hatten wir Hinweise dafür gewonnen, daß es während epileptischer Anfälle vermehrt zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen kommen könnte. In einem Status epilepticus Modell an organotypischen Hirnschnittkulturen konnten wir zeigen, daß die Bildung freier Radikale mit Zunahme von Anfallsereien (‚seizure-like events‘) stark zunimmt. Dies korrelierte mit einer Abnahme SLE-induzierter NAD(P)H Erhöhungen und könnte auf eine Schädigung von Mitochondrienfunktionen hinweisen (**Kovacs et al., 2001; Schuchmann et al., 2001; Heinemann et al., 2002; Schuchmann et al., 2002a**). Tatsächlich ließ sich die Produktion freier Radikale durch den Radikalfänger α -Tocopherol reduzieren und die Mitochondrienschädigung vermindern. Gleichzeitig konnte ein neuroprotektiver Effekt von α -Tocopherol nachgewiesen werden (**Kovacs et al., 2002**). Es stellte sich die Frage, ob möglicherweise die Bildung von Peroxynitrit in der

Schadenskaskade beteiligt ist. Wir haben deshalb den NO-sensitiven Farbstoff DAQ verwendet, um die Bildung von NO während epileptiformer Aktivität zu verfolgen (**von Bohlen und Halbach et al., 2002**). Nach Untersuchungen zur Spezifität des Farbstoffs zeigte sich, daß die NO Bildung während eines status epilepticus stark zunahm. Blockade der NO-Synthese führte überraschenderweise auch zu einer Blockade der epileptiformen Aktivität im niedrig Mg^{2+} -Modell. Dieser Effekt konnte durch Applikation eines NO-Donors aufgehoben werden (**Schuchmann et al., 2002b**). Hier stellt sich allerdings die Frage, wie weit der antikonvulsive Effekt ausschließlich auf einer reduzierten NO-Bildung beruht. Spezifische NO-Synthase Blocker sollen an einem alternativen status epilepticus Modell verwendet werden, um diesen Effekt zu verifizieren.

Um die Frage klären zu können, über welche Mechanismen die Stimulation der NADH Bildung kontrolliert wird und um damit an chronisch-epileptischem Gewebe denkbare Veränderungen der Mitochondrienfunktion aufdecken zu können, haben wir Versuche zur Reiz-induzierten und Transmitter-induzierten NADH Bildung durchgeführt. In diesen Experimenten wurden Erhöhungen der $[K^+]_o$ als ein Maß für die neuronale Erregung und die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme mit NAD(P)H Fluoreszenzsignalen korreliert. Es zeigte sich, daß es nach kurzen Reizserien mit unterschiedlicher Frequenz und Intensität zu einer reizabhängigen Akkumulation von Ca^{2+} in den Mitochondrien kommt und zu relativ lang anhaltenden Erhöhungen der NAD(P)H Fluoreszenz. In Gegenwart von nominal Ca^{2+} -freiem ACSF und dadurch blockierter zytosolischer und mitochondrialer Ca^{2+} -Aufnahme waren die NAD(P)H Signale stark reduziert (**Kann et al., 2003a**). Daraus leiten wir als Arbeitshypothese ab, daß die Aktivierung metabotroper Rezeptoren, die über einen IP_3 -abhängigen Mechanismus Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum freisetzen, ebenfalls stimulierend auf den mitochondrialen Metabolismus auswirken könnten. Tatsächlich zeigte sich, daß Applikation von metabotropen glutamatergen, serotonergen und muskarinschen Agonisten, aber auch von Caffeine, sowohl einen Ca^{2+} -Anstieg in Mitochondrien als auch die Erhöhung von NAD(P)H Fluoreszenz induziert. Diese Effekte ließen sich auch in Ca^{2+} -freien Lösungen induzieren. Auch die Wiederzufuhr von extrazellulärem Ca^{2+} führte über kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom zur Erhöhung des mitochondrialen Ca^{2+} und der NAD(P)H Fluoreszenz (**Kann et al., 2003b**). Mit Klärung der Mechanismen der Kopplung von neuronaler Aktivität und Mitochondrienmetabolismus unter physiologischen Stimulationsbedingungen steht uns ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem wir in chronisch-epileptischem Gewebe des Menschen (nAHS und AHS) sowie an Pilocarpin-behandelten Tieren, die spontane epileptische Anfälle entwickeln, veränderte mitochondriale Funktionen zu untersuchen. Die bisher vorliegenden Daten lassen vermuten, daß in chronisch epileptischen Geweben von Ratte und Mensch eine schwere mitochondriale Dysfunktion vorliegt (**Kann et al., in Vorbereitung**).

Die erhöhte Produktion freier Radikale während eines epileptischen Anfalls könnte darauf beruhen, daß depolarisierte Mitochondrien Sauerstoff weniger vollständig verstoffwechseln. Es ist deshalb zu klären, ob es während epileptiformer Aktivität zu Mitochondrien-Depolarisationen kommt und welche Mechanismen für diese Depolarisationen verantwortlich sind. Um diese Fragen zu klären, benutzen wir konfokale Techniken, um an ‚gepatchten‘ Neuronen die Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials während epileptiformer Entladungen zu verfolgen. Es zeigte sich, daß es während experimenteller anfallsartiger Ereignisse zu einer signifikanten und synchronen Mitochondriendepolarisation kommt. Diese ließ sich durch Blockade des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters verhindern, während Blockade des mitochondrialen Na^+/Ca^{2+} Transporters die Mitochondriendepolarisation stark verzögerte. Erste Experimente mit Cyclosporin A zeigten, daß die Bildung von Transitionsformen an der Depolarisation der Mitochondrien nicht beteiligt ist. In diesen Untersuchungen zeigte sich weiterhin, daß in erster Linie Mitochondrien in den dendritischen Fortsätzen während anfallsartiger Ereignisse irreversibel geschädigt werden können. Dies könnte der entscheidende Schritt zur Induktion von Apoptose bzw. programmierten Zelltod nach Status epilepticus sein (**Kovacs et al., in Vorbereitung**).

Wir haben nun damit begonnen, zu klären, ob die Störung der NAD(P)H Homeostase in chronisch-epileptischem Gewebe auf einer veränderten Reagibilität der Mitochondrien gegenüber Ca^{2+} -bedingten Potentialveränderungen beruhen könnte. Die bisher vorliegenden Messungen an humanem Gewebe zeigen, daß sich durch Glutamat-Applikation Depolarisationen der Mitochondrienmembran selbst in chronisch-epileptischem Gewebe mit AHS induzieren lassen. In Voruntersuchungen haben wir weiterhin die Frage gestellt, ob sich der Farbstoff DAF für Messungen an gepatchten Neuronen einsetzen läßt. Wir haben Protokoll entwickelt, daß es erlaubt, Reiz-, Glutamat- oder Anfalls-abhängige eine Zunahme des DAF-Signals zu verfolgen. Allerdings stehen Experimente zur Spezifität des Signals noch aus.

C3 Heinemann

4 **Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten**

Untersuchungen zur Regulation der Kaliumkonzentration wurden besonders im Labor von C. Steinhäuser in Bonn durchgeführt. Dies Labor konnte zeigen, dass KIR-Kanäle im humanen epileptischen Gewebe an Astrozyten herabreguliert wurden. Die Messungen zur Bildung von freien Radikalen, Mitochondriende-polarisation und Zelltod sowie zur Bildung von NAD(P)H sind sehr weitgehend auch von anderen Gruppen aufgenommen worden, insbesondere in London (Cook, Walker), in den USA (J. Connors), in Deutschland (W. Kunz) und in Ungarn (R. Kovacs). Die vorgelegten Befunde haben zu einer Reihe von Einladungen zu Vorträgen und Symposien geführt, die unten detailliert aufgeführt sind.

5 **Offene Fragen**

- Ist epileptiforme Aktivität, unabhängig von der primären Ursache (Modell), einerseits mit erhöhter Bildung von NO und ROS und andererseits mit verminderter NAD(P)H Produktion und Zelltod assoziiert? Wo sind NO und ROS Produktion bzw. ihre induzierten Veränderungen am größten (Zellkörpersegment versus Axonen-/Dendritensegment)?
- Lassen sich durch Verhinderung abnorm erhöhter NO und/oder ROS Produktion während Status epilepticus Veränderungen im mitochondrialen Metabolismus und Zelltod reduzieren?
- Fördert die Bildung von NO auch unabhängig von der primären Ursache (Modell) die Entstehung epileptiformer Aktivität?
- Lassen sich durch Hochregulation der zellulären Glutathionspiegel (intrinsischer antioxidativer Mechanismus) mitochondriale Schäden und Zelltod verringern?
- Nachweis, daß in chronisch-epileptischem Gewebe eine anhaltende Schädigung mitochondrialer Funktionen vorliegt.
- Erhöhen aktivierte Mikrogliazellen durch ROS/NO Produktion Vulnerabilität und Zelltod im Gewebe in der Phase nach Status epilepticus?

6 **Veröffentlichungen (2001, 2002, 2003)**

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

Kann O, Schuchmann S, Buchheim K, Heinemann U. Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat. *Neuroscience*. 2003; 119(1): 87-100. (IF=3,5)

Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, Doring B, Frisch C, Sohl G, Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhäuser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K. Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J Neurosci*. 2003; 23(3): 766-76. (IF=8,0)

Kann O, Kovacs R, Heinemann U. Metabotropic receptor-mediated Ca^{2+} signaling elevates mitochondrial Ca^{2+} and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol*. 2003; 90(2): 613-21. (IF=3,7)

Remy S, Gabriel S, Urban BW, Dietrich D, Lehmann TN, Elger CE, Heinemann U, Beck H. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol*. 2003; 53(4): 469-79. (IF=(8,6))

Schuchmann S, Albrecht D, Heinemann U, von Bohlen und Halbach O. Nitric oxide modulates low- Mg^{2+} -induced epileptiform activity in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Neurobiol Dis*. 2002; 11(1): 96-105. (IF=5,1)

von Bohlen und Halbach O, Albrecht D, Heinemann U, Schuchmann S. Spatial nitric oxide imaging using 1,2-diaminoanthraquinone to investigate the involvement of nitric oxide in long-term potentiation in rat brain slices. *Neuroimage*. 2002; 15(3): 633-9. (IF=5,6)

- Kovacs R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol.* 2002; 88(6): 2909-18. (IF=3,7)
- Heinemann U, Buchheim K, Gabriel S, Kann O, Kovacs R, Schuchmann S. Coupling of electrical and metabolic activity during epileptiform discharges. *Epilepsia.* 2002; 43 Suppl 5: 168-73. (IF=3,5)
- Schuchmann S, Meierkord H, Stenkamp K, Breustedt J, Windmuller O, Heinemann U, Buchheim K. Synaptic and nonsynaptic ictogenesis occurs at different temperatures in submerged and interface rat brain slices. *J Neurophysiol.* 2002; 87(6): 2929-35. (3,7)
- Longo BM, Sanabria ER, Gabriel S, Mello LE. Electrophysiologic abnormalities of the hippocampus in the pilocarpine/cycloheximide model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsia* 2002;43 Suppl 5:203-8. (IF=3,5)
- Jauch R, Windmuller O, Lehmann TN, Heinemann U, Gabriel S. Effects of barium, furosemide, ouabaine and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ionophoretically-induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal slices from rats and from patients with epilepsy. *Brain Res.* 2002; 925(1): 18-27. (IF=2,5)
- Schuchmann S, Kovacs R, Kann O, Heinemann U, Buchheim K. Monitoring NAD(P)H autofluorescence to assess mitochondrial metabolic functions in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2001; 7(3): 267-76. (IF=1,3)
- Pomper JK, Graulich J, Kovacs R, Hoffmann U, Gabriel S, Heinemann U. High oxygen tension leads to acute cell death in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001 Jan 31;126(1):109-16. (IF=1,5)
- Heinemann U, Eilers A, Gabriel S, Jandova K, Jauch R, Meencke H-J, Njunting M, Päsler D, Schulze K, Lehmann TN. Gliafunktionsänderungen in epileptischem Hirngewebe: Störungen der glialen Kalium-pufferung. *Klin Neurophysiol.* 2002; 33:128-136. (IF=0,2)
- Päsler D, Gabriel S, Theis M, Willecke K and Heinemann U. Spread of low Ca^{2+} -induced epileptiform discharges in mouse hippocampal slices is independent of gap junctions. (in Revision)
- Gabriel S, Njunting M, Pomper J, Merschhemke M, Sanabria ERG, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U and Lehmann TN. Mossy fiber sprouting and experimental epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis (in Revision)
- Kann O, Kovács R, Njunting M, Behrens CJ, Lehmann TN, Gabriel S and Heinemann, U. Severe impairment of NAD(P)H generation in tissue from chronic epileptic rat and human in situ. (in Vorbereitung)
- Kovács R, Kann O, Kardos J and Heinemann U. Changes of mitochondrial membrane potential during epileptiform activity in hippocampal slice cultures. (in Vorbereitung)

Projektassoziierte Buchbeiträge

- Heinemann U, Buchheim K, Gabriel S, Kann O, Kovacs R and Schuchmann S. Cell death and metabolic activity during epileptiform discharges and status epilepticus in the hippocampus. In: DO SEIZURES DAMAGE THE BRAIN, PERSPECTIVES IN ANALYTICAL PHILOSOPHY 135 (2002): 197-210. (IF=1,4)

Veröffentlichungen in Kooperation mit anderen Teilprojekten des SFBs (sofern noch nicht aufgeführt)

- Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmuller O, Orzechowski HD, Lindauer U, Heinemann U, Einhaupl KM, Dirnagl U. Endothelin-1 potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain.* 2002; 125: 102-12.
- Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, Einhaupl KM, Dirnagl U. Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol.* 2001 Mar 1;531(Pt 2):515-26
- Schilling T, Repp H, Richter H, Koschinski A, Heinemann U, Dreyer F, Eder C. Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCa1 Ca^{2+} -dependent K^{+} channels. *Neuroscience.* 2002;109(4):827-35. Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C. Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K^{+} channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci.* 2001 Aug;14(3):463-73.

C3 Heinemann

Veröffentlichungen der Antragsteller, die in den vergangenen 3 Jahren erschienen sind (2001, 2002, 2003; nicht unmittelbar Projekt-assoziiert)

- Wozny C, Kivi A, Lehmann TN, Dehnicke C, Heinemann U, Behr J. Comment on "On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro". *Science*. 2003; 301(5632): 463; author reply 463.
- Gloveli T, Behr J, Dugladze T, Kokaia Z, Kokaia M, Heinemann U. Kindling alters entorhinal cortex-hippocampal interaction by increased efficacy of presynaptic GABA(B) autoreceptors in layer III of the entorhinal cortex. *Neurobiol Dis*. 2003; 13(3): 203-12.
- Kirchner A, Breustedt J, Rosche B, Heinemann UF, Schmieden V. Effects of taurine and glycine on epileptiform activity induced by removal of Mg²⁺ in combined rat entorhinal cortex-hippocampal slices. *Epilepsia*. 2003; 44(9): 1145-52.
- Weiss T, Veh RW, Heinemann U. Dopamine depresses cholinergic oscillatory network activity in rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 2003; 18(9): 2573-2580.
- Egorov AV, Heinemann U, Müller W. Differential excitability and voltage-dependent Ca²⁺ signalling in two types of medial entorhinal cortex layer V neurons. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(7): 1305-12.
- Behr J, Gebhardt C, Heinemann U, Mody I. Kindling enhances kainate receptor-mediated depression of GABAergic inhibition in rat granule cells. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(5): 861-7.
- Gebhardt C, Korner R, Heinemann U. Delayed anoxic depolarizations in hippocampal neurons of mice lacking the excitatory amino acid carrier 1. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22(5): 569-75.
- Pöschel B, Draguhn A, Heinemann U. Glutamate-induced gamma oscillations in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *Brain Res*. 2002; 938: 22-8.
- Schmitz D, Schuchmann S, Fisahn A, Draguhn A, Buhl EH, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Heinemann U, Traub RD. Axo-axonal coupling: a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron*. 2001; 31(5): 831-40.
- Fleiderer IA, Gebhardt C, Astman N, Gutnick MJ, Heinemann U. Enhanced spontaneous transmitter release is the earliest consequence of neocortical hypoxia that can explain the disruption of normal circuit function. *J Neurosci*. 2001; 21(13): 4600-8.
- Hinz B, Becher A, Mitter D, Schulze K, Heinemann U, Draguhn A, Ahnert-Hilger G. Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur J Cell Biol*. 2001; 80: 615-9.
- Stenkamp K, Palva JM, Uusisaari M, Schuchmann S, Schmitz D, Heinemann U, Kaila K. Enhanced temporal stability of cholinergic hippocampal gamma oscillations following respiratory alkalosis in vitro. *J Neurophysiol*. 2001; 85(5): 2063-9.
- Gloveli T, Dugladze T, Schmitz D, Heinemann U. Properties of entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2001; 13(2): 413-20.
- Stanton PK, Heinemann U, Müller W. FM1-43 imaging reveals cGMP-dependent long-term depression of presynaptic transmitter release. *J Neurosci*. 2001; 21(19): RC167.

