

"Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen"

**Konzept zur Einrichtung eines
SONDERFORSCHUNGSBEREICHES
in Berlin**

der

**Humboldt-Universität zu Berlin
und des
Max Delbrück Centrums für Molekulare Medizin, Berlin-Buch**

**Zur Vorlage für ein Beratungsgespräch bei der
Deutschen Forschungsgemeinschaft**

März 1994

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Allgemeine Angaben	3
1.1.	Koordinatoren	3
1.2.	Beteiligte Forschergruppen	4
2.	Wissenschaftliche Fragestellung	6
2.1.	Ausgangspunkt	6
2.2.	Ziel des geplanten Sonderforschungsbereiches	9
2.3.	Thesen	9
3.	Arbeitsprogramm	10
3.1.	Liste der Teilprojekte	10
3.2.	Geplante Projektbereiche	11
3.3.	Vernetzung im Arbeitsprogramm	20
3.3.1.	Bestehende und geplante Kooperation	20
3.3.2.	Zu erwartende Kooperation	20
3.3.	Technische Hilfestellung	22
3.4.	Positiv/Negativ-Katalog	23
3.5.	Beschreibung der Teilprojekte	23
4.	Ähnliche Forschungsaktivitäten	69
5.	Berührungspunkte mit anderen Forschungsvorhaben	69
5.1.	Förderung der bestehenden Programme	69
5.2.1.	Schwerpunktprogramme	70
5.2.2.	Sonderforschungsbereiche	70
6.	Stellung innerhalb der Hochschule	71
6.1.	Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses und der Lehre	72
6.2.	Räumliche und personelle Grundausrüstung	72
7.	Stellungnahme der Universität	72

8.	Jährlich erwartete Mittel	74
8.1.	Übersicht über beantragte Mittel (in TDM)	74

Anhang Lebensläufe und Publikationsverzeichnis der beteiligten Wissenschaftler

1. ALLGEMEINE ANGABEN

1.1. Koordinatoren

**Prof. Dr. Karl M. Einhäupl,
Universitätsklinikum Charité,
Neurologische Klinik,
10098 Berlin
Tel (030) 2802-3228**

**Prof. Dr. Uwe Heinemann,
Physiologisches Institut der Charité,
Abteilung Neurophysiologie,
Hessische Str. 3 - 4,
10115 Berlin
Tel (030) 2846-8228**

**Prof. Dr. Helmut Kettenmann,
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
Robert-Rössle-Str. 10,
13122 Berlin-Buch
Tel (030) 9406-3325**

1.2. Beteiligte Forschergruppen

**Neurologische Klinik der Charité,
Humboldt-Universität Berlin,
Schumannstr. 20/21, 10098 Berlin**

Dr. G. Arnold,	Tel 030 2802 3228, Fax 030 2802 5047
Dr. T. Back,	z.Zt. Cerebral Vascular Disease Research Center, University of Miami, P.O. Box 016960, Miami, Fl 33101, USA, Tel 001 305 547 6731, Fax 001 305 547 5830
PD Dr. U. Dirnagl,	Tel 030 2802 8318, Fax 030 2802 5047
Prof. Dr. K.M. Einhäupl,	Tel 030 2802 3228, Fax 030 2802 5047
PD Dr. A. Villringer,	Tel 030 2802 4237, Fax 030 2802 5047
Dr. J. Weber,	Tel 030 2802 3750, Fax 030 2802 5047

**Abt. Neurophysiologie, Physiologisches Institut, Charité,
Humboldt-Universität Berlin
Hessische Str. 3-4, 10015 Berlin**

Dr. E. Ficker,	z.Zt. Department of Molecular Physiology and Biophysics, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX, 77030 Tel. 001-713-798-5708
PD Dr. R. Grantyn,	z.Zt. Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Entwicklungsneurobiologie/BMFT, Am Klopferspitz 18A, D-82152 Martinsried, Tel: 089-8578-3728, Fax: 089-8578-2481
Prof. Dr. U. Heinemann,	Tel 030 28468228, Fax 030 2846600

**Anatomisches Institut,
Humboldt Universität Berlin
Phillipstr. 12, 10017 Berlin**

PD Dr. R. Nitsch,	z.Zt. Zentrum für Morphologie der Uniklinik Frankfurt, Theodor Stern Kai 7, 60590 Frankfurt,
--------------------------	---

Tel. 069 63016916, Fax. 069 63016425

**Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie,
Berlin-Friedrichsfelde,
Alfred Kowalke Str.4, 10315 Berlin**

PD Dr. I. E. Blasig, Tel 030 5163290, Fax 030 5128014

**Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,
Berlin-Buch**

Robert Rössle Str 10, 13122 Berlin Buch

Prof. Dr. D. Ganten, Tel 030 94060, Fax 030 9494161

Dr. U.-K. Hanisch, Tel 030 94063503, Fax 030 94063819

Prof. Dr. H. Kettenmann, Tel 030 94063325, Fax 030 94063819

Dr. A. Lippoldt, Tel 030 94063278, Fax 030 9497008

PD Dr. M. Paul, Tel 030 9488593, Fax 030 9488510

**vermutl. ab 1.7.1994: Institut für Pharmakologie, Klinikum
Steglitz, Berlin**

Dr. S. Patt, Tel 030 94063325, Fax 030 94063819

Dr. R. Reszka, Tel 030 94062479, Fax 030 94063213

Dr. W. Walther, Tel 030 94062479, Fax 030 94063213

**Neurochirurgische Klinik,
Universitätsklinikum Steglitz Berlin,
Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin**

Dr. F. Weber, Tel 030 7983184, Fax 030 7983569

**Neurologische Klinik,
Universitätsklinikum Steglitz Berlin,
Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin**

Dr. F. Boegner Tel. 030 7982276, Fax 030 7984141

Dr. H.-C. Schumacher Tel. 030 7982276, Fax 030 7984141

2. WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG

'Die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen bei neurologischen Erkrankungen'

2.1. Ausgangspunkt

Während in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts der Glia bereits großes wissenschaftliches Interesse entgegengebracht wurde, hat sich die moderne Hirnforschung in den letzten drei Dekaden überwiegend auf die Betrachtung der Neuronen und neuronaler Netzwerke konzentriert. Daraus ergab sich zwangsläufig, daß die meisten neurologischen Erkrankungen heute als eine Störung des Neurons und seiner Verbindungen betrachtet werden.

Im Zentrum des Interesses standen vor allem morphologische Befunde wie der Verlust neuronaler Zellen (Ischämie, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson), Schrumpfung von Neuronen (Morbus Alzheimer), Rarefizierung von Dendriten (Epilepsie, traumatische Läsionen), sowie funktionelle Störungen wie veränderte Projektionsmuster (posttraumatische Läsionen, transiente Ischämie, Regeneration), veränderte Kanal- und Transmitterexpression (Epilepsie, Ischämie, Morbus Alzheimer), veränderte Regulationskaskaden (z. B. c-fos, c-jun, Wachstumsfaktoren), sowie bei zahlreichen Erkrankungstypen veränderte Freisetzungseigenschaften von Transmittern (Epilepsie, Morbus Parkinson).

Trotz dieser weitreichenden Kenntnisse über pathologische Veränderungen neuronaler Strukturen kann bis heute keine neurologische Erkrankung ausschließlich über die Störungen neuronaler Prozesse verstanden werden. Letztendlich kann man pointiert formulieren, daß es bisher überhaupt nicht gelungen ist, durch eine rein neuronale Betrachtung neurologische Erkrankungen kausal befriedigend zu erklären (z. B. Morbus Alzheimer, Epilepsie, Ischämie). Obzwar eine Beteiligung nicht-neuronaler Zellen, etwa der Gliazellen, bei den genannten Erkrankungen aufgrund histopathologischer Untersuchungen seit langer Zeit bekannt ist, ist die funktionelle Rolle der nicht-neuronalen Zellen bei der überwiegenden Zahl der ZNS-Erkrankungen ungeklärt. Zum komplexen Verständnis der Pathogenese neurologischer Erkrankungen fehlt damit weitgehend die Einbeziehung nicht-neuronaler Strukturen in die Krankheitsbetrachtung.

In der Betrachtung nicht-neuronaler Strukturen des Nervensystems sind insbesondere 4 Zelltypen zu nennen: *Endothelzellen, Oligodendrogliazellen, Astrogliazellen, Mikrogliazellen.*

Endothelzellen:

Die Bedeutung der Endothelzellen in der Bildung der Bluthirnschranke ist heute ebenso akzeptiert wie die Funktion dieser Zellen bei der Regulation der Hirndurchblutung. Sie kontrollieren an erster Stelle den Zugang von Substrat, Cytokinen, Hormonen und zellulären Elementen zum Gehirn. Dies ist um so mehr von Bedeutung, als das Gehirn ansonsten ein autonom reguliertes Milieu besitzt. Die durch das Endothel bedingte Isolierung des Gehirns begründet auch die spezifischen, von anderen Organen unterschiedlichen Mechanismen immunologischer Prozesse im ZNS.

Oligodendrozyten:

Die bevorzugte Funktion der Oligodendrozyten besteht in der Myelinisierung von Faserverbindungen im zentralen Nervensystem. Ihre besondere Bedeutung geht aber über die klassischen demyelinisierenden Erkrankungen (Multiple Sklerose und verwandte Krankheiten) hinaus. Die Gruppe der Leukenzephalopathien (Enzephalitiden, ischämischen Erkrankungen vom Binswanger Typ, Marklagerödem) ist bisher weitgehend unverstanden. Während die Funktion von Oligodendrozyten in der weißen Substanz gut untersucht ist, gibt es wenig Information über die Rolle von Oligodendrozyten in der grauen Substanz. Auch die ontogenetische und regionale Heterogenität von Oligodendrozyten in Bezug auf physiologische und pathophysiologische Funktionen ist weitgehend unverstanden.

Astrozyten:

Die Astrozyten stellen die morphologisch und funktionell heterogenste Gruppe der nicht-neuronalen Zellen des Gehirns dar. Dies zeigt sich bereits in der Zuordnung verschiedener Zelltypen wie Bergmann-Glia, Müllerzellen etc. zur Gruppe der Astrozyten. Für die Entwicklung des Zentralnervensystems scheint gerade die radiäre Glia, die ebenfalls zur Astroglia gerechnet wird, von hervorragender Bedeutung zu sein. Als Beispiel sei die Bedeutung der Bergmannzellen in der Entwicklung des Cerebellums angeführt. Hier führt eine Störung in der Struktur der Bergmannglia zu einer schweren Entwicklungsstörung cerebellärer Strukturen. Auch Migrationsstörungen, eine wesentliche Ursache epileptischer Phänomene, werden als eine Störung astrozytärer Funktion aufgefaßt. Wenngleich die Bedeutung von Astrozyten in der Interaktion zwischen kapillären und synaptischen Strukturen bereits seit mehreren Jahren Gegenstand von wissenschaftlichen Projekten ist, beginnt man erst jetzt die Vielfalt molekularer Interaktionen zu erfassen. Eine unbestritten wichtige Rolle spielen die Astrozyten bei der Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase, der Transmitterhomöostase, sowie ihre Rolle bei der Regulation des zerebralen Energiemetabolismus. Die große Bedeutung astrozytärer Zellen für die neuronale Funktion wird alleine schon durch ihre Beteiligung an synaptischen Prozessen unterstrichen. Wenngleich die Bedeutung der Astrozyten in der Immunregulation noch umstritten ist, ist heute als gesichert anzusehen, daß sie über die

Freisetzung von Zytokinen in immunologische Prozesse eingreifen können. Bemerkenswert und unverstanden ist auch die hohe topographische Variabilität in der Präsenz und in den Eigenschaften astrozytärer Zellen. Dies betrifft die Expression von Ionenkanälen und Transmitterrezeptoren, ferner die Bereitstellung von potentiellen Peptid-Transmittern. Die Astrozyten haben ferner eine wichtige hemmende und fördernde Funktion bei der Regulation von Proliferationsvorgängen.

Mikroglia:

Gerade in den letzten Jahren hat das wissenschaftliche Interesse an der Mikroglia sprunghaft zugenommen. Jeder Eingriff am Gehirn führt zu einer unmittelbaren und heftigen in ihrer Komplexität noch unverstandenen Reaktion der Mikroglia. Sie vermittelt immunologische Reaktionen innerhalb des Gehirns (Expression von MHC2-Komplexen) und ist somit der wichtigste Interaktionspartner immunologischer Zellen. Besonders die Aufklärung der ZNS-Infektion durch HIV hat dazu beigetragen, daß die immunologische Funktion mikroglialer Strukturen starke Beachtung erfahren hat. Bisher ist die Mikrogliazelle als einzig sicher infizierte Zelle des ZNS identifiziert worden. Dies zeigt in besonders eindrücklicher Weise, daß eine bisher nicht aufgeklärte Interaktion zwischen infizierter Mikrogliazelle und der im Laufe der Krankheit stattfindenden neuronalen Degeneration stattfindet. Dies hat wichtige Impulse für die Betrachtung der mikroglialen Zellen in der Entstehung des protrahierten Zelltodes gegeben. Die Interaktion bei degenerativen und regenerativen Vorgängen wird durch das "synaptic stripping" eindrücklich illustriert. Diese weitreichenden, neuen Erkenntnisse über die Funktionsvielfalt nicht-neuronaler Zellen im Nervensystem zwingt dazu, die Frage der Pathogenese neurologischer Krankheiten unter diesem Gesichtspunkt neu zu stellen. Die strukturelle und funktionelle Vielfalt nicht-neuronaler Zellen veranlaßt uns, die Betrachtung pathologischer Vorgänge unter dem Gesichtspunkt der akuten Veränderung, der chronischen Veränderungen und der Tumorentstehung zu sehen.

Als Beispiel für die Bedeutung bei akuten Prozessen sei die Rolle der nicht-neuronalen Zellen bei ischämisch/hypoxischen Läsionen genannt. Auch kurzzeitige Anoxien führen zu einer ebenso schnellen wie heftigen Reaktion der Mikroglia mit einer nachfolgenden Aktivierung der Astroglia. Unmittelbar kommt es zu einer Störung der endothelialen Zellen mit einer nachfolgenden Störung der Blut-Hirn-Schranke.

Auch bei der Chronifizierung neurologischer Erkrankungen (Epilepsie, neurodegenerative Erkrankungen) spielt die Interaktion nicht-neuronaler Zellen sowie ihre morphologische und funktionelle Veränderung eine entscheidende Rolle. So wird z.B. die Hippocampusklerose heute allgemein als Operationsindikation pharmakologisch unbehandelbarer Epilepsien betrachtet.

Die außerordentliche klinische Relevanz glialer Zellen in der Neuroonkologie wird dadurch unterstrichen, daß nahezu alle hirneigenen Tumoren, die 90 % der klinisch beobachteten Hirntumoren ausmachen, nicht-neuronalen Ursprungs sind.

2.2. Ziel des geplanten Sonderforschungsbereiches

Angesichts der oben dargestellten großen Bedeutung nicht-neuronaler Zellen und unseres im Vergleich geringen Wissens, ist es Ziel dieses Sonderforschungsbereiches die Bedeutung nicht-neuronaler Zellen, ihrer Interaktion untereinander und ihrer Interaktion mit neuronalen Zellen aufzuklären. Der geplante Sonderforschungsbereich wird daher als innovativer Ansatz zum komplexen Verständnis neurologischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems verstanden. Es wurde deshalb in der Strukturierung dieses Sonderforschungsbereiches besonders darauf Wert gelegt, molekularbiologisch orientierte Arbeitsgruppen mit klinisch orientierten Arbeitsgruppen zu integrieren. Unser Ansatz soll uns ein komplexeres Verständnis von den Pathomechanismen neurologischer Erkrankungen vermitteln und somit die Grundlage für die Entwicklung neuer, diagnostischer und therapeutischer Ansätze schaffen.

2.3. Thesen

- a) Nicht-neuronale Zellen spielen sowohl im zeitlichen Ablauf als auch quantitativ eine bisher weit unterschätzte Rolle in der Entstehung neurologischer Erkrankungen.
- b) Das Verständnis der Funktion nicht-neuronaler Zellen ebenso wie das Verständnis ihrer Interaktion untereinander sowie ihre Interaktion mit neuronalen Zellen stellt eine wichtige Voraussetzung sowohl für die Erklärung neurologischer Krankheitsabläufe als auch für die Schaffung von Grundlagen therapeutischer Ansätze dar.
- c) Für zahlreiche neurologische Erkrankungen nehmen die nicht-neuronalen Zellen die entscheidende, wenn nicht ausschließliche Rolle im Krankheitsprozeß ein (hirneigene Tumoren, Meningitis).
- d) Die hier geplante enge Verzahnung grundlagenorientierter, molekularbiologisch arbeitender Gruppen mit klinisch tätigen Forschergruppen ist im Bereich dieser wissenschaftlichen Fragestellung in Deutschland einmalig und fügt sich somit in das Konzept moderner Sonderforschungsbereiche im Bereich der Medizin ein.
- e) Die Ähnlichkeiten der molekularbiologischen und funktionellen Abläufe in unterschiedlichen nicht-neuronalen Zellen, sowie die gemeinsame Endstrecke der grundlegenden Mechanismen bei einer Vielzahl neurologischer Krankheitsprozesse erfordert die Kooperation. Es bietet sich an, deshalb einen SFB mit der Integration dieser Forschungsziele zu schaffen.
- f) Der geplante SFB erfüllt für die Neurowissenschaften in Berlin, und insbesondere in den Institutionen der neuen Bundesländer in Berlin, eine wichtige Funktion zur Konsolidierung und Integration von

Wissenschaftlern, die mit dem Ziel anspruchsvoller klinischer und Grundlagenforschung in den Neurowissenschaften im Raum Berlin angetreten sind.

3. ARBEITSPROGRAMM

3.1. Liste der Teilprojekte

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

**A1. Ulrich Dirnagl/Tobias Back, Neurologische Klinik, Charité, Humboldt-Universität
Spreading Depression (SD): Interaktion nicht-neuronaler und neuronaler Zellen bei molekularen, metabolischen und vaskulären Mechanismen**

**A2. Arno Villringer/Guy Arnold, Neurologische Klinik, Charité, Humboldt-Universität
Pathogenese der Migräne: Interaktion neuronaler und nicht-neuronaler Zellen**

**A3. Uwe Heinemann/Rosemarie Grantyn, Abt. Neurophysiologie, Physiologisches Institut, Charité, Humboldt-Universität
Beteiligung von Gliazellen an der Spreading Depression**

**A4. Karl M. Einhäupl/Jörg Weber, Neurologische Klinik, Charité, Humboldt-Universität
Akute Schadenmechanismen der bakteriellen Meningitis**

**A5. Ingolf E. Blasig, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Radikale und Hypoxie an Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS)**

**A6. Martin Paul, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Mechanismen der Endothelinregulation im Gehirn**

Projektbereich B: Physiologie und Beeinflussung glialer Tumore

**B1. Helmut Kettenmann/Stephan Patt, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Physiologische Eigenschaften glialer Tumore**

**B2. Uwe-Karsten Hanisch, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Cytokine als Modulation glialer Ionenströme**

**B3. Friedrich Boegner/Hermann Christian Schumacher, Neurologische Abteilung,
Universitätsklinikum Steglitz, Freie Universität Berlin
Synthese von Zellmediatoren durch Gliazellen unter Hypoxiebedingungen und
Einfluß von Matrixkomponenten**

**B4. Regina Reszka/Wolfgang Walther, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Friedrich Weber, Neurochirurgische Klinik, Universitätsklinikum Steglitz
Veränderungen von Zell-Zell-Wechselwirkungen glialer Tumorzellen in vitro und in vivo nach
retroviralem und liposomalem Zytokingentransfer**

**B5. Rosemarie Grantyn, Abt. Neurophysiologie, Physiologisches Institut, Charité,
Humboldt-Universität
Differenzierung und Redifferenzierung in der Netzhaut: Elektrophysiologische
Charakterisierung pluripotenter Vorläuferzellen und der von ihnen abstammenden
Tumorzellen**

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

**C1. Andrea Lippoldt/Detlev Ganten, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Die Rolle des Renin-Angiotensin-Systems in de- und regenerativen Prozessen im Gehirn:
Focus auf gliale-neuronale Interaktionen**

**C2. Robert Nitsch, Anatomisches Institut, Charité, Humboldt-Universität
Die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion**

**C3. Uwe Heinemann/E. Ficker, Abt. Neurophysiologie, Physiologisches Institut, Charité,
Humboldt-Universität
Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse**

3.2. Geplante Projektbereiche

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

Obzwar der Schaden an Neuronen die wesentliche Determinante des klinischen Endresultates (Restitutio, Defizit, Tod) bei Akuterkrankungen des ZNS wie Hypoxie/Ischämie, Epilepsie, Meningitis etc. ist, spielen nicht-neuronale Zellen in der Schadenskaskade dieser Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Die in der Projektgruppe A zusammengefassten Einzelprojekte haben es sich zum Ziel gesetzt, die bisher noch wenig verstandene Interaktion von Endothelzellen, Astrozyten, Mikroglia, und Neuronen in der Akutphase dieser Erkrankungen zu untersuchen. Wir wissen heute, daß es bei den genannten akuten ZNS- Schädigungen zur Auslösung einer Schadenskaskade kommt, welche sich in der Folge unabhängig vom Schädigungsmechanismus (z.B. Ischämie, bakterielle Infektion) entwickeln und unterhalten kann. Hierfür kann die eitrige Meningitis des Erwachsenen als Beispiel dienen, bei der trotz adäquater Antibiotikatherapie rund 30% der Erkrankten versterben. Eine Verbesserung der Therapiemodalitäten ist daher nur zu erwarten, wenn Strategien zur Unterbrechung der bisher nur teilweise verstandenen Schadenskaskaden entwickelt werden.

Folgende Erkrankungen bzw. pathophysiologische Prozesse stehen im Vordergrund dieser Projektgruppe: Die Spreading Depression, die Migräne, die zerebrale Ischämie, sowie die eitrige Meningitis.

Die Spreading Depression (SD), ein experimentell durch verschiedene Noxen auslösbares, langsam über den Hirnkortex sich ausbreitendes Sistieren der hirnelektrischen Aktivität, wird seit langem im Zusammenhang mit der Pathogenese einer Reihe von ZNS-Erkrankungen diskutiert. Insbesondere die Epilepsie, die zerebrale Ischämie, sowie die Migräne sind hier zu nennen. Die Mechanismen dieses Phänomens und seine letztendliche Bedeutung für die genannten Erkrankungen sind jedoch nach wie vor nur unzureichend verstanden. Seit mehreren Jahren vermutet man, daß Astrozyten eine wichtige Rolle sowohl bei der Auslösung als auch bei der Weiterleitung der SD spielen. Auch die mit der SD assoziierten Blutflußveränderungen, welche sowohl eine Hyper- als auch eine Hypoperfusion einschließen und v.a. durch Endothelzellen und Astrozyten getriggert werden könnten, scheinen für die Pathophysiologie der SD von großer Bedeutung zu sein.