7 Kooperationen innerhalb des Sonderforschungsbereichs

Mit dem Teilprojekt A1 Dreier/Einhäupl entstanden zwei gemeinsame Publikationen (weitere sind in Vorbereitung). Herr Dreier richtete im Labor von Herrn Heinemann einen Hirnschnittmessplatz für Untersuchungen an humanen Hirnschnittpräparaten ein. Die Methodik zu Messungen von NO wurde in dieses Projekt transferiert. Es wurde weiter der Frage nach Störungen der Bluthirnschrankenfunktion bei Spreading depression nachgegangen. Mit dem Projekt A7 gab es einen interessanten Erfahrungsaustausch. Mit dem Projekt C7 wurde ebenfalls gemeinsam publiziert und Probleme bei der Kultivierung gelöst.

8 Dokumentation sonstiger Aktivitäten

SFB 515, stellvertretender Sprecher TP B7, U. Heinemann und A. Herz: „Rhythmogenese und synaptische Plastizität im entorhinalen Cortex-Hippokampuskomplex“; **SFB TR3** A. Behr, TN Lehmann und U Heinemann: „Reorganisation hippocampaler Netzwerke bei der Temporallappenepilepsie“; **D5** W. Müller

und U. Heinemann: „Muskarinische Signaltransduktion bei mesialen Temporallappenepilepsien“; Graduiertenkolleg **GRK 238**: „Schadensmechanismen im Nervensystem: Untersuchungen mit bildgebenden Verfahren“; **Direktor** des Neurowissenschaftliches Forschungszentrum (Charité, HUB), **Beiratsmitgliedschaften** (Schillingstiftung, Otto Loewi Minerva Center, European Neuroscience Institute Göttingen, Institut für Neurobiologie Magdeburg, Klinischer Forschungszentrum Universität Leipzig), **Kooperationen** außerhalb des SFBs bestehen mit: Prof. Dr. A. Draguhn, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; PD Dr. H. Beck, Klinik für Epileptologie, Bonn; Prof. Dr. M. Gutnick, Ben-Gurion University, Beer-Sheva, Israel; Dr. R. Kovács, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn; Prof. Dr. I. Mody, Department of Neurology and Physiology, UCLA, California, USA

9 Kongreß-, Vortrags- und Kontaktreisen

2001

- *Vortrag an der Hebrew University*, Ben Gurion University, Februar 2001
- Teilnahme am *Otto Loewi Symposium* in Eilat, Februar 2001: „Coupling of neuronal and metabolic activity in central neurones“
- Teilnahme an einem *Symposium des NIH* in Washington, USA ,Februar 2001: „New perspectives in the treatment of epilepsies“
- Eingeladener *Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Liga gegen Epilepsie* in Zürich, März 2001: „Mechanisms of facilitated seizure spread in kindled animals“
- Eingeladener *Vortrag beim Wonoep Symposium* in Iguacu, Brasilien, Mai 2001: „Alterations in potassium homeostasis in chronic epileptic tissue“
- Eingeladener *Vortrag bei SFB Symposium* in Homburg, Saar, Mai 2001: „Role of mitochondrial calcium uptake in stimulation of NADH synthesis“
- Eingeladener *Vortrag Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie*, Bielefeld, Mai 2001: „Properties of human epileptic tissue“
- *Vortrag Institut für Physiologie Jena*, Juni 2001: „Mechanisms of neuronal and metabolic coupling“
- Eingeladener *Vortrag Symposium ‚Progression of temporal lobe epilepsies‘* in Rovaniemi, Finland, Juni 2001: „Mitochondrial damage in temporal lobe epilepsies and cell death“
- *Vortrag Neurologische Klinik Jena*, July 2001: „Mechanismen der Entstehung fokaler Epilepsien“
- Vorträge und Kurs bei der IBRO Summer School in Tihany, Ungarn, August 2001
- *Vortrag Universität Freiburg*: “Oscillatory properties of hippocampal and entorhinal cortex neurones”
- *Vortrag Paris*, INSERM: “Epileptiform activity in the dentate gyrus and hippocampus in human hippocampal tissue”, September 2001.

2002

- *Vortrag an der Universität Göttingen*, Januar 2002, „Coupling of neuronal and metabolic activity in central neurones“
- „*European Winter Conference on Brain Research*“, Oberstdorf: Vorträge „Seizure-induced cell death in relation to changes in mitochondrial function“ und “Determination of early events during hypoxia”
- *Fortbildungsveranstaltung der Neurologischen Klinik der Universität Marburg*, Vorträge zur Rolle von Glutamat bei der Entstehung von Epilepsien und zur Funktion von GABA in der Entstehung und Behandlung epileptischer Anfälle
- Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Tübingen. Mehrere Poster und Vorträge aus dem Labor, eigener Vortrag
- Berliner Neuroscience Forum, Liebenwalde: Mehrere Poster und Vorträge
- Workshop „Mesiale Temporallappenepilepsien“ in Istanbul, Vortrag und Diskussionen

C3 Heinemann

- *Paris*: Besuch im Labor von R. Miles, Vortrag; externer Gutachter in einem Promotionsvorhaben und Gespräche über die Weiterführung eines gemeinsamen Projektes.
- Teilnahme am *Satellitensymposium der „European Neurological Society“*: „Therapy refractory Status epilepticus“ mit Vortrag
- Vortrag im *Vogtareuther Fortbildungskurs* mit Vortrag zu Therapieproblemen bei der Behandlung kindlicher Epilepsien aus theoretischer Sicht
- Referent, Instructor and Demonstrator bei der *European Summerschool*, Kuopio, Finnland: “The entorhinal cortex”
- Teilnahme am Satelliten-Symposium zum *FENS-Meeting in Düsseldorf* mit Vortrag „Oscillatory properties of entorhinal cortex cells“
- Teilnahme *FENS-Meeting Paris*, Vortrag und mehrere Poster
- Teilnahme an einem Symposium in München
- Teilnahme an der 14-tägigen *Summerschool “Bridging basic and clinical epileptology“ San Servolo, Venedig*, 4 Vorträge, einwöchige Erarbeitung zu einem klinischen Forschungskonzept „Models of pharmaco-resistant epilepsy“ sowie Vorbereitung und Abhalten mehrerer Journal Clubs
- Teilnahme *DFG Rundgespräch in Kaiserslautern* „Die Rolle von Astrozyten für synaptische Funktion und Plastizität“
- Organisation eines *Symposiums zu Mechanismen der Epileptogenese in Berlin* mit N. Moshe, Y. Yaari, G. Avanzini, C. Elger, H. Beck, u.a.
- Organisation eines Symposium zum 125-jährigen Bestehen des Institut für Physiologie, Charité

2003

- *Annual Meeting Society for Neurosciences*, New Orleans, USA; Posterpräsentation “Activation of metabotropic receptors elevates mitochondrial Ca^{2+} and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures: functional implications of cellular Ca^{2+} entry and release”, O. Kann, R. Kovács und U. Heinemann
- *International Epilepsy Congress*, Lissabon, Portugal; Vortrag “Mechanisms in coupling of neuronal and metabolic activity”, O. Kann und U. Heinemann
- *Deutsche Physiologentagung*, Bochum; Posterpräsentation “Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism in organotypic hippocampal slice cultures of the rat”, O. Kann, S. Schuchmann, K. Buchheim und U. Heinemann
- Winter meeting der European Association of Neurosurgeons, Bonn; Vortrag U. Heinemann, “Long term potentiation”
- 10th Otto Loewi Meeting “Intra- and intercellular signals in the nervous system”, Eilat, Israel
- Vortrag: *Jahrestagung der Deutschen Liga gegen Epilepsie* Berlin, Vortrag U. Heinemann: „Führt hypersynchrone Aktivität zu Veränderungen der Signalverarbeitung im Hippokampus?“
- Vortrag Uwe Heinemann: „Entwicklung von Toleranz bei Antikonvulsiva“
- Neurobiologentagung Göttingen: 6 Posterbeiträge
- *3. Internationaler Kongress „Neuroprotection and Neurorepair“*, Magdeburg: “Changes of coupling between neuronal and metabolic activity during experimental status epilepticus”
- Vortrag am Institut für Physiologie der Universität Mainz: “Oscillatory activity in parahippocampal structures”
- *Symposium „2nd Conference on Epileptogenesis“* Ferrara, Italien; Vortrag U. Heinemann: “Changes in the hodologic organization of the hippocampal formation and its significance for seizure spread and frequencies of seizures”
- *Symposium “Function and Dysfunction of cortical neurons”*, Rehovot, Israel, Vortrag U. Heinemann: “Stimulus induced gamma oscillations in the hippocampal formation”
- Congress Euroglia, Berlin, 2 Posterbeiträge

- *Symposium Wonoep VII, „Developmental program(s) in epileptogenesis“* Ericeira, Portugal, Vortrag U. Heinemann: Alterations in potassium regulation in chronic epileptic tissue mimic changes in potassium regulation during development.
- *Symposium “Metabolic and Neuronal Coupling during Status and Chronic Epilepsy”* at the 27th International congress of epilepsy, Lisbon, Portugal, Organiser U. Heinemann; Vortrag “Changes of Mitochondrial Membrane Potential during Seizure like Events in Hippocampal Slice Cultures”
- *Symposium “New Horizons in the development of Anticonvulsant drugs“*, Cambridge, USA, eingeladener Diskutant und Koautor in einem Vortrag von H. Beck “Resistance of Na⁺-currents to CBZ in human dentate gyrus granule cells”.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB507/C6 2002-2004**Mikrogliaaktivierung durch geschädigte Neurone: Signalwege oxidativ modifizierter Lipide**

Projektleiter: Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Oliver Ullrich
 Institut für Immunologie
 Universitätsklinikum
 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
 Leipziger Str. 44
 39120 Magdeburg
 Tel. 0391 67 15382
 Fax. 0391 67 15394
 e-mail: oliver.ullrich@medizin.uni-magdeburg.de

Vormals:

Institut für Anatomie
 Universitätsmedizin Berlin
 Campus Charité Mitte
 Philippstr. 12
 10115 Berlin

1. Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

Ein wesentlicher Bestandteil der Frühphase eines neuronalen Schadens ist die Oxidation neuronaler Makromoleküle (Calingasan et al., 1999; Yoshino et al., 1997; van der Veen et al., 1997). So bewirken Agonisten an ionotropen Glutamatrezeptoren wie NMDA, Kainat oder AMPA eine konsekutive massive intraneuronale Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen (Kucukkaya et al., 1996; Mattson et al., 1995; Bondy et al., 1993), wobei eine Ca^{2+} -abhängige Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette (Dugan et al., 1995) und ein Transpeptidase-induzierter Glutathion-Efflux (Wallin et al., 1999) als Ursache diskutiert werden. Die dabei freigesetzten Sauerstoffradikale sind hochreaktiv und kurzlebig und reagieren sofort mit intrazellulären Molekülen wie Proteinen, Lipiden und DNA. Die dabei entstehenden Oxidations- und Degradations-endprodukte sind teilweise langlebig genug, um unter den Bedingungen eines neuronalen Primärschadens zu akkumulieren, und wahrscheinlich ursächlich für die letztendliche Toxizität freier Sauerstoffradikale (Keller et al., 1998; Esterbauer et al., 1991). Diese oxidative Schädigung von zellulären Makromolekülen erfolgt neben der Auslösung intrazellulärer Schadenskaskaden natürlich auch durch den Angriff aktivierter Immunoeffektorzellen, beispielsweise Mikrogliazellen, die durch Freisetzung grosser Mengen an freien Sauerstoff- und Stickstoffradikalen (Banati et al., 1993) neuronale und nicht-neuronale Zellen im inflammatorisch infiltrierte Hirngewebe attackieren.

Während nun geschädigte zytosolische und nukleäre Proteine einem selektiven und effektiven intrazellulären Abbau durch das Proteasom-System zugeführt werden (Grune et al., 1997; Ullrich et al., 1999) und die Zellgrenzen üblicherweise erst bei schweren Membranschäden oder dem Zelltod verlassen, unterliegen die Membranlipide nicht nur einer Vielzahl oxidativer Modifikationen (Esterbauer et al., 1991), sondern auch einem hohen Turnover mit dem Extrazellulärraum (Pitas et al., 1987). Bisher ist über die

C6 Ullrich

Art und Quantität der nach exzitotoxischer oder inflammatorischer Schädigung freigesetzten Lipidoxidationsprodukte so gut wie nichts bekannt.

So ist z.B. das Cholesterol als ein quantitativ bedeutender Membranbestandteil auf der einen Seite sehr oxidationsempfindlich (Sevanian et al., 1994), während die dabei entstehenden Cholesteroloxidationsprodukte auf der anderen Seite eine ausgeprägte Neurotoxizität aufweisen (Kölsch et al., 1999; Chang et al., 1998a, 1998b, 1998c, 1998d, 1998e, 1997). Weitere potentiell neurotoxische Lipidoxidationsprodukte gehören zu der Gruppe der aldehydischen Lipidperoxidationsprodukte, die einerseits durch radikalische Kettenreaktionen in großer Menge in oxidierten Membranen entstehen und andererseits stabil genug sind, um dort zu akkumulieren. So besteht dabei die direkte Gefahr, daß diese toxische Lipidoxidationsprodukte im Rahmen eines axonalen Regenerations- oder Wachstumsprozesses neuronal wiederaufgenommen werden und das wachsende Neuron schwer schädigen oder töten. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, daß die Aufnahme von oxidativ geschädigten High-Density-Lipoproteinen (HDL) in primären Neuronen zum Zelltod führt (Keller et al., 2000; Kivatiniz et al., 1999). Daher muß ein System existieren, das in der Lage ist, die neurotoxischen Produkte der oxidativen Modifikation von Lipiden zu erkennen und aus dem Kreislauf der Membranlipide des ZNS zu entfernen.

Während gut beschrieben ist, daß Makrophagen über ihre scavenger-Rezeptoren in der Lage sind, neben nativen auch oxidierte Lipoproteine zu erkennen und aufzunehmen, so daß sich intrazellulär eindeutig entsprechende Cholesterol- und Lipidperoxidationsprodukte nachweisen lassen (Maor et al., 2000), gibt es ebenfalls deutliche Hinweise, daß dies auch in den funktionell vergleichbaren Mikrogliazellen der Fall ist (Bell et al., 1994; Christie et al., 1996; Pitas et al., 1987). Darüber hinaus wirken oxidierte Lipoproteine in dem für Neurone toxischen Konzentrationen auf Mikrogliazellen oder Astrozyten nicht toxisch (Keller et al., 2000). So kann vermutet werden, dass der aktivierten Mikroglia eine zentrale Funktion in der Aufnahme und Entgiftung der neurotoxischen Lipidoxidationsprodukte zukommt, wobei sie selbst anscheinend gut gegen diese Toxizität geschützt ist. Der besondere Schutz von Mikrogliazellen gegenüber Oxidantien-induziertem Streß wurde schon früher (Noack et al., 1998) und in eigenen Vorarbeiten beschrieben (Ullrich et al., 1999, 2001). Daher ist es von Interesse, ob und auf welchem Wege neurotoxische Lipidoxidationsprodukte protektive Signalwege in Mikrogliazellen induzieren.

Die Mikrogliaaktivierung ist ein charakteristisches Merkmal der Frühphase des neuronalen Schadens und geht mit spezifischen morphologischen, immunphänotypischen und funktionellen Veränderungen einher (Kreutzberg, 1996). Zu den spezifischen intrazellulären Signalen, die zu einer Aktivierung der Mikrogliazelle führen, gehören zytosolisch die an den IL-15-Rezeptor-gekoppelte JAK-Aktivität (Hanisch et al., 1997) und weitere Serin/Threonin-Kinasen und-Phosphatasen (Lockhart et al., 1998), nukleär das CREB-Protein (Herdegen et al., 1992), NF- κ B (Lockhart et al., 1998) und Corticoid-Rezeptoren (Drew et al., 2000). Über die intrazelluläre Wirkung von oxidativ modifizierten Lipiden in Mikrogliazellen ist bisher so gut wie nichts bekannt. Untersuchungen an anderen Zelltypen, vor allem außerhalb des ZNS, beschreiben eine Phosphorylierung von JNK und p38-MAPK durch 4-Hydroxynonenal (Uchida et al., 1999), eine Hemmung der IkappaB-Phosphorylierung (Page et al., 1999), eine erhöhte DNA-Bindung von AP-1 (Camandola et al., 2000; Uchida et al., 1999) und CREB (Ito et al., 1999). Über die intrazellulären Signalwege von Cholesteroloxiden ist noch so gut wie nichts bekannt, ein vor kurzem beschriebener und in CHO-Zellen funktionell charakterisierter Oxysterol-Rezeptor (Ridgway et al., 1998) ist im Zytosol und Golgi-Kompartiment lokalisiert und reguliert die HMG-CoA-Expression und Sphingomyelin-Synthese (Lagace et al., 1999). Erkenntnisse über die dabei beteiligte Transkriptionsfaktoren gibt es noch nicht, ebenso gibt es bisher keinerlei Untersuchungen über die Signalwege von 4-Hydroxynonenal und Cholesteroloxiden in Mikrogliazellen.

Aktivierte Mikrogliazellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen (z.B. IL-1, TNF- α , IL-6, TGF- β , IL-10) mit proinflammatorischen, zytotoxischen oder protektiven Funktionen, setzen aber auch große Mengen freier Sauerstoffradikale und exzitatorischer Aminosäuren frei, die neurotoxisch wirken (Banati et al., 1993). Diese Produkte wirken ihrerseits auch wieder aktivierend auf Mikrogliazellen (Takeda et al., 1998), so daß die Gefahr eines circulus vitiosus im Sinne einer nun pathologischen Mikrogliazellaktivierung besteht. Diese duale Funktion der Mikroglia wird in der Literatur intensiv diskutiert, da aktivierte Mikrogliazellen dadurch selbst zur Ursache eines neuronalen (Sekundär-)schadens werden können (Gebicke-Haerter et al., 1996; Heppner et al., 1998) und diese anhaltene Mikrogliaaktivierung ein wesentliches Merkmal vieler neurodegenerativer und neuroinflammatorischer Krankheiten darstellt (Gebicke-Haerter et al., 1996). Daher ist es von grundsätzlichem Interesse, ob ein Mikroglia-aktivierender Signalweg,

insbesondere infolge einer Mediation durch primär geschädigte Neurone, zu einer eher neuroprotektiven oder neurodegenerativen Reaktion im Gewebeverband führt. Die Kenntnis der Regulation der intrazellulären mikroglialen Signalwege in Folge eines aktivierenden Stimulus ist daher auch von klinischer Relevanz, da dadurch eine gezielte und differenzierte pharmakologische Intervention möglich werden könnte, die zwar die protektiven Fähigkeiten der Mikroglia (z.B. die Aufnahme neurotoxischer Degenerationsprodukte) erhält, aber auf der anderen Seite beispielsweise eine überschießende neurotoxische Aktivierung verhindern könnte.

Ausgehend von dem Stand der Forschung und der eigenen Vorarbeiten sollte daher in diesem Projekt der Crosstalk zwischen geschädigten Neuronen und Mikrogliazellen über Produkte der oxidativen neuronalen Schädigung, die dadurch ausgelösten mikroglialen Signalwege und deren funktionelle Bedeutung für die Interaktion Mikrogliazelle-Neuron im Sinne einer Neuroprotektion oder Neurodegeneration untersucht werden und folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche oxidativ modifizierten und mikrogliaaktivierenden Lipide werden wie und in welchem Umfang unter den Bedingungen neuronaler Schädigung freigesetzt ?
2. Welche mikroglialen Signalwege werden durch die identifizierten oxidativ modifizierten Lipide aktiviert ?
3. Bewirken die identifizierten Signalwege Neuroprotektion oder Neurodegeneration ?

2. Angewandte Methoden

Proben aus humanen Material.

Aus einer im Rahmen dieses Projektes entstandenen intensiven Kooperation mit den Teilprojekten von Prof. Zipp und Prof. Nitsch konnte bei den Untersuchungen äußerst wertvolles humanes Material (Serum, Liquor und Hirngewebe) von Patienten mit Multipler Sklerose einbezogen werden. Serum, Liquor und PBMC wurde am Institut für Neuroimmunologie and in der Klinik für Neurologie der Charité im Rahmen der diagnostischen Laborroutine gewonnen. Alle Patienten waren zuvor unbehandelt, die Diagnose der MS erfolgte entsprechend den Poser-Kriterien (Poser et al., 1983). Tiefgefrorene Blöcke von autopsierten Hirngewebe wurde uns von Cedrik S. Raine, Albert Einstein College of Medicine, New York aus Beständen der Miami Human Brain Bank und der Manhattan Brain Bank zur Verfügung gestellt.

Detektion von Cholesteroloxiden

Cholesteroloxide im Serum und Liquor wurden mittels Gaschromatographie /Massenspektroskopie (GC/MS) nach der Methode von Sevanian et al. (Sevanian et al., 1994) analysiert. Alle Extraktionen und Derivatisierungen wurden in Anwesenheit von 0.01% BHT und einer Argonatmosphäre zur Vermeidung artifizieller Oxidation durchgeführt. Cholesteroloxide wurden ausserdem mittels Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) nach Kritharides (Kritharides et al., 1993) bestimmt.

Induktion und klinische Evaluierung der aktiven Experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE)

Die Experimente mittels EAE wurden in Kooperation und unter der Tierversuchserlaubnis von Prof. Zipp durchgeführt. Weibliche SJL Mäuse (6-8 Wochen) wurden s.c. mit 75 µg proteolipid protein (PLP) 139-151 immunisiert, während 0.2 ml einer Emulsion mit gleichen Volumen PBS and CFA, 6 mg/ml of Mycobacterium tuberculosis H37Ra und 200 ng Pertussis toxin i.p. an den Tagen 0 und 2 verabreicht wurde. Die Tiere wurden täglich nach den Kriterien von Brocke (Brocke et al., 1993) untersucht und einem klinischen Score zugeordnet.

Immunhistochemie und quantitative Auswertung

Die Mäuse wurde transkardial mit 4% Paraformaldehyde (PFA) perfundiert und horizontale 50-µm-dicke Vibratom-Schnitte wurden gewaschen, geblockt und apoptotische Neurone wurden mittels Active Caspase 3-Antikörpern und Gegenfärbung mit Nissl quantifiziert.

C6 Ullrich

Zellkultur

BV-2 microglial cells sind mittels eines *c-myc*-Oncogen-tragenden *J7*-retrovirus immotalisierte primäre Mikrogliazellen (Bocchini et al., 1992), die einen nativen primären Mikrogliazellen funktionell identischen Phänotyp zeigen (Hailer et al., 1996). *BV-2*-Mikrogliazellen wurden in DMEM mit 10% FCS in einer Dichte unter 2×10^5 Zellen/ml kultiviert, die Aktivierung wurde mit 10 µg/ml lipopolysaccharide für 24 h durchgeführt. *Primäre Neurone* wurden aus 10 Tage alten Mäusen präpariert, das Hirngewebe in 0.25% Trypsin dissoziiert, bei 470g für 10 min zentrifugiert, in Neurobasal-Medium resuspendiert, auf Poly-L-lysin-beschichteten Platten ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Gliazellen wurden mechanisch entfernt und mit 8 µM cytosin-arabinside an ihrer Proliferation gehindert. *HT22 hippocampale Neurone* wurden in DMEM mit 10% FCS und 8.5 g/l glucose bei einer Dichte von 10^5 Zellen/ml kultiviert. Zur Untersuchung *CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten*, wurden PBMC von 4 gesunden Spendern mittels lymphoprep™ Dichtgradientenzentrifugation angereichert und mittels immunomagnetischen Beads getrennt. Die Stimulation erfolgte mit 1 µg/ml immobilisiertem anti-CD3 und 25 µg/ml anti-CD28 oder 50 ng/ml LPS.

Inkubation von BV-2-Mikrogliazellen mit 5-Cholesten-3β-ol-7-one (7-Ketocholesterol)

BV-2-Mikrogliazellen wurden für 24h mit 0, 1, 10 und 100 mg/l 5-Cholesten-3β-ol-7-one (7-Ketocholesterol) bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Kulturflasche in 20ml DMEM mit 10% FCS inkubiert. Alle Experimente wurden mit der adäquaten Vehikel-Kontrolle durchgeführt und die Konzentration im Inkubationsansatz mittels HPLC bestätigt.

Biochemische Analysen

Die *FACS-Analysen* wurden mit FITC-konjugierten monoclonalen rat-anti-mouse-CD11a, rat-anti-mouse-CD11b, rat-anti-mouse-CD18, und rat-anti-mouse-ICAM-1-Antikörpern durchgeführt. Die *Zellen* wurden durch wiederholte Frieren-Tauen-Zyklen lysiert, die Lysate für die Experimente eingesetzt. *Nuklei* wurden nach einer modifizierten Methode nach Emig et al. (Emig et al., 1995) präpariert and durch wiederholte Frieren-Tauen-Zyklen in 1 mM DTT lysiert. *Poly(ADP-ribosyl)ierungs-Aktivität* wurde durch Inkorporation von Radioaktivität aus ³²P-NAD⁺ in Trichloressigsäure-unlösliches Material gemessen. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.8), 200 µM NAD⁺, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 µg sonifizierte DNA/Reaktion und 500,000 dpm ³²P-NAD⁺. *In vitro*-Poly(ADP-ribosyl)ierung wurde durch Inkubation von 2 µg rekombinanter PARP-1, experimiert in *E.coli*, mit und ohne nativer und sonifizierter pcDNA3.1-vector-DNA. *SDS/PAGE-Analysen* wurden in einem 12%-Trenngel separiert und auf Nitrozellulose- Membranen geblotet. Die Membranen wurden mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern inkubiert, der Nachweis erfolgte mittels Chemolumineszenz (ECL).

Experimente mit organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSCs)

OHSCs wurde aus p9-p10-Mäusen gewonnen, durch aseptische Entfernung der Meningen und eines frontalen Schnittes aus dem kaudalen Cerebrum, das in 350 µm dicke Transversalschnitte in MEM mit 1% L-Glutamin zerschnitten wurde. Die OHSCs wurden in Kulturmedium (MEM:HBSS 2:1, 25% normal horse serum, 2 % L-Glutamin, 2.64 mg/ml Glucose und Penicillin/Streptomycin) bei 35°C mikt 5% CO₂ für 10 days *in vitro* inkubiert, um gesunde, organotypische Bedingungen in der Mitte des Hirngewebes zu erreichen (Hailer et al., 1996). Zur Detektion von 7-Ketocholesterol nach einem exzitotoxischen Insult wurtden die OHSCs mit 50 µM NMDA inkubiert und das Medium zur Analyse entfernt. 3 Tage nach dem Transfer von *BV-2*-Mikrogliazellen, pcDNA3.1-*BV-2*-Mikrogliazellen oder Antisense-PARP-1-pcDNA3.1-*BV-2*-Mikrogliazellen (Ullrich et al., 2001) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 10 mg/l 7-Ketocholesterol wurde der Zelltod in den Regionen der neuronalen Schädigung (neuronale Schichten des CA und DG) mittels Propidium-Iodid-Färbung (5 µg/ml, 4 h) in Gefrierschnitten quantifiziert. Neurone wurden mittels Doppelfluoreszenzfärbung gegen das neuronale nukleäre Protein NeuN und gegen Neurofilament identifiziert. Mikroglia wurde immunhistochemisch mittels *Griffonia simplicifolia* isolectin IB₄ (IB₄)-FITC detektiert. Das Material wurde mit einem BX-50-Mikroskop bei 470-490 nm Exzitation (515-550 nm Filter) für FITC und 520-550 nm Exzitation (580 nm Filter) für Rhodamin analysiert.

3. Ergebnisse und ihre Bedeutung

3.1. Welche oxidativ modifizierten und mikrogliaaktivierenden Lipide werden wie und in welchem Umfang unter den Bedingungen neuronaler Schädigung freigesetzt ?

3.1.1. Akkumulation von 7-Ketocholesterol im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose

Mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS) wurde Serum und Liquor von Patienten mit neu diagnostizierter Multipler Sklerose (MS-Patienten) ohne vorherige Behandlung und von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (OND-Patienten) analysiert. Dabei wurden im Liquor von MS-Patienten hohe Konzentrationen von Cholesteroxiden detektiert, wobei 5-Cholesten-3 β -ol-7-one (7-Ketocholesterol) das Hauptprodukt darstellte. Die dabei im Serum detektierten Konzentrationen entsprachen in etwa den von Sevanian et al. erhobenen Befunden im Plasma gesunder Probanden (Sevanian et al., 1994; Dyer et al., 1997; Addis et al., 1989). 25-Hydroxycholesterol zeigte die zweithöchsten Konzentrationen, andere Cholesteroxide waren nur in Spuren vorhanden. Der Liquor/Serum-Quotient zeigte eine klare Herkunft des 7-Ketocholesteroles aus dem ZNS.

3.1.2. Akkumulation von 7-Ketocholesterol bei anderen inflammatorischen ZNS-Erkrankungen

Cholesterol ist nicht allein eine Komponente des Myelins, sondern auch der äusseren Zellmembranen von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen, von wo seine Zerfallsprodukte leicht in den Interzellularraum diffundieren könnten (Posse de Chaves et al., 2000). Daher besteht die Möglichkeit, dass die oxidative Schädigung und Zerfall des Cholesterols (Bondy et al., 1993; Maor et al., 2000; Mattson et al., 1995) sowohl von intraneuronalen Schadenskaskaden stammt, bei denen freie Sauerstoffradikale freigesetzt werden, oder vom Angriff inflammatorischer Zellen auf neuronale und nichtneuronale Zellen des Hirngewebes. Daher wurden mittels HPLC (Kritharides et al., 1993) zunächst Liquorproben von Patienten mit primär neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen die neuronale Schädigung im Vordergrund steht (z.B. M. Alzheimer, Systematrophie), mit denen von Patienten mit primär neuroinflammatorischen Erkrankungen (z.B. schwere Meningitis, virale Enzephalitis) und Patienten mit MS verglichen. Während bei den primär neurodegenerativen Erkrankungen keine Akkumulation von 7-Ketocholesterol im Liquor detektiert werden konnte (mean = 0.47 mg/l \pm 0.47 mg/l S.E.M., n=6), wiesen Patienten mit primär neuroinflammatorischen Erkrankungen eine deutlich erhöhte Konzentration von 7-Ketocholesterol im Liquor auf (mean = 5.55 mg/l \pm 0.63 mg/l S.E.M., n=6), genauso wie Patienten mit MS (mean = 8.50 mg/l \pm 0.29 mg/l S.E.M., n=11). Das bedeutet, dass die inflammatorische Schädigung von Hirngewebe eher zur Freisetzung von 7-Ketocholesterol führt, als neuronale Schädigung mit wenig Inflammation.

3.1.3. 7-Ketocholesterol entsteht beim oxidativen Angriff aktivierter Mikrogliazellen auf Hirngewebe

Um zu untersuchen, ob 7-Ketocholesterol im Rahmen aktiver Entzündungsvorgänge produziert wird, bestimmten wir die Konzentration von 7-Ketocholesterol in OHSCs während der Inkubation mit nativen oder vorstimulierten BV-2-Mikrogliazellen. Darüberhinaus könnten invadierende Entzündungszellen infolge der oxidativen burst reaction (Maor et al., 2000) auch selber eine Quelle von Cholesteroxiden darstellen. Daher untersuchten wir, ob aktivierte Immunzellen (BV-2-Mikrogliazellen/LPS, CD3+ T-Zellen/CD3+CD28, CD14+ Monozyten/LPS) in der Lage waren, 7-Ketocholesterol freizusetzen und detektierten innerhalb von 0-72 h keine Freisetzung von 7-Ketocholesterol. Demgegenüber akkumulierte 7-Ketocholesterol zunächst stark in lebenden Hirngewebe der OHSCs bei der Invasion aktivierter Mikrogliazellen, verschwand aber wiederum sehr schnell nach Erreichen eines Maximums, was auf die Existenz eines 7-Ketocholesterol-abbauenden Systems hindeutet. Tatsächlich waren 3 Tage nach Inkubation von OHSCs mit 10 mg/l 7-Ketocholesterol noch 68 \pm 7.8% der Initialkonzentration vorhanden, während diese in Anwesenheit von invadierten Mikrogliazellen während dieses Zeitraumes vollständig bis auf einen geringen Rest (2.1 \pm 0.4%) abgebaut war. Die massive Freisetzung von 7-Ketocholesterol aus inflammatorisch infiltriertem Hirngewebe ist bei Koinkubation mit dem Radikalfänger DMPO deutlich reduziert, was auf den oxidativen Angriff aktivierter Mikrogliazellen als Ursache der 7-Ketocholesterol-Freisetzung hindeutet. Zur Untersuchung des Beitrages neuronaler und nichtneuronaler Zellen zur 7-Ketocholesterol-Produktion wurden sowohl primäre Neurone exzitotoxisch geschädigt, als auch lebendes Hirngewebe mit und ohne selektiver Elimination der Neurone mittels NMDA, mit Mikrogliazellen inkubiert. Dabei entsprach die Differenz zwischen der gemessenen Freisetzung in OHSCs mit lebenden Neuronen (etwa 220 μ g/mg Protein) zu der in OHSCs mit eliminierten Neuronen

C6 Ullrich

(etwa 185 µg/mg Protein) in etwa der Freisetzung in NMDA-geschädigten isolierten Neuronen (etwa 40 µg/mg Protein). Daraus kann gefolgert werden, dass inflammatorisch freigesetztes 7-Ketocholesterol zu etwa 85 % nicht-neuronalen Ursprungs ist.

3.1.4. 7-Ketocholesterol wird von aktivierten Mikrogliazellen abgebaut, nicht aber von neuronalen Zellen
Die rapide Metabolisierung von 7-Ketocholesterol in OHSCs, in die Mikrogliazellen invadiert sind, legt das Vorhandensein eines abbauenden Systems in Mikrogliazellen nahe. Tatsächlich waren kultivierte Mikrogliazellen in der Lage, 7-Ketocholesterol sehr schnell und in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand abzubauen, aber weder neuronale HT22-Zellen, noch primäre Neurone.