Dirnagl und Back untersuchen deshalb den Einfluß von Glia, Endothel, und zerebralen Blutflußveränderungen bei der Spreading Depression (SD) in tierexperimentellen Ansätzen in vivo. Ziel des Projektes ist es, den differentiellen Beitrag von Astrozyten, Endothelzellen, sowie der mit der SD einhergehenden Blutflußveränderungen für Auslösung, Propagation sowie den möglichen Schaden durch SD zu erforschen. Besondere Aufmerksamkeit wird der Untersuchung der Faktoren gewidmet, unter denen die SD neuronalen Schaden verursachen könnte. Methodisch stehen Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Laser Doppler Blutflußmessung sowie verschiedene Radikalmessverfahren (z.B. NO-Ozonchemolumineszenz) im Vordergrund.

Das Projekt von Heinemann und Grantyn befaßt sich ebenfalls mit der Frage, welchen Beitrag insbesondere Gliazellen an der SD haben und unter welchen Bedingungen SD zum Gewebeschaden führt. In diesem Projekt werden Ansätze gewählt, welche die komplette Isolation der zellulären von den Blutflußphänomenen ermöglichen und die Differenzierung glialer von neuronalen Mechanismen erleichtern: Brain slices, Brain slice Kulturen, sowie Retinapräparationen. Es wird mit klassischen elektrophysiologischen Methoden und neuen optischen Verfahren (z.B. Infrarotvideomikroskopie) gearbeitet.

Das Projekt von Villringer und Arnold plant, die tierexperimentellen Ergebnisse aus Projekt A1 am Menschen umzusetzen. Die Rolle der SD bei der Migräne soll mit bildgebenden (funktionelle und konventionelle MR-Technik) und elektrophysiologischen (Magnetenzephalographie) Methoden sowie der neuen Technik der Nahinfrarot-Spektroskopie untersucht werden. Die Bedeutung neuronaler, glialer und vaskulärer Mechanismen soll durch pharmakologische Intervention weiter differenziert werden.

Inhaltlich und methodisch eng verzahnt mit den Projekten zur SD sind die von Blasig geplanten Untersuchungen. Dieses Projekt untersucht die Rolle der zerebralen Endothelien und der Astrozyten, also der Zellen der Bluthirnschranke, für die Schadensentstehung bei der zerebralen Ischämie. Es wird sich dabei auf die mögliche Generierung von freien Radikalspezies in der Reperfusionsphase nach globaler zerebraler Ischämie (z.B. beim Herzstillstand) bzw. der Perinfarktzone bei der fokalen zerebralen Ischämie (ischämischer Schlaganfall) konzentrieren. Freien Sauerstoffradikalen, welche bevorzugt in den genannten nicht-neuronalen Zelltypen generiert werden können, werden seit langem als wichtige Schadensmediatoren bei der Ischämie/Hypoxie vermutet. Schwierigkeiten im Nachweis dieser reaktiven und kurzlebigen Spezies haben eine endgültige Klärung der Rolle der freien Radikale bei dieser und anderen ZNS-Erkrankungen bisher aber verhindert. Durch Verwendung neuer methodischer Ansätze (Elektronenspinresonanz und Chemolumineszenz) und Modelle (z.B. sog. künstliche Bluthirnschranke) sollen die geplanten Untersuchungen unser Verständnis der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie/Hypoxie verbessern. Diese Untersuchungen werden ergänzt durch tierexperimentelle Untersuchungen (Dirnagl), bei denen die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die in vivo Situation geprüft werden soll. Insofern eine Reihe von antioxidativen Strategien existieren, könnte dieses Wissen von erheblicher therapeutischer Relevanz sein. Dieses Projekt wird auch eng verbunden sein mit dem Projekt von Heinemann und Ficker der Projektgruppe C, bei dem es ebenfalls um die Rolle der Astrozyten für den Radikalstoffwechsel geht.

Neben den bereits diskutierten nicht-neuronalen Schadensmechanismen bei akuten ZNS-Erkrankungen könnte auch das zerebrale Endothelin-System bei diesen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Endotheline, welche stark vasokonstriktorisch wirken und vor allem von Astrozyten und Endothelzellen produziert werden, könnten als Neurotransmitter, Neuromodulatoren, sowie als Vermittler der Zell-Zell Interaktion neuronaler und nicht-neuronaler Zellen unter physiologischen

sowie pathophysiologischen Bedingungen relevant sein. Besonders bei der SD und der Ischämie, welche in den bereits genannten Projekten untersucht werden, könnten Endotheline an der Schadenskaskade beteiligt sein, z.B. als Ursache für die post-SD bzw. post-ischämische Hypoperfusion.

Das Projekt von Paul untersucht deshalb die Regulation des Endothelin-Systems im Gehirn und dessen mögliche Rolle für die SD und die Ischämie. Methodisch stehen molekularbiologische Ansätze, hier vor allem transgene Tiermodelle im Vordergrund. In Zusammenarbeit mit den anderen Gruppen des Teilprojektes werden diese transgenen Tiere (z.B. Endothelin-überexprimierende Ratten) in pathophysiologischen Modellen (Brain slices, zerebrale Ischämie und SD in vivo etc.) eingesetzt und so die Rolle der Endotheline bei diesen Prozessen studiert.

Weber und Einhäupl untersuchen die Schadenskaskade bei bakterieller Meningitis. Aus eigenen Voruntersuchungen wissen wir, daß die Leukozyten/Endothelinteraktion und die damit zusammenhängende Freisetzung von Interleukinen und freien Radikalspezies stark im Vordergrund der sich in der Akutphase dieser Erkrankung abspielenden Vorgänge steht. In einem tierexperimentellen Modell der eitrigen Meningitis werden deshalb folgende Ansätze verfolgt: Blockade von Leukozyten-Endothelinteraktion durch spezifische monoklonale Antikörper (Ratte) gegen endotheliale Adhäsionsmoleküle (in Zusammenarbeit mit Athena Neuroscience Inc.), Monitoring des dynamischen Verhaltens von Leukozyten unter Blockade und Kontrollbedingungen (konfokale Laser Scanning Mikroskopie in vivo), On line in situ Messung der Bildung von freien Sauerstoffradikalen (Enhanced chemiluminescence in vivo), Messung der Bildung von nitric oxide (Sievers NO Analyzer), Messung des zeitlichen Verlaufes der Interleukinproduktion (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hanisch). Im in vitro System der astrozytären Zellkultur sollen schließlich die Mechanismen der Induktion der Produktion von Interleukinen und freien Sauerstoffradikalen durch Bakterien bzw. deren Zellwandbestandteile untersucht werden. Enge inhaltliche und methodische Bindungen bestehen zwischen diesem Projekt und dem Projekt Dirnagl/Back sowie Blasig (Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Nitric Oxide, Blutflußmessungen, Radikalmessungen) sowie zum Projekt von Reszka (Liposomen) und Hanisch (Interleukine).

In der Projektgruppe A sollen nicht-neuronale Mechanismen bei häufigen, akuten ZNS-Erkrankungen untersucht werden. Insofern bei all diesen Erkrankungen ähnliche Schadensmediatoren und -mechanismen diskutiert werden (z.B. freie Radikalspezies, Endotheline, Interleukine etc.), ergibt sich eine sehr enge inhaltliche bzw. methodische Verzahnung aller Projekte. Das Methodenspektrum reicht dabei von den molekularbiologischen Ansätzen der Arbeitsgruppe von Paul über in vitro Modelle zu in vivo Modellen und den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Villringer am Menschen. Durch diese breite methodische Basis sowie durch die enge Anbindung der Arbeitsgruppen an die Behandlung der untersuchten Erkrankungen (z.B. Neurologische Intensivstation der Charité) wird eine Diagnose- bzw. Therapie-orientierte Grundlagenforschung gewährleistet.

Projektbereich B: Physiologie und Beeinflussung glialer Tumore

Das Forschungsziel des Projektbereiches B ist es, die zellbiologischen Eigenschaften von Hirntumoren zu verstehen. Ein solches Verständnis könnte es langfristig ermöglichen, neue Strategien zur Hemmung des Tumorwachstums zu entwickeln. Die überwiegende Zahl der Tumore des Hirnparenchyms ist glialen Ursprungs. Die Tumorzellen zeigen entweder morphologische Eigenschaften von Astrozyten (Astrozytom), Oligodendrozyten (Oligodendrogliom) oder glialen Vorläuferzellen (Glioblastom); letztere gehören zu den bösartigsten Tumorformen.

Bezüglich der Entstehung des Tumors ist es bisher ungeklärt, ob die Tumorzelle aus einer dedifferenzierten Gliazelle oder aus einer glialen Vorläuferzelle entsteht. Um den Entwicklungsprozess der Gliome zu verstehen, müssen die physiologischen und zellbiologischen Eigenschaften sehr früher Vorläuferzellen (Grantyn), normaler Glia (Hanisch) und glialer Tumorzellen (Kettenmann) verglichen werden. Diese drei Projekte beschäftigen sich mit den physiologischen, immunzytochemischen und morphologischen Eigenschaften dieser Zellpopulationen. Über eine enge Interaktion könnten diese Gruppen Kriterien finden, die Hinweise auf die 'lineage relationships' zwischen normalen und tumorösen Gliazellen geben.

Das Projekt Kettenmann bildet eine Referenz und Grundlage, da hier die physiologischen, immunzytochemischen und morphologischen Eigenschaften einzelner Zellen aus verschiedenen Hirntumortypen untersucht werden. Der gewählte Ansatz ist neu, da hier der Schwerpunkt auf der physiologischen Charakterisierung von Gliazellen des Tumorgewebes liegt, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, die bisher nur an Zelllinien durchgeführt wurden. Gliale Tumorzellen werden aus frisch operativ entferntem Gewebe gewonnen und dann in akut hergestellten Hirnschnitten untersucht. Die entsprechenden Kooperationen mit neurochirurgischen Abteilungen in Berlin sind schon etabliert. Ergänzt werden die in situ Experimente durch eine weitere Charakterisierung dieser Zellen in einem nachfolgenden Kulturansatz. Wir hoffen, daß uns dieses Projekt Antwort auf die Fragen gibt, welches Rezeptor- und Ionenkanalrepertoire die verschiedenen Typen von Gliatumoren exprimieren, wie sie sich in ihrem Motilitäts- und Proliferationsverhalten unterscheiden und ob sich diese beiden Parameter gegenseitig beeinflussen, wie dies schon zum Teil für normale Astrozyten und Schwann'sche Zellen gezeigt wurde.

Die beiden Projekte Grantyn und Hanisch erweitern diesen Ansatz, in denen die Eigenschaften sehr früher Vorläuferzellen und die Kontrolle glialer Eigenschaften durch Zytokine untersucht werden sollen. Frühe Vorläuferzellen, die sich sowohl in Neurone wie auch Gliazellen differenzieren können, werden in

retinalen Kulturen von R. Grantyn charakterisiert. Dieses Projekt hat dadurch einen Bezug zur Entstehung glialer Tumore, da sich Retinoblastome, Tumore der Netzhaut, wahrscheinlich aus einer glialen/neuronalen Vorläuferzelle entwickeln. Die physiologische Charakterisierung und die Beeinflussung dieser Zellen durch extrazelluläre Signal wie z. B. Integrine steht im Mittelpunkt des Projektes.

Ein zentrale Rolle bei dem Projekt Hanisch spielen Zytokine wie z. B. Tumornekrosefaktor und Wachstumsfaktoren wie z. B. Neurotrophine. Die erste Substanzklasse ist im Immunsystem gut charakterisiert, vermittelt vielfältigste Interaktionen zwischen immunkompetenten Zellen. Das Tumorstadium wird von ihnen stark beeinflussen. Neue Untersuchungen haben aufgezeigt, daß normale Gliazellen nicht nur Zytokinrezeptoren exprimieren, sondern auch Zytokine produzieren und ausschütten. Im besonderen die Gruppe Hanisch interessiert sich nun für die Beeinflussung der normalen und pathologischen Gliazellen durch diese Substanzklasse. Die zellulären Parameter, deren Veränderung überprüft werden, sind wie folgt: (1) physiologische Eigenschaften wie z. B. Regulation der Kalziumhomöostase (2) die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, (3) Moleküle der extrazellulären Matrix (Laminin).

Die Bedeutung von Zytokinen beim ischämischen Hirninfarkt ist das zentrale Untersuchungsthema des Projektes Bögner und Schumacher. Im ZNS können vor allem Astrozyten und Mikroglia Zytokine bilden. Zytokine könnten ein wichtiges Element in der Schadenskaskade bei cerebraler Ischämie sein, insofern sie u.a. prothrombotisch wirken und eine Aktivierung von Leukozyten vermitteln. In dem Projekt ist es geplant, Zellkulturmodelle heranzuziehen um die Wirkung von Hypoxie auf die Expression und Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus Astrozyten zu studieren. Diese Untersuchungen haben damit auch eine sehr enge Bindung an den Projektbereich A, in dem die Rolle nicht-neuronaler Zellen am ischämischen Schaden eine Schlüsselrolle einnehmen. Nachdem bisher neuronale Mechanismen im Zentrum der Ischämieforschung standen, ist die Rolle der Astrozyten nach Ischämie bisher kaum bekannt. Das Zellkulturmodell soll ein erster Schritt sein, um herauszufinden, ob das Zytokinsystem der Astrozyten bei Hypoxie/Ischämie stimuliert wird und damit am ischämischen Schaden beteiligt sein könnte.

Im Projekt Rezska ist die Transfektion von glialen Tumorzelllinien mit Zytokingenen geplant. Diese gentechnisch veränderten Zellen produzieren das transfizierte Zytokin in großer Menge. Wir könnten damit zwei Fragen beantworten: (1) verändert die Zytokinproduktion die Eigenschaften der Gliazellen bzw. der glialen Tumorzellen; (2) verändert eine Zytokin-produzierende Zelle die Eigenschaften ihrer (normalen) Nachbarzellen. Dies kann eine Vielzahl von Eigenschaften betreffen, wie z. B. Kalziumhomöostase, Expression von Kalziumkanälen, pH-Regulation und -sensitivität. Zusätzlich lässt sich die Produktion von Zytokinen durch die Zelle mit einer externen Zytokingabe vergleichen. Ein wichtiger Punkt bei der Ausbreitung des Tumors sind die Tumorrundzonen. An dieser Stelle trifft ein

proliferierendes Gewebe auf normale Gliazellen. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit sich Zellen mit Gentransfer (d. h. Zytokin produzierende Zellen) anders verhalten als normale Tumorzellen. Des weiteren wollen wir untersuchen, wie weit sich Gliazellen in dieser Randzone anders verhalten als normale Gliazellen.

Die einzelnen Projekte ergänzen sich auf vielfältige Weise, sowohl in thematischer, als auch in methodischer Hinsicht. Die Untersuchungsobjekte sind sowohl menschliches Material als auch Ratten- und Mausgewebe. Uns steht ein sehr breites Methodenspektrum zur Verfügung, das sich über über moderne physiologischen Methoden, Gentransfer, biochemischen und molekularbiologischen Methoden, immunzytochemische und morphologische Methoden erstreckt. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sollten uns langfristig die Möglichkeit geben, Modelle zu entwickeln, um die Differenzierung, Migration, Proliferation und Adhäsion glialer Tumorzellen zu verstehen und möglicherweise zu modifizieren.

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

Während der Projektbereich A sich mit den Vorgängen bei akuten neurologischen Erkrankungen beschäftigt und der Projektbereich B sich insbesondere mit der Beeinflussung von Tumorzellen im zentralen Nervensystem auseinandersetzt, betrifft der Projektbereich C Aspekte der Chronifizierung neurologischer Erkrankungen.

Die klinischen Symptome nach Hirninfarkten, degenerativen Veränderungen im Nervensystem bei Krankheiten wie der Alzheimer Erkrankung oder dem Parkinsonismus, sowie nach Läsionen und Infektionen, resultieren aus der Summe von zwei Ereignissen:

- dem Verlust einer umschriebenen Zahl von Nervenzellen mit mehr oder minder genau definierten Funktionsmerkmalen und einer spezifischen Rolle innerhalb eines neuronalen Netzwerkes und
- den Umbauprozessen, die sich als Folge der Läsionen im Nervensystem einstellen (neuronale Plastizität). Unter Umständen, so bei der Epilepsie und auch bei der Alzheimer Erkrankung, handelt es sich um immer wieder auftretende "Miniläsionen" mit nachfolgenden Aktivierungen von Mikrogliazellen und Proliferationen von Astrozyten sowie Funktionsänderungen. Diese können wiederum die neuronale Übertragung und re- und degenerativen Prozesse beeinflussen.

Die geplanten Forschungsprojekte in dem Forschungsbereich setzen sich mit zellulären Funktionen von Mikrogliazellen bzw. Astrozyten auseinander. Mikrogliazellen können auf das neuronale Geschehen

Einfluß nehmen, indem sie durch Sekretion von freien Radikalen, NO, Interleukinen u.a. das neuronale Verhalten beeinflussen. Ungeklärt ist, welche Funktionen die Freisetzung derartiger Substanzen auf das Regenerationsverhalten von Nervenzellen haben. Daneben können sich Mikrogliazellen durch ihre hohe Mobilität zwischen synaptische Kontakte drängen und so zu einem Entfernen synaptischer Eingänge auf Nervenzellen führen. Solche Vorgänge wurden zunächst durch die Arbeitsgruppe um Herrn Kreuzberg bei retrograden Degenerationen beobachtet.

In dem Projekt von Nitsch geht es darum zu klären, ob auch anterograde Degenerationen nach Läsionen des entorhinalen Kortex zu ähnlichen Veränderungen führen können. Unklar ist z. Zt. noch, welche Vorgänge zur Aktivierung von Mikrogliazellen führen. Möglicherweise reichen dazu bereits starke Änderungen des Ionenmilieus, wie sie etwa während der Spreading Depression oder bei transienten Hypoxien oder Hypoglykämien auftreten. Vorbefunde aus der Gruppe von Herrn Ben Ari in Paris deuten darauf hin, daß auch einzelne epileptische Anfälle zur Aktivierung von Mikrogliazellen führen können (solche Fragen können besonders gut an Explantatkulturen beantwortet werden). Mikrogliazellen sind im weiteren wahrscheinlich daran beteiligt, Astrozyten zur Vermehrung anzuregen. So wird in der Tat selbst bei umschriebenen Läsionen eine weit verbreitete Aktivierung von Astrozyten beobachtet. Im Bereich degenerativer Veränderungen kommt es zu einer starken Proliferation von Astrozyten. Dabei ist es unklar, welche Funktionen die aktivierten Astrozyten besitzen. Sie können auf das weitere Verhalten neuronaler Netze Einfluß gewinnen, die Fähigkeit zur Elektrolytregulation verändern. Es ist unklar, ob aktivierte Astrozyten einen veränderten Besatz mit Transportermolekülen besitzen. Ein reduzierter Glutamat-Uptake beispielsweise würde zu einer Verstärkung der glutaminergen Kopplung führen. Ein abgeschwächter GABA-Uptake könnte umgekehrt zu einer Vermehrung von GABA im extrazellulären Bereich und damit zu einer Ruhigstellung der Nervenzellen beitragen. Astrozyten scheinen ferner in der Lage zu sein, selbst Zytokine freizusetzen. Zur Zeit ist unklar, ob diese Fähigkeit nur aktivierten Astrozyten zu eigen ist oder ob diese Fähigkeit auf Astrozyten im allgemeinen zutrifft. Astrozyten können in der Bereitstellung von Neurotransmittern wie Glutamat, durch die Synthese von Glutamin und die nachfolgende Freisetzung sowie durch die Verstoffwechslung von GABA im sogenannten GABA Shunt Einfluß nehmen. Auch hier ist es unklar, ob reaktive Astrozyten eine diesbezüglich veränderte Funktion besitzen.

In den Projekten von Nitsch und Heinemann wird es ganz wesentlich um solche Funktionen gehen. Dabei sollen neben einer morphologischen und Kopplungsanalyse der Besatz mit Ionenkanälen, Rezeptoren und Transportermolekülen untersucht werden.

In den letzten Jahren ist gezeigt worden, daß Gliazellkulturen abhängig von der Gewebevorgeschichte (Zeitpunkt, Lebensalter, Tumorrandgewebe, epileptisches Narbengewebe, Temporallappensklerose und auch regional) unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Diese Eigenschaften scheinen in Kulturen teilweise erhalten zu bleiben. Dies deutet auf eine gewisse klonale Selektierung der

Astrozyteneigenschaften hin. Herr Nitsch und Herr Heinemann planen gemeinsam solche Kulturen anzulegen und morphologisch und elektrophysiologisch zu charakterisieren.

Astrozyten spielen daneben eine wichtige Funktion bei der Entgiftung von freien Radikalen. Die dafür bereit gestellte Substanz ist das Glutathion, das in Astrozyten weit verbreitet vorkommt. Unklar ist, ob reaktive Astrozyten ihren Glutathionbesatz verändern. Auch dieser Fragestellung soll in den Projekten von Nitsch und Heinemann mit Hilfe eines bildgebenden Verfahrens nachgegangen werden. In diesem Zusammenhang ist das Zusammenspiel zwischen Astrozyten und Mikrogliazellen von besonderem Interesse. Mikrogliazellen werden nur dort zu Läsionen im Nervensystem durch die Freisetzung freier Radikaler führen, wo die in den Zellen enthaltenen Glutathionspiegel nicht ausreichen, mit den freien Radikalen fertig zu werden. Diesbezüglich sind die Glutathionspiegel in Nerven- und Gliazellen von erheblicher Bedeutung. Die Synthese des Glutathions hängt ganz wesentlich von Transportvorgängen über der Zellmembran ab, die für einen Nachschub mit schwefelhaltigen Aminosäuren wie dem Cystein sorgen.

Diese sind an die Bereitstellung von entsprechenden Transportern, aber auch an ausreichende Zufuhr dieser Substanzen gebunden. In den genannten Projekten wird es auch darum gehen, die Eigenschaften solcher Transporter im einzelnen zu klären. Geprüft werden soll, in welchem Umfang reaktive Astrozyten noch über einen entsprechenden Cysteintransport verfügen.

In dem Projekt von Lippoldt/Ganten geht es um das Gehirn-Renin-Angiotensin System, dessen Effektorpeptid, Angiotensin II, in der Regulation neuronaler Erregungsvorgänge und in der synaptischen Transmission eine Rolle spielt. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe sowie eigene experimentelle Hinweise weisen auf eine Beteiligung von Angiotensinogen und Angiotensin II, die in Astrozyten exprimiert und aus diesen freigesetzt werden können, an Sprossungsphänomenen sowie auf eine Bedeutung während der Ontogenese des zentralen und peripheren Nervensystems hin. Die Funktion dieser Peptide in diesen Prozessen ist aber gegenwärtig noch völlig unklar. Es ist aus Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen bekannt, daß Angiotensin II auf die Expression von PDGF sowie bFGF stimulierend wirken kann und in Endothelzellen die Expression von ET-1 auf der Ebene der Transkription regulieren kann. Deshalb ist es von besonderem Interesse, den Einfluß von Angiotensinogen und Angiotensin II auf die Expression glialer Wachstumsfaktoren sowie deren Modulation durch verschiedene Angiotensin II Rezeptortypen zu untersuchen. Für diese Untersuchungen sollen auch transgene Tiere eingesetzt werden, in denen einzelne Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems in Gliazellen überexprimiert oder supprimiert sind. Das genannte Projekt wird darüber hinaus methodische Hilfestellungen im Bereich der Molekularbiologie und Gentechnologie für andere Projekte in diesem Forschungsbereich zur Verfügung stellen.

Methodisch bietet der Projektbereich C eine große Palette unterschiedlicher Präparate. Diese reichen von aufgereinigten Kulturen von Mikrogliazellen über Astrozytenkulturen zu Explantatkulturen und transgenen Tieren. Die eingesetzten Methoden reichen von Patchclampuntersuchungen an Astrozyten

und Mikrogliazellen über detaillierte morphologische Analysen bis zu modernen molekularbiologischen Methoden. Das Projekt von Heinemann hat aber auch unmittelbare Bezüge zum Projektbereich A, in dem es um akute Reaktionen von nicht-neuronalen Zellen während neurologischer Erkrankungen geht.

3.3. Vernetzung im Arbeitsprogramm

3.3.1. Bestehende und geplante Kooperation

Bereits jetzt bestehen mannigfaltige Kooperationen zwischen den Projektleitern der vorgeschlagenen Untersuchungen. Diese sind sowohl inhaltlicher als auch methodischer Natur. In der auf der nächsten Seite folgenden Tabelle sind diese bereits bestehenden Kooperationen in den weissen Feldern der Tabelle (rechte obere Hälfte) stichwortartig charakterisiert. Auf den grau schattierten Feldern (linke untere Hälfte) finden sich dagegen die geplanten Kooperationen (s.u.).

3.3.2. Zu erwartende Kooperation

Während der Planungsphase dieser SFB-Initiative wurden eine Reihe von Kooperationen zwischen den beteiligten Arbeitsgruppen vereinbart, die Vorbereitungen hierfür sind in den meisten Fällen bereits angelaufen. Diese geplanten Kooperationen sind in den grau schattierten Feldern der Tabelle auf der nächsten Seite kurz zusammengefaßt. Im Rahmen der innerhalb des SFB's dann stattfindenden konkreten Zusammenarbeit werden sich natürlich noch eine Reihe von Kooperationsfeldern ergeben, welche zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vorherzusehen sind.

3.3.3. Technische Hilfestellung

Eine methodische Hilfestellung ist zwischen den einzelnen Gruppen durch die vorhandene Expertise in einer Vielzahl von Techniken möglich:

Elektrophysiologie (In vitro, in situ, patch clamp, Ionenselektive Mikroelektroden etc.):

Heinemann, Kettenmann, Grantyn, Ficker, Hanisch

Optische Messung von Ionenkonzentrationen: Dirnagl, Kettenmann

Mikroskopische Techniken (Lichtmikroskopie, konfokale Mikroskopie,

Elektronenmikroskopie, Nahinfrarot-Mikroskopie etc.): Dirnagl, Einhäupl

Heinemann, Kettenmann, Nitsch, Grantyn

Molekularbiologische Methoden (Transgene Tiere, in situ Hybridisierung, liposomaler

Gentransfer Single Cell PCR etc.): Hanisch, Heinemann, Lippoldt, Reszka, Paul

Cerebrale Blutflußmessung, funktionelle Bildgebung (Laser Doppler, funktionelle

Kernspintomographie, Nahe Infrarotspektroskopie etc.): Arnold, Dirnagl, Einhäupl,

Lippoldt, Villringer

Tiermodelle (Ischämie, Spreading Depression, Meningitis, Läsionen etc.): Arnold, Dirnagl,

Einhäupl, Heinemann, Nitsch, Weber

In vitro Modelle (Zellzucht, Organotypische Kulturen, Brain Slices): Blasig, Dirnagl, Grantyn,

Heinemann, Kettenmann, Nitsch, Reszka

Histomorphologie und Immunhistochemie: Kettenmann, Nitsch

Messung von freien Radikalen (Chemolumineszenz, Elektronen-Spinresonanz etc.): Blasig,

Dirnagl, Heinemann

Zytokinbestimmung: Hanisch

Wachstumsfaktoren: Ganten, Lippoldt

3.4. Positiv/Negativ-Katalog

Positivkatalog

- 1. Projekte, die sich überwiegend mit nicht-neuronale Zellen des Zentralnervensystems befassen, Untersuchungen zu Glia-Neuron-Interaktionen und Endothel-Glia-Interaktionen**
- 2. Untersuchungen, die einen konkreten klinischen Bezug haben**
- 3. Untersuchungen, deren Schwerpunkt im zellulären und molekularen Bereich liegt**

Negativkatalog

- 1. Projekte, die sich vorwiegend mit Eigenschaften von Neuronen beschäftigen**
- 2. Grundlagenforschung ohne klinischen Bezug**
- 3. Rein klinische Projekte ohne zellulären oder molekularen Bezug**

3.5. Beschreibung der Teilprojekte

Auf den folgenden Seiten finden sich die Projektskizzen. Die Systematik folgt den einzelnen Projektgruppen (A,B,C).

A1. Ulrich Dirnagl und Tobias Back

Neurologische Klinik, Charité, Humboldt Universität

Spreading Depression (SD): Interaktion nicht-neuronaler und neuronaler Zellen bei molekularen, metabolischen und vaskulären Mechanismen

1. Stand der Forschung

Die SD ist ein langsam über den Cortex propagierendes Sistieren der elektrischen Aktivität, das von einem großem negativen DC-Potential im Extrazellulärraum begleitet wird (1). Dieses elektrophysiologische Muster wird von charakteristischen Veränderungen der extrazellulären Konzentration von Neurotransmittern und Ionen sowie des zerebralen Blutflusses begleitet. Die SD kann experimentell durch eine Reihe von chemischen, elektrischen oder mechanischen Stimuli ausgelöst werden. Es wird vermutet, daß die SD Bedeutung für eine Reihe von ZNS-Erkrankungen hat: Sie gilt als elektrophysiologisches Korrelat der Migräne, ihr Auftreten im Gefolge der zerebralen Ischämie könnte den ischämischen Gewebsschaden verstärken. Dem vorliegenden Antrag liegt die Hypothese zu Grunde, daß nicht-neuronale Zellen sowie die SD-induzierten Blutflußveränderungen eine wichtige Rolle für die Entstehung und Ausbreitung der SD sowie den möglichen Schaden durch die SD unter pathophysiologischen Bedingungen spielen.

2. Eigene Vorarbeiten

Beide Antragsteller haben langjährige Erfahrung mit den im Antrag eingesetzten in-vivo Untersuchungstechniken, welche zum Teil von Ihnen zur Anwendung am Gehirn entwickelt oder etabliert wurde (z.B. Laser-Doppler Blutflußmessung (2), Confokale Laser Scanning Mikroskopie (3), NO-Messung, Nah-Infrarotspektroskopie (4)). Die verwendeten Modelle und Techniken sind im Labor der Neurologischen Klinik der Charité etabliert. Einer der Antragsteller (T.B.) konnte zeigen, daß es bei den SD-ähnlichen Depolarisationen in der Randzone eines fokal ischämischen Areales SD-abhängige Blutflußanstiege ausbleiben und es zu einer Abnahme des Gewebe-pO₂ kommt. Im Gegensatz hierzu fand er während SD in normalem Gewebe einen Anstieg von lokalem Blutfluß und der Gewebe-Oxygenierung (5). Damit könnten die SD-abhängigen Blutflußveränderungen von zentraler Bedeutung für die Pathophysiologie der SD sein. Eine wichtige Rolle in der Auslösung der Blutflußveränderungen könnte das Bioradikal Nitric Oxide (NO) spielen (6), welches v.a. aus Endothelzellen, aber auch Astrozyten freigesetzt werden könnte. Wir konnten bisher bereits zeigen, daß NO eine zentrale Rolle in der Regulation der Hirndurchblutung unter physiologischen Bedingungen spielt (z.B. (7)).

3. Ziele

Ziel der vorgeschlagenen Untersuchungen soll es sein, die Rolle nicht-neuronaler Mechanismen am Ablauf der SD zu untersuchen und dabei potentielle Schadensmechanismen der SD zu charakterisieren. In der ersten Antragsphase werden dabei die mit der SD assoziierten cerebralen Blutflußveränderungen und deren Mechanismen im Mittelpunkt stehen. Folgende Hypothesen werden überprüft:

- Die SD-assoziierte Hyperperfusion wird durch NO, insbesondere aus Endothelzellen und Astrozyten, verursacht.
- Die auf die Hyperperfusion folgende Hypoperfusion wird durch die Produktion von Endothelin aus Astrozyten bzw. die Bildung endothelialer Mikrovilli verursacht
- Die Hyperperfusion bei SD verhindert Gewebeschaden. Beim Ausbleiben der Hyperperfusion führt die SD zum Gewebeschaden.

4.Arbeitsprogramm

- a) Lokale, differentielle funktionelle Ausschaltung von Astrozyten (Fluoroacetat), Neuronen (Ibutensäure), oder Endothel (Light & Dye). Auslösung von SD (Ratte). Messung von rCBF (Laser-Doppler (2)), extrazellulärem K⁺ und pO₂ (5), DC-Potential, NO (Sievers NO-Analyzer (8)), Cytochromoxydaseoxygenierung (Nahe Infrarotspektroskopie (4)). SD-Auslösbarkeit? SD-Ausbreitung? SD-induzierte Blutflußveränderungen? Beeinflussung der gemessenen Parameter (Amplitude, Zeitverlauf)? Histologische Aufarbeitung (EM, Neuhaus&Kettenmann, MDC) der Hirne nach Versuchsende: Endotheliale Mikrovilli?
- b) Auslösung von SD bei Endothelin-überexprimierenden Ratten (Paul, MDC): Verlauf der Hyper/-Hypoperfusion? Gewebeschaden?
- c) Induktion von SD bei verschiedenen Graden der cerebralen Perfusionseinschränkung (9): Blutflußschwellewert zur Auslösung eines neuronalen Schadens? Blockade der NO-Synthetase und damit der Blutflußveränderungen bei erhaltener SD-Elektrophysiologie (6): Gewebeschaden?

5.Literatur

1. Leao, A. P. (1944) *J Neurophys* 7, 359-390.
2. Dirnagl, U. , Kaplan, B. , Jacewicz, M. & Pulsinelli, W. (1989) *J Cereb Blood Flow Metab* 9, 589-596.
3. Dirnagl, U. , Villringer, A. & Einhäupl, K. M. (1992) *J Microscopy* 165, 147-158.
4. Villringer, A. , Planck, J. , Hock, C. , Schleinkofer, L. & Dirnagl, U. (1993) *Neurosci Let* 154, 101-104.
5. Back, T. , Kohno, K. & Hossmann, K. A. (1994) *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 12-19.
6. Goadsby, P. J., Kraube, H. & Hoskin, K. L. (1992) *Brain Res* 595, 167-170.
7. Dirnagl, U. , Lindauer, U. & Villringer, A. (1993) *Neurosci Let* 149, 43-46.
8. Termin, A. , Hoffmann, M. & Bing, R. J. (1992) *Life Sci* 51, 1621-1629.
9. Dirnagl, U. , Thoren, P. , Villringer, A. , Sixt, G. , Them, A. & Einhäupl, K. M. (1993) *Neurol Res* 15, 128-130.

6.Kooperation

A.Villringer/G.Arnold, Neurologie, Charité: Das vorliegende Projekt und das von Villringer/Arnold, welches die klinische Relevanz der SD untersucht, werden eng gekoppelt sein.

U.Heinemann, Physiologisches Institut, Charité: Elektrophysiologie

H.Kettenmann, MDC: Histologie, Histochemie, EM

M.Paul, MDC: Transgene Modelle

7.Beantragte Mittel

Beantragte Stellen: 1 BAT IIa Stelle, 1 BAT V (MTA) Stelle

Beantragte Investitionen: DM 50.000 .-

Beantragte Sach- und Reisemittel DM 45.000 .-

A 2 A. Villringer und G. Arnold

Neurologische Klinik, Charité, Humboldt-Universität

Pathogenese der Migräne - Interaktion neuronaler und nicht-neuronaler Zellen

1. Stand der Forschung

Traditionell wurde die Migräne als eine vaskuläre Erkrankung angesehen (Graham und Wolff 1938). Nach dieser Hypothese sind die neurologischen Ausfälle der Aura durch eine Vasokonstriktion intrakranieller Gefäße bedingt, während die Kopfschmerzen auf eine Vasodilatation vornehmlich extrakranieller Gefäße zurückzuführen sein sollen. Für diese Hypothese spricht eine verminderte Reaktivität des zerebralen Blutflusses auf Hyperventilation bei Migränepatienten mit Aura in der Dopplersonographie sowie das Ansprechen der Kopfschmerzen auf vasokonstriktorisch wirkende Substanzen wie z.B. Ergotamin-Präparate und Sumatriptan.

Gegen diese Erklärung spricht jedoch, daß die neurologischen Ausfälle sich nicht auf ein Gefäßversorgungsgebiet beziehen lassen, daß transcranielle Doppler-Studien keine eindeutigen Befunde erbrachten, und daß Blutflußsteigerungen anderer Genese i.d.R. keine Kopfschmerzen verursachen. Die langsame Ausbreitung neurologischer Symptome im Rahmen der Aura, die schon von Lashley (1) beschrieben wurde, das Auftreten von Reizsymptomen und der Nachweis von EEG-Veränderungen haben die Hypothese begründet, daß die von Leao (2) im Tierexperiment beschriebenen "spreading depression" (SD), eine langsam über den Cortex wandernde DC-Potential-Veränderung, das Korrelat der Aura sein könnte. Diese Erklärung wird durch tierexperimentelle Daten aus der Arbeitsgruppe Moskowitz (3) sowie durch den magnetencephalographischen Nachweis langsam sich über den Cortex ausbreitender Wellen (4) gestützt. Die derzeit favorisierte Pathogenese postuliert die SD als Auslösemechanismus und Korrelat der Aura, die zu einer meningealen Plasmaexsudation und zu einer sterilen Meningitis führe. Durch diese sterile Meningitis und sie begleitende Ausschüttung nociceptiver Substanzen werden afferente C-Fasern des "trigeminovaskulären" Systems erregt, das für die Schmerzvermittlung verantwortlich gemacht wird. Bei den Blutflußveränderungen, die während der SD im Tierexperiment beobachtet werden können, handelt es sich möglicherweise um (regelmäßig auftretende) Epiphänomene, die jedoch für den pulsierenden Charakter des Schmerzes verantwortlich sind. .

2. Eigene Vorarbeiten

Einer der Antragssteller (AV) hat sich in den letzten 8 Jahren klinisch und wissenschaftlich mit der Entwicklung und Anwendung neuer funktionell bildgebenden Verfahren des Gehirns beschäftigt sowie die Interaktion von neuronalen Zellen und Blutfluß tierexperimentell untersucht. Klinisch besteht eine langjährige Erfahrung in der Interpretation computertomographischer und kernspintomographischer Untersuchungen (Auswertung und Befundung von insgesamt circa 2000 Untersuchungen). Im Bereich folgender Methoden hat der Antragssteller wissenschaftlich gearbeitet:

Kernspintomographie: In Arbeiten am Massachusetts General Hospital wurde ein neuer kernspintomographischer Kontrastmittelmechanismus beschrieben (5) auf dem heute wichtige neue funktionell-bildgebende Methoden beruhen. In Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des MGH wird seither die physiologische Grundlage des beschriebenen Effektes weiteruntersucht (6).

Nahinfrarot-Spektroskopie: Mit dieser Methode ist es möglich, beim Menschen am Krankenbett nicht invasiv die Oxygenierung von Blut und die Oxygenierung der Cytochrom-Oxydase zu untersuchen. Es konnte vom Antragssteller erstmals nachgewiesen werden, daß es hiermit möglich ist, hämodynamische Veränderungen, welche bei funktioneller Stimulation auftreten, zu messen.

Ein Antragssteller (GA) hat sich drei Jahre lang tierexperimentell mit elektrophysiologischer Grundlagenforschung beschäftigt (7). Das Thema im SFB 220 war die Umsetzung elektrophysiologischer Daten in Bildgebung. Die vierjährige klinisch-wissenschaftliche Arbeit an der Neurologischen Klinik der Universität München umfaßte die Entwicklung bildgebender Verfahren (SPECT, MRT) in der Früh- und Differentialdiagnose von Parkinson-Syndromen. An der Neurologischen Klinik der Charité baut er derzeit eine Migräne-Ambulanz auf.

3. Ziele des Projektes

Das oben gennante pathogenetische Konzept der Migräne bezieht seine Plausibilität im wesentlichen aus tierexperimentellen Daten mit Untersuchungen zur Pharmakologie von Substanzen wie Sumatriptan, die bei der Migräne wirksam eingreifen. Parallel und komplementär zu dem tierexperimentellen Projekt unserer Klinik (Dirnagl, Back) sollen in dem vorliegenden Projekt die dem Konzept zugrundeliegenden Hypothesen über pathogenetische Mechanismen in der Entstehung der Migräne überprüft werden. Dabei spielt die Interaktion zwischen neuronalen und nicht-euronalen Zellen an mehreren Stellen ein zentrale Rolle:

- *Neuronen - Gliazellen* / im Ablauf der SD
- *Neuronen - Endothel* /SD führt zu Blutflußänderungen
- *Neuronen (Glia ?) - Meningen* / in der Entstehung der aseptischen Meningitis
- *Meningen - trigeminale C-Fasern* / in der Schmerzentstehung

Wesen des Ansatzes im vorliegenden Projekt ist es, i) mit neuen nicht-invasiven Verfahren diese verschiedenen Ebenen zu erfassen und dann ii) mit pharmakologischer Intervention zu untersuchen.

Ad i) 1. Die Magnetenzephalographie ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand die einzige Methode, mit der am Menschen die Hypothese, ob und unter welchen Umständen SD auftritt geprüft werden kann (4). In Kooperation mit dem Klinikum Steglitz (G. Curio) sollen Patienten magnetenzephalographisch untersucht werden. 2. Die neue Methode der Nahinfrarot-Spektroskopie ist rasch und nicht-invasiv in der Lage, intrakranielle Blutflußveränderungen zu erfassen. 3. Die Kernspintomographie ist eine Standardmethode der klinischen Diagnostik. In Kombination mit Gd-DTPA können entzündliche Prozesse im Bereich der Meningen evaluiert werden. 4. Mit neuen MR-Verfahren können funktionelle Prozesse untersucht werden. Tierexperimentelle Arbeiten (8) zeigen, daß SD mit funktioneller MRI-Technik visualisiert werden kann.

Ad ii) Desweiteren stehen Pharmaka zur Verfügung, die einerseits über einen bekannten Mechanismus Migräneschmerzen blockieren (z.B. Sumatriptan), andererseits eine Migräneattacke auslösen können (Glycerolnitrat, Nitroprussid). Ob es möglich ist, die Aura pharmakologisch zu beeinflussen und auf diese Weise die Entstehung von Kopfschmerzen zu verhindern, ist bisher nicht untersucht.

4. Arbeitsprogramm

Ad i) Beschreibung der Pathologie

4.1 Nachweis der spreading depression in der Migräne-Attacke

I: Untersuchung elektrophysiologischer Veränderungen mittels MEG in der Aura oder der Migräne-Attacke.

II: Diffusions-MR zur Überprüfung der sehr neuen tierexperimentellen Daten, die einen Nachweis der SD postulieren, am Menschen.

4.2 Koppelung von SD und Blutflußveränderungen

III: Nahinfrarot-Spektroskopie zur Untersuchung von Blutflußveränderungen in Aura und Attacke der Migräne

IV: Aktivations-MR zur Untersuchung von Blutflußveränderungen in der Aura und der Attacke der Migräne

4.3 Nachweis der aseptischen Meningitis

V: Konventionelle T1-gewichtete MRT Untersuchung mit und ohne GdDTPA in der Migräne-Attacke sowie eine Woche später

Ad ii) Überprüfung der relevanten Interaktionen mittels pharmakologischer Intervention

4.4 Rolle von SD in der Entstehung der Kopfschmerzen

VI: Unterdrückung einer SD durch Gabe von NMDA-Antagonisten (Amantadin) bei Migränepatienten.

4.5 Koppelung von SD und Kopfschmerz

VII: Bei Patienten mit Migräne-Attacke Gabe von Sumatriptan. Frage: Gehen nur die Kopfschmerzen zurück (Blockade der Koppelung) oder auch die elektrophysiologischen Veränderungen?

VIII: Gabe von Nitroprussid bzw. Glycerolnitrat als NO-Analog, die bei Migränepatienten Attacken auslösen. Frage: Lassen sich durch erhöhtes Angebot des in der Koppelung von SD und Kopfschmerz involvierten NOs nur die Kopfschmerzen oder auch elektrophysiologische Veränderungen induzieren?

5. Zitierte Literatur

1. Lashley KS (1941) Arch Neurol Psychiat 46:331-339
2. Leao AAP (1944) J Neurophysiol 7:359-390
3. Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP (1993) J Neurosci 13:1167-1177
4. Barkley GL, Tepley N, Nagel Leiby S, Moran JE, Simkins RT, Welch KMA (1990) Headache 30:428 - 439
5. Villringer A, Rosen BR, Belliveau JW, Ackerman JL, Lauffer RB, Buxton RB, Chao YS, Wedeen VJ, Brady TJ (1988) Magn Reson Med 6:164-174
6. Villringer A, Dirnagl U (1994) J Neuroimaging, accepted.
7. Kolb FP, Lerch R, Arnold G (1993) (Maurer K, ed.) pp 339- 343, Berlin Heidelberg, Springer.
8. Gardner-Medwin AR, van Bruggen N, Williams SR, Ahier RG (1994) J Cereb Blood Flow Metab 14:7-11

6. Kooperation

U. Dirnagl/ T. Back (Neurologische Klinik). In enger Kooperatioin wird einer der Antragssteller (GA) sowohl in diesem klinischen wie auch im genannten tierexperimentellen Projekt (Dirnagl) tätig sein.