3.1.5. 7-Ketocholesterol im Hirngewebe korreliert mit dem Krankheitsscore und der neuronalen Schädigung bei experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis

Aufgrund unserer Ergebnisse, dass 7-Ketocholesterol hauptsächlich aus dem oxidativen Angriff auf nicht-neuronale Bestandteile des ZNS resultiert, resultierte unmittelbar die Frage nach der Existenz von 7-Ketocholesterol im Hirngewebe von MS-Patienten. In einer Kollaboration mit Prof. Cedrik S. Raine (Albert Einstein College of Medicine, New York) analysierten wir daher humanes Hirngewebe von MS-Patienten und fanden im Hirngewebe von Patienten mit akuten MS-Läsionen eine um das 2,6-fache erhöhte Konzentration im Vergleich zu Hirngewebe von Patienten mit chronischer, nicht-aktiver MS oder von Patienten ohne ZNS-Erkrankungen. Darüberhinaus untersuchten wir die Konzentration von 7-Ketocholesterol im Hirnstamm von Mäusen nach Induktion einer experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) als gut charakterisiertes CD4+ T-Zell-vermitteltes Tiermodell der MS (Martin et al., 1992; Noseworthy et al., 2000). Hier kam es während der Krankheitsverlaufes zu einer mit dem mittels active-caspase-3-Färbung nachgewiesenen neuronalen Zelltod und klinischem Krankheitsbild parallelen Anstieg der Konzentration von 7-Ketocholesterol in den betroffenen Hirnstammarealen. Die Konzentration in den histologisch betroffenen Hirnarealen war signifikant höher ($4,14 \pm 0,71$ ng/mg w.w.), als in den nicht betroffenen Hirnarealen ($1,48 \pm 0,16$ ng/mg w.w.). Interessanterweise blieben die 7-Ketocholesterol-Konzentrationen bei den Tieren, die nach der EAE keine Regredienz der klinischen Symptome zeigten, konstant erhöht, was einen sich selbst erhaltenden Mechanismus spricht.

3.2. Welche mikroglialen Signalwege werden durch die identifizierten oxidativ modifizierten Lipide aktiviert?

3.2.1. Oxidierte Cholesterole aktivieren eine MAPK-vermittelte Signaltransduktion, gelangen in den Zellkernen und aktivieren die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) in Mikrogliazellen

Die Inkubation von BV-2-Mikrogliazellen mit pathophysiologischen Gewebekonzentrationen von 7-Ketocholesterol führte zur Induktion eines amöboiden Phänotyps, einer erhöhten Proliferationsrate, einer erhöhten Expression von migrationssteuernden Integrinen wie CD11a und ICAM-1 und einer Induktion der iNOS. Der Mikrogliaaktivierung durch nicht primär neurotoxische Konzentrationen von 7-Ketocholesterol ging eine Phosphorylierung und Aktivierung von MEK und ERK-1/2, aber nicht von p38 oder CREB voraus, sowie die nukleäre Translokation von NF-κB und Aktivierung der PARP-1 im Nukleus. Es konnte direkt gezeigt werden, dass 7-Ketocholesterol innerhalb von etwa 30 min auf einem noch unbekanntem Wege den Nukleus erreicht und dort durch Interaktion mit der DNA die Aktivierung der PARP-1 direkt induziert. Prinzipiell wird eine ähnliche Signalkaskade auch durch 25-Hydroxycholesterol ausgelöst, dem zweithäufigsten Cholesteroxid im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Multipler Sklerose.

Ausschaltung der PARP-1 mittels stabiler Transfektion mit einem antisense-PARP-1-Vektors war in der Lage, die 7-Ketocholesterol-induzierte Mikrogliaaktivierung zu verhindern. So reagieren antisense-PARP-1-BV-2-Mikrogliazellen auf die Inkubation mit 7-Ketocholesterol zwar mit einer Induktion cytoplasmatischer Signalwege wie der ERK-1/2-Phosphorylierung und mit der Translokation von NF-κB, die aber nicht mehr mit der Induktion der NOS oder den migrationssteuernden Integrinen CD11a und ICAM-1 verbunden war. Dieser Befund demonstriert die zentrale Funktion der PARP-1 in der nukleären Exekution zytoplasmatischer Mikrogliaaktivierender Signalwege.

Derzeit wird untersucht, durch welche Rezeptoren oder welche Signalwege die Aktivierung des MAPK-Signallings von 7-Ketocholesterol vermittelt wird. Dabei werden die Experimente zur Überprüfung der bisher an BV-2-Mikrogliazellen gewonnenen Befunde auch auf primäre Mikrogliazellen ausgedehnt.

Darüberhinaus wird die Frage verfolgt, ob 7-Ketocholesterol und 25-Hydroxycholesterol, also die beiden hauptsächlich nachweisbaren Cholesteroloxide ähnliche oder unterschiedliche Signalwege induzieren und fanden bisher keine Unterschiede in den durch verschiedene Cholesteroloxide induzierten Signalwegen.

3.3. Bewirken die identifizierten Signalwege Neuroprotektion oder Neurodegeneration ?

3.3.1. 7-Ketocholesterol induziert in lebendem Hirngewebe einen durch Mikrogliazellen hervorgerufenen inflammatorischen Schaden

Ausgehend von den Erkenntnissen über eine direkte Neurotoxizität von 7-Ketocholesterol in Experimenten mit neuronalen Zelllinien (Chang et al., 1998) untersuchten wir zunächst die mögliche schädigende Wirkung von pathophysiologischen Konzentrationen von 7-Ketocholesterol auf lebendes Hirngewebe in OHSCs. In diesen Experimenten konnte kein signifikanter Anstieg des neuronalen Zelltods nach bis zu 3-tägiger Inkubation mit Konzentrationen, so wie sie im Liquor von Patienten mit MS gefunden worden sind, detektiert werden. Auf der anderen Seite waren diese Konzentrationen in der Lage, in Anwesenheit von Mikrogliazellen eine deutliche neuronale Schädigung zu induzieren, die Neuronenspezifität der geschädigten Zellen wurde hierbei mittels Doppelimmunfluoreszenz von Propidiumiodid und NeuN oder Neurofilament nachgewiesen. Darüberhinaus migrierten Mikrogliazellen in Anwesenheit von 7-Ketocholesterol deutlich stärker und selektiver in die neuronalen Schichten des lebenden Hippocampus. Damit konnte gezeigt werden, dass 7-Ketocholesterol unter in vivo-ähnlichen Bedingungen in der Lage war, die Migration von Mikrogliazellen in neuronalen Schichten des Hirngewebes sowie einen nachfolgende deutlich inflammatorische neuronale Schädigung zu induzieren.

3.3.2. Ausschaltung der mikroglialen PARP-1 schützt lebendes Hirngewebe vor 7-Ketocholesterol-induzierter neuronaler Schädigung

Da im Teil 2 der Arbeit die PARP-1 als ein zentrales regulatorisches Protein der 7-Ketocholesterol-induzierten Mikrogliaaktivierung identifiziert werden konnte, wurde nun untersucht, welche Wirkung die Ausschaltung der PARP-1 mittels stabiler Transfektion mit einem antisense-Vektor auf die mikrogliale Migration und Induktion des neuronalen Zelltods hat. Hierbei fanden wir, dass im Gegensatz zu Kontrollvektor-Mikrogliazellen antisense-PARP-1-Mikrogliazellen nach Stimulation mit 7-Ketocholesterol nicht mehr spezifisch in die neuronalen Schichten von OHSCs migrierten und nicht mehr in der Lage waren, einen inflammatorischen Sekundärschaden auszulösen.

References

- Addis, P.B., Emanuel, H.A., Bergmann, S.D. and Zayoral, J.H. 1989. Capillary GC quantification of cholesterol oxidation products in plasma lipoproteins of fasted humans. *Free Radic. Biol. Med.* 7: 179
- Alexander L, Lee H, Rosenzweig M, Jung JU, Desrosiers RC. EGFP-containing vector system that facilitates stable and transient expression assays. *Biotechniques* 23(1997): 64-66
- Bell MD, Lopez-Gonzales R, Lawson L, Hughes D, Frasier I, Gordon S, Perry VH. Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J. neurocytol.* 23 (1994): 605-613
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7 (1993): 111-118
- Bjorkhem I, Lutjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* 39 (1998): 1594-1600
- Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P, Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 31 (1992): 616-621
- Bondy SC, Lee DK. Oxidative Stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* 610 (1993): 229-233
- Brocke, S., Gaur, A., Piercy, C., Gautam, A., Gijbels, K., Fathman, C.G. and Steinman, L. 1993. Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 365: 642-644
- Calingasan NY, Chun WJ, Park LC, Uchida K, Gibson GE. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58 (1999): 946-958

C6 Ullrich

- Chang JY, Chavis JA, Liu LZ, Drew PD. Cholesterol oxides induce programmed cell death in microglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (1998a): 817-821
- Chang JY, Liu LZ. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Int.* 32 (1998b): 317-323
- Chang JY, Phelan KD, Chavis JA. Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on sympathetic neurons. *Brain Res. Bull.* 45 (1998c): 615-622
- Chang JY, Phelan KD, Liu LZ. Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on NGF-differentiated PC12 cells. *Neurochem. Res.* 23 (1998d): 7-16
- Chang JY, Liu LZ. Toxicity of cholesterol oxides on cultured neuroretinal cells. *Curr. Eye Res.* 17 (1998e): 95-103
- Chang JY, Liu LZ. 25-Hydroxycholesterol causes death but does not prevent nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 31 (1997): 517-523
- Christie RH, Freeman M, Hyman BT. Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J. Pathol.* 148 (1996): 399-403
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262 (1993): 689-695
- Czapiga M, Colton CA. Function of microglia in organotypic slice cultures. *J. Neurosci. Res.* 56(6) (1999): 644-651
- Drew PD, Chavis JA. Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Res. Bull.* 52 (2000): 391-396
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rithman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.* 15 (1995): 6377-6388
- Dyer, R.G., Stewart, M.W., Mitcheson, J., George, K., Alberti, M.M. and Laker, M.F. 1997. 7-Ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malonaldehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin. Chem. Acta* 260: 1
- Emig, S., Schmalz, D., Shakibaei, M. and Buchner, K. 1995. The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* 270: 13787-13793
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992): 341-390
- Esterbauer H, Zollner H, Lang J. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991): 81-128
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.* 186 (1990): 407-421
- Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B. Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 45 (1995): 143-164
- Gebicke-Haerter PJ, van Calker D, Norenberg W, Illes P. Molecular mechanisms of microglial activation. Implications for regeneration and neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 29 (1996): 1-12
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 11 (1997): 526-534
- Hailer, N.P., Jarhult, J.D. and Nitsch, R. 1996. Resting microglia cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18: 319-331
- Hanisch UK, Lyons S, Nolte C, Prinz M, Weber J, Kettenmann H, Kirchhoff F. Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272 (1997): 28853-28860
- Heppner F, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R. Activated microglial cells migrate towards site of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998): 3284-3290
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP. Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* 22 (1998): 180-188

- Herdegen T, Fiallos Estrada C, Schmid W, Bravo R, Zimmermann M. The transcription factor CREB, but not immediate-early gene encoded proteins, is expressed in activated microglia of lumbar spinal cord following sciatic nerve transection in the rat. *Neurosci. Lett.* 142 (1992): 57-61
- Keller JN, Hanni KB, Kindy MS. Oxidized high-density lipoprotein induces neuron death. *Exp. Neurol.* 161(2) (2000): 621-630
- Keller JN, Mattson MP. Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cells dysfunction, and death in the nervous system. *Rev. Neurosci.* 9 (1998), 105-116
- Kritharides, L., Jessup, W., Gifford, J. and Dean, R.T. 1993. A method for defining the stages of low-density lipoprotein oxidation by the separation of cholesterol- and cholesteryl ester-oxidation products using HPLC. *Anal. Biochem.* 213: 79-89
- Kivatiniz SC, Pelsman MA, Alonso AC, Bagatolli L, Quiroga S. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *J. Neurochem.* 69 (1999): 2601-2609
- Kolsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao ML. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 818(1) (1999): 171-175
- Kopec KK, Carroll RT. Phagocytosis is regulated by nitric oxide in murine microglia. *Nitric Oxide* 4(2) (2000): 103-111
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *TINS* 19(8) (1996): 312-318
- Kucukkaya B, Haklar G, Yalcin AS. NMDA excitotoxicity and free radical generation in rat brain homogenates: application of a chemoluminescence assay. *Neurochem. Res.* 21 (1996): 1535-1538
- Lagace TA, Byers DM, Cook HW, Ridgway ND. Chinese hamster ovary cells overexpressing the oxysterol binding protein (OSBP) display enhanced synthesis of sphingomyelin in response to 25-hydroxycholesterol. *J. Lipid. Res.* 40 (1999): 199-116
- Lindenau J, Noack H, Asayama K., Wolf G. Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24 (1998): 252-256
- Liu H, Jan M, Chou C, Chen P, Ke N. Is green fluorescent protein toxic to the living cells ? *Biochem. Biophys. Res. Comms.* 260 (1999): 712-717
- Lockhart BP, Cressey KC, Lepagnol JM. Suppression of nitric oxide formation by tyrosine kinase inhibitors in murine N9 microglia. *Br. J. Pharmacol.* 123 (1998): 879-889
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999): 7238-7243
- Maor I, Kaplan M, Hayek T, Vya J, Hoffman A, Aviram M. Oxidized monocyte-derived macrophages in aortic atherosclerotic lesion from apolipoprotein E-deficient mice and from human carotid artery contain lipid peroxides and oxysterols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000): 775-780
- Martin, R., McFarland, H.F. and McFarlin, D.E. 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 10 : 153-187
- Mattson MP, Barger SW, Begley JG, Mark RJ. Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol.* 46 (1995): 187-216
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374 (1995): 647-650
- Mohan PF, Ard MD. Induction of microglial nitric oxide synthesis by very low density lipoprotein. *Glia* 17(3) (1996): 259-262
- Nakajima H, Ishikawa M, Ohkuma K, Kakui N, Hiranuma T, Ohsawa F, Hoshiko S. The automodified poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) is essential for lipopolysaccharide (LPS)-induced glial activation. 30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, USA (2000)
- Newcombe J, Li H, Cuzner ML. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20(2) (1994): 152-162
- Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayama K, Wolf G. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitric stress. *Glia* 23 (1998): 285-297

C6 Ullrich

- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C.F., Rodriguez, M. and Weinshenker, B.G. 2000. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343: 938-952
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SG, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* 262 (1987): 14352-14360
- Ridgway ND, Lagace TA, Cook HW, Byers DM. Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and cholesterol transport on oxysterol-binding protein phosphorylation and Golgi localization.
- Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, Hayn N, Ziegler-Heitbrock HW, Neumeier D, Brand K. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 11611-11618
- Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Selective modulation of BV-2 microglial activation by prostaglandin E(2). Differential effects on endotoxin-stimulated cytokine induction. *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 28823-28827
- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W. 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* 13(3): 227-231
- Posse de Chaves, E.I., Vance, D.E., Campenot, R.B., Kiss, R.D. and Vance, J.E. 2000. Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 275: 19883-19890
- Raine, C.S. 1984. Biology of disease. The analysis of autoimmune demyelination : its impact upon multiple sclerosis. *Lab Invest.* 50: 608-635
- Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356 (1992): 356-358
- Sevanian A, Seraglia R, Traldi P, Rossato P, Ursini F, Hodis H. Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* 17(5) (1994): 397-409
- Stojkovic T, Colin C, Le-Saux F, Jacque C. Specific pattern of nitric oxide synthase expression in glial cells after hippocampal injury. *Glia* 22(4) (1998): 329-337
- Sudo S, Tanaka J, Toku K, Desaki J, Matsuda S, Arai T, Sakanaka M, Maeda N. Neurons induce the activation of microglial cells in vitro. *Exp. Neurol.* 154 (1998): 499-510
- Takeda H, Tomita M, Tanahashi N, Kobari M, Yokoyama M, Takao M, Ito D, Fukuuchi Y. Hydrogen peroxide enhances phagocytic activity of amoeboid microglia. *Neurosci. Lett.* 240 (1998): 5-8
- Tanaka J, Fujita H, Matsuda S, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* 20 (1997): 23-37
- Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* 274 (1999): 2234-2242
- Ullrich, O., Diestel, A., Eyüpoglu, I.Y. and Nitsch, R. 2001. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Nature Cell Biol.* 3: 1035-1042
- van der Veen RC, Hinton DR, Incardonna F, Hofman FM. Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. *J. Neuroimmunol.* 77 (1997): 1-7
- Wallin C, Weber SG, Sandberg M. Glutathion efflux induced by NMDA and kainate: implications in neurotoxicity ? *J. Neurochem.* 73 (1999): 1566-1572.
- Waeg G, Dimsity G, Esterbauer H. Monoclonal antibodies for detection of 4-hydroxynonenal modified proteins. *Free Radic. Res.* 25 (1996): 149-159
- Wang ZQ, Auer B, Stingl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M and Wagner EF. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes & Dev.* 9 (1995): 509-520
- Witting A, Muller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C. Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J. Neurochem.* 75 (2000): 1060-1070

Yoshino H, Hattori N, Urabe T, Uchida K, Tanaka M, Mizuno Y. Postischemic accumulation of lipid peroxidation products in the brain: immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins. *Brain Res.* 767 (1997): 81-86

4. Vergleiche mit Arbeiten ausserhalb des Sonderforschungsbereiches und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

In Rahmen dieses Projektes wurde auf Ebene des Sonderforschungsbereiches eine intensive Kollaboration mit den Gruppen von Prof. Nitsch und Prof. Zipp etabliert. Internationale Kooperationen bestanden mit Prof. Raine, Albert Einstein College of Medicine, New York. Im Verlauf dieses Projektes wurde Teilergebnisse bereits auf einer grossen Zahl nationaler und internationaler Meetings vorgestellt und stiessen dort auf lebhaftes Interesse.

Besonders hervorgehoben sollen folgende Ereignisse:

- Im Rahmen der Präsentation auf dem Meetings der Society for Neuroscience wurden die aus diesem Projekt entstandenen Arbeiten als „*Editor's bronze choice abstract*“ in der Zeitschrift „*Neurobiology of Lipids*“ ausgezeichnet.
- Die Ergebnisse dieses Teilprojektes wurden in einer *invited plenary lecture auf der William-Harvey-Research-Conference* „PARP 2003“ im Mai 2003 in Lissabon, Portugal vorgestellt.
- Nach Erscheinen der aus dieser Arbeit entstandenen Originalpublikation im *Journal of Experimental Medicine* am 01.12.2003 wurden die Ergebnisse dieser Arbeit von vielen *Wissenschaftsinformationsdiensten* aufgenommen, wovon hier einige genannt sind:

Medizin-Report aus Berlin:

<http://www.berlin-ne.ws/medizin12/Na0312-03.htm>

Bionity, Informationsportal für Medizin und Pharmazie:

<http://www.bionity.com/news/d/32494/>

Informationsdienst Wissenschaft

http://idw-online.de/public/pmid-73133/zeige_pm.html

- Im Januar erfolgten ausführliche Berichte über diese Arbeit in der „*Pharmazeutischen Zeitschrift*“, Ausgabe 04/2004 und im „*Uni-Report*“ der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/pza/2004-04/medizin3.htm>

<http://www.uni-magdeburg.de/unirep/UR2004/januar2004/nervenwasser.htm>

5. Offene Fragen

Folgende Fragen sind offengeblieben und sollen in Fortführung des Projektes ausserhalb der Förderung durch den SFB 507, aber in enger Kooperation mit diesem (Prof. Dr. F. Zipp, Prof. Dr. R. Nitsch, Prof. Dr. I. Bechmann) beantwortet werden. Es ist beabsichtigt, das Projektes innerhalb des neurowissenschaftlichen Schwerpunktes der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zu integrieren und fortzuführen.

- Identifikation von Cholesteroxid-Rezeptoren in Mikroglia und deren Signalübertragung
- Untersuchung der Konzentrationen von aldehydischen Lipidperoxidationsprodukten im Liquor und Hirngewebe von Patienten mit Multipler Sklerose
- Untersuchungen der Funktion und Signaltransduktion von aldehydischen Lipidperoxidationsprodukten in Mikroglia

C6 Ullrich

6. Publikationen

6.1. Originalpublikationen

Direkt aus dem Projekt entstandene Publikationen:

Diestel A, Aktas O, Hackel D, Häke I, Meier S, Raine CR, Nitsch R, Zipp F, **Ullrich O**. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: A link between demyelination and neuronal damage. **Journal of Experimental Medicine** **198(11)**, 1729-1740 (2003)

Publikationen in Zusammenarbeit mit Mitgliedern des SFB 507:

Merker K, **Ullrich O**, Schmidt H, Sitte N, **Grune T**. Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts. *FASEB J.* **17(13)**, 1963-1965 (2003)

6.2. Eingeladene Vorträge

O.Ullrich. Regulation of microglial functions by PARP-1 – consequences for neurons ? Wilhelm Harvey Research Conference: PARP-2003, Lissabon, Portugal, 2003, invited lecture

O.Ullrich. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation. *2nd Symposium of the „Forschungszentrum Immunologie Sachsen-Anhalt“, Weimar, Germany (2003)*

6.3. Konferenzbeiträge als Abstracts

I.Häke, A.Diestel, R.Nitsch, **O.Ullrich**. Interaktion neuronal freigesetzter Cholesteroxide mit Mikrogliazellen: Mechanismen der Neuroprotektion oder Neurodegeneration ? 97.Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Halle, Germany (2002)

A.Diestel, I.Häke, D.Hackel, O.Aktas, R.Nitsch, F.Zipp, **O.Ullrich**. Neuronal damage by oxysterol-induced microglia activation – an injurious neuron-microglia-crosstalk ? Berlin Neuroscience Forum, Liebenwalde (2002)

A.Diestel, I.Häke, O.Aktas, R.Nitsch, F.Zipp, **O.Ullrich**. Cholesterol oxides induce microglia activation in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. 5th European Meeting on Glia cell Function in Health and Disease, Rome (2002)

A.Diestel, D.Hackel, I.Häke, F.Zipp, R.Nitsch, **O. Ullrich**. Microglia-mediated neuronal injury by 7-ketocholesterol found in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. 19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany (2002)

O.Ullrich, A.Diestel, D.Hackel, I.Haeke, O.Aktas, F.Zipp, R.Nitsch. Activation of microglia cells and induction of neuronal injury by cholesterol oxides found in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. 32th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Orlando, USA (2002)
Awarded as Editor's bronze choice abstract in Neurobiology of Lipids Vol.1, 5 (2002)

7. Gastwissenschaftler

- Dr. Anke Witting, University of Washington, Seattle, USA
- Prof. Dr. Ghazally Ismail, Malaysia University of Science and Technology, Kuala Lumpur, Malaysia

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB507/C7 2002-2004

Physiologische Mechanismen der Lysophospholipid-vermittelten Aktivierung von Mikrogliazellen

C. Eder

1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

Mikrogliazellen, die ortsständigen immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems, befinden sich im gesunden adulten Gehirn in einem funktionellen Ruhezustand, der morphologisch durch eine starke Ramifizierung gekennzeichnet ist. Verschiedene neurologische Erkrankungen sind von einer raschen Aktivierung der Mikrogliazellen begleitet. Charakteristische Merkmale aktivierter Mikrogliazellen sind die amöboide Morphologie, die Expression verschiedener Makrophagen-Oberflächenantigene sowie die Fähigkeit zur Migration, zur Antigenpräsentation und zur Phagozytose (Raivich et al., 1999; Stoll und Jander, 1999; Streit et al., 1999). Die Faktoren, die eine Aktivierung der Mikrogliazellen im Gehirn auslösen, sind bisher nicht vollständig identifiziert. Neben proinflammatorischen Zytokinen spielen Lysophospholipide eine wesentliche Rolle als Aktivierungsmediatoren (Goetzl und An, 1998).

Seit etwa 10 Jahren werden die physiologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen untersucht. Mit Hilfe von Patch-clamp-Experimenten wurde nachgewiesen, daß Mikrogliazellen in der Lage sind, verschiedene Ionenkanäle zu exprimieren, die selektiv K^+ , H^+ , Na^+ , Ca^{2+} oder Cl^- leiten. An isolierten kultivierten Mikrogliazellen wie auch an Mikrogliazellen aus Hirnschnittpräparaten wurde beobachtet, daß sich die Ionenkanalexpressionsmuster nach Aktivierung der Zellen drastisch ändern (Eder, 1998).

Zitierte Literatur:

Eder, C. (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* **275**, C327-C342.

Goetzl E.J. and An S. (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* **12**, 1589-1598.

Raivich G., Bohatschek, M., Kloss, C.U.A., Werner, A., Jones, L.L. and Kreutzberg, G.W. (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* **30**, 77-105.

Stoll, G. and Jander, S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.* **58**, 233-247.

Streit, W.J., Walter, S.A. and Pennell, N.A. (1999) Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* **57**, 563-581.

2 Angewandte Methoden

Zellkultur:

Die Mehrzahl der Untersuchungen erfolgte an isolierten kultivierten Mikrogliazellen, die durch die Zugabe des astrozyten-konditionierten Mediums in den ramifizierten deaktivierten Zustand überführt worden waren. Einige Experimente wurden an der Zell-Linie BV-2 durchgeführt.

Patch-clamp-Untersuchungen:

Es wurden sowohl konventionelle Ganzzelleableitungen als auch Perforated-patch-clamp Ableitungen an isolierten kultivierten Mikrogliazellen und BV-2 Zellen durchgeführt.

Fluoreszenzimagingverfahren:

Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration erfolgte ratiometrisch an einem Video-Imaging Meßplatz unter Anwendung des Farbstoffes FURA-2AM.

C7 Eder

Time-lapse Videomikroskopie

Mit Hilfe der Videomikroskopie wurden die morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen untersucht. Ein Video-Mikroskopierplatz diente ebenfalls zur Detektion des Migrationsverhalten der Mikrogliazellen auf Einzelzellebene. Die Migrationsexperimente erfolgten an den Universitäten von Würzburg und Münster im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Albrecht Schwab.

RT-PCR Bestimmungen

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Florian Dreyer wurden die Experimente zur Aufklärung der molekularen Identität des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals von Mikrogliazellen an der Universität Gießen durchgeführt.

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung

Die im Antrag formulierten Aufgabenstellungen wurden mittlerweile fast vollständig bearbeitet. Es wurden die durch Lysophospholipide aktivierten Ionenkanäle identifiziert. Ihre biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften wurden detailliert charakterisiert. Außerdem gelang es uns, die funktionelle Rolle der identifizierten Ionenkanäle für die Aktivierungsprozesse der Mikroglia aufzuklären. Im Einzelnen erlangten wir die folgenden Ergebnisse:

(1) Untersuchungen zur Wirkung der Lysophospholipide Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidsäure (LPA) auf kultivierte Mikrogliazellen

Zunächst wurde die Wirkung der Lysophospholipide S1P und LPA auf kultivierte Mikrogliazellen unter Anwendung der Patch-clamp- und Fluoreszenzimaging-Methoden untersucht. Wir konnten zeigen, daß S1P und LPA transiente Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirken. Diese S1P- und LPA-induzierten Ca^{2+} -Anstiege sind sowohl in Ca^{2+} -freier als auch in Ca^{2+} -haltiger Extrazellulärlösung nachweisbar. Sie sind jedoch nicht nach vorheriger Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Thapsigargin meßbar. Daraus kann man schlußfolgern, daß in Mikrogliazellen die transiente Freisetzung des intrazellulären Kalziums nach LPA- oder S1P-Stimulation aus Thapsigargin-sensitiven intrazellulären Ca^{2+} -Speichern erfolgt.

Diese S1P- und LPA-induzierten Kalziumanstiege bewirken in kultivierten Mikrogliazellen die Aktivierung eines Ionenkanals, der unter Kontrollbedingungen nicht nachweisbar ist. Es zeigte sich, daß es sich hierbei um einen spannungsunabhängigen Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanal handelt. In Spannungs-sprung-Protokollen wurde kein zeitliches Aktivierungs- oder Inaktivierungsverhalten der Ca^{2+} -aktivierten Kaliumströme beobachtet. In pharmakologischen Untersuchungen konnten wir die Sensitivität dieses Kanals gegenüber Charybdotoxin, Clotrimazol als auch gegenüber Iberiotoxin nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigte weder Apamin noch Paxillin eine Wirkung auf den durch S1P oder LPA-aktivierten Kaliumkanal. In molekularbiologischen Analysen mit Hilfe der RT-PCR wurde die molekulare Identität des LPA- und S1P-aktivierten Kaliumkanals aufgeklärt. Hierbei handelt es sich um den Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit IKCa1 (Schilling et al., 2002, 2004a).

(2) Funktionelle Bedeutung des durch S1P oder LPA ausgelösten Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals für Aktivierungsprozesse der Mikroglia

Die Aktivität des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals IKCa1 führt zu einer transienten Membranhyperpolarisation in Mikrogliazellen. Diese Membranhyperpolarisation wiederum bewirkt, daß sich die treibende Kraft für bestimmte Ionenkanäle erhöht, wie z. Bsp. für die Ca^{2+} -freisetzungsaktivierten Ca^{2+} Kanäle. Aufgrund des K^+ -Ausstromes durch die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle wird zusätzlich eine Veränderung der intrazellulären K^+ Konzentration und damit verbunden eine Veränderung der intrazellulären Osmolarität bewirkt, welche eine Zellschrumpfung zur Folge hat (Schilling et al., 2002).

Eine funktionelle Bedeutung des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals IKCa1 für die Mikrogliaaktivierung konnte in unseren Untersuchungen nachgewiesen werden. In der Annahme, daß i) Lysophospholipide das Migrationsverhalten von Mikrogliazellen beeinflussen und ii) Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellmigration spielen, wurde das Migrationsverhalten der Mikrogliazellen auf Einzelzellebene mit Hilfe der Time-lapse Videomikroskopie untersucht. In unseren Untersuchungen zur Wirkung von LPA zeigte sich, daß dieses Lysophospholipid das Migrationsverhalten der Mikrogliazellen stimuliert. Diese LPA-stimulierte Migration konnte durch Charybdotoxin und Clotrimazol inhibiert werden. Dabei wurden diese Inhibitoren in gleichen Konzentrationen verwendet, wie sie zur Auslösung einer kompletten

Kaliumkanalblockade benötigt wurden. Unsere Ergebnisse beweisen die Notwendigkeit des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals IKCa1 für die optimale Migration von Mikrogliazellen (Schilling et al., 2004a).

(3) Untersuchungen zur Wirkung des Lysophospholipids Lysophosphatidylcholin (LPC) auf kultivierte Mikrogliazellen

In weitergehenden Untersuchungen wurden die Effekte des Lysophospholipids LPC auf kultivierte Mikrogliazellen aufgeklärt. LPC bewirkt im Gegensatz zu LPA und S1P einen persistierenden intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg in Mikrogliazellen, der mit Hilfe von Fluoreszenzimaging-Experimenten belegt werden konnte. Die LPC-induzierten Ca^{2+} -Anstiege sind nicht nachweisbar in Ca^{2+} -freier Extrazellulärlösung, was auf einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum ohne Beteiligung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher schließen läßt.

In Patch-clamp Untersuchungen wurde gezeigt, daß die LPC-bedingten persistierenden Ca^{2+} -Anstiege eine dauerhafte Aktivierung von Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen zur Folge hatte. Dabei unterschied sich das pharmakologische Profil des durch LPC aktivierten Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals nicht von dem durch LPA oder S1P transient aktivierten Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanal IKCa1. Desweiteren wurde aufgeklärt, daß der LPC-induzierte Ca^{2+} -Anstieg durch die Aktivierung eines unselektiven Kationenkanals bedingt ist. Dieser Kanal ist für mono- und divalente Kationen, aber nicht für Anionen permeabel. Er zeigte kein zeitliches Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten im Spannungsbereich zwischen -120 mV und +60 mV. Die Aktivierung dieses Kanals durch LPC erfolgt verzögert nach etwa 2-3 Minuten und ist vollständig reversibel nach Auswaschen des LPC. Ein detailliertes pharmakologisches Profil dieses Kanals wurde ebenfalls erstellt. Es zeigte sich, daß der Kationenkanal vollständig inhibierbar durch die Lanthanide Gadolinium und Lanthan, partiell inhibierbar durch Zinkionen und das Spinnentoxin von *Grammostola spatulata*, aber insensitive gegenüber Amilorid, Diltiazem, LOE908MS sowie den Chloridkanalblockern DIDS und NPPB ist.

In Current-clamp Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß LPC komplexe Membranpotentialänderungen auslöst. Zunächst zeigen mit LPC stimulierte Mikrogliazellen eine transiente Depolarisation, welche durch die Aktivierung der unselektiven Kationenkanäle bewirkt wird. Aufgrund des Ca^{2+} -Einstromes durch die unselektiven Kationenkanäle wird der kalziumaktivierte Kaliumkanal IKCa1 aktiviert, wodurch eine konsekutive Membranhyperpolarisation ausgelöst wird (Schilling et al., 2004b).

(4) Funktionelle Bedeutung des durch LPC ausgelösten unselektiven Kationenkanals für Aktivierungsprozesse der Mikroglia

In weiteren Untersuchungen wurden LPC-induzierte Morphologieänderungen, die ein Zeichen der Mikrogliaaktivierung sind, analysiert. Die kultivierten Mikrogliazellen wurden zunächst für einige Tage mit astrozyten-konditioniertem Medium kultiviert, welches die Ausbildung mehrerer stark verzweigter Zellausläufer zur Folge hatte (Schilling et al., 2001). Nach Stimulation dieser ramifizierten Mikrogliazellen mit LPC wurde ein rascher Wechsel der Zellmorphologie beobachtet, d.h., die Zellen zogen ihre Fortläufer ein und gingen innerhalb kurzer Zeit vom ramifizierten in den amöboiden Zustand über. Interessanterweise verliefen diese Morphologieänderungen unabhängig von den extrazellulären und intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Die Aktivierung der unselektiven Kationenkanäle war für die morphologischen Änderungen notwendig. Lanthanide in Konzentrationsbereichen, die unselektive Kationenkanäle vollständig blockieren, inhibieren die LPC-induzierten morphologischen Veränderungen der kultivierten Mikrogliazellen (Schilling et al., 2004b).

Dennoch konnten bei vollständiger Inhibition der unselektiven Kationenkanäle die morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen nicht komplett aufgehalten werden, was auf einen zweiten Mechanismus der Regulation des mikroglialen Deramifizierungsprozesses hinwies. Es zeigte sich, daß zusätzlich die Aktivität eines Kalium-Chlorid-Cotransporters für den Übergang der Mikrogliazellen von dem ramifizierten in den amöboiden Zustand notwendig ist. Bei gleichzeitiger Inhibition des unselektiven Kationenkanals und des Kalium-Chlorid-Cotransporters wurden keine morphologischen Veränderungen von Mikrogliazellen nach Stimulation mit LPC beobachtet (Schilling et al., 2004b).