R. Reszka/ W. Walther/ F. Weber (MDC) Funktionelle MR-Tomographie

7. Beantragte Mittel

Pro Jahr:

1 BAT IIa (90 000,--),

1 Stud. Hilfskraft (12 000,--),

Verbrauchsmittel (15 000,--)

Zusätzlich Investitionen von ca.

75 000,--

A 3 Uwe Heinemann, Rosemarie Grantyn.

Physiol. Inst. der Charite, Abt. Neurophysiologie, Hessische Str. 3-4, 10115 Berlin

Beteiligung von Gliazellen an der Spreading Depression

1. Stand der Forschung:

Spreading depression (SD) wird oft als Analog der hypoxischen Depolarisation gewertet, soll aber auch eine wichtige Funktion bei Migräneanfällen vor allen in ophthalmologischen Formen spielen. SD's breiten sich vermutlich über nichtsynaptische Mechanismen aus. Dabei wird diskutiert, daß Gliazellen durch räumliche Umverteilung von Kalium sowie Freisetzung von Glutamat und GABA die Ausbreitung bedingen. Gliazellen haben in verschiedenen Schichten des Hippokampus eine unterschiedliche Ausrichtung und weisen vielleicht auch Unterschiede im Dye-Coupling auf. Dies könnte mit unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeiten der SD in verschiedenen Hippokampusschichten zu tun haben. Epileptische Anfälle gehen vor allem im sich entwickelnden Gehirn immer wieder in Spreading depression über. Dies wird auf abnorm große Kaliumakkumulation zurückgeführt. Für diese K^+ -Akkumulation wird die eingeschränkte Fähigkeit der Gliazellen, Kalium zu puffern verantwortlich gemacht.

2. Eigene Vorarbeiten

Untersuchungen zur Kaliumregulation im Neokortex und Hippokampus verschiedener Spezies haben ergeben, daß Anstiege der $[K^+]_o$ auf Werte zwischen 10 und 12 mM begrenzt bleiben. Wird dieser "Ceiling-Level" (1) durchbrochen, treten SD's auf. Dies ist besonders häufig im sich entwickelnden Hippokampus und Neokortex der Fall. (2,3) SD's treten allerdings im sich entwickelnden Hippokampus nicht auf in einer Phase in der sich die radiäre Glia zurückbildet und die Astroglia sich erst allmählich entwickelt (P6-P10). In Untersuchungen zur Entwicklung von Astrozyten am Hippokampus konnten wir zeigen, das Astrozyten im stratum radiatum eine andere Orientierung besitzen als im Stratum lacunosum moleculare (4). Dies könnte mit der unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeit von SD's im Hippokampus zu tun haben. Neben der Rolle von Kalium wird die Rolle von Glutamat bei der SD Genese diskutiert. Wir konnten als erste zeigen, daß SD besonders empfindlich auf NMDA Rezeptorantagonisten reagiert (5). In Untersuchungen an der Meerschweinchenretina fanden wir, daß sich in diesen weder durch hohe Spiegel von Kainat noch durch mechanische Läsionen SD auslösen läßt. Diese nichtdurchbluteten Retinae unterscheiden sich von anderen Netzhäuten durch die fehlende horizontale Schicht von Astroglia.

Unterschiede zwischen SD und anoxischer Depolarisation legen Untersuchungen an neokortikalen Hirnschnitten nahe. Während die SD durch Glu-Antagonisten unterdrückt werden kann, ist dies bei anoxischen Depolarisationen (AD) nicht der Fall (5). SD und AD unterscheiden sich wahrscheinlich auch in Bezug auf die Freisetzung von GABA und Glutamat nach Beendigung des Ereignisses (6). So beobachten wir bei SD's im Gegensatz zu AD's in der Regel keine erhöhte Frequenz der Miniatur-PSP's.

Da häufig in der Ischämieforschung AD und SD gleichgesetzt werden, hätte dies wichtige Konsequenzen in der Interpretation pharmakologischer Daten.

In der Penumbrazone von Infarkten sind bereits früh SD artige Depolarisationen beobachtet worden. Diese werden für das Vorkommen von Zelltod in diesen Regionen verantwortlich gemacht. An Hippokampusschnitten, Kultur und in der Retina können die Bedingungen studiert werden, unter denen SD's zytotoxische Wirkungen entfalten (Ödem, Hypoglykämie, Hypoxie, Azidose)

3. Arbeitsprogramm/Methodischer Ansatz

Die Vorgänge zur SD sollen an whole mount retinae, an Hirnschnitten des Hippokampus und an hippokampalen Slicekulturen untersucht werden. SD's sollen entweder durch Puls-Applikation von Glutamat oder Kalium ausgelöst werden. Bei den Messungen werden Änderungen der extrazellulären Ionenkonzentrationen, der DC Potentiale und neuronale und gliale Stromregistrierungen mit der in situ Patch clamp-Methode durchgeführt. Abgeleitete Glia- und Nervenzellen werden routinemäßig mit Farbstoffen unterschiedlicher Molekülgröße (Biocytin, Lucifer Yellow etc) angefärbt, um die Ausdehnung verschiedener Gliazellklassen zu ermitteln und preferentielle Kopplungsrichtungen zu ermitteln. Zunächst soll die Frage bearbeitet werden, welche Ähnlichkeiten und Unterschiede es zwischen hypoxischen, hypoglykämischen und glutamatergen Depolarisationen und SD gibt. Dazu sollen Veränderungen des extrazellulären Milieus, Membran-Ströme und spontane Transmitterfreisetzung (mini-EPSP's und -IPSP's) analysiert werden. Die pharmakologische Sensitivität gegenüber verschiedenen Kaliumkanalblockern, Glutamatantagonisten und Entkopplungsverfahren von GAP-Junctions (CO₂, Halothan, pH) soll ermittelt werden.

Dann sollen Ausbreitungswege der SD im Hippokampus adulter und juveniler Tiere und in Hippokampuskulturen mit der Expression von Gliazellen korreliert werden. Es soll geklärt werden, ob die SD sich auch noch bei blockierter chemischer Neurotransmission auslösen läßt und wie sich diese pharmakologisch unterdrücken läßt. An Hippokampus-Slicekulturen soll die Proliferation von Gliazellen ua durch Cytostatika reduziert werden und so geprüft werden, welche Beziehung zwischen Gliazellen und SD besteht. In gleicherweise sollen Gliotoxine eingesetzt werden (DL alpha Aminoacidipinat, Fluoroacetat). In diesen Untersuchungen soll weiter der Frage nachgegangen werden, ob und wann repetitive SD's zu Zelltod führen (Variation des Glucose, Sauerstoffgehalts und des pH's). Parallel zu diesen Untersuchungen soll die Reifung von Astrogliafunktionen im Hippokampus weiter untersucht werden und in Beziehung zur Kalium-Regulation gesetzt werden. Die Membraneigenschaften der Gliazellen in den verschiedenen Schichten sollen vergleichend untersucht werden und ihre ontogenetische Reifung analysiert werden. Entsprechend diesen Ergebnissen wird eine ontogenetische Variation in den Ausbreitungsprozessen der SD erwartet. Die Beziehung zwischen erhöhter Krampfanfälligkeit des sich entwickelnden Hippokampus, der Genese von SD's und der Funktion von Gliazellen bei der Elektrolytregulation soll weiter analysiert werden. Schließlich sollen die Eigenschaften der SD's an hippokampalen Strukturen mit denen an der Netzhaut verglichen werden.

4. Referenzen

1. HEINEMANN, U., LUX, H.D. *Brain Res.* 120:231-249, 1977.
2. HABLITZ, J.J., HEINEMANN, U. *Dev. Brain Res.* 36:209-303, 1987.
3. HABLITZ, J.J., HEINEMANN, U. *Dev. Brain Res.* 46: 243-252, 1989.
4. NIXDORF, B., ALBRECHT, D., HEINEMANN, U. *Glia*, submitted.
5. MODY, I., LAMBERT, J.D.C., HEINEMANN, U. *J. Neurophysiol.* 57, 869-888, 1987.
6. KRAL, T., LUHMANN, U., MITTMANN, T., HEINEMANN, U. *Brain Res.* 612: 278-288, 1993.
6. LUHMANN, H.J., HEINEMANN, U. *J. Neurophysiol.* 67:798-811, 1992.
7. HEINEMANN, U., ALBRECHT, D., BECK, H., FICKER, E., D. v. HAEBLER, STABEL, J. In: *Neurobiology and Epilepsy; Molecular basis of epileptogenesis*, Elseviers, Amsterdam, pp. 107-114, 1992.

5. Kooperation:

Einhäupl, Dirnagl, Nitsch, Pförringer, Kettenmann

Räumliche, personelle Voraussetzg.: C4, C3, wiss.Ass., TA, 2 Meßplätze.

6. Beantragte Mittel

Stellen:	1 BATIIa, 2 Studentische Hilfskräfte
Verbrauchsmittel:	30 KDM/Jahr
Investitionen:	70 KDM (Infrarotkamera, Manipulatoren, Mini-Inkubator, Mikroskop)

A 4 Karl M. Einhäupl und Jörg Weber
Neurologische Klinik, Charite, Humboldt Universität
Akute Schadensmechanismen der bakteriellen Meningitis.

1. Stand der Forschung.

Sowohl die Mortalität als die Morbidität der bakteriellen Meningitis ist in den letzten 30 Jahren unverändert geblieben. Trotz adäquater antibiotischer Therapie versterben nach wie vor 30% der an einer Pneumokokken-Meningitis erkrankten Erwachsenen. Da Fortschritte in der Antibiose momentan kaum zu erwarten sind (1), ist die Erforschung der Schadensmechanismen und deren pharmakologischen Beeinflussung extrem wichtig.

TNF, IL-1 und IL-6, vorwiegend aus Astrozyten gebildet, kommen bei der Auslösung der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis eine Schlüsselrolle zu (2). TNF und IL-1 sind in der Lage Endothelzellen zur Expressierung von Adhäsionsmolekülen anzuregen (ELAM, ICAM-1, Mac-1, LFA-1 etc.) (3). ICAM-1 ist eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle in der Leukozyten Endothel Interaktion bei bakterieller Meningitis (4). Integrine wie Mac-1 vermitteln einen wesentlichen Teil der cytotoxischen Aktivität von an Endothelzellen haftenden aktivierten Leukozyten. Diese setzen freie Radikale, Leukotriene, und proteolytische Enzyme frei und führen damit wahrscheinlich zu Hirnödemen, Zunahme des rCBF und zur Schädigung der Bluthirnschranke und sekundär zu neuronalem Schaden. In in vitro Experimenten konnte auch gezeigt werden, daß TNF selbst neuronalen Schaden bewirken kann (5).

Diesem Antrag liegt die Hypothese zu Grunde, daß die Verminderung von TNF in der akuten Phase der Pneumokokkenmeningitis zum einen und die Blockade der durch TNF exprimierten Adhäsionsmoleküle zum anderen, zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei der Behandlung der bakteriellen Meningitis führen kann.

2. Eigene Vorarbeiten

Der Antragsteller bzw. die Mitarbeiter seiner Arbeitsgruppe haben langjährige Erfahrung mit den im Antrag verwendeten in-vivo Methoden. Diese wurden zum Teil von ihm und seiner Arbeitsgruppe mitentwickelt. (tierexperimentelles Modell der bakteriellen Meningitis, Laser-Doppler Blutflußmessung, Confokale Laserscanning Mikroskopie, Chemolumineszenz, NO-Messung). Die geplanten Methoden sind im Labor der neurologischen Klinik etabliert. Die Schlüsselrolle von TNF bei der Entstehung von Hirnödemen, Störung der Bluthirnschranke sowie der Zunahme von rCBF bzw. deren positive Beeinflussung durch TNF Antikörper bei der bakteriellen Meningitis konnten von seiner Arbeitsgruppe gezeigt werden. Ebenso die Veränderung oben genannter Parameter durch freie Radikale und die Blockierung der Effekte durch SOD und Katalase (6,7,8).

J. Weber war bisher vorwiegend klinisch tätig und hat unter Anweisung von K.M.Einhäupl und U.Dirnagl die verwendeten Methoden erlernt. Eine weitere Vertiefung der experimentellen Ausbildung im Labor bei PD. Dr. W. Pfister in München ist geplant.

3. Ziele

Ziel der vorgeschlagenen Untersuchungen soll es sein, die vorwiegend nicht neuronale Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis weiter zu charakterisieren. Im Mittelpunkt werden dabei die Astrocyten (später auch Mikroglia) bzw. die von diesen Zellen produzierten Stoffe (TNF, IL-1, IL-6) und die Endothelzellen sowie die durch diese Zellen exprimierten Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und MAC-1 sein. Folgende Fragen sollen in der ersten Antragsphase bearbeitet werden:

Produzieren Astrozyten Interleukine nach Inkubation mit Pneumokokken und deren Zellwandbestandteile (Inaktivierung durch Hitze, Penicillin, Penem) und bestehen Unterschiede durch Inaktivierungsverfahren?

Produzieren Astrozyten nach Inkubation mit Pneumokokken und deren Zellwandbestandteile freie Radikale?

Wie verändert sich die Charakteristik der Entzündung bei selektiver Gliaausschaltung?

Wie verändert die Gabe von selektiven ICAM-1 Antikörpern und selektiven Mac-1 Antikörpern die Leukozyten Endothel-Interaktion, die Bluthirnschranke und die Freisetzung freier Radikale.

4. Arbeitsprogramm

a) in vitro:

Astrozytenkulturen (Ratte-vorhanden, geplant humane), Inkubation mit Pneumokokken bzw. deren Zellwandbestandteile (nach unterschiedlichen Inaktivierungsverfahren) und Bestimmung von TNF, Zeitverlauf?, Nitric Oxide (Sievers NO-Analyzer) und freier Sauerstoffradikale (Chemolumineszenz). In humanen Astrozytenkulturen auch IL-1, IL-6 mittels ELISA, Zeitverlauf.

b) in vivo:

lokale, differentielle Ausschaltung von Astrozyten (Fluoroacetat). Intracisternale Pneumokokkeninjektion. Messung von rCBF (Laser Doppler), Messung der Störung der BHS und des Leukozytenverhaltens in der pialen Mikrozirkulation mit Confokaler Laser Scanning Mikroskopie. Nitric Oxide Messung, freie Sauerstoffradikale.

Meningitisinduktion mit Pneumokokken, IV Gabe von selektiven ICAM-1 Antikörpern (Rattenspezifisch, Kooperation Athena Neurosciences, Inc.) oder bzw. und IV Gabe von selektiven Mac-1 Antikörpern(Rattenspezifisch, Athena Neurosciences, Inc.) Confokale Laser Mikroskopie, BHS, Leukozyten Endothelinteraktion, Liquoruntersuchung (Leukozyten,

Protein, Albumin) Messung von NO, freien Sauerstoffradikalen, rCBF und Hirndruck, Histologie, Brain Water Content, Zeitliches Auftreten von ICAM-1 und Mac-1, Nachweis mit markierten Antikörpern.

5. Literatur

1. Quagliariello VJ, Scheld WM. CID 1993;17:603-608
2. Sharif SF, Hariri RJ, Chang VA, Barie PS, Wang RS, Ghajar JBG. Neurol Res 1993;15:109-112
3. Quagliariello VJ, Scheld WM. New Engl J Med 1992;327:864-872
4. Jander S, Heidenreich F, Stoll G. Neurology 1993;43:1809-1813
5. Täuber MG, Sachdeva M, Kennedy SL, Loetscher H, Lesslauer W. J Inf Dis 1992;166:1045-1050
6. Pfister HW, Koedel U, Haberl RH, Dirnagl U, Feiden W, Rusckdeschel G, Einhüpl KM. J Cereb Blood Flow Metab 1990;10:914-922
7. Pfister HW, Koedel U, Haberl RH, Dirnagl U, , Rusckdeschel G, Einhüpl KM. J. Inf. Dis. 1992;166:1442-1445
8. Dirnagl U, Ködel U, Pfister HW, Villringer A, Schleinkofer L, Einhüpl KM. Adv Exp Med Biol 1993;333:203-212

6. Kooperationen

- U. Dirnagl; Neurologische Klinik, Charité: Tiermodell, Nachweis freier Radikale (Chemolumineszenz, NO Bestimmung, Laser Doppler, nichtneuronale Zellkulturen, Laser Scanning Mikroskopie)
- U.K. Hanisch, MDC: Interleukinbestimmung
- I. Blasig, Institut für Molekulare Pharmakologie: frei Radikale, BHS Modell
- H. Kettenmann, MDC: Gliotoxine

7. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:	1 BAT IIa, 1 Doktorandenstelle
Beantragte Investitionen:	DM 50.000
Beantragte Sach- und Reisemittel (pro Jahr)	DM 50.000

A 5 Ingolf Blasig

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Forschungsverbund Berlin
 Radikale und Hypoxie an Zellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS)

1. Stand der Forschung

Vereinzelte Befunde weisen darauf hin, daß bei hypoxischen Störungen im Bereich der BHS freie Radikale von pathogenetischer Bedeutung sind.¹ Endothelzellen (EZ) und Astrozyten (AZ) sind Hauptbestandteile der BHS. EZ werden als wesentliche Radikalquelle angesehen; unter Hypoxie/Reoxygenierung wird die dort lokalisierte Xanthinoxidase aktiviert. EZ sind reich an Mitochondrien, die schon unter Normalbedingungen Sauerstoffradikale produzieren. Bei Schädigungen im Bereich der BHS tritt eine Migration von Leukozyten als weitere Radikalquelle auf; reoxygenierungsbedingte EZ-Schäden führen zur Adhäsion von Neutrophilen.² Das kann eine Aktivierung der Leukozyten bedingen, wodurch der oxidative Streß zusätzlich erhöht wird. Damit sind Gehirnkapillaren gleichzeitig Target freier Radikale. Bei Hypoxie kommt es, möglicherweise durch verstärkte Superoxidbildung, zum Verlust der NO-Bildung,³ was die Gewebsperfusion reduzieren kann. EZ besitzen einen hohen Gehalt an Polyenfettsäuren.⁴ Die Aktivierung der Arachidonsäurekaskade, z.B. durch hypoxische Zustände, führt durch Freisetzung reaktiver Folgeprodukte zum Zusammenbruch der Barrierefunktion und zu Ödemen.⁵ Andererseits verfügen Gehirn-EZ über ein wirksames Radikalabwehrsystem, das stärker ausgeprägt ist als in anderen Zellen des Gehirns.⁴ Radikalfänger können die Neutrophilenadhäsion¹, die Beeinträchtigung der NO-Generierung³, die Arachidonat-induzierte Ödembildung sowie die gleichzeitig auftretenden Membranschäden und Lipidperoxidation⁵ verhindern und so zum Schutz der BHS beitragen. Die Bedeutung des Radikalstoffwechsels für Hypoxiegeschädigte AZ, die die BHS-Funktion wesentlich beeinflussen, ist weitgehend unklar. AZ können unter basalen Bedingungen und durch geeignete Agonisten Nitroxid⁶ und Sauerstoffradikale⁷ produzieren. Für die Radikalabwehr scheint das Gluthathionsystem relevant zu sein.⁸ Insgesamt liegen erste indirekte Hinweise vor, die die Annahme rechtfertigen, daß freie Radikale an der Verursachung Hypoxie-assoziiierter Beeinträchtigungen der BHS beteiligt sind. Es ist unklar, welche Radikale durch welche Bestandteile der BHS bei hypoxischen Störungen gebildet werden und welche Schäden durch diese Species hervorgerufen bzw. vermittelt werden. Ein spezifischer Radikalnachweis, z.B. mit der Elektronenspinresonanz(ESR)-Spektroskopie, ist bei den genannten Schädigungszuständen bisher nicht bekannt.

2. Eigene Vorarbeiten

Primärkulturen von AZ und Gehirnkapillar-EZ werden routinemäßig kultiviert und sind gut charakterisiert. Ein Zellkulturmodell der BHS ist etabliert: Kokultivierung von EZ und AZ auf einer Membran. Der transendotheliale Widerstand liegt derzeit bei $400 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^2$, die Fluoresceinpermeation unter 3%. Damit können Beeinträchtigungen (z.B. Hypoxie/Reoxygenierung) und Verbesserungen der Barrierefunktion (z.B. durch Antioxidanzien) erfaßt werden. Weiterhin liegen Erfahrungen zur

Messung des Transportes von Aminosäuren und Zuckern durch EZ-Monolayer vor. Durch Hypoxie und anschließende Reoxygenierung induzierte EZ-Schäden sind umfangreich charakterisiert: anaerobe Glykolyse, Energiemangel, Membranschäden, morphologische Alterationen. Lipidperoxidation und Bildung von Lipofuscingranula bei Reoxygenierung weisen auf eine Verstärkung radikalischer Prozesse hin,⁹ was Radikalmessungen mit der ESR-Spintrap-Methode bestätigen. Gleichzeitig wurden neue Spintrapverbindungen entwickelt,¹⁰ die zum Radikalnachweis an Zellen konzipiert wurden. Weiterhin sind Untersuchungen zur Zytoprotektion mit Radikalfängern, die EZ-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies reduzieren können, vorgenommen worden. Damit sind alle Voraussetzungen gegeben, die vergleichende Untersuchungen von Radikalstoffwechsel und Funktionen an AZ, EZ sowie am Zellkulturmodell der BHS bei Hypoxie und Reoxygenierung erlauben.

3. Ziele

Es soll ein Beitrag zur Aufklärung der Bedeutung freier Radikale für funktionelle Schäden der BHS nach Hypoxie und Reoxygenierung geleistet werden. Dazu erfolgt an Zellkulturen von AZ, EZ sowie einem aus beiden Zellarten bestehenden Modell der BHS (1) eine Identifizierung und Quantifizierung der bei Hypoxie und Reoxygenierung freigesetzten Radikale. (2) Aus Vergleichen von Radikalfreisetzung und funktionellen Schäden am BHS-Modell werden Schlußfolgerungen über die pathologische Rolle der zu messenden Radikale bei hypoxischen Zuständen abgeleitet. (3) Erkannte Korrelationen zwischen Radikalfreisetzung und Funktionsstörungen sollen durch Zytoprotektiva gezielt beeinflusst werden. Damit sollen weitere Rückschlüsse zur Relevanz radikalischer Spezies für die genannten Störungen erhalten werden.

In Weiterführung des Projektes bzw. in Kooperation innerhalb des SFB sind Studien des Radikalstoffwechsels unter Wechselwirkung von EZ und Leukozyten sowie zur Radikalbildung unter hypoxischen Zuständen *in vivo* geplant. Durch die Experimente an Leukozyten ist zu prüfen, welche Bedeutung freie Radikale für die Leukozytenadhäsion haben (Präsenz, BHS-Gängigkeit von Adhäsionsmolekülen). Die beabsichtigten *in vivo*-Untersuchungen (Identifizierung, Quantifizierung freier Radikale) dienen der Überprüfung der Relevanz der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse.