C7 Eder

Eigene Veröffentlichungen:

Projekt-assoziierte Veröffentlichungen:

- Schilling T., Nitsch R., Heinemann U., Haas D. & Eder C. Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K^+ channel expression in microglia via distinct signaling pathways, *Eur. J. Neurosci.* 14: 463-473, 2001.
- Eder C. & DeCoursey T.E. Voltage-gated proton channels in microglia. *Prog. Neurobiol.* 64: 277-305, 2001.
- Schilling T., Repp H., Richter H., Koschinski A., Heinemann U., Dreyer F. & Eder C. Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCa1 Ca^{2+} -dependent K^+ channels, *Neuroscience*, 109: 827-835, 2002.
- Eder C. Microglial ion channels. In: *Microglia in the regenerating and degenerating CNS.* (Ed.: Streit W.J.), Springer-Verlag, New York, pp. 36-57, 2002.
- Schilling T. & Eder C. Effects of kinase inhibitors on TGF- β induced upregulation of Kv1.3 K^+ channels in brain macrophages. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, 447: 312-316, 2003.
- Schilling T., Stock C., Schwab A. & Eder C. Functional importance of Ca^{2+} -activated K^+ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur. J. Neurosci.*, in press, 2004a.
- Schilling T., Lehmann F., Rückert B. & Eder C. Physiological mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced microglial deramification. under revision, 2004b.

b) sonstige Veröffentlichungen:

- Schilling T., Gratopp A., DeCoursey T.E. & Eder C. Voltage-activated proton currents in human lymphocytes, *J. Physiol.*, 545.1: 93-105, 2002.

c) Abstrakta:

- Schilling T., Repp H., Richter H., Koschinski A., Heinemann U., Dreyer F. & Eder C. Sphingosine-1-phosphate activates IK1 calcium-activated potassium channels in murine microglia. *Biophys. J.* 80: 206a-207a, 2001.
- Schilling T., Repp H., Koschinski A., Dreyer F., Richter H., Heinemann U. & Eder C. Sphingosine-1-phosphate activates the calcium-activated potassium channel SK4 in murine microglia. *Pflügers Arch.* 441: R147, 2001.
- Schilling T., Gratopp A. & Eder C. Voltage-activated proton currents in human lymphocytes. *Pflügers Arch.* 441: R274, 2001.
- Gratopp A., Schilling T. & Eder C. Functional proton channels are required for respiratory burst generation in human B lymphocytes. *Pflügers Arch.* 443: S238, 2002.
- Schilling T., Gratopp A. & Eder C. Proton channels in human lymphocytes. *Biophys. J.* 82: 639a, 2002.
- Schilling T., Rückert B., Lehmann F. & Eder C. Non-selective cation channels are involved in lysophosphatidylcholine-induced calcium increases and shape changes of microglia. *Pflügers Arch.* 445: S79, 2003.

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Unsere erhobenen Daten stießen im Berichtszeitraum national und international auf großes Interesse, welches sich unter anderem in den Einladungen zum Verfassen von zwei Übersichtsartikeln über die Ionenkanäle in Mikrogliazellen (Eder und DeCoursey, 2001; Eder, 2002) sowie in zahlreichen Einladungen zu Vorträgen widerspiegelte. Unsere Arbeiten wurden mehrfach zitiert - entweder von Kollegen aus der Physiologie, die sich mit Ionenkanälen anderer Zellpräparationen beschäftigen oder von Kollegen aus der Anatomie, Neurologie und Immunologie, die an dem Verhalten von Mikrogliazellen interessiert sind. Der Übersichtsartikel Eder & DeCoursey, 2001 fand Beachtung in Bertil Hille's Lehrbuch "Ion channels in excitable membranes" (2001).

5 Offene Fragen

Nachdem die funktionelle Bedeutung von Ionenkanälen für Aktivierungsprozesse Lysophospholipid-stimulierter Mikroglia *in vitro* weitgehend aufgeklärt wurde, stellt sich nun die Frage, ob diese Prozesse in gleicher Weise *in situ* erfolgen. Untersuchungen mit Hilfe der Patch-clamp- und Fluoreszenzimagungsverfahren an akuten Hirnschnitten sowie an organotypischen Hirnschnittkulturen können hierbei Aufschluß über die Aktivierung von Ionenkanälen und deren Rolle für die Funktionalität der Mikrogliazellen in Modellen neurologischer Erkrankungen, wie zum Beispiel bei der Ischämie, Multiplen Sklerose und der Epilepsie, geben.

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB507/C8 2002-2004

Physiologische Eigenschaften glialer Tumore

Prof. Dr. H. Kettenmann

1 Kenntnisstand und Ausgangsfragestellung

Gliome sind bei weitem die häufigsten Tumore des zentralen Nervensystems. Wie der Begriff andeutet, geht man davon aus, dass sie von Gliazellen abstammen. Dabei unterscheidet man zwischen Astrozytomen, Oligodendrogliomen, Glioblastomen und Ependymomen. Letztere stellen die wohl aggressivste Form des Glioms dar. Während die intrinsischen Hirntumore praktisch nicht metastasieren, das heisst in andere Organe einwandern, begründet sich ihre Aggressivität jedoch auf ihr invasives Verhalten innerhalb des Hirnparenchyms. Daher ist das größte klinische Problem die diffuse Infiltration des Gehirns. Als Konsequenz ergibt sich, dass die Grenzen zwischen Tumor und gesundem Gewebe fließend sind und es daher für den Neurochirurgen unmöglich ist, alle Gliomzellen zu entfernen. Ähnliche Probleme wirft die Bestrahlung auf, da die Tumorzellen weite Bereiche des gesunden Gewebes infiltrieren und die Grenze dieser Infiltration unscharf definiert ist. Als Konsequenz liegt die Überlebensrate der Patienten nach der Operation in der Größenordnung von ½ Jahr. Über die Kontrollfaktoren, die die Invasion von Gliomzellen in das Hirnparenchym steuern, ist bisher wenig bekannt. Neue Ansätze wie die Kookultivierung von Hirnschnitten mit Tumorsphäroiden (Matsumura et al., 2000) oder der Einsatz transfizierter, veränderter Gliomzellen (Senner et al., 2000) geben neue Möglichkeiten, diese Fragen anzugehen. Das Ziel unseres Antrages ist daher zu verstehen, wie sich Tumorzellen in der Gehirnumgebung verändern und welche Faktoren das starke infiltrative Verhalten kontrollieren.

2 Ziele des Projektes

Das Ziel dieses Forschungsvorhabens war es herauszufinden, wie sich Tumorzellen in Interaktion mit Hirnzellen verändern. Dieses Projekt untergliederte sich in folgende Teilbereiche:

1. Die Entwicklung eines Kulturmodells, in dem die Interaktion zwischen Tumorzellen und Hirngewebe unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersucht werden kann.
2. Die Bedeutung der Expression von GABA-Rezeptoren für das Verhalten der Tumorzellen und die Identifizierung der neuronalen Signale, die die Rezeptorexpression induzieren.
3. Untersuchungen zur funktionellen Expression von GABA Transportern.
4. Suche nach Kandidatengen, die das Migrationsverhalten der Tumorzellen kontrollieren. Dieser Projektteil wird in enger Interaktion mit der Arbeitsgruppe von Deimling durchgeführt.
5. Untersuchungen zu GABA Rezeptoren und zum Transkriptionsfaktor ETS-1 als Kandidaten für Migrationskontrolle.

Wie nachfolgend beschrieben, haben wir zu eine Reihe von Ergebnissen zu den meisten der Teilbereiche erarbeitet. Zudem hat sich eine der interessantesten Ergebnisse eher überraschend aus einer Zufallsbeobachtung ergeben, nämlich die Bedeutung von adulten neuralen Stammzellen für das Tumorwachstum.

Die Entwicklung eines Schnittkulturmodells zeigt die Bedeutung der Mikroglia für die Invasion von Gliomzellen.

Im Berichtszeitraum haben wir ein Schnittkulturmodell entwickelt, um die Infiltration von Gliomzellen im Hirngewebe zu quantifizieren. Fluoreszenzmarkierte Gliomzellen werden dabei in einen kultivierten Hirnschnitt infiziert. Wir können dann die Wanderung der Gliomzellen über mehrere Tage verfolgen und dabei quantifizieren. Wir haben uns zuerst die Frage gestellt, ob die Anwesenheit von Mikrogliazellen die Tumordinfiltration fördert oder behindert. Wir haben eine Methode angewandt, um diese Schnitte Mikroglia-frei zu machen. Eine Behandlung mit 100 µl Clodronate- geladenen Liposomen führt zu einem vollkommenen Verschwinden der Mikrogliazellen innerhalb von 24 Stunden. Wir konnten zeigen,

dass durch diese Behandlung die Schnitte Mikroglia-frei sind, dass jedoch Astrozyten und Neurone weitgehend intakt sind. Astrozyten wurden durch diese Behandlung transient aktiviert, was sich in einer erhöhten Expression von GFAP ausdrückte. 72 Stunden nach der Behandlung war jedoch die Aktivierung wieder abgeklungen und die GFAP-Expression der Astrozyten war auf dem Niveau wie in Kontrollschnitten. Wir haben daher diese Periode (72 h) nach Mikroglia- Depletion abgewartet und dann zu diesem Zeitpunkt die Gliomzellen injiziert. Nichtbehandelte Hirnschnitte dienten dabei als Kontrolle. Um die Gliomwanderung zu quantifizieren, wurde die Distanz der Gliomzellen von der Injektionsstelle individuell bestimmt. Damit ergaben sich aus jedem Schnitt einige hundert Wanderungswerte für diese Zellen. Wir haben dabei zwei Populationen von Gliomzellen unterschieden, die zum einen wenig wanderten und damit an der Injektionsstelle verblieben und die Haupttumormasse bildeten und eine zweite Population, die sich sehr aktiv und über große Distanzen durch das Schnittgewebe von der Injektionsstelle wegbelegte. Unsere Auswertungen zeigten, dass in Mikroglia-depletierten Schnitten die Population der hochinvasiven Zellen stark reduziert war. Während zum Beispiel in Kontrollen nach 4 und 5 Tagen 54 bzw 43% der Zellen hochinvasiv waren, waren es in den Mikroglia-depletierten Schnitten nur 28 bzw. 20% aller Zellen. Dies zeigt, dass die Anwesenheit von Mikrogliazellen die Tumordinvasion fördert.

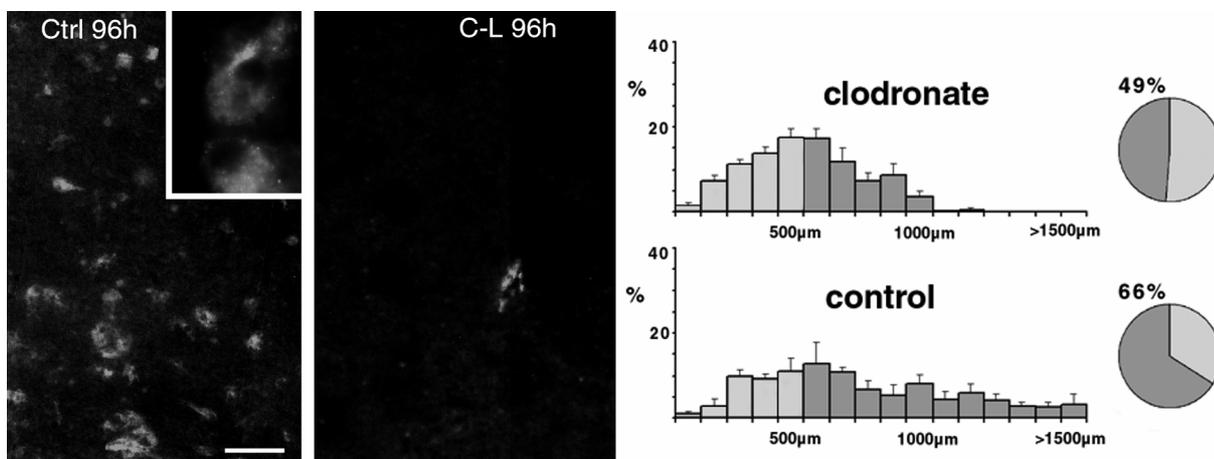


Abb. 1 Selektive Ausschaltung von Mikroglia im Schnittkulturmodell. In der linken Abb. sind Mikroglia im Schnittkulturmodell über eine immunhistochemische Markierung von IL-B4 dargestellt, 96 Stunden Kultivierung. Rechter Hand ist ein Mikroglia-freier Schnitt nach Behandlung mit liposomal verkapseltem Clodronat dargestellt zum selben Zeitpunkt. Hier ebenfalls Markierung über IL-B4 und Detektion eines Blutgefäßes. In den Histogrammen im rechten Teil der Abb. ist die signifikante Inhibition der Tumorzellen hinsichtlich ihrer Wanderungsdistanz im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors ETS1 für Gliominvasion

Transkriptionsfaktoren der ETS Familie spielen eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Genexpression. In vitro Experimente deuten darauf hin, dass insbesondere ETS-1 migratorische Aktivität bei Gliomzellen fördert, indem dieser Transkriptionsfaktor die Expression von Integrin und Urokinase Plasminogen Aktivator kontrolliert. Die Expression dieser beiden Moleküle ist eng mit der Degradierung der extrazellulären Matrix durch Proteinasen verbunden. Daher führt auch die Inhibition von ETS-1 zu einer vermindernden Degradation der extrazellulären Matrix in vitro. Wir haben in diesem Projekt die Bedeutung von ETS-1 für Wanderungsvorgänge *in situ* untersucht. Wir haben ein Konstrukt hergestellt, das sowohl die Expression des grünen fluoreszenten Proteins (GFP) als auch eines dominant negativen Proteins für ETS-1 auf demselben Vektor kontrolliert, von dieser mRNA jedoch zwei unabhängige Proteine translatiert. Dieses Konstrukt erlaubt es uns, die Zellen zu erkennen, die das dominant negative Protein für ETS-1 exprimieren. Wir haben Zellen erfolgreich transfiziert und können zeigen, dass eine Blockade von ETS-1 die Tumordinfiltration reduziert.

Funktionelle GABA Rezeptoren als Modulatoren des Gliomverhaltens

Wir haben in der vergangenen Periode gezeigt, dass GABA_A Rezeptor-Aktivität die Proliferation der Gliomzellen beeinflusst. Weiterhin haben wir Hinweise, dass hochproliferierende Gliome den Rezeptor nie exprimieren, während der Rezeptor bei niedergradigen Gliomen zu finden ist. Wir haben daher in dem laufenden Projekt ein Konstrukt hergestellt, um Gliomzellen mit GABA_A Rezeptoren zu transferieren.

Wir haben dazu mit Hartmut Lüddens, Universität Mainz, eine Kollaboration begonnen, da er grosse Erfahrungen mit Konstrukten von GABA_A Rezeptor-Untereinheiten und deren Transfektion hat. Wir haben nun ein Konstrukt hergestellt, das die Untereinheit $\alpha 1$ und $\gamma 2$ trägt, eine Kombination, die nach Hartmut Lüddens' Erfahrung funktionelle Rezeptoren exprimiert. Unsere ersten Injektionen haben zwar eine positive Transkription gezeigt, aber wir konnten bisher noch keine funktionellen GABA Rezeptoren bei den transfizierten Gliomzellen nachweisen.

Die Bedeutung von A1 Rezeptoren für Tumorwachstum

In einer Zusammenarbeit mit Prof. Langen, FZ Jülich, konnten wir zeigen, dass Gliome im Randbereich hohe Expression für den Adenosin A1 Rezeptor zeigten. Unsere nachfolgenden immunzytochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass alle Zellen dieses Randgebietes, nämlich Astrozyten, Mikroglia aber auch die Tumorzellen den A1 Rezeptor hochregulieren. Insbesondere die Mikrogliazellen zeigen eine hohe Expression. Um die funktionelle Bedeutung des Rezeptors für Tumorproliferation und Invasion zu untersuchen, haben wir unser Schnittmodell herangezogen, indem wir Invasion quantitativ erfassen können. Wir konnten zeigen, dass eine chronische Stimulation des Hirnschnittes mit einem spezifischen Agonisten für den A1 Rezeptor die Tumorproliferation und Invasion inhibierte. Dies wird bestätigt durch Experimente mit Antagonisten gegen den A1 Rezeptor, die zeigten, dass eine chronische Blockade die Tumorproliferation und Invasion signifikant erhöhte. Wir haben durch eine Kollaboration mit Jürgen Schnermann (Natl. Inst. Of Diabetes, Digestive and Kidney Disease; Bethesda Maryland, USA) A1 Rezeptor knock-out Tiere erhalten und sind gerade dabei, Tumorzellen in diesen Zellen zu untersuchen und sie mit Kontrollzellen zu vergleichen. Wir hoffen damit die Bedeutung von Adenosin Rezeptoren für Tumorwachstum zu bestimmen.

Vorläuferzellen umhüllen Tumore

In einer Zusammenarbeit mit Gerd Kempermann haben wir die Bedeutung von Stammzellen für das Tumorwachstum untersucht. Wir konnten dabei zwischen Tumorzellen und intrinsischen Stammzellen unterscheiden, da wir Tumore in ein transgenes Tier inokuliert haben, bei dem die Stammzellen durch die Expression von EGFP, gekoppelt an den Nestin Promotor, markiert waren. Wir waren daher in der Lage zu unterscheiden, ob Stammzellen aus dem normalen Gewebe mit den Tumorzellen interagierten oder ob diese Stammzellen aus der Tumormasse stammten. Die Tumorzellen waren durch Transfektion mit DsRed markiert. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei jungen Tieren Stammzellen aus der ventrikulären Zone aktiv über grosse Distanzen auf den Tumor zuwandern und diesen einhüllen. Dies fanden wir jedoch nur bei jungen Tieren, während bei älteren Tieren ein solches Verhalten nicht zu beobachten war. Wir gehen daher davon aus, dass bei älteren Tieren die Stammzellen nicht mehr in diesem Maße rekrutiert werden können. Durch Vergleich der Überlebensraten konnten wir zeigen, dass die jungen Tiere eine erhöhte Überlebensrate im Vergleich zu den älteren hatten. Um die Bedeutung der Stammzellen für das Überleben der Tiere zu bestätigen, haben wir gleichzeitig mit den Tumorzellen isolierte Stammzellen inokuliert. Dies führte dazu, dass diese alten Tiere erheblich besser überlebten und damit eine Überlebensrate ähnlich wie junge Tiere erreichten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Stammzellen Tumorwachstum verhindern können. Das korreliert interessanterweise mit der klinischen Beobachtung, dass Gliome bei Jugendlichen kaum beobachtet werden. Es legt die Vermutung nahe, dass in dieser Lebensphase genügend aktive Stammzellen vorhanden sind, um potentielles Tumorwachstum zu unterdrücken (Glass et al. 2004.)

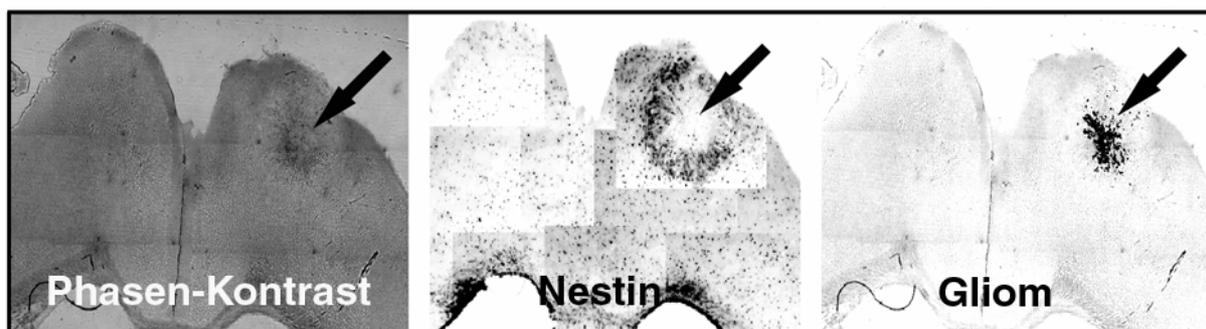


Abb. 2 Hirnspezifische Vorläuferzellen umhüllen gliale Hirntumore. Im linken Phasen-Kontrast Bild ist ein glialer Hirntumor induziert über eine Injektion von rot fluorescent markierten Tumorzellen dargestellt (markiert via Pfeil).

C8 Kettenmann

Die intrinsischen Vorläuferzellen sind grün markiert, da wir eine transgene Maus verwenden, bei der die Stammzellen durch die Expression von EGFP gekoppelt an den Nestin Promotor markiert sind. In der Mitte der Abb. ist der Randsaum von nestin-positiven Stammzellen um den Tumor nach konfokaler Lasermikroskopie dargestellt (grüner Farbkanal). Rechts ist derselbe Ausschnitt aus dem Phasen-Kontrast nach konfokaler Lasermikroskopie invertiert dargestellt, mit Darstellung der Tumorzellen (roter Farbkanal).

Glass, R; Synowitz, M; Kronenberg, G; Markovic, D; Wang, LP; Gast, D; Kiwit, J; Kempermann, G and Kettenmann, H Glioma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival, submitted

Arbeits- und Ergebnisbericht SFB507/C9 2002-2004**Molekulare Mechanismen der Invasion von Gliomzellen****A. von Deimling****1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung**Kenntnisstand Invasion von Gliomzellen

Bei Glioblastomen ist die operative Entfernung im Gesunden oder eine kurative Strahlentherapie nicht möglich, weil die Tumorzellen diffus und weit in angrenzendes Gehirngewebe infiltrieren (Berens and Giese, 1999). Für die Invasion ist die Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix (EZM) von großer Bedeutung (Giese et al., 1996). Die Invasion wird durch Bindung von EZM Bestandteilen an Rezeptoren der Tumorzellen beeinflusst. Involvierte Moleküle sind die Integrine und proteolytische Enzyme wie die Metalloproteinasen.

Kenntnisstand in-vivo Tiermodell:

Tiermodelle haben sich in einzelnen Fällen als geeignet erwiesen, invasionsassoziierte Genprodukte zu charakterisieren. Die meisten Studien stützen sich auf Untersuchungen mit der chemisch induzierten Ratten-Gliomzelllinie C6 (Benda et al., 1968). Das Muster der Einwanderung von C6 Zellen im Rattengehirn (Pedersen et al., 1995) entspricht in etwa demjenigen, das in Patienten mit Glioblastomen beobachtet wird, i.e. diffuse Infiltration mit besonderem Tropismus zu den großen weißen Bahnen (Burger et al., 1988). Unter anderem konnten mit solchen Modellen die Rolle von Metalloproteinasen (Belien et al., 1999) und CD24 für die Migration von C6 Zellen nachgewiesen werden (Senner et al., 1999). Die Zelllinie F98 (ebenfalls Ratte) weist gegenüber C6 eine stärkere Invasion angrenzender Strukturen auf (Beobachtung des Teilprojekts C8) (Tzeng et al., 1991). Daher soll bei den beantragten Arbeiten zunächst mit F98 Zellen gearbeitet werden. Ein bisher wenig bearbeitetes Tiermodell beruht auf der Induktion von Gehirntumoren in Mäusen durch intrazerebrale Applikation der Maus Linie SMA-560 (SMA = spontaneous murine astrocytoma). Diese Zelllinie wurde bereits 1980 etabliert und zeichnet sich durch ein hohes infiltratives Wachstum aus (Serano et al., 1980). Intrazerebrale Inokulation von 5×10^3 Zellen führt innerhalb von 30 Tagen zum Tode des Empfängers. In diesem Modell konnte gezeigt werden, daß Transfektion von IL-2, IL-4 und TNF α , zu einer vierfach längeren Überlebenszeit führt (Sampson et al., 1997).

Kenntnisstand in-vitro Modelle:

Zellkulturexperimente konnten erste Einblicke in die Rolle invasionsmediierender Mechanismen vermitteln. Auch hier stellte sich eine wichtige Rolle der Metalloproteinasen (MMP) heraus (Amberger et al., 1998, Hensel et al., 1998), deren erhöhte Aktivität die inhibitorische Wirkung zentralen Myelins aufhob. Untersuchungen an humanen Zelllinien wiesen auf eine inhibitorische Wirkung von TNF α auf die Expression von MMP-2 hin (Qin et al., 1998). Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass TNF α Expression in tumornahen Arealen einer Invasion entgegenwirken könnte (Roessler et al., 1995). BCL-2 ist ein anderes Gen, das die MMP-2 Expression hochreguliert und somit der Tumorzellinvasion Vorschub leisten kann (Wick et al., 1998). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass BCL-2 einen stark antiapoptotischen Effekt aufweist und in humanen Gliomen oft hochreguliert ist und somit auch das Überleben von Tumorzellen unterstützt (Alderson et al., 1995). Auch TGF- β_1 und TGF- β_2 sind in der Lage MMP-2 und MMP-9 in malignen Gliomzellen hochzugeregulieren (reviewed by Platten et al., 2001). Als weitere migrationsassoziierte Genprodukte haben sich unter anderem G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) herausgestellt, die beide Proliferation und Migration von Gliomzellen stimulieren können (Mueller et al., 1999). Allerdings müssen viele dieser Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da das Proliferations- und Migrationsverhalten von etablierten Zellkulturen sich von demjenigen primärer Glioblastomkulturen unterscheidet und keine ausreichenden Vergleiche zwischen dem Expressionsverhalten dieser beiden Systeme vorliegen.

C9 von Deimling

Kenntnisstand organotypische Kulturen:

Kürzlich wurde ein interessantes Invasionsmodell für Gliomzellen vorgestellt (Matsumura et al., 2000, Ohnishi et al., 1998). Die Gliomzellen C6 (Ratte) und T98G (Mensch) wurden in Sphäroiden auf organotypische Kulturen aufgebracht. Nach 24 Stunden begannen die Tumorzellen auszuwandern. Interessanterweise war kein wesentlicher Unterschied zwischen der Auswanderung humaner und C6 Tumorzellen auf den murinen organotypischen Kulturen zu beobachten (Matsumura, Ohnishi, 2000). In diesen Modellen wurden Migrationsstrecken von über 100µm gesehen. Es zeigte sich eine differentielle Expression von Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) in migrierenden und stationären Tumorzellen. Die auswandernden Zellen zeichneten sich durch eine wesentlich stärkere Expression dieser Proteine aus.

Ausgangsfragestellung:

Welche Gene werden in migrierenden und stationären Gliomzellen differentiell exprimiert?

Hypothese: Mit dem vorgestellten experimentellen Ansatz (Ratte und Maus) lassen sich Gene identifizieren, die differentiell exprimiert und an der Tumorzellinvasion beteiligt sind.

Führt der Kontakt von Tumorzellen mit nicht tumorösen Zellen und der extrazellulären Matrix des umgebenden Gehirngewebes zur Modifikation der Genexpression in den Tumorzellen?

Hypothese: Mit diesem Ansatz lassen sich Gene identifizieren, welche als Antwort auf Kontakt mit Gehirngewebe exprimiert werden und das Invasionsverhalten der Tumorzellen beeinflussen.

Können die migrierenden Tumorzellen durch Modifikation der Tumorzell-Wirtszell Interaktion unter Verwendung organotypischer Kulturen von "transgenen" oder "knockout" Mäusen beeinflusst werden?

Hypothese: Die Tumorzell-Wirtszell Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion und kann durch "transgene" oder "knockout" Wirtszellen modifiziert werden.

Kann die ektope Expression von Kandidatengenen, die in migrierenden Tumorzellen unterexprimiert sind, das Invasionsverhalten beeinflussen? Kann durch ektope Expression von Antisenseoligonukleotiden gegen in Tumorzellen überexprimierten Kandidatengene das Invasionsverhalten beeinflussen?

Hypothese: Die Transfektion von Genen, die in migrierenden Tumorzellen unterexprimiert sind, hat einen invasionshemmenden Einfluß.

Lassen sich in geeigneten differentiell exprimierten Kandidatengenen (z.B. Ionenkanäle, Rezeptoren etc.) physiologisch unterschiedliche Eigenschaften zwischen migrierenden und stationären Gliomzellen feststellen?

Hypothese: Mit dieser Kooperation von Teilprojekten C9 und C8 lassen sich invasionsassoziierte Gene funktionell überprüfen.

2 angewandte Methoden,

Organotypische Kulturen und Isolierung GFP markierter Zellen

Organotypische Kulturen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Kettenmann angelegt. Die methodischen Details sind im Arbeitsbericht der Gruppe Kettenmann dargelegt.

Nach Beimpfung der organotypischen Kulturen mit GFP-markierten F98 Tumorzellen wurden zwei Zellpopulationen isoliert: Zellen, die im Bereich des Applikationsortes verblieben sind und Zellen die eine Strecke von etwa 100µm vom Applikationsort zurückgelegt haben. Die Invasionsstrecke der GFP exprimierenden Zellen konnte am Modell täglich kontrolliert werden. Für Isolierungen mit dem Ziel nur RNA der von migrierenden und stationären Tumorzellen zu gewinnen, wurden Bereiche aus den organotypischen Kulturen mit definierten Abständen vom Applikationsort entfernt und die GFP markierten Zellen mittels Zellsorter (FACS) isoliert. Die stationären Zellen verblieben auf der Membran.

Kontaktkulturen

Ko-Kulturen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Kettenmann durchgeführt. Es wurden primäre Astrozyten aus postnatalen Tag 1 Ratten gewonnen. Diese wurden nach 20 Tagen mit GFP-markierten F98-Zellen im Verhältnis 3:1 für 2 Tage ko-kultiviert. Unmittelbar nach FACS-Zellsortierung wurde

RNA aus jeweils den fluoreszenten Gliomzellen und nicht fluoreszenten isoliert und für die Microarray-Anwendung genutzt.

SMART

Von den zwei Zellpopulationen wurde zunächst mit der SMART® Technologie ausreichend cDNA für die nachfolgende SSH transkribiert. Ausgehend von etwa 3×10^5 Zellen (nach FACS) pro Zellpopulation wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Clontech) mit einem ersten modifizierten oligo(dT) Primer eine cDNA-Synthese durchgeführt. Durch die terminale Transferase-Aktivität wurden an diese cDNA Stränge einige Desoxycytosine (dC) angehängt. Daran konnte ein zweites Oligonukleotid mit einer poly-G Sequenz binden. Die reverse Transkriptase wechselte dann den "template" Strang und replizierte das zweite Oligonukleotid ("SMART anchor"). Als Folge wurde mittels der ersten modifizierten Oligo(dT) Sequenz und des "SMART anchor" als Bindungsstelle für Primer der gesamte RNA "pool" amplifiziert.

SSH und Untersuchung der differentiell exprimierten cDNAs

Danach wird eine Anreicherung differentiell exprimierter Gene mittels SSH durchgeführt werden. Die Methode basiert auf der Hybridisierung zweier zu vergleichender cDNA-Pools, "tester" und "driver", in zwei unabhängigen Ansätzen A und B. Das experimentelle Design verlangt, daß in der "tester" cDNA Sequenzen enthalten sind, die in der "driver" cDNA unterrepräsentiert oder abwesend sind. Die RsaI geschnittene "tester" cDNA der beiden Ansätze wird mit zwei verschiedenen Adaptern versehen (Adapter A und Adapter B). Die RsaI geschnittene "driver" cDNA für beide Ansätze ist identisch und liegt gegenüber der "tester" cDNA im 30-fachen Überschuß vor. Nach Denaturierung werden die beiden "tester" cDNAs getrennt jeweils mit der denaturierten "driver" cDNA hybridisiert. In beiden Ansätzen reichern sich einzelsträngige, mit Adaptern versehene, cDNA Sequenzen an, die im "driver" unterrepräsentiert bzw. abwesend sind, und die im "tester" in einer niedrigen Konzentration vorliegen. Der Grund hierfür ist die mit geringerer Kopienanzahl abnehmende Wahrscheinlichkeit einen Hybridisierungspartner zu finden. Hiermit steigt die Wahrscheinlichkeit des betreffenden cDNA Fragments der Hybridisierung als Einzelstrang zu "entkommen". Die beiden Ansätze A und B werden ohne einen vorgeschalteten Denaturierungsschritt vereint unter nochmaliger Zugabe denaturierten "drivers". Jetzt können Einzelstränge aus Ansatz A mit solchen aus Ansatz B hybridisieren und Doppelstränge mit Adapter A am einen und Adapter B am anderen Ende ausbilden. Nach Auffüllen der überstehenden Enden können nur diese Hybride mittels einem Adapter-A und einem Adapter-B spezifischen Primer amplifiziert werden. Das Ergebnis ist ein Pool amplifizierter cDNA-Stränge mit Anreicherung der im "tester" überrepräsentierten Sequenzen. Dieser Ansatz wird zweimal durchgeführt - am konkreten Beispiel erstens mit migrierenden Tumorzellen als "tester" und mit stationären Tumorzellen als "driver", und zweitens mit migrierenden Tumorzellen als "driver" und mit stationären Tumorzellen als "tester". Die SSH ist seit Mai 2000 im Institut für Neuropathologie etabliert. Als Kooperationspartner steht uns weiterhin Prof. Dr. rer. nat. R. Schäfer (Experimentelle Pathologie, Charité, CCM) zur Seite. Seine Arbeitsgruppe hat mit großem Erfolg SSH Analysen an transformierten Zellen publiziert (Tchernitsa et al., 1999, Zuber et al., 2000).