4. Arbeitsprogramm

Die Untersuchungen erfolgen an Kulturen von AZ, EZ und an einem BHS-Modell (Kokultivierung von AZ bzw. EZ auf den beiden Seiten einer Membran). (1) Bei Hypoxie und Reoxygenierung sollen mittels ESR-Spektroskopie freie Radikale nachgewiesen, identifiziert und ihr Bildungsort lokalisiert werden. Um die Radikalbildung abzuschätzen, wird die endogene Radikalabwehr erfaßt, z.B. Thiolreste, Superoxiddismutase (SOD). Um Fehlinterpretationen zu vermeiden bzw. um zusätzliche Informationen zu erhalten, werden Lipidperoxidation (TBARS) und Chemilumineszenz ebenfalls gemessen. Zum intrazellulären Radikalnachweis werden neue Spintrapverbindungen verwendet, die in Modellversuchen an Liposomen zu erproben sind. (2) Durch quantitativen und zeitlichen Vergleich der Radikalfreisetzung (ESR-Spintrapping, Lipidperoxidation, Chemilumineszenz) mit auftretenden

Störungen (morphologisch, biochemisch erfassbare Membranalterationen, Enzymfreisetzung; Bildung von Streßproteinen, z.B. SOD; Permeationsschäden; Störungen im Energiestoffwechsel, anaerobe Glykolyse, energiereiche Phosphate) soll zur Klärung der pathologischen Bedeutung freier Radikale für hypoxische Zustände am Zellkulturmodell der BHS beigetragen werden. Um Wechselbeziehungen zwischen AZ und EZ zu erfassen, ist es notwendig, die durch Hypoxie und Reoxygenierung bedingten Schäden nicht nur am BHS-Modell sondern auch an den Einzelkulturen zu untersuchen. Ein Vergleich zu den Modellen der Solokultivierung bietet möglicherweise auch Aufschluß über protektive Effekte oder verstärkte Schädigung beider Zelltypen durch interzelluläre Wechselwirkung. (3) Ergeben sich aus den vergleichenden Untersuchungen Korrelationen zwischen Radikalfreisetzung und funktionellen Störungen am BHS-Modell, schließen sich pharmakologische Interventionen an. Dabei sollen erkannte Zusammenhänge mit Antioxidanzien (z.B. Radikalfänger) beeinflußt werden. Eine Verminderung sowohl von Radikalbildung als auch von Schäden an BHS-Funktionen würde die Annahme eines kausalen Zusammenhanges unterstützen. Weiterhin ist geplant, Zytoprotektiva mit anderem Wirkungsmechanismus (z.B. Kalziumantagonisten) einzusetzen. Damit soll Aufschluß erhalten werden, inwiefern weitere Mechanismen an der Radikalgenerierung bzw. an der Verursachung von BHS-Schäden bei Hypoxie/Reoxygenierung beteiligt sind.

5. Literatur

1. Grammas P, Lin G-J, Wood K, Floyd RA: Free Rad. Biol. Med. 1993, 14: 553-557
2. Palluy O, Morliere L, Gris JC, Bonne C, Modat G: Free Rad. Biol. Med. 1990, 13: 21-30
3. Lefer AM, Lefer DJ: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993, 33: 71-90
4. Shukla A, Shukla R, Dikshit M, Skimal RC: Free Rad. Biol. Med. 1993, 15: 97-100
5. Audus KL, Guillot FL, Braughler JM: Free Rad. Biol. Med. 1991, 11: 361-371
6. Murphy S, Wek G: Neurosci. Lett. 1990, 109: 152-156
7. Chang PK, Chen SF, Yu ACH: J. Neurochem. 1988, 50: 1185-1193
8. Raps SP, Lai JCK, Hertz L, Copper AJL: Brain Res. 1989, 493: 398-401
9. Blasig IE, Mertsch K, Ladhoff A, Grune T: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994, in press
10. Klauschenz E, Haseloff RE, Volodarski LB, Blasig IE: Free Rad. Res. Commun. 1993, in press

6. Kooperation

- U. Dirnagl, Neurologie, Charite: Radikalmessung an Zellen der BHS bei Hypoxie mit Chemilumineszenz; Radikalbestimmung bei Ischämie in vivo mit ESR-Spektroskopie
- R. Reszka, MDC: intrazellulärer Radikalnachweis, Modellversuche mit Liposomen; Bestimmung der endogenen Radikalabwehr (SOD); Permeation von Adhäsionsmolekülen durch BHS-Modell
- H. Kettenmann, MDC: Charakterisierung hypoxischer Zellschäden durch Erfassung intrazellulärer Kalziumakkumulation mittels konfokaler Mikroskopie

7. Beantragte Mittel

Stellen:	1 BAT IIa, 1 BAT IIa/2
Investitionen:	DM 25.000,-
Sach- und Reisemittel:	DM 50.000,-

A 6. Martin Paul**Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (ab 1.7. voraussichtlich UKS, FU Berlin)****Molekulare Mechanismen der Endothelinregulation im Gehirn****1. Stand der Forschung:**

Das Zentralnervensystem spielt eine bedeutende Rolle für die Regulation kardiovaskulärer Mechanismen. Hieran sind neben den klassischen Neurotransmittern auch vasoaktive Peptidhormone wie ANF, Angiotensin II und Endothelin beteiligt (1,2). Diesen kommen neben den postulierten Funktionen als Neurotransmitter oder Neuromodulatoren auch mögliche Rollen bei Zell-Zell-Interaktionen zwischen nichtneuronalen Zellen, z.B. zwischen Astrozyten und Endothelzellen zu. Die Familie der Endothelinpeptide hat hierbei möglicherweise eine Sonderstellung inne, da sowohl die Endotheline als auch ihre Rezeptoren in hohen Konzentrationen in Astrozyten und in Endothelzellen beschrieben wurden. Dieses Expressionsmuster lässt auf eine Beteiligung der Endotheline an der Funktion der Blut-Hirn-Schranke zielen. In diesem Zusammenhang wird besonders eine pathophysiologische Rolle dieser Peptide bei ischämischen Erkrankungen des Gehirns diskutiert. Die zellulären und molekularen Grundlagen dieser Veränderungen sind jedoch nach wie vor unbekannt (3).

2. Eigene Vorarbeiten:

Ich beschäftige mich seit eineinhalb Jahren mit der Genregulation der Endothelinpeptide und ihrer Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Prozesse. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde der Endothelin-1-Promotor kloniert, sequenziert und charakterisiert (4). Die Promotorsequenzen wurden in Endothelzellen transfiziert und die Rolle von Stimulatoren der Endothelinsekretion konnte in Vorversuchen genauer charakterisiert werden (5).

Zur Untersuchung der Genexpression auf mRNA Ebene wurde ein quantitativer PCR-Assay zur Messung der Expression der Endotheline sowie ihrer Rezeptoren etabliert. Weiterhin besteht die Möglichkeit zur Charakterisierung der mRNA Regulation mittels Northern-Blotting.

Als Zellkulturmodelle für Transfektionsstudien wurden Endothelzellen aus der Aorta, der Koronararterie, dem Gehirn sowie Astrozyten in Primärkultur aus verschiedenen Gehirnarealen in Kultur etabliert. Methoden zur Transfektion dieser Zellen werden zur Zeit optimiert.

Zur Untersuchung der Endothelinregulation in vivo wurden zwei transgene Rattenmodelle etabliert. Ein Modell (TGRhET1-37) überexprimiert ein genomisches Konstrukt des menschlichen Endothelin-2 Gens. Bei diesen Tieren findet sich unter anderem eine erhöhte Expression des Transgens im Gehirn (3). Bei einem anderen Modell (THRrET/Luc) wurde ein Reporter-genkonstrukt, bei dem der ET-1

Promotor die Expression des Luciferase Gens steuert, ubiquitär exprimiert. Mittels dieser Modelle ist die Möglichkeit zur Untersuchung der Rolle von ET im ZNS in vitro, ex vivo und in vivo gegeben.

3. Ziele:

Das Forschungsprojekt hat das Ziel, die molekularen Mechanismen der Endothelinregulation zu im Gehirn zu untersuchen und ihre Bedeutung bei ischämischen Prozessen aufzuklären. Folgende Komplexe sollen bearbeitet werden:

Untersuchung der Endothelinregulation auf Genexpressionsebene in Astrozyten und Gehirndothelzellen. Darstellung zellspezifischer Phänomene.

Untersuchung der Endothelin-Wirkungen auf Rezeptoren an Astrozyten und Endothelzellen

Untersuchungen des Endothelinsystems in Kokultur-Modellen von Endothelzellen und Astrozyten, sowie in Slice-Explantaten.

Untersuchung der Endothelinregulation in nichtneuronalen Zellen des ZNS bei pathophysiologischen Modellen der cerebralen Ischämie sowie bei transgenen Tieren, die Endothelogene überexprimieren.

4. Arbeitsprogramm:

a) Untersuchung der basalen Genexpression des Endothelinsystems in Astrozyten, Endothelzellen und neuronalen Zellen. Transfektion dieser Zellen mit Reportergenkonstrukten (Endothelin/Luciferase) zur Charakterisierung des Endothelinpromotors. Detaillierte Untersuchungen zur Darstellung der cis-trans Interaktionen in den verschiedenen Zelltypen. Charakterisierung und Lokalisation der Endothelinexpression im Gehirn transgener Ratten.

b) Untersuchung nukleärer Faktoren, die an der Regulation des Endothelinsystems beteiligt sind. Charakterisierung der Endothelin-Wirkungen auf die Rezeptoren an Astrozyten und Endothelzellen. Hierzu werden *second messenger* Systeme sowie der regulative Einfluß auf Protoonkogene und Wachstumsfaktoren untersucht. Es soll die Frage abgeklärt werden, inwieweit zellspezifische Regulationsmechanismen vorliegen.

c) Etablierung von Kokultur-Modellen zwischen Astrozyten und Endothelzellen. Charakterisierung der Zell-Zell- Interaktionen auf Ebene der Gentranskription. Untersuchung komplexerer Zellsysteme

("Slice"-Kulturen) in vitro. Langzeitversuche hinsichtlich der Endothelin-Wirkungen werden an diesen Systemen durchgeführt.

d) Charakterisierung der Endothelinexpression in pathologischen Modellen. der cerebralen Ischämie. Analoge Manipulationen werden an den bereits etablierten transgenen Modellen durchgeführt.

5. Literatur:

- (1) Ganten D, Paul M, Lang RE (1991) The role of neuropeptides in cardiovascular regulation. *Cardiovasc. Drugs and Ther.* 5:119-130
- (2) Paul M, Bader M, Steckelings UM, Voigtländer T, Ganten D (1993) The renin angiotensin system in the brain: Localization and functional significance. *Drug Research* 43:207-213
- (3) Böcker W, Paul M (1994) Molecular regulation of endothelin. *Clin Exp Hypert.*, in press
- (4) Zintz M, Paul M . Cloning and functional characterization of the rat endothelin-1 promoter, *submitted*
- (5) Paul M, Zintz M, Yanagisawa M. Transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *submitted*

6. Kooperationen:

Andrea Lippoldt, MDC: in situ Hybridisierung, Interaktionen zwischen dem Endothelinsystem und dem Renin-Angiotensin-System

Detlev Ganten:, MDC:Etablierung transgener Modelle

Regina Retzka:, MDC: Optimierung der Transfektionsmethoden

Ulrich Dirnagl:, Neurologische Klinik, Charite: Ischämie Modelle bei transgenen Ratten

Robert Nitsch, Anatomisches Institut, Charite: Untersuchungen an Slice/Organoidpräparaten
Morphologische Analyse transgener Hirnpräparate

Ingolf E. Blasig, Institut für Molekulare Pharmakologie: Kokultur von Zellen, Radikal-Nachweis

U. Heinemann, Institut für Physiologie, Charite: PCR-Technik

H. Kettenmann, MDC: neonatale Astrozytenkulturen

7. Beantragte Mittel:

Beantragte Stellen:	1 BAT IIa Stelle, 1 BAT V (MTA) Stelle
Beantragte Investitionen:	DM 45.000
Beantragte Sachmittel:	DM 40.000

B 1 Helmut Kettenmann und Stephan Patt
Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin
Physiologische Eigenschaften glialer Tumore

1. Stand der Forschung

Unter den Tumoren des zentralen Nervensystems sind ungefähr 15 bis 20 % Gliatumore, zu denen man die Form der Astrozytome und Oligodendrogliome rechnet. Glioblastome sind die bösartigsten Gliatumorvarianten und sind mit über 50 % aller Gliome die häufigsten Gliatumore. Die postoperative 5-Jahresüberlebensrate liegt bei Patienten mit Glioblastomen unter 5 %, und verschiedenste moderne Therapiekonzepte haben bisher noch keine Verbesserung erkennen lassen. Gliale Tumore wurden bisher weitgehend mit morphologischen Methoden charakterisiert. Molekularbiologische Charakterisierungen wurden in den letzten Jahren verstärkt angegangen [1]. Die physiologischen Eigenschaften glialer Tumore sind weitgehend unbekannt. Bisher wurden nur Zelllinien tumorösen Ursprungs untersucht [2]. Daten über tumoröses Gliagewebe liegen bisher nicht vor.

2. Eigene Vorarbeiten

Unsere Untersuchungen an Gliazellen aus normalem Gewebe der letzten Jahre haben gezeigt, daß Gliazellen eine Vielzahl von Ionenkanälen und Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone exprimieren [3, 4]. Dieses Repertoire an Rezeptoren und Kanälen konnte auch erfolgreich herangezogen werden, um Gliazellen besser zu klassifizieren [5, 6]. Wir wissen z. B., daß die Entwicklung der Oligodendrozyten aus ihren Vorläufern von einer massiven Änderung im Ionenkanalmuster begleitet ist [7]. Die Aktivierung von Rezeptoren bzw. Blockade von Kanälen verändert nicht nur die Membraneigenschaften der Gliazellen, sondern kann auch zentrale zellbiologische Eigenschaften wie die Proliferationsrate steuern [8]. Eine Blockade der Proliferation wurde z. B. nach Aktivierung von Glutamatrezeptoren bei Astrozyten beobachtet [9]. Wir hoffen nun, über eine Beeinflussung der Membraneigenschaften wie Rezeptoraktivierung die zellbiologischen Eigenschaften der Tumorzellen zu beeinflussen.

3. Ziele

In diesem Forschungsprojekt verfolgen wir drei thematische Ansätze:

1. Wir wollen durch eine physiologische Charakterisierung verschiedener Hirntumore diese besser klassifizieren. Diese Klassifizierung soll mit der Malignität des Tumors korreliert werden. Wir könnten uns z. B. vorstellen, daß eine hohe Malignität mit der Expression eines definierten Musters an Kanälen und Rezeptoren korreliert. Dies ist nicht unwahrscheinlich, denn die Membraneigenschaften haben einen großen Einfluß auf grundlegende zelluläre Eigenschaften.
2. Wir wollen die physiologischen Eigenschaften glialer Tumorzellen des akuten Hirnschnittes aus postoperativem humanen Gewebe mit denen von kultivierten Zellen aus demselben Patienten

vergleichen. Dies umfaßt nicht nur die elektrophysiologischen Eigenschaften, sondern auch die Motilität der Zellen. Die Dokumentation der zellulären Veränderungen durch die Kultivierung ist ein wichtiger Schritt, um Daten von kultivierten glialen Tumorzellen zu interpretieren und deren klinische Möglichkeiten abzuschätzen. Die Untersuchungen in Kultur ermöglichen längerfristige Untersuchungen zellbiologischer Parameter, die im akuten Hirnschnitt nicht möglich sind, wie die Modulierbarkeit der proliferativen Aktivität.

3. Wir suchen nach Rezeptoren, deren Aktivierung bzw. Blockade die Eigenschaften der Gliomzellen verändert. Die untersuchten Eigenschaften sind Motilität, das proliferative Verhalten und die elektrophysiologischen Eigenschaften.

Diese Befunde sollen uns helfen, Ansätze zu entwickeln, die die Eigenschaften dieser Gliazellen durch Aktivierung der Rezeptoren verändern. Perspektivisch können wir uns vorstellen, daß wir dadurch die Eigenschaften von Gliomzellen modellieren können und damit unter Umständen langfristig therapeutische Ansätze entwickeln können.

4. Arbeitsprogramm

Die Gliomzellen sollen sowohl in akuten Hirnschnitten als auch in Zellkulturen untersucht werden. In Zusammenarbeit mit Neurochirurgen im Klinikum Berlin-Buch und an der Freien Universität Berlin arbeiten wir mit Zellen aus operativ entferntem humanen Tumorgewebe. Das Gewebe wird direkt nach der Entfernung in 120-150 µm dicke Schnitte geteilt oder zum Anlegen von Gewebekulturen dissoziiert. Die Hirnschnitte werden so schnell wie möglich im MDC physiologisch charakterisiert. Mit der Patch-Clamp-Technik können wir die spannungs- und ligandengesteuerten Ionenkanäle charakterisieren. Cytosolische Ca^{2+} -Änderungen, ausgelöst durch Liganden, dienen uns dazu, metabotrope Rezeptoren nachzuweisen und zu charakterisieren. Die gewonnenen Daten können an den kultivierten Zellen verifiziert werden. Wir können nun prüfen, ob sich die Eigenschaften der Zellen unter den definierten Kulturbedingungen ändern. In der Kultur können wir zudem die Proliferations- und Migrationsrate der Zellen bestimmen und analysieren, ob sich diese für die Malignität wichtigen Eigenschaften beeinflussen lassen.

Als Methode zur Charakterisierung der Gliatumore planen wir, verschiedene physiologische Methoden einzusetzen. Dies umfaßt die Messung von Membranströmen mit der Patch-Clamp-Technik und die Charakterisierung von Ionenströmen mit bildgebenden Verfahren inklusive Messungen mit dem konfokalen Mikroskop. Das Motilitätsverhalten wird über ein Rechnersystem erfaßt und ausgewertet. Die Zellen werden nach physiologischer Charakterisierung mit immunzytochemischen und ultrastrukturellen Methoden charakterisiert. Alle Methoden sind in der Arbeitsgruppe am MDC bereits etabliert.

5. Literatur

1. Patt, S., Thiel, G., Maas, S., Lozanowa, T., Cervós-Navarro, J., Witkowski, R., Blumenstock, M. (1993) Chromosomal changes and correspondingly altered proto-oncogene expression in

- human gliomas. Value of combined cytogenetic and molecular genetic analysis. *Anticancer Research* 13:113-118
2. Brismar, T., Collins, V.P. (1989) Inward rectifying potassium channels in human malignant glioma cells. *Brain Res.* 480:249-258
 3. Verkhratsky, A., Trotter, J., Kettenmann, H. (1990) Cultured glial precursor cells from mouse cortex express two types of calcium currents. *Neurosci. Lett.*, 112:194-198
 4. Berger, T., Schnitzer, J., Kettenmann, H. (1991) Developmental changes in the membrane current pattern, K⁺ buffer capacity and morphology of glial cells from the corpus callosum slice. *J. Neurosci.*, 11:3008-3024
 5. Backus, K.H., Berger, T.B., Kettenmann, H. (1991) Activation of neurokinin receptors modulates K⁺ and Cl⁻ channel activity in cultured astrocytes. *Brain Res.*, 541:103-109
 6. Kettenmann, H., Hoppe, D., Gottmann, K., Banati, R., Kreutzberg, G. (1990) Cultured microglial cells express a different pattern of membrane channels as peritoneal macrophages. *J. Neurosci. Res.* 26:278-288
 7. Sontheimer, H., Trotter, J., Schachner, M., Kettenmann, H. (1989) Developmental regulation of channel expression in cultured oligodendrocytes. *Neuron*, 2:1135-1145
 8. Chiu, S.Y. (1991) Functions and distribution of voltage-gated sodium and potassium channels in mammalian Schwann cells. *Glia* 4, 541-558
 9. Condorelli, D.F., Ingrao, F., Magri, G., Bruno, V., Nicoletti, F., Avola, R. (1989) Activation of excitatory amino acid receptors reduces thymidine incorporation and cell proliferation rate in primary cultures of astrocytes. *Glia* 2, 67-69

6. Kooperation

R. Grantyn (Physiologische Untersuchungen früher Vorläuferzellen; Daten am konfokalen Mikroskop)
 U.-K. Hanisch (Untersuchungen zur Interaktion mit Zytokinen)
 U. Heinemann (Diskussionspartner für physiologische Fragestellungen)
 R. Nitsch (Kooperation und Beratung zur morphologischen Charakterisierung der Gliome)
 M. Paul (Kooperation über die physiologische Wirkung von Endothelin)
 R. Reszka und W. Walther (Physiologische Untersuchungen transfizierter Zellen)
 alle Neurologen der Charité als Diskussionspartner für klinisch relevante Probleme

6. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:	1 BAT IIa-Stelle, 1 Doktorandenstelle
Beantragte Investitionen:	keine
Beantragte Sach- und Reisemittel (pro Jahr):	DM 45.000,--

B 2 Uwe-Karsten Hanisch
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Cytokine als Modulatoren glialer Ionenströme

1. Stand der Forschung

Cytokine haben regulatorische Funktionen während viraler Infektionen, Entzündungen, Immunantworten und der Hämoopoese (1). Cytokine scheinen ebenfalls an der Steuerung neuraler Differenzierungen teilzunehmen (1-3), ähnlich den Rollen die sie als Wachstumsfaktoren in der Peripherie innehaben. Im adulten Hirngewebe können diese Peptide neuronale und neuroendocrine Aktivitäten modulieren, z.B. die Freisetzung von Transmittern und releasing-Faktoren (1,2). Gliazellen, als den massenmäßig bedeutsamsten Produzenten und Wirkorten von Cytokinen im ZNS, könnte auch über den lokalen Cytokinhaushalt eine Regulation neuronaler Funktionen zukommen. Die während neuropathologischer Veränderungen (z.B. Multiple Sklerose, Alzheimersche Krankheit, AIDS) oder als Folge und im Bereich traumatischer Ereignisse beobachteten Anstiege in Gewebekonzentrationen von Cytokinen und ihrer Bindungsstellen stehen vermutlich direkt mit der Aktivierung von Glia im Zusammenhang, die zur Ausbildung von Narben, zur erhöhten Phagozytoseleistung und Produktion regenerationsfördernder Wirkstoffe, aber ebenso zur Auslösung neurotoxischer Kaskaden führen kann (4,5). Letztere sind auch deshalb von Interesse, da die immuntherapeutische Anwendung von Cytokinen (z.B. IL-2) in der Behandlung von peripheren und zentralen Tumoren durch dramatische, teilweise zentral vermittelte Nebeneffekte behindert wird (6,7). Die molekularen und zellulären Mechanismen, die im ZNS Cytokineffekte vermitteln, sind kaum untersucht, entsprechende Rezeptor- und Postrezeptorsysteme nicht identifiziert. Erste Hinweise lassen gewebespezifische Eigenschaften vermuten (2). So konnten inzwischen Cytokineffekte auf das elektrochemische Verhalten von neuronalen und nichtneuronalen Zellen (Muskelzellen) dargestellt werden (8-19). Der Nachweis modulatorischer Cytokineinflüsse auf Ionenströme in Gliazellen steht nahezu aus.

2. Eigene Vorarbeiten

Für den Einsatz von Cytokinen in der Tumorthherapie ist es erforderlich, deren mögliche Nebeneffekte und Einflüsse auf normales Hirngewebe zu kennen. Bisherige Untersuchungen zu zentralen Cytokineffekten zeigten u.a. für IL-2 eine komplexe, selektive und hochpotente Regulation von Transmitterfreisetzungen, eine langfristige Aktivierung des hypothalamisch-hypophysären-adrenalen Systems und eine unerwartet markante, mit Myelinschädigung und massiver Astroglia-Aktivierung gekoppelte Neurotoxizität.

3. Ziele

Ziel des Projektes ist die Erfassung von Cytokineffekten auf physiologische Eigenschaften glialer Zellen. Neben den Experimenten an normalen Zellen und Geweben ist die Einbeziehung von Tumormaterial

vorgesehen. Schwerpunkt dabei ist, mögliche Veränderungen von Ionenleitfähigkeiten bzw. intrazellulären Ionenverteilungen als Antwort auf Cytokinkontakte darzustellen: (1) Über die Messung von intrazellulärem Ca^{2+} wird die Aktivierung dieses Signals nach Cytokinkontakt untersucht. (2) Die vermutete Modulation elektrophysiologischer Eigenschaften von Gliazellen durch ausgewählte Cytokine wird über eine Beeinflussung der Kanaleigenschaften und Kanalmuster erfaßt. (3) Für Microglia wird darüber hinaus das Motilitäts- und Phagozytoseverhalten in Gegenwart von Cytokinen charakterisiert. Zum einen wäre ein direkter Einfluß von endogenen bzw. therapeutisch verabreichten Cytokinen auf die Eigenschaften von Gliazellen denkbar, der z.B. während der Gewebereifung, nach Schädigung des Gewebes oder in Tumorrundzonen Glia im Bereich veränderter oder sterbender Zellen aktiviert. Andererseits könnten Cytokine die Ansprechbarkeit von Glia gegenüber weiteren Signalen (lokale Schwankungen in Transmitter- und Ionenkonzentrationen) modulieren, was zur Unterscheidung des normalen Gewebeszustandes gegenüber einem geschädigten Bereich beitragen könnte. (4) Glia-Aktivierungen und cytotoxische Veränderungen als Folge von Cytokinadministration (IL-2, IL-3, TNF) oder -expression (TNF) werden an Hirnschnittmaterial untersucht, um die Konsequenzen der im Gewebeverband möglicherweise auslösbaren Kaskaden (z.B. Cytokin-vermittelte Cytokininduktion) zu erfassen.

4. Arbeitsprogramm

Zur Charakterisierung akuter und langfristiger Effekte von Cytokinen ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , -2, -3, -6, TGF- β) auf (elektro)physiologische Eigenschaften von normaler Glia und Tumorzellen (intrazelluläres Ca^{2+} , Ionenströme) werden Zellkulturen und Gewebeschnitte eingesetzt, wobei neben dem Zusatz auch der selektive Entzug (Blockierung durch Antikörper) dieser Faktoren während längerer Inkubationen untersucht werden soll. Ionenleitfähigkeits- und Ionenkonzentrationsänderungen können durch Anwendung von Patch-clamp-Verfahren sowie der konfokalen Mikroskopie erfaßt werden. Neben direkten Effekten auf die Membranströme wird eine Modulation transmitterinduzierter Leitfähigkeitsänderungen durch Cytokine berücksichtigt. Dem unmittelbaren Nachweis eines Zusammenhanges zwischen Cytokinkontakt und ionalen Veränderungen in Gliazellen soll sich eine erste Charakterisierung der beteiligten extra- und intrazellulären Mechanismen mit immunologischen und pharmakologischen Methoden (Anti-Rezeptor- und Antiligandantikörper, Antagonisten, Kanalblocker, Medienzusammensetzung) anschließen. Der Nachweis von entsprechenden Rezeptoren, Cytokinpeptiden und zellspezifischen Antigenen auf und in Gliazellen könnte dabei über autoradiographische, Western-blot- und immunocytochemische Techniken erfolgen. Für microgliale Zellen wird zusätzlich der Cytokineinfluß auf deren Motilität und Phagozytoseaktivität mit computergestützter Bewegungsanalyse getestet. In Fortführung einer Zusammenarbeit mit dem Douglas Hospital Research Centre (DHRC), McGill University Montreal werden die Konsequenzen von zentralen Cytokingaben an Hirnschnittmaterial charakterisiert.

5. Literatur

1. Plata-Salaman, C. R. (1991) *Neurosci Biobehav Rev* 15, 185-215.
2. Merrill, J. E. (1991) *J. Cell. Biochem.* 46, 191-198.
3. Patterson, P. H. & Nawa, H. (1993) *Cell* 72/*Neuron* 10 (Suppl.), 123-137.
4. McGeer, P. L. & Rogers, J. (1992) *Neurology* 42, 447-449.
5. Dickson, D. W. & Rogers, J. (1992) *Neurobiol. Aging* 13, 793-798.
6. Tartour, E., Mathiot, C. & Fridman, W.H. (1992) *Biomed. Pharmacother.* 46, 473-484.
7. Maas, R. A., Dullens, H. F. J. & Den Otter, W. (1993) *Cancer Immunol. Immunother.* 36, 141-148.
8. Sawada, M., Hara, N. & Maeno, T. (1991) *Brain Res.* 545, 248-256.
9. Sawada, M., Hara, N. & Maeno, T. (1991) *Neurosci. Lett.* 131, 217-220.
10. Lorenzon, P., Ruzzier, F., Caratsch, C.G., Giovannelli, A., Velotti, F., Santoni, A. & Eusebi, F. (1991) *Pflügers Arch.* 419, 380-385.
11. Soliven, B. & Albert, J. (1992) *J. Neurosci.* 12, 2665-2671.
12. Brinkmeier, H., Kaspar, A., Wiethölter, H. & Rüdell, R. (1992) *Pflügers Arch.* 420, 621-623.
13. Plata-Salaman, C. R. & French-Mullen, J. M., H. (1992) *Brain Res. Bull.* 29, 221-223.
14. Szucs, A., Stefano, G. B., Hughes, T.K. & Rozsa, K.S. (1992) *Cell. Mol. Neurobiol.* 12, 429-438.
15. Sawada, M., Hara, N. & Maeno, T. (1992) *Cell. Mol. Neurobiol.* 12, 439-445.
16. Sawada, M., Hara, N. & Ichinose, M. (1992) *J. Neurosci. Res.* 33, 461-465.
17. Kagan, B. L., Baldwin, R. L., Munoz, D. Wisnieski, B. J. (1992) *Science* 255, 1427-1430.
18. Tancredi, V., D'Arcangelo, G., Grassi, F., Tarroni, P., Palmieri, G., Santoni, A. & Eusebi, F. (1992) *Neurosci. Lett.* 146, 176-178.
19. McLarnon, J.G., Michikawa, M. & Kim, S. U. (1993) *Glia* 9, 121-126.

6. Kooperationen

Innerhalb der Arbeitsgruppe "Zelluläre Neurobiologie" am MDC (Dr. H. Kettenmann) bestehen Kooperationen bei der Untersuchung cytokininduzierter Veränderungen von $[Ca^{2+}]$ in Mausgliakulturen und im Rahmen der Untersuchung glialer Membraneigenschaften und Motilität unter Cytokineinflüssen. Mit den Gruppen um Dr. R. Reszka (MDC) und Dr. H. Kettenmann (MDC) werden die Projektanteile, die sich mit Cytokineffekten auf Tumorzellen bzw. auf Zellen in deren Umgebung befassen, bearbeitet. Mit den Labors von Dr. R. Quirion (DHRC, Montreal), Dr. R. Nitsch (Universität Frankfurt) und Dr. A. Lippoldt (MDC) besteht Zusammenarbeit bei der Charakterisierung cytotoxischer Cytokineffekte im ansonsten normalen Rattenhirngewebe.

7. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:

1 Doktorandenstelle (BAT 2a/2 Ost)

Beantragte Investitionen:	DM 30.000.--
Beantragte Sachmittel:	DM 15.000.--/Jahr
Beantragte Reisemittel:	DM 3.000.--/Jahr

B 3 Friedrich Boegner, Hermann Christian Schumacher

Neurologische Abteilung, Universitätsklinikum Steglitz, Freie Universität Berlin

Synthese von Zellmediatoren durch Gliazellen unter Hypoxiebedingungen und Einfluß von Matrixkomponenten

1. Stand der Forschung

Die molekulare Genese ischämischer Hirninfarkte ist bislang weitgehend unbekannt. Gliazellen (Astrozyten, Mikroglia) sind in der Lage unter verschiedenen Bedingungen Nervenwachstumsfaktor (NGF), Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrose Faktor-alpha (TNF-a) zu synthetisieren und sezernieren. IL-1 und TNF-a haben eine potente prothrombotische Wirkung auf Gerinnungssystem und Endothelzellen (1). Zusätzlich stimulieren Sie die Synthese und Ausschüttung von anderen Zytokinen durch Leukozyten (1). Unter Hypoxiebedingungen konnte die Synthese von NGF (2), TNF-a (3) und IL-1b (4) nachgewiesen werden. Unklar ist es bisher, welche Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) diese Mediatoren unter Hypoxie synthetisieren. Die Freisetzung von NGF, TNF-a und IL-1b durch Gliazellen könnte ein entscheidender Schritt in der Pathogenese ischämischer Hirninfarkte sein.

2. Eigene Vorarbeiten

Einer der Antragsteller (FB) hat eine langjährige Erfahrung im Umgang mit neuronalen Zellkulturen (Primärzellkulturen, Zelllinien) und Durchführung von immunzytochemischen Nachweismethoden bzw. Bioassays zum Nachweis von NGF und anderen neurotrophen Faktoren. Zusätzlich wendet er Zellkulturen zur Bearbeitung neurotoxi- und immunpharmakologischer Fragestellungen an (5, 6). Der zweite Antragsteller (HCS) hat langjährige Erfahrung in der Isolierung von DNA und mRNA, Durchführung von polymerisierender Kettenreaktion (PCR) und Nachweis von DNA/RNA-Sequenzen mittels Nukleinsäurehybridisierung, sowie in der Durchführung von immunzytologischen Färbungen und ELISA von Interleukinen. Mit Hilfe dieser Methoden hat er (HCS) infektiologische Fragestellungen im Rahmen der HIV-Infektion bearbeitet (7-9).

3. Ziele

Das Ziel der vorgeschlagenen Untersuchungen ist es, den Einfluß von Hypoxie auf die Synthese und Freisetzung von NGF, IL-1b und TNF-a durch Gliazellen zu untersuchen. Folgende Hypothesen werden untersucht:

- Hypoxie führt zu einer Synthese und Freisetzung von IL-1b, TNF-a und NGF durch astrozytäre Zelllinien (C6) bzw. Primärzellkulturen (Astrozyten, Mikroglia).
- Bestandteile der extrazellulären Matrix (Laminin, Fibronectin, Kollagen IV) haben einen Einfluß auf die postulierte, hypoxieinduzierte Synthese und Freisetzung von IL-1b, TNF-a und NGF.

4. Arbeitsprogramm

- a) Immunzytochemischer Nachweis von NGF, TNF-a und IL-1b in Gliazellen (zunächst C6-Gliomzellen, später Primärzellkulturen aus Ratte bzw. Hühnerembryonen) unter Hypoxie.
- b) Nachweis von NGF, TNF-a und IL-1b mittels Bioassays (NGF: Neuronen von Spinalganglien von Hühnerembryonen, IL-1: Quantifizierung der Zellproliferation im HL-4/CTTL-2-Assay, TNF-a: Zytotoxizität von L 929-Zellen) bzw. im ELISA (NGF, TNF).
- c) Isolierung der mRNA von NGF, TNF-a und IL-1b und deren Nachweis mittels reverser Transkription, PCR und anschließender Nukleinsäurehybridisierung.
- d) Wiederholung der Schritte a), b) und c) nach Kultivierung der Zellen auf verschiedenen Substraten (Laminin, Fibronectin, Kollagen IV).

5. Literatur

1. Beutler B: Tumor necrosis factors. Raven Press, New York, 1992.
2. Shozuhara et al. J Neurochem 1992; 59:175-180
3. Scannell et al. J Surg Res 1993; 54:281-285
4. Liu et al. Stroke 1993; 24:1746-1751
5. Stoltenburg-Didinger G, Boegner F: Neurotoxicology 1992; 13:179-184
6. Boegner et al.: Neurotoxicology 1994, in press
7. Schumacher HC et al: Verhandlung Dtsch Gesel Neurol 1990; 6:662-663
8. Schumacher HC et al.: Verhandlung Dtsch Gesel Neurol 1990; 6:666-667
9. Schumacher HC et al.: Lab Med 1991; 93:92-95

6. Kooperationen

- R. Hellweg, Psychiatrische Universitätsklinik der Freien Universität Berlin (NGF-ELISA).
U. Hanisch, Zytokine
H. Kettenmann, Zellkulturtechniken

7. Beantragte Mittel

Beabtragte Stellen:	1 Bat VIb (MTA) Stelle
Beantragte Investitionen:	20.000 DM
Beatragte laufende Mittel	30.000 DM/Jahr

B 4 Regina Reszka, Wolfgang Walther und Friedrich Weber*

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch; *Neurochirurgische Klinik,
Universitätsklinikum Steglitz, Freie Universität Berlin

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

1. Stand der Forschung

Hirntumoren stellen eine Gruppe von malignen Erkrankungen dar, die noch immer schwer therapierbar sind und eine hohe Mortalität aufweisen. Die Gentherapie als ein neues therapeutisches Konzept eröffnet auch für diese Gruppe von Tumoren potentiell bessere kurative Möglichkeiten, die auf einer selektiven lokalen Tumorbehandlung basieren. Neben dem Transfer von Zytokin-Genen therapeutisch aktiver Substanzen, wie den Zytokinen, ist der Transfer der sogenannten Suizid-Gene für Hirntumoren ein innovativer Ansatzpunkt. Das Konzept der "Suizid-Gentherapie" beruht auf dem Transfer des Herpes-Simplex-Thymidin-Kinase (HSVtk)-Gens in Tumorzellen mit Hilfe eines retroviralen Vektors. Zellen, die nach Transfer dieses Gen exprimieren, werden für die antivirale Substanz Ganciclovir sensitiv. *Culver et al.* (1992) konnten zeigen, daß nach Injektion Virus-produzierender Zellen in transplantierte Hirntumoren und nachfolgender Ganciclovir-Behandlung eine vollständige Regression der Tumoren erreicht wird. Maßgeblich für den Erfolg dieser Therapie ist der "bystander"-Effekt, der auch zur Abtötung von nichttransfizierten Tumorzellen führt. Zur Zeit läuft am NCI eine FDA- und RAC-genehmigte experimentelle Studie an Patienten mit Hirntumoren.

Die Mehrzahl genterapeutischer Konzeptionen und Protokolle nutzen den *ex-vivo*-Gentransfer mit anschließender Reimplantation bzw. Reinjektion der transduzierten Zellen, meist mit dem Ziel einer Tumorzellvakzinierung. Das von Culver erarbeitete Prinzip sieht u.a. den *in-vivo*-Gentransfer mittels *in situ* produzierter Viren vor.

Ein Therapieansatz, der erstmals den liposomalen *in vivo* Transfer des MHC-Klasse-I (HLA-B7)-Gens in einem klinischen Protokoll zum Ziel hat, wird zur Zeit am Medical Center, Ann Arbor, University of Michigan, im Rahmen einer RAC-genehmigten Studie von *Nabel et al.* (1993) am malignen Melanom durchgeführt.

Durch direkte Injektion der Liposomen/Plasmid-DNA-Komplexe in das Tumorgewebe soll eine Immunantwort stimuliert werden, die zur Abtötung der malignen Zellen führt.

Im Rahmen des von uns geplanten Projektes sollen unterschiedliche Zytokine [Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-2] mit Hilfe des retroviralen bzw. liposomalen Gentransfers in maligne Gliomzellen (*in vitro* und *in vivo*) transferiert werden. Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen werden dann neben der Integrationseffizienz des Fremdgens ins Glioblastomzellgenom und die damit verbundene Proteinexpression, der Einfluß der Zytokinfreisetzung auf das Wachstumsverhalten, die Expression von Oberflächenantigenen, das Verhalten der Zytokinrezeptoren und die Wechselwirkung mit immunkompetenten Zellen sowie Adhäsionsmolekülen sein.

2. Eigene Vorarbeiten

Für die Konstruktion retroviraler Vektoren liegen beim Antragsteller Dr. W. Walther umfangreiche, jahrelange Erfahrungen vor. Es sind am I.C.R.F. in London Klonierungen des int-2, HST Onkogens sowie des FGF-5 Wachstumsfaktor-Gens in verschiedene retrovirale Vektorsysteme vorgenommen worden und für die Herstellung amphotroper Verpackungszelllinien verwendet worden (Dickson 1991, Goldfarb 1992). Seit geraumer Zeit werden durch den Antragsteller W. Walther Zytokingen-exprimierende retrovirale Vektoren kloniert und für die Herstellung von Verpackungszelllinien zur Produktion rekombinanter Retroviruspartikel verwendet. Es bestehen Erfahrungen auf dem Gebiet des Gentransfers retroviraler Vektoren durch Injektion sowie Elektroporation in vor allem humane Koloncarcinom- und Glioblastomzelllinien. Bei den Arbeiten zum Gentransfer des humanen $\text{TNF}\alpha$ -Gens in verschiedene Koloncarcinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, daß die Expression des Zytokins in den Tumorzellen zu einer Wachstumsinhibition *in vitro* und *in vivo* führt und deren Tumoriginität herabsetzt (Walther 1992, 1993a+b). Die stabile Expression und Vektorintegration konnte über den Zeitraum von mehreren Monaten in diesem Modell nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen an Rattenglioblastomzellen *in vitro* konnten zeigen, daß durch $\text{TNF}\alpha$ -Gentransfer bei TNF -produzierenden Zellen, neben morphologischen Veränderungen, Wachstumsinhibition auch verminderte Tumoriginität induziert wurde.

Die Antragstellerin R. Reszka verfügt über langjährige Erfahrungen zur liposomalen Verkapselung pharmakologisch aktiver Substanzen. So wurden verschiedene Zytostatika liposomal verkapselt und ihre Wirkung auf Tumorzellen *in-vitro* und in tierexperimentellen Tumor-Modellen getestet (Fichtner et al. 1991, 1993; Reszka et al. 1992). Seit 3 Jahren werden Versuche zur liposomalen Verkapselung von genetischem Material durchgeführt. Neben dem Einschluß von Retrovirusvektoren, die das Tumornekrosefaktor-Gen enthalten, wurde auch das β -Galactosidase-Gen (Lac Z) in unterschiedliche Liposomentypen verkapselt. Die Effektivität des liposomalen TNF -Gentransfers in verschiedene Kolonkarzinom-Zelllinien wurde mit der Kalziumphosphat-Präzipitationstechnik verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Effizienz des liposomalen Transfers in Abhängigkeit von der Zelllinie bis zum zehnfachen der durch die Kalziumphosphat-Präzipitationstechnik möglichen Transferrate gesteigert war (Walther et al. 1991).

Beim Antragsteller Dr. F. Weber liegen umfassende klinische Erfahrungen zur Behandlung von Hirntumoren vor. In der Neurochirurgischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Köln-Merheim wurden im Zeitraum 1985-1990 Pilotstudien zur systemischen und lokalen β -Interferon- sowie IL-2-Therapie bei Patienten mit malignen Gliomen durchgeführt (Weber, 1992). β -Interferon, obwohl in Japan als Medikament für Hirntumorthherapie zugelassen, zeigte keinen klinisch bedeutsamen zytoreduktiven Effekt. In Deutschland kam es aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien zu keiner

Zulassung von β -Interferon für Hirntumore. Humanes IL-2 zeigte keinen signifikanten antitumoralen Effekt (Weber, 1992). Ein therapeutischer Effekt von IL-2, der im Nacktmausmodell gesehen wurde (Weber, 1989), ließ sich klinisch nicht bestätigen (Weber, 1992). Parallel dazu erfolgte die Etablierung des Sphäroidmodells, einem dreidimensionalen Tumormodell (Weber, 1993), zur Prüfung der Wirkung unterschiedlicher Liposomentypen bzw. $\text{TNF}\alpha$ -beladener Vesikel. Bei 16 Patienten wurde die lokale Gabe von IL-2 sowie Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) durchgeführt. Es zeigte sich eine gute Verträglichkeit bei intrazerebraler Applikation von 1.000.000 Einheiten IL-2. Die intrazerebrale Injektion von IL-2 aktivierten autologen Lymphozyten wurde ebenfalls nebenwirkungsfrei toleriert (Weber, 1992).

3. Ziele

Etablierung einer in vivo Gentransfermethode für Zytokingene zur verbesserten Therapie von Hirntumoren als Ansatz für eine klinisch anwendbare Gen-Immun-Therapie.

4. Arbeitsprogramm

- a) *Charakterisierung* eines ausgewählten Panels humaner Glioblastom-Zelllinien (A172, U373, HS683, N-28, 39, 64, 65, 66) unterschiedlichen Malignitätsgrades hinsichtlich ihrer Ausstattung mit *Adhäsionsmolekülen und Oberflächenmarkern* (CD11a, CD18, CD44, CD54, CD56, MHC-I, MHC-II).
- b) *Konstruktion Zytokingen-tragender retroviraler Vektoren* - Ausgehend von retroviralen Expressionsvektoren werden das $\text{TNF}\alpha$ sowie das IL-2-Gen unter Verwendung Hormon- bzw. Zytokin-stimulierbarer Promotoren in diese Vektoren kloniert. An der Modifikation Zytokingen-exprimierender Vektoren wird gegenwärtig gearbeitet.
- c) *Liposomale Verkapselung rekombinanter DNA* - Verschiedene Liposomenzusammensetzung und -typen (kationische- und Immunliposomen) sind für den Gentransfer rekombinanter DNA vorgesehen und sollen hinsichtlich ihrer Transfereffizienz in vitro und in vivo geprüft werden.
- d) *Gentransfer in Tumorzellen* - Geplant ist sowohl der retrovirale als auch der liposomale Gentransfer von Zytokin-exprimierenden Vektoren (vgl. b).
- e) Untersuchung der *Veränderungen* hinsichtlich *Adhäsionsmolekül- und Oberflächenmarkerausstattung nach Zytokinexpression* von transfizierten Tumorzellen im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen bzw. nach Behandlung mit exogen verabreichtem $\text{TNF}\alpha$ oder IL-2.
- f) *Etablierung von Rattengliomen in vivo über eine stereotaktische Implantation* und Untersuchung der Wachstumskinetik sowie des Energiestoffwechsels in vivo (MRI, MRS). Stereotaktische Implantation von ex vivo transfizierten Glioblastomzellen. Stereotaktisch assistierte in vivo Transfektion von implantierten Tumoren als Simulation der klinischen Situation.

g) Auswertung der *in vitro* und *in vivo*-Versuche nach folgenden Kriterien: Wachstumshemmung, Tumormigration und Progression, Veränderungen im Ausstattungsgrad mit Adhäsionsmolekülen, Infiltration von immunkompetenten Zellen (Überwindung der Blut-Hirn-Schranke), Toxizität auf das peritumorale Gewebe.