Die amplifizierten DNA "pools" wurden in Plasmide eingebracht. Mit diesen werden kompetente Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden auf Nährmedium ausplattiert. Die Klone wurden entnommen und zunächst in Mikrotiterplatten überführt und nochmals vermehrt. Nach Anlegen von Kopien ("masterplates") wurden die Original Mikrotiterplatten unter Kryoschutz eingefroren. Die Klone der kopierten Mikrotiterplatten wurden mittels "primern", die an die "adapter" binden amplifiziert, und anschließend im reversen Northern Blot auf differentielle Expression überprüft. Danach wurden die amplifizierten "inserts" (cDNAs) der Plasmide beider experimenteller Reihen elektrophoretisch aufgetrennt und "geblottet". Als Sonde wurden jeweils die differentiell angereicherten cDNA "libraries" beider Reihen verwendet. Mit diesem Vorgehen konnten diejenigen Klone eliminiert werden, die in beiden reversen Northern Blots gleich stark repräsentiert waren. Die Klone, die nach Hybridisierung mit nur einer der "libraries" Signale zeigten sind die Kandidaten, die (an)sequenziert wurden. Hierfür kamen Standard-Protokolle und unser Sequenziergerät (ABI model 377) zur Anwendung. Es wurden insgesamt 43 Klone sequenziert. Die identifizierten Sequenzen wurden daraufhin auf Homologien mit den abgelegten Sequenzdaten von Gendatenbanken verglichen. Eine Reihe von Klonen wurden hierbei als gleiche Gene identifiziert, wodurch sich die Anzahl der individuellen Gene reduzierte. Differentiell exprimierte Gene sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

C9 von Deimling

Array

Erkenntnisse über differentiell exprimierte Gene in ko-kontaktierten Glioblastomzellen und primären Astrozyten sollten mit Hilfe der Genchip-Analyse von Affymetrix gewonnen werden. Die Umschreibung der aus beiden Zellpopulationen isolierten RNA in cDNA, die Hybridisierung von cRNA auf U34 Ratten Neurobiologie-Chips (Affymetrix) sowie die bioinformatische Auswertung erfolgte durch Dr. Ungethuen und Dr. Kuban im Rahmen des LFGC. Die Normalisierung der Daten, die Clusteranalyse und Genontologie wurden mit GCOS, MAS5.0 (Affymetrix) und GeneSpring (Silicon Genetic) durchgeführt.

Verifizierung von Kandidatengenens mittels Immunhistochemie

Einige Kandidatengene, die für Proteine kodieren, gegen welche bereits Antikörper erhältlich sind, wurden mittels immunhistochemischer Analyse untersucht. Hierzu wurden humane Tumorproben mit soliden Tumoranteilen und bereichen der Infiltrationszone ausgewählt. Immunhistochemisch untersuchte (Daten nicht gezeigt).

Funktionelle Untersuchung von verifizierten Kandidatengenens

Untersuchungen zur DFO abhängigen Migration und Invasion wurden durchgeführt. Der Einfluss von der DFO bedingten Eisendepletion auf die Expression der MMPs wurde untersucht

3 Ergebnisse und ihre Bedeutung,

Aus den SSH Untersuchungen konnten 19 differentiell exprimierte Gene verifiziert werden (Abb. 1) Diese Kandidaten werden zur Zeit untersucht. Erste Ergebnisse liegen bereits für Ferritin (FTH1) vor (Abb.2).

Ferritin:

Eisen ist wichtig für die Proliferation jeder Zelle. Neoplastische Zellen, die einen erhöhten Eisenbedarf aufweisen, reagieren sensitiver auf den Einsatz von eisenbindenden Agenzien (Larrick et al.,1979).

Eingriffe in den Eisenhaushalt von Tumorpatienten werden bereits in Phase II Studien erprobt. Unter der Annahme, dass die Proliferationsrate verringert wird, erhalten Tumorpatienten extrazellulär eisenchelierende Substanzen (z.B. Deferoxamin). Die Entwicklung von geeigneten Substanzen ist Inhalt zahlreicher Forschungsprojekte.

Nach Zugabe von 25 µM DFO konnte, wie bisher bekannt, eine Reduktion der Proliferationsaktivität der Tumorzellen beschrieben werden. Allerdings wurde aber auch eine Erhöhung der Migration/ Invasion der Glioblastomzellen nach 72 h Behandlung beobachtet (Abb. 3). Diese Beobachtung geht mit der Tatsache einher, dass diese Zellen vermehrt matrix-degradierende Metalloproteinasen wie MMP-2 exprimierten (Abb. 4).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die DFO vermittelte Proliferationshemmung auf Kosten einer stark erhöhten Invasivität erkauft wird. Unsere Ergebnisse weisen auf ein grundlegendes Problem dieses therapeutischen Ansatzes hin.

Die Array Daten aus den Kontaktexperimenten werden zur Zeit ausgewertet.

4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs und Reaktionen der wissenschaftlichen Öffentlichkeit auf die eigenen Arbeiten

Die Tatsache, dass eisenchelierende Substanzen zwar einen Rückgang der Tumormasse, jedoch im Fall von Glioblastomen auf Kosten einer Erhöhung des Invasionspotentials dieser Zellen zur Folge hatte, stiess in Vorträgen auf dem Kongress der DGNN sowie auf SFB-Zusammenkünften auf reges Interesse. Der Vorschlag wurde gemacht, die Rolle des HIF-1 α Proteins in diesem Zusammenhang zu beleuchten. Es ist bekannt, dass HIF-1 α durch Eisenentzug aktiviert wird (Semenza et al., 1993). Desweiteren weiss man auch, dass HIF-1 α u.a. das Invasionspotential von Zellen durch Aktivierung von Urokinase Plasminogen Rezeptoren erhöhen kann (Graham et al., 1998).

5 offene Fragen.

Die bisher durchgeführten Experimente ergaben eine größere Anzahl von Kandidaten. Diese werden zum Teil bereits untersucht. Die Analyse weiterer Kandidaten wird noch länger Zeit in Anspruch nehmen.

Ein Aspekt der gegenwärtig untersucht wird ist die möglicherweise HIF1 α unabhängige Rolle von Ferritin auf die Proliferation von Tumorzellen. Erste Voruntersuchungen in unserem Labor ergaben, dass durch die Verringerung der DFO-Konzentration die Expression von MMP-2 weiterhin erhalten bleibt, jedoch die Aktivierung von HIF-1alpha unterbunden werden kann. Dies könnten Hinweise dafür sein, dass Eisenentzug in Glioblastomzellen die Invasion erhöht, diese Regulierung jedoch auf physiologischem Level (DFO-Zugabe in sehr niedriger Konzentration) möglicherweise HIF-1alpha – unabhängig erfolgt.

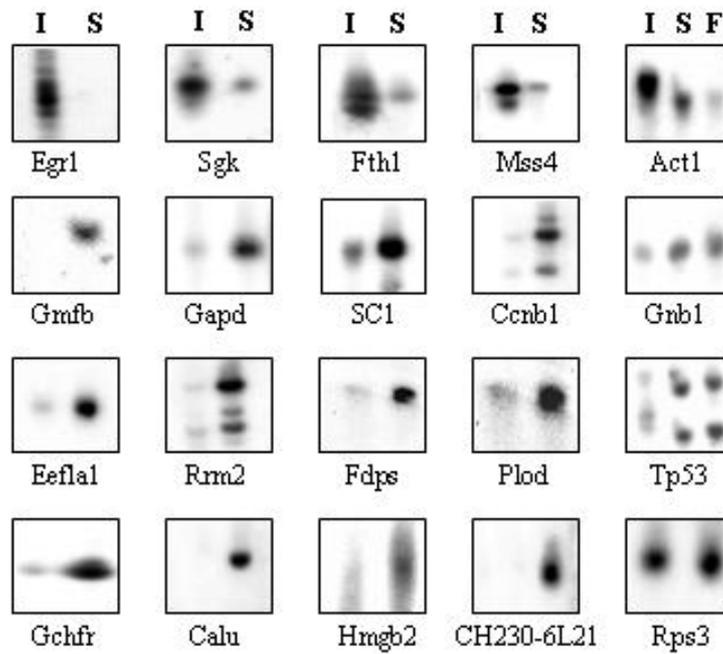
C9 von Deimling

Tabelle 1

Liste der differentiell exprimierten Gene: Der obere Tabellenabschnitt zeigt Gene, die in den invadierten F98 Zellen stärker vertreten waren. Der untere Tabellenabschnitt zeigt Gene, die in den stationären F98 Zellen stärker repräsentiert waren.

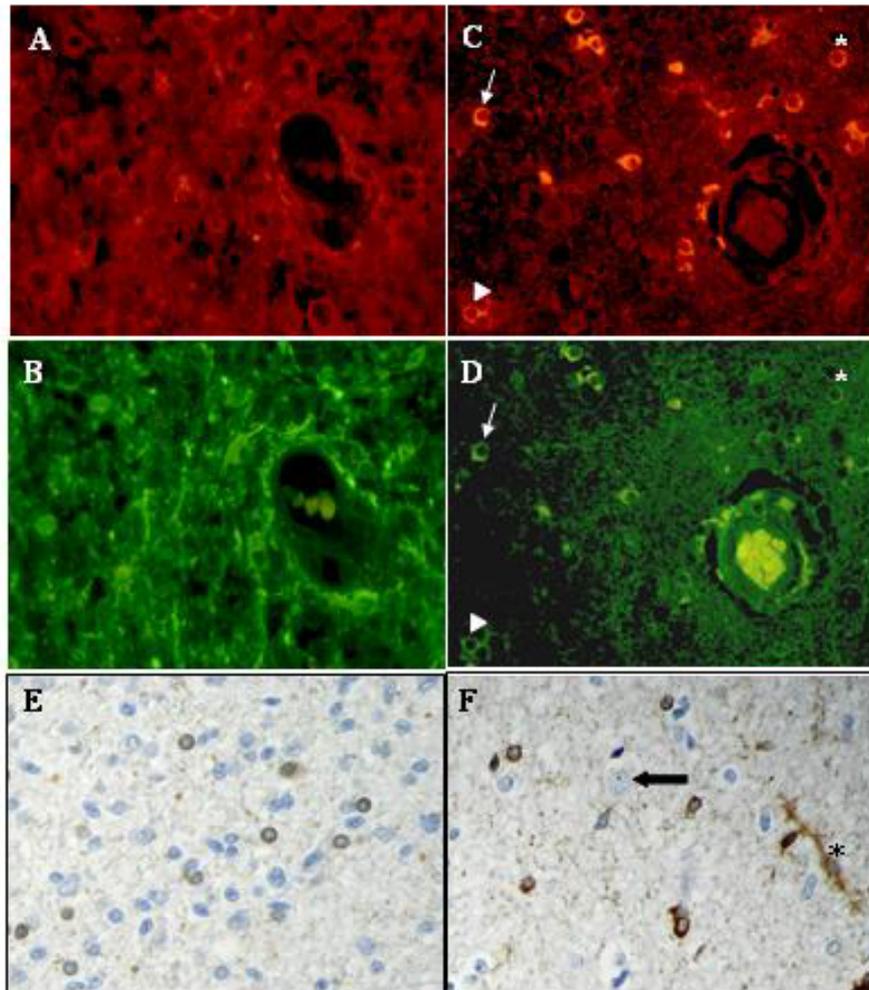
| Accession | Name | Gene | Human locus | Function of the gene product |
|-----------|--|--------|--------------|---|
| X70496 | Guanine nucleotide-releasing protein | Mss4 | 1q32-q41 | Vesicular transport, GTP-GDP exchange |
| NM_019232 | Serum/Glucocorticoid-regulated kinase | Sgk | 6q23 | Signalling, learning, Na(+)-transport, induced by TGFB1 |
| NM_012551 | Early growth response 1 | Egr1 | 5q31.1 | Transcription factor, regulation of proliferation, migration, pro-apoptotic, pro-angiogenic, induces TGFB1, fertility |
| X52815 | Actin gamma | Actg1 | 17q25.3 | Cytoskeleton, cell motility |
| U58829 | Ferritin H subunit | Fth1 | 11q12-q13 | Iron storage |
| NM_030989 | Tumor suppressor protein p53 | Tp53 | 17p13.1 | Cell cycle regulation, pro-apoptotic |
| X64589 | Cyclin B1 | Ccnb1 | 5q12 | Cell cycle regulation, proliferation |
| NM_017187 | High mobility group box 2 | Hmgb2 | 4q31 | Increase activity of the steroid hormone class of nuclear receptors |
| NM_009104 | Ribonucleotide reductase M2 | Rrm2 | 2p25-p24 | DNA synthesis (formation of deoxyribonucleotides) |
| NM_133595 | GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein | Gchfr | 15q15 | Regulation of phenylalanine metabolism and neurotransmitters as well as nitric oxide synthesis. |
| NM_031840 | Farnesyl diphosphate synthase | Fdps | 1q21.2 | Cholesterin biosynthesis |
| X61043 | Elongation factor 1 alpha | Eef1a1 | 6q14 | Translation |
| L25331 | Lysyl hydrolase | Plod | 1p36.3-p36.2 | Collagen biosynthesis |
| AY009092 | Endogenous rat retrovirus SC1 | SC1 | -- | -- |
| NM_007594 | Calumenin | Calu | 7q32 | Protein folding, calcium binding protein |
| NM_030987 | Guanine nucleotide binding protein b1 | Gnb1 | 1p36.33 | Signalling, ion channel activation |
| NM_022023 | Glia maturation factor beta | Gmfb | 14q22.2 | Signalling, cell-cell communication |
| NM_017008 | Glycerol aldehyde dehydrogenase | Gapd | 12p13 | Carbohydrate metabolism, energy supply |
| AC094964 | Clone CH230-6L21 | | -- | -- |

Abb. 1



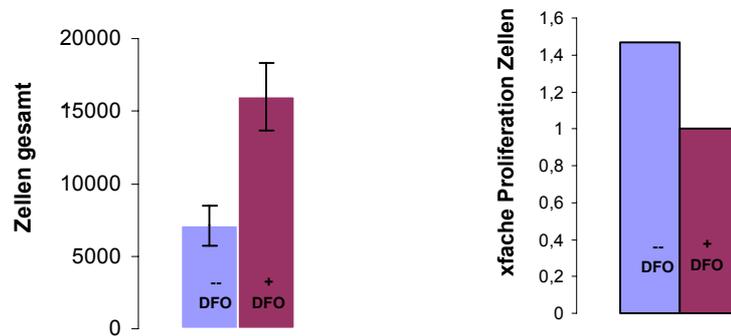
Virtuelle Northern Blot Analyse von differentiell exprimierten Genen. Invasive (I) und stationäre (S) F98-EGFP Zellen. Obere Reihe: Gene mit erhöhter CDNA Prävalenz in invasiven Zellen. 3 untere Reihen: Gene mit erhöhter CDNA Prävalenz in stationären Zellen. "Housekeeping gene" Rps3 rechts unten demonstriert vergleichbaren cDNA Auftrag.

Abb. 2



Ferritin (rot) und GFAP (grün) Doppelmarkierung von Astrozytom N1006/00. **A** und **B** solider Tumor. **C** und **D** Invasionszone. Zellen positiv für Ferritin und GFAP sind markiert. **E-F** Ferritin Immunhistochemie **E** solider Tumor **F** Infiltrationszone mit Neuronen (Pfeil) und aktivierter Mikroglia (Stern).

Abb. 3

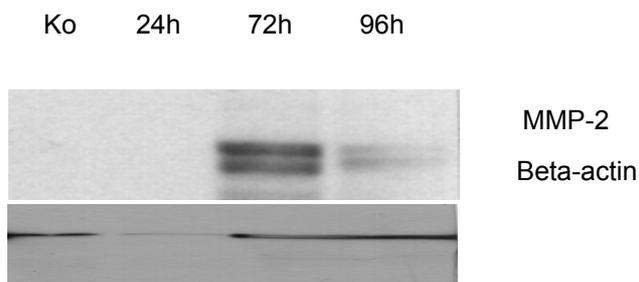


Invasionsverhalten (links) und Proliferationsrate (rechts) von U87MG-Zellen nach 72 bzw. 24 Stunden

-- DFO =keine DFO Behandlung

+ DFO = Zugabe von 25 µM DFO

Abb. 4



Expression von MMP-2 in U87MG nach Zugabe von 25 µM DFO

KO = Kontrolle, keine DFO Behandlung

+ = Behandlung mit 25 µM DFO

MMP-2 = Metalloproteinase 2

PROJEKTBEREICH Z
Zentralprojekt 2
(Projektbereichsleiter: Prof.Dr. K.M. Einhüpl)

Zwei-Photonen-Laserscanning Mikroskop (DPLSM)

Das im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 507 beschaffte 2-Photonenmikroskop wird seit der letzten Förderperiode durch eine ausgewiesene wissenschaftliche Mitarbeiterin, Fr. Dr. Elena Pohl (Biophysikerin), betreut. Die Finanzierung ihrer Stelle wurde aufgrund der Förderung des Sonderforschungsbereiches einerseits durch Mittel der Fakultät für das Neurowissenschaftliche Forschungszentrum, andererseits über eine halbe Co-Finanzierungsstelle für den Sonderforschungsbereich realisiert. Durch diese Maßnahme ist die Nutzung des 2-Photonenmikroskops für Projekte im Sonderforschungsbereich erheblich verbessert worden. In den Einzelberichten finden sich Hinweise auf die Benutzung des DPLSM, so z.B. im Projekt A5, in dem die in vivo Transmigration von Zellen aus dem Blut in das Gehirn dargestellt werden konnte (Priller J, et al. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. Nat Med. 2001;7:1356-61) oder bei den Projekten B 11 und B 14, in denen ein direkter Schädigungsmechanismus von T-Zellen auf Neurone in Sliceulturen nachgewiesen werden konnte (Nitsch R, et al.. J Neurosci 2003; 24: 2458-2464).

Das Gerät ist mittlerweile rund um die Uhr im Einsatz, es kann via website (<http://www.charite.de/nw fz/deutsch/mikroskop/kalender/belegung.pdf>) gebucht werden kann. Das Gerät steht auch anderen neurowissenschaftlichen Arbeitsgruppen nach Einweisung offen und stellt so ein wertvolles Angebot des SFB für die Neurowissenschaften an der Charité dar, die es umgekehrt Mitgliedern des SFB einfacher machen, bei anderen Arbeitsgruppen technische Hilfe oder Serviceleistungen zu akquirieren.