5. Literatur

1. Culver, K.W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E.H., Blaese, R.M. *Science* 256:1550 (1992)
2. Nabel, G.J., Nabel, E.G., Yang, Z.Y., Fox, B.A., Plautz, G.E., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D., Chang, A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307-11311 (1993)
3. Fichtner, I., Arndt, D., Reszka, R., Gens, J. *Anti-Cancer Drugs* 2:555-563 (1991)
4. Reszka, R., Fichtner, I. Deutsches Patentamt, München 09.10.1992, PCT/DE 92/00868
5. Fichtner, I., Reszka, R., Schütt, M., Rudolph, M., Becker, M., Lemm, M., Richter, J., Berger, I. *Oncology Research* 5: 2 65-74, (1993)
6. Dickson, C., Acland, P., Smith, R., Doxon, M., Deed, R., McAllan, D., Walther, W., Fuller-Pace, F., Kiefer, P., Peters, G. *J. Cell. Sci.* 13:87-96 (1990)
7. Walther, W., Reszka, R. *European J. Cancer* 27: Suppl.3, A 1111 (1991)
8. Goldfarb, M., Deed, R., McAllan, D., Walther, W., Dickson, C., Peters, G. *Oncogene* 6:65-71 (1991)
9. Walther, W., Huth, J., Sparmann, G., Uckert, W. *European Biotechnology Today*, chapter 23: 209-215 (1992). Intercept Ltd., Andover, U.K.
10. Stein, U., Walther, W. Deutsches Patentamt, München 12.11.1992, No. P42 38 779.5.
11. Walther, W., Fichtner, I., Uckert, W. *Anticancer Res.* 13: 1565-1574 (1993)
12. Walther, W., Stein, U., Uckert, W. *Nucleic Acids Research* 21: 1682 (1993)
13. Weber, F., Hossmann, K.-A. Menzel, J. *Modern Neurosurgery*, 25-29 (1992)
14. Mootz, B., Weber, F., Moser, K.-H., Braunke, H., Menzel, J. *Neurosurgical Review* 12:41-45 (1989)
15. Weber, F., Kremer, C., Klinkhammer, M., Rasier, B., Brock, J. *Neurooncol.* (in press)

6. Kooperationen

- J. Blasig, Institut für Molekulare Pharmakologie: Nachweis freier Radikale (ESR, Bluthirnschrankenmodell)
- U. Dirnagl, A. Villringer, Neurologische Klinik, Charité: NMR (MRS und MRI)
- U. Hanisch, MDC: *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von Zytokingenen im Hirn, Zytokinnachweis im Liquor
- H. Kettenmann, MDC: Immunhistochemie

7. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:	1 BAT IIa Stelle
Beantragte Investitionen:	30.000,-DM einmalig
Beantragte Sach- und Reisemittel	45.000,- DM p.a.

B 5 Rosemarie Grantyn

Abt. Neurophysiologie, Physiologisches Institut der Charité,

Humboldt-Universität Berlin

**Differenzierung und Redifferenzierung in der Netzhaut: Elektrophysiologische
Charakterisierung pluripotenter Vorläuferzellen und der von ihnen abstammenden
Tumorzellen**

1. Stand der Forschung

Tumoren des Zentralnervensystems machen nur 4-6% aller zum Tode führenden Tumorklassen aus (Sandritter, Schattauer, Stuttgart, 1981). Ihre Untersuchung hat jedoch, neben der Leukämieforschung, in besonderem Maße zum Verständnis der relativen Rolle von genetischen und epigenetischen Determinanten der unkontrollierten Proliferation beigetragen (1). Während die vorwiegend im Erwachsenenalter auftretenden Gliome und Glioblastome Tumoren sind, die aus weitgehend determinierten Stammzellen hervorgehen, entspringen die im frühen Kindesalter zu beobachtenden Neuroblastome und Retinoblastome pluripotenten Vorläuferzellen. Letztere können sich, zumindest in der Netzhaut, sowohl in eine neuronale als auch in eine gliale Richtung entwickeln. Neuroblastome und Retinoblastome unterscheiden sich von malignen Tumoren des Erwachsenenalters dadurch, daß sie sich unter Umständen auch spontan zurückbilden, was auf die Wirkung von noch unbekanntem und offenbar nur im Kindesalter verfügbaren Differenzierungsfaktoren zurückgeführt wird. Eine induzierte Differenzierung von Tumorzellen wurde auch *in vitro* erzielt. Die sensationelle Beobachtung, daß Tumorzellen die genetischen Voraussetzungen für eine Ausdifferenzierung behalten (z. B.), eröffnete völlig neue Möglichkeiten der Krebstherapie.

Es ist deshalb von größtem Interesse, alle epigenetischen Mechanismen zu verstehen, welche die Proliferation und Differenzierung sowohl von gesunden als auch von 'entarteten' Zellen steuern. Da die experimentell erzielte und auch klinisch beobachtete Redifferenzierung offenbar stark altersabhängig ist, kann man vielleicht durch einen Vergleich der Eigenschaften und Reaktionen von pluripotenten Progenitorzellen (PPZ) und glialen Stammzellen (GSZ), sowie der von ihnen abstammenden Tumorzellen, mehr über die für die Differenzierung bzw. Redifferenzierung kritischen Bedingungen erfahren.

Normalerweise entwickeln sich PPZ der Netzhaut zu Photorezeptoren, Neuronen oder Gliazellen (Müller-Zellen). Lineage-Analyse durch Retrovirus-vermittelten Gentransfer haben an der prä- und postnatalen Netzhaut der Ratte gezeigt, daß retinale Vorläuferzellen sogar nach der Geburt bis zum Ende der mitotischen Aktivität pluripotent bleiben (3). Signale, welche pluripotente Progenitorzellen in eine gliale oder neuronale Richtung treiben oder aber zur Entstehung des Retinoblastoms führen, sind im einzelnen noch nicht bekannt. Es wird jedoch (nicht unwidersprochen) vermutet, daß ein Zusammenhang zwischen zellulärer Umgebung und Differenzierung der PPZ existiert (4). Besonders

relevant scheint gegenwärtig die Expression bestimmter Untereinheitskombinationen (z. B. mit und ohne $\alpha 6$) von Lamininrezeptoren (Integrine), welche ihrerseits (zumindest in der undifferenzierten Netzhaut des Hühnchens) durch Neurotrophine reguliert wird (persönliche Mitteilung Rodríguez-Tébar, Madrid).

Neueste Ergebnisse lassen erkennen, daß dabei auch die Regulation von spannungs- und ligandaktivierten Ca^{2+} -Kanälen zu berücksichtigen ist (5). Es steht zu erwarten, daß in den nächsten Jahren die Aufklärung der Rolle von Ca^{2+} -permeablen Ionenkanälen und anderen Ca^{2+} -regulierenden Membranrezeptoren wesentlich zum Verständnis der Tumorgenese beitragen wird. Die embryonale und postnatale Netzhaut der Maus ist dabei ein besonders geeignetes Modell, weil sie auch als intaktes isoliertes Präparat für experimentelle Manipulationen leicht zugänglich ist (Rörig und Grantyn, Dev. Brain Res., 1993, 74, 98-110), mitotische Aktivität auch nach der Geburt aufweist, und weil charakteristische Schichtungen und Zellmorphologien mit den entsprechenden Markierungssubstanzen die Analyse von Differenzierungsprozessen erleichtern.

2. Eigene Vorarbeiten

Das Forschungsprojekt konzentriert sich auf folgende Schwerpunkte:

- 1) Muster der Ionenkanal-Expression an isolierten PPZ der Maus und des Hühnchens. Die Ergebnisse sollen mit bereits vorhandenen oder noch zu gewinnenden Daten von Gliazellen und Neuronen der Netzhaut dieser Spezies verglichen werden, um die spezifischen funktionellen Eigenschaften der PPZ abgrenzen zu können.
- 2) Rolle von Integrinen in der Kontrolle der Expression von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen der PPZ.
- 3) Rolle von trk-Proteinen und anderen membranständigen Tyrosinkinasen in der Regulation der strukturellen und funktionellen Differenzierung von PPZ; Vergleich der PPZ in Retina der normalen und BDNF-'gene-knock-out'-Netzhaut.
- 4) Analyse von Retinoblastomprotein-(RBP)-induzierten Phosphorylierungsprozessen durch bildgebende Verfahren an PPZ.
- 5) Mechanismen der Zell-Zellinteraktionen in PPZ. Vergleich mit differenzierten Glia- und Nervenzellen der Netzhaut.
- 6) Muster der Kanalexpression und deren Manipulation an Retinoblastoma-Zellen; Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu PPZ.

Zu 1: Wir haben zu diesem Thema Vorarbeiten an der Netzhaut der Ratte und pigmentierten Maus geleistet (6). In intakten isolierten Netzhäuten der Maus (C57Bl6), bzw. an entsprechenden Primärkulturen wurden Patch-clamp-Messungen durchgeführt, um zu klären, welche Ionenkanäle der PPZ für den transmembranalen Ca^{2+} -Einstrom zur Verfügung stehen. Letztere Arbeit ist unseres Wissens die erste Untersuchung über die Expression von Ionenkanälen in PPZ in vivo. Um die Zusammenarbeit mit klinisch und molekularbiologisch orientierten Forschergruppen zu gewährleisten,

sollen im weiteren auch geeignete Präparate der menschlichen Netzhaut und der Netzhaut des Hühnchens eingesetzt werden.

Zu 2: Diese Fragestellung ergibt sich aus eigenen noch unveröffentlichten Beobachtungen an neuronalen Vorläuferzellen aus dem Tectum der Ratte (Grantyn, Perouansky und Hofer). Durch Patch-clamp-Messungen und Autoradiographie mit ^{124}J -markiertem Omega-Conotoxin konnte gezeigt werden, daß der Kontakt mit Laminin eine selektive Verstärkung der Expression einer Klasse von inaktivierenden LVA Ca^{2+} -Strömen zur Folge hat. Im weiteren soll der Mechanismus dieses Effekts geklärt werden, wobei in erster Linie die Rolle von bFGF zu berücksichtigen wäre. Von großer Wichtigkeit könnten in diesem Fall Experimente an menschlichem Tumorgewebe sein, da in dieser Richtung ein therapeutischer Ansatz denkbar ist.

Zu 3: Die entwicklungsabhängige Expression von *trkB* und niedrigaffinen NGF-Rezeptor wurde von Takahashi et al. (7) beschrieben. Wir selbst haben kürzlich die mit der Expression von *trkB* bzw. *trkC* verbundene neurotrophe bzw. differenzierende Wirkung von BDNF bzw. NT3 auf retinale und amakrine Zellen der Ratte und Maus in ihrer Entwicklungsabhängigkeit beschrieben (Korenbaum und Grantyn, Manuskript in Vorbereitung). Noch laufende Versuche befassen sich mit der Interaktion zwischen Neurotrophin-aktivierten Tyrosinkinasen und spannungs- und glutamataktivierten Ca^{2+} -Strömen (R. Grantyn und T. Rothe).

Zu 4: Das Retinoblastomprotein (RBP) ist eines der bestuntersuchten tumor suppressor gene products. Seine Inaktivierung leitet die Entstehung von vielen menschlichen Tumoren ein. Es wird angenommen, daß RBP das Zellwachstum durch Suppression der für die Proliferation aktivierten Transkriptionsgene reguliert (8). Zu diesem wichtigen Thema existieren im eigenen Labor lediglich methodische Vorarbeiten in Form von Fura-Experimenten an kultivierten und markierten retinalen Vorläuferzellen (Grantyn, in Vorbereitung). Die Ausweitung der bildgebenden Experimente auf die Untersuchung von Faktoren der Tumorgenese scheint uns besonders förderungswürdig, da sich bereits eine Rolle von Ca^{2+} in der RBP-gesteuerten Differenzierungssequenz abzeichnet (9).

Zu 5: Es besteht die Annahme, daß in der Netzhaut und in anderen neuralen Strukturen der Übergang von PPZ zu Neuronen durch einen graduellen Verlust von gap junctions und der damit verbundenen elektrischen Kopplung einhergeht. Umgekehrt ist Dedifferenzierung durch das Auftreten von gap junctions gekennzeichnet. Wir möchten unsere Erfahrung in der Paar-patch-clamp Analyse (10) für die detaillierte Untersuchung der Kopplungsmechanismen und ihrer Regulation in der Entwicklung einsetzen, weil auch hier möglicherweise ein Schlüssel zur Elektrophysiologie der Tumorgenese liegt.

Zu 6: Retinoblastoma-Zellen wurden von uns selbst noch nicht untersucht. Es gibt erste Ansätze zur Charakterisierung von Ca^{2+} -Kanälen einer menschlichen Neuroblastoma-Zelllinie (Y79), wobei gezeigt werden konnte, daß eine Differenzierung in die neuronale Richtung mit einer verstärkten Expression von LVA-Strömen einhergeht (11).

3. Ziele

Die Identifikation von Differenzierungssubstanzen und deren Wirkungsmechanismus durch elektrophysiologische Untersuchung von PPZ der Vertebratennetzhaut ist das Hauptziel dieses Forschungsprojekts. Darüber hinaus ist beabsichtigt, operativ gewonnenes Tumorgewebe und PPZ-bezogene Zelllinien mit der Methode der Patch-clamp-Technik und mit bildgebenden Verfahren in bezug auf Ionenkanalmuster und ihre Regulation zu charakterisieren, um sie dann mit Tumorzellen glialen Ursprungs zu vergleichen. Es geht in jedem Fall um grundsätzliche Fragen der zellulären Differenzierung im Zentralnervensystem, und damit auch um die Erschließung neuer Therapiemöglichkeiten von Krebserkrankungen.

4. Arbeitsprogramm

Diese ziemlich weitgefächerte Thematik soll weitgehend parallel bearbeitet werden. Rein molekularbiologische, anatomische und klinisch-angewandte Probleme müssen durch Kooperation mit anderen Forschergruppen gelöst werden. Der eigene methodische Schwerpunkt liegt bei der Kombination von elektrophysiologischen mit bildgebenden Techniken und Verfahren der zellulären Biochemie (evtl. Einzelzell-PCR). Techniken zur Manipulation von differenzierten oder undifferenzierten retinalen Zellen, wie z. B. Mikroinjektion von Tracern, Onkogenen, Enzymblockern und virale Transfektion müssen verfügbar bleiben oder etabliert werden.

Als Forschungsobjekt dienen neben der isolierten intakten Netzhaut und einer Reihe von Primärkulturen auch Zelllinien und, wenn irgend möglich, menschliches Tumorgewebe. Gedacht ist in letzterem Falle vor allem an Retinoblastoma-Gewebe, das operativ anfällt und über längere Zeit vital gehalten werden kann.

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts nicht untersucht werden sollen die später in der Entwicklung zu berücksichtigenden Aspekte der neuronalen Reifung. Dieser Problemkreis ist z. T. Gegenstand eines noch laufenden SFB-Projekts (SFB 220, A10). Im vorliegenden Antrag geht es ausschließlich um Eigenschaften der noch nicht in gliale oder neuronale Richtung festgelegten proliferierenden Vorläuferzellen sowie Signale, welche diese Zellen in die eine oder andere Richtung treiben bzw. die PPZ zur anhaltenden Proliferation zwingen (Tumorzellen mit vorwiegend glialen oder neuronalen Eigenschaften).

5. Literatur

1. Horsthemke, Cancer Genet. Cytogenet., 1992, 63, 1-7
2. Sachs, Science, 1978, 274, 535-539
3. Turner und Cepko, Nature, 1987, 328, 131-136
4. Williams und Goldowitz, Trends Neurosci. 1992, 15, 368-373
5. Schwartz et al., J. Biol. Chem., 1993, 268, 19931-19934
6. Rörig und Grantyn, Eur. J. Neurosci., im Druck
7. Takahashi et al. Neurosci. Lett. 1993, 151, 174-177
8. Helin und Harlow, Trends Cell Biol., 1993, 3, 43-46
9. Takuwa et al., J. Biol. Chem., 1993, 268, 138-145
10. Kraszewski und Grantyn, Neurosci., 1992, 47, 555-570
11. Barnes and Haynes, Brain Res., 1992, 598, 19-22

6. Kooperation

Grundsätzlich wird eine enge Zusammenarbeit mit den Antragstellern Kettenmann, Reszka und Hanisch angestrebt, weil es ja um den Vergleich von Glia- und Neuroepithel-Proliferation, -differenzierung und die entsprechenden Tumoren geht (s. Abschnitt 1). Es ist ein besonderes Anliegen dieses Projekts, die epigenetischen differenzierungsinduzierenden Faktoren in ihrer Abhängigkeit vom Alter, der zellulären Umgebung und dem Reifungsgrad der entarteten Zellen (pluripotente vs. gliale Vorläuferzellen) zu betrachten.

Darüberhinaus sind vorwiegend methodische Interaktionen vorgesehen:

mit H. Kettenmann, MDC, konfokale Mikroskopie zur Darstellung geometrischer Aspekte der $[Ca^{2+}]_i$ an PPZ in vivo;

mit U. Heinemann, Physiologisches Institut, Charité, Infrarot-Mikroskopie;

Kontakte zur Augenklinik der Charité müssen noch hergestellt werden. Es liegt außerdem ein Angebot zur Zusammenarbeit mit der Abteilung Teratologie an der Augenklinik der Universität Halle vor.

7. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:	1 BATIIa-Stelle, 1 BAT V (MTA)-Stelle
Beantragte Investitionen:	60.000,- DM
Beantragte Sach- und Reisemittel:	60.000,- DM

C 1 Andrea Lippoldt und Detlev Ganten
 Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch
**Die Rolle angiotensinerger Mechanismen in de- und regenerativen Prozessen
 im Gehirn: Focus auf gliale-neuronale Interaktionen**

1. Stand der Forschung

Die Existenz eines lokalen Renin-Angiotensin-Systems im Gehirn kann als weitgehend geklärt angesehen werden ^{1, 2}. Es spielt eine bedeutende Rolle für die Regulation kardiovaskulärer Mechanismen. Für Angiotensin II, das Effektorpeptid des Systems, welches Neurotransmitterfunktionen hat und auch als Neuromodulator beschrieben ist, gibt es Hinweise, daß es als Wachstumsmodulator für nichtneuronale und neuronale Zellen fungieren kann ^{3, 4}. Desweiteren gibt es Hinweise, daß sowohl Angiotensinogen als auch Angiotensin II in der Ontogenese während der Differenzierung des zentralen und peripheren Nervensystems eine Rolle spielen können. Das Angiotensinogen Gen wird im Gehirn ausschließlich in Astrozyten exprimiert. Angiotensinogen sowie das Peptidhormon Angiotensin II und dessen Rezeptoren können in Gliazellen sowie in Nervenzellen nachgewiesen werden ^{5, 6}.

Das zentral sezernierte Angiotensinogen und/ oder ANG II könnten möglicherweise, wie an den Blutgefäßen vermutet, eine Funktion in der Regulation von de- und regenerativen Prozessen haben. Angiotensin II kann direkten Einfluß auf die Expression glialer Wachstumsfaktoren, wie z. B. PDGF, bFGF, NGF oder auch auf Endothelin ausüben. Die zellulären und molekularen Mechanismen dieser Prozesse sowie deren Induktoren im Zentralnervensystem sind aber noch weitgehend unbekannt.

2. Eigene Vorarbeiten

Seit ca. 1 Jahr untersuchen wir die Expression von bFGF nach focaler Ischämie, epileptischen Anfällen sowie mechanischen Interventionen und deren pharmakologischer Modulation. Im Zusammenhang damit wurde begonnen, die Beteiligung von Angiotensinogen und Angiotensin II an trophischen Prozessen in folgenden experimentellen Modellen zu untersuchen:

- mechanische Läsionen des cerebellaren Cortex der Ratte
- human neocortical grafts im cerebralen Cortex der Ratte

Nach mechanischen Läsionen konnte eine signifikante Zunahme der Angiotensinogen-Genexpression in Gliazellen, sowie der Angiotensinogen-IR und der ANG II-IR in Gliazellen und in vermutlich degenerierenden Purkinjezellendriten beobachtet werden. Angiotensin (1-7) und (2-7) wurden am Läsionsort in Gliazellen nachweisbar.

Die Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung von AOPEN, ANG II und ANG(1-7) und (2-7) in trophischen Prozessen im cerebellaren Cortex hin. Die beobachteten Veränderungen sind offensichtlich längerfristiger Natur, wobei die molekularen Mechanismen eingehenderer Untersuchung bedürfen.

Weitere Hinweise auf die Beteiligung von Angiotensinogen an trophischen Prozessen wurden aus Untersuchungen der Entwicklung menschlichen corticalen Gewebes implantiert in eine Kavität des cerebralen Cortex der Ratte gefunden. In Glioblasten gut entwickelter Implantate konnte eine sehr

starke Expression des humanen Angiotensinogen Gens sowie eine hohe Angiotensinogen-IR nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen ist die Einbeziehung transgener Tiere. Es wurde ein transgenes Mausmodell etabliert, das sich durch eine Überexpression des Ratten-Angiotensinogens auszeichnet. Die transgene Linie TGM(rAOPEN)123 ist hyperten und exprimiert das Transgen vor allem im Gehirn in einer normalen anatomischen Verteilung, die der AOPEN mRNA Expression im Rattenhirn entspricht. Eine zweite Linie TGM(rAOPEN)92 weist eine abweichende Expression des Ratten-AOPENs im Gehirn auf und ist normotensiv⁷. Diese sowie nicht transgene Tiere sollen als Referenzlinien verwendet werden.

Als zweite Untersuchungsmöglichkeit dient die gezielte Hemmung der Genexpression mit Hilfe der Antisense-Methode bei den transgenen Mäusen. Zur spezifischen Inhibierung der Angiotensinogen Genexpression wurde ein Antisense-Konstrukt hergestellt, welches den Transkriptions- und den Translationsstartpunkt, eine Exon-Intron Grenze, sowie den für ANG II kodierenden Bereich des Ratten-AOPENs enthält. Dieses Konstrukt reduziert in Voruntersuchungen die AOPEN-Expression in stabil transfizierten Hepatoma-Zellen.

3. Ziele

Das Ziel der Untersuchungen ist, die Beteiligung von glialem Angiotensinogen und ANG II an trophischen Prozessen im Gehirn zu analysieren. Dabei sollen insbesondere folgende Aspekte näher untersucht werden:

1. Untersuchungen zur Angiotensinogen-Gen- und AT-1- und AT-2-Rezeptorgen-Regulation in nichtneuronalen Zellen nach mechanischen Läsionen sowie Ischämie, Untersuchung der Regulation der Angiotensinogen-Genexpression und ANG II-IR während der Ontogenese des Zentralnervensystems.
2. Untersuchung des Einflusses von AOPEN und ANG II auf de- und regenerative Veränderungen in Slice-Explantaten sowie auf die Expression glialer Wachstumsfaktoren sowie Untersuchung der modulierenden Wirkung verschiedener ANG II Rezeptoren (Typ 1, Typ 2, Typ 4) auf die Expression glialer Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF, NGF, GDNF) in verschiedenen pathophysiologischen Modellen (Ischämie, Status Epilepticus, Hypertonie)
3. Untersuchung der Wirkung von Angiotensin II und seiner Antagonisten auf Rezeptoren in Astrozyten-, Mikroglia- und Oligodendrozytenkulturen und deren Einfluß auf die Expression von Wachstumsfaktoren. Charakterisierung von Ionenkanälen und second messenger Systemen.
Spezifische Inhibierung der Angiotensinogen-Genexpression durch lokale Antisense-Expression und deren Auswirkungen auf die Zelldifferenzierung während der Ontogenese des ZNS, auf die Expression glialer Wachstumsfaktoren sowie de- und regenerative Prozesse unter pathophysiologischen Bedingungen.

4. Arbeitsprogramm

1. Charakterisierung der Überexpression von Angiotensinogen und dessen zellulärer Lokalisierung in transgenen Tieren und des Einflusses auf die Expression von Wachstumsfaktoren und Regeneration.

2. Untersuchung der Regulation der Angiotensinogen-Genexpression sowie der Regulation verschiedener Komponenten des Renin-Angiotensin Systems nach mechanischen Läsionen und Ischämie.
3. Detaillierte Untersuchungen der verschiedenen glialen Angiotensin II Rezeptortypen.
4. Untersuchung der Expression von Angiotensinogen und Angiotensin II in Slice-Explantaten.

5. Referenzen

1. Ganten, D., Hermann, K., Bayer, C., Unger, Th., Lang, R.E., Science 221, 869 (1977)
2. Lind, R.W., Swanson, L.W., Ganten, D., Brain Res 321, 209 (1984)
3. Iwasaki, Y., Kinoshita, M., Ikeda, K., Shiojima, T., Kurihara, T., Appel, S.H., J. Neurol. Sc. 103, 151 (1991)
4. Schelling, P., Fischer, H., Ganten, D., J. Hypertens. 9, 3 (1991)
5. Intebi, A.D., Flaxman, M.S., Ganong, W.F., Deschepper, C.F., Neurosc. 34, 545 (1990)
6. Lippoldt, A., Bunnemann, B., Iwai, N., Metzger, R., Inagami, T., Fuxe, K., Ganten, D., Neurosc. Letters 150, 153 (1993)
7. Kikmura, S., Mullins, J.J., Bunnemann, B., Metzger, R., Hilgenfeldt, U., Zimmermann, F., Jacob, H., Fuxe, K., Ganten, D., Kaling, M., EMBO J., 821 (1992)

6. Kooperation

In Zusammenarbeit mit Martin Paul werden die Zusammenhänge der Angiotensinogen-Genexpression und der Endothelin-Expression im Gehirn untersucht.

Mit Helmut Kettenmann werden in vitro Untersuchungen zur elektrophysiologischen Charakterisierung von glialen ANG II Rezeptortypen durchgeführt.

Mit Robert Nitsch sollen Untersuchungen zur morphologischen Charakterisierung der Läsionen sowie der Ischämie Modelle durchgeführt werden.

7. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:	1 Doktorandenstelle (BAT IIa/2), 1 technische Assistentenstelle (BAT V)
Beantragte Sach- und Reisemittel (pro Jahr):	50 000,- DM

C 2 Robert Nitsch

Anatomisches Institut, Charité, Humboldt Universität

Die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach entorhinaler Läsion

1. Stand der Forschung

Der entorhinale Cortex ist die zentrale "Relaisstation" für die Signalweiterleitung isocortikaler Information in die für Gedächtnisleistungen wichtige Hippocampusformation. Selektive pathologische Prozesse im entorhinalen Cortex, wie sie in der Initialphase des M. Alzheimer und bei der Parkinson-Demenz auftreten, führen deshalb zu einer partiellen Deafferenzierung des (noch) nicht geschädigten Hippocampus (Braak and Braak, 1993). Tierexperimentell kommt es nach experimenteller entorhinaler Läsion zu einer bleibenden Rarifizierung des Dendritenbaumes hippocampaler Neurone in der denervierten Zone (Nitsch, 1993). Elektrophysiologische Untersuchungen weisen auf eine gravierende Veränderung in der hippocampalen Signalweiterleitung hin (Clusmann et al., 1994). Eine Aktivierung hippocampaler Gliazellen nach entorhinaler Läsion ist wiederholt beschrieben worden (Steward et al., 1990; Gehrman et al., 1991).

2. Eigene Vorarbeiten

Nach entorhinaler Läsion kommt es zu persistierenden Veränderungen hippocampaler Dendriten (Nitsch, 1993). Dabei legen unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nahe (Nitsch and Frotscher, 1993). Immunzytochemische Untersuchungen und in situ-Hybridisierungsstudien haben Hinweise dafür ergeben, daß "early genes" nicht nur in hippocampalen Neuronen, sondern auch in Gliazellen postläsional aktiviert werden (Nitsch and Frotscher, 1992; Nitsch, 1993). Dabei scheinen transneuronale Veränderungen sowie die Aktivierung von "early genes" sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen transmitterabhängig vermittelt zu sein, da sie sich durch NMDA-Rezeptorantagonisten wie MK-801 blocken lassen (Nitsch and Frotscher, 1992).

3. Ziele

Die geplanten Untersuchungen sollen (I) im Läsionsexperiment und (II) am *in-vitro* System der entorhinalen-hippocampalen Komplexschnittkultur adoleszenter Ratten die Beteiligung von Gliazellen an den molekularen und zellulären Vorgänge analysieren, die im deafferenzierten Hippocampus stattfinden. Dabei hoffen wir, perspektivisch Strategien entwickeln zu können, die es ermöglichen, in diese Prozesse einzugreifen.

4. Arbeitsprogramm

(I) Läsionsexperimente

Die Beteiligung von Gliazellen an transneuronalen Veränderungen nach experimentelle entorhinaler Läsion soll zunächst in kombinierten LM/EM-Studien unter Einsatz von Doppelmarkierungen untersucht werden. Hierbei sollen gliaspezifische Marker und immunzytochemische sowie intrazelluläre Färbungen hippocampaler Neurone eingesetzt werden. Daran anschließend soll der Einfluß von z.B. Rezeptorantagonisten auf die Beteiligung von Gliazellen an solchen Veränderungen analysiert werden. Zur Klärung der Frage, ob Sproutingprozesse zu einer Afferenz-spezifischen Reaktion von unterschiedlichen Gliazellpopulationen führen, sollen anterograde Tracingstudien (PHAL) nach EC-Läsion in Kombination mit Gliazelldarstellungen durchgeführt werden. Es ist geplant, mittels immunocytochemischer Techniken die Rolle gliaspezifischer Substanzen bei transneuronalen Veränderungen einzugrenzen. Hierbei sollen Neurotrophine und Neurotrophinexpression-regulierende Systeme, wie z.B. das Angiotensinsystem, im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Diese *in-vivo* Studien sollen wichtige Referenzdaten für die Experimente mittels der Komplexslicekultur liefern.

(II) Komplexschnittkultur

In der ersten Phase des Projektes soll das Komplexschnittpräparat genauer charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den üblicherweise angelegten Schnittkulturen von sehr jungen Tieren (p 2-7), ist die Kultivierung adoleszenten Gewebes vorgesehen, um Differenzierungsprozesse noch weitgehend *in-vivo* zum Abschluß kommen zu lassen. Erste Daten aus meinem Labor zeigen, daß eine solche Kultivierung adoleszenter Komplexpräparate von entorhinalen Cortex und Hippocampus mit der "interface-technique" über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen gelingt und daß nach dieser Zeit *in-vitro* sowohl die Ursprungsneurone der entorhinal-hippocampalen Projektion, als auch deren Zielzellen typische morphologische und neurochemische Charakteristika aufweisen (Diekmann et al., 1994). Wir haben Untersuchungen zur Charakterisierung von Astrozyten und Mikrogliazellen während der Kultivierung begonnen. Dabei kommt es darauf an, den genauen Verlauf der explantationsbedingten primären Aktivierung von Gliazellen und eine längerfristige Reorganisation der Glia im Präparat zu beschreiben. Ausgehend von einer solchen Charakterisierung ist es nun vorstellbar, die Reaktion von Gliazellen auf definierte Läsionen und Noxen zu überprüfen und mittels Doppelmarkierungen jeweils mit den auftretenden neuronalen Veränderungen zu korrelieren. Hierbei sind sowohl mechanische Läsionen vorstellbar als auch die Gabe krankheitsspezifischer toxischer Substanzen. Eine selektive Ausschaltung von Gliazellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Läsion mittels spezifischer Toxine (etwa Fluorocitrat) ist vorgesehen, um die Beteiligung dieser Zellen an transneuronalen Veränderungen zu studieren. Das Modellsystem bietet die Möglichkeit, mit molekularbiologischen Methoden (Antisense-Experimente; Transfektionen) systematisch die Expression definierter (gliaspezifischer) Substanzen zu beeinflussen und damit ihre Rolle bei den oben genannte Veränderungen aufzuklären.

5. Zitierte Literatur

- Braak H, Braak E (1993) Hippocampus (Special Issue, eds. Nitsch R, Ohm TG):239-246.
 Clusmann H, Nitsch R, Heinemann U (1994): submitted.

- Diekmann S, Nitsch R, Ohm TG (1994) J Neural Trans: in press.
- Gehrmann J, Schoen SW, Kreutzberg GW (1991) Acta Neuropathol 82:442-455.
- Steward O, Torre ER, Phillips LL, Trimmer PA (1990) J Neurosci 10:2373-2384.
- Nitsch R (1993) Hippocampus (Special Issue, eds. Nitsch R, Ohm TG):247-256.
- Nitsch R, Frotscher M (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:5197-5200.
- Nitsch R, Frotscher M (1993) Hippocampus 3:481-490.

6. Kooperationen

Zusammen mit Dr. U. Heinemann haben wir zeigen können, daß die Charakteristika der Feldpotentiale der Körnerzellen in der Fascia dentata nach entorhinaler Läsion auf Reizung in den verschiedenen Abschnitten der Molekularschicht permanent verändert bleiben. Eine weitere Zusammenarbeit zur funktionellen Charakterisierung der Rolle von Gliazellen bei transneuronalen Veränderungen sowohl an akuten Slices nach Läsion als auch in der Komplexschnittkultur mittels der Technik intrazellulärer Ableitungen und des "patch-clampings" sind verabredet. Molekularbiologische Experimente wie der Einsatz der Antisense-Technik und Transfektionsversuche, ebenso auch die methodische Erweiterung unserer Arbeiten, die Western- und Northernblottingtechniken sowie die PCR-Technik umfassen soll, werden in enger Kooperation mit Dr. M. Paul durchgeführt werden. In Kooperation mit Dr. A. Lippoldt sollen die Untersuchungen zur Rolle der Neurotrophine und der Neurotrophinexpression-regulierenden Systeme durchgeführt werden.

7. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:	1 Wissenschaftliche Mitarbeiterstelle (BAT IIa)
	1 Technische Assistentenstelle (BAT 5b/c)
Beantragte Investitionen:	DM 90.000
Beantragte Sach- und Reisemittel (pro Jahr):	DM 40.000

C 3 U. Heinemann, E. Ficker

Physiol. Inst. der Charité, Abt. Neurophysiologie, Hessische Str. 3-4, 10115 Berlin

Funktionen von Gliazellen während epileptogener Prozesse

1. Stand der Forschung / eigene Vorarbeiten

Etwa 20 % der epileptischen Patienten sprechen auf die gegenwärtig zur Verfügung stehenden Antikonvulsiva nicht an. Etwa 80 % dieser Patienten leiden an Temporallappenepilepsie. Diese Patienten weisen variable Nervenzellverluste in der Area entorhinalis, dem Hilus dentatus und der Area CA3 und CA1 sowie dem Subiculum auf. Das Gewebe ist durch eine Sklerose aufgrund der Proliferation glialer Zellen gekennzeichnet. Ähnliche Veränderungen treten auch bei der Kindlingepilepsie auf, wenn hohe Reizintensitäten verwendet werden oder wenn eine spontane Temporallappenepilepsie durch einen limbischen Status epilepticus verursacht worden ist. Unklar ist welche molekularen Signale zur Gliazellproliferation beitragen. Epileptische Anfälle können jedoch zur Aktivierung von Mikrogliazellen führen, die über sezernierte Moleküle an der Proliferation der Gliazellen beteiligt sein könnten. Die funktionellen Eigenschaften der proliferierten Gliazellen sind nicht bekannt. Möglicherweise handelt es sich bei den proliferierten Gliazellen allerdings um die von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen stammenden Typ II Astrozytenzellen. Gliazellen beeinflussen das Krampfgeschehen vielfach. Sie können neuronal aktive Substanzen freisetzen, sie regulieren den Transmittergehalt im Extrazellulärraum, sie sind an der Elektrolytregulation und an der Entstehung von Hirnödemen beteiligt und sie benutzen im Stoffwechsel GABA. Gliazellen stellen einen großen Teil des für die Entgiftung von freien Sauerstoffradikalen erforderlichen Glutathions. Gliazellkulturen, angelegt aus operativ entfernten Gewebe epileptischer und nicht epileptischer Patienten unterscheiden sich in Bezug auf Glutamat- oder mechanisch ausgelöste Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$. In Untersuchungen zur Elektrolytregulation während epileptischer Anfälle haben wir wahrscheinlich machen können, daß Gliazellen wesentlich an der extrazellulären Kaliumregulation und an der Genese langsamer DC Potentiale beteiligt sind (1). Untersuchungen in einem Narbenherd haben gezeigt, daß die Fähigkeit von Gliazellen Kalium umzuverteilen wahrscheinlich eher verbessert als verschlechtert ist (2) und das Gliazellen im Narbengewebe wahrscheinlich keine ionotropen Glutamatrezeptoren besitzen. In Untersuchungen an in vitro Hirnschnittpräparaten des Hippokampus haben wir an Hand der Niedrig-Kalziumepilepsie zeigen können, daß die glial bedingte Kalium Umverteilung an der Ausbreitung epileptischer Aktivität beteiligt ist (3). An diesem Präparat haben wir auch den Beitrag von Gliazellen zur Entstehung langsamer DC Potentiale sichern können (4). Diese unterstützen die Entstehung epileptischer Aktivität an Nervenzellen (5). In einem status epilepticus Modell des entorhinalen Kortex ist der Übergang von behandelbaren Entladungsformen zu pharmakoresistenten Entladungsformen sehr wahrscheinlich an eine Verstoffwechslung von synaptisch freigesetztem und in Gliazellen aufgenommenes GABA beteiligt (6). Mit Hilfe der Einzelzell PCR ist es uns seit kurzem möglich, die Expression von Glutamat- und GABA Transportern in verschiedenen Zelltypen zu studieren.

Schließlich verfügen wir seit kurzem über die Fähigkeit, Veränderungen der Glutathionspiegel in Nerven und Gliazellen mit einem bildgebenden Verfahren darzustellen. Wir haben schließlich im letzten Jahr sehr intensive Untersuchungen zu den biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften kultivierter und unterschiedlich stimulierter Mikrogliazellen gesammelt.

2. Arbeitsprogramm/methodischer Ansatz

1. Die Verteilung und das Vorkommen von Astrozyten-Typ II Zellen bei der Kindlingepilepsie ebenso wie bei Kainatläsion und anderen Modellen des Status epilepticus mit Zelldegeneration soll mit immunhistochemischen Methoden analysiert werden. In gleicher Weise wollen wir klären, ob Mikrogliazellen durch einzelne epileptische Anfälle oder im Verlauf einer chronischen Epileptogenese aktiviert werden können. Ihre Beziehung zur Astrozytenproliferation soll geklärt werden.
2. An akut isolierten Astrozyten und Mikrogliazellen, in Explantatkulturen und an Hirnschnittpräparaten sollen deren Eigenschaften mit Hilfe der Patch clamp Methode studiert werden. Die pharmakologischen Eigenschaften der exprimierten Ströme sollen analysiert werden und es soll in Kooperation mit Herrn Fischer in Düsseldorf geklärt werden, welche pharmakologischen Manipulationen geeignet sind, das Sekretionsverhalten der Mikro-Gliazellen zu beeinflussen.
3. An Astrozytenkulturen unterschiedlicher Herkunft (Regional, experimentelle Vorgeschichte, humanes Gewebe mit Tumoren oder Epilepsie) sollen Farbstofftransfer, Calciumoszillationen und Glutathion-Reaktionen auf verschiedene Glutamatagonisten sowie Transporteigenschaften für Glutamat und GABA untersucht werden.
4. Mittelfristig soll an Schnittkulturen nach Muller die Folgen einfacher epileptischer Anfälle, wahrscheinlich aber auch der Kindling Epilepsie für das Verhalten von Astrozyten und Mikrogliazellen studiert werden (Strommessungen, Glutathion und Ca Imaging, Dye-Coupling). Es soll an diesen Kulturen über Suppression der Bildung von Wachstumsfaktoren und Hemmung der Interleukin Freisetzung versucht werden, die reaktive Proliferation von Gliazellen zu unterdrücken und ihre Auswirkungen auf Epileptogenese und Anfallsentstehung zu studieren.
5. Die Folgen der Astrozytose für das Gewebe sollen anhand von in vitro Epilepsiemodellen untersucht werden (extrazelluläre Registrierungen mit ionenselektiven Mikroelektroden, CSD, Intrazelluläre Ableitungen). Kann sich die epileptische Aktivität bei unterdrückter synaptischer Transmission bevorzugt über Gliazelle ausbreiten? Wenn ja, über welche gliale Rezeptoren lassen sich solche Prozesse modulieren? Sind Veränderungen in den Transporteigenschaften von Gliazellen für GABA und Glutamat an der Entstehung pharmakoresistenter Anfälle beteiligt.

3. Referenzen:

- DIETZEL, I., HEINEMANN, U., HOFMEIER G., LUX, H.D. Exp. Brain Res. 46:73-84, 1982.*
HEINEMANN, U., DIETZEL, I.J. Neurophysiol. 52:421-434, 1984.
KONNERTH, A., HEINEMANN, U., YAARI, Y. Nature 307: 69-71, 1984.
KONNERTH, A., HEINEMANN, U., YAARI, Y.J. Neurophysiol. 56:409-423, 1986.

- MODY, I., HEINEMANN, U.* Nature 326: 701-703. 1987.
- MODY, I., LAMBERT, J.D.C., HEINEMANN, U.J.* Neurophysiol. 57, 869-888, 1987.
- ALBRECHT, D., RAUSCHE, G., HEINEMANN, U.* Brain Res 480: 393-396, 1989.
- DIETZEL, I., LUX, H.D., HEINEMANN, U.* Glia 2:25-44, 1989
- EDER, C., FICKER, E., GÜNDEL, J., HEINEMANN, U.* Eur. J. Neuroscience 3:1271-1280, 1991.
- FICKER, E., HEINEMANN, U.J.* Physiol.(London) 445:431-455, 1992.
- HEINEMANN, U., EDER, C., ZHANG, C.L.* Hippocampus, in press.
- LESCHINGER, A., STABEL, J., IGELMUND, P., HEINEMANN, U.* Exp. Brain Res. 96: 230-240, 1993.
- NIXDORF, B., ALBRECHT, D., HEINEMANN, U.* Glia, submitted.
- GLIMM, H., FICKER, E., HEINEMANN, U.J.* Neurophysiol, submitted.
- CLUSSMANN, H., NITSCH, R., HEINEMANN, U.* Neuroscience submitted.

4. Kooperationen/Räumliche und personelle Voraussetzungen:

Bereits erprobte Kooperationen: Kettenmann, Nitsch, Grantyn.

Geplante Kooperationen: Paulus, Einhüpl, Dirnagl, Ganten.

Personelle Voraussetzungen: C4, 2 Assistenten, Zellkultur, Histologie, 3 elektrophysiologische Meßplätze, einer mit Imaging-Einrichtung.

5. Beantragte Mittel

Beantragte Stellen:	1 Bat IIa Stelle für C. Eder, 1 Bat IIa/2 Stelle (Doktorand)
Sachmittel:	DM 50.000.-- (pro Jahr)
Investitionen:	DM 90.000.--
und	(Inkubatoren, Manipulatoren, EPC 9 Verstärker Eppendorf Injektor)

4. ÄHNLICHE FORSCHUNGSAKTIVITÄTEN:

Die Auseinandersetzung mit der Funktion nicht-neuronaler Zellen bei neuronalen Mechanismen gewinnt zunehmend an Interesse. Entsprechend bilden sich nationale und internationale Schwerpunkte, in denen eine gezielte Kooperation möglich ist.

In Deutschland befinden sich solche Gruppierungen außer in Berlin in:

- München (Kreutzberg, Wekerle, Thoenen, Brandt).
- Düsseldorf (Hadding, Fischer, Stoll, Müller),
- Leipzig (Bigl, Reichenbach, Hanitsch, Reichelt, Brückner)
- Bonn (Wiestler, Willeke, Dermitzl)
- Tübingen (Hamprecht, Wollburg, Müller, Dichgans)

Außerhalb Deutschlands bilden sich Zentren um folgende renommierte Neurobiologen:

- Paris (Nicole Baumann mit einer ganzen CNRS-Gruppe)
- Yale (Ransom, Bell-Cornell, Waxman)
- Saskatchewan (Hertz, Fedoroff, Walz)
- Duke University (Somjen, Lewis)
- London (Raff, Gardner-Medwin, Attwell, Szatkowski)

In Frankreich hat sich mittlerweile sogar ein eigener Glia-Club gebildet, der regelmäßig große Veranstaltungen organisiert und im Frühjahr 1994 findet der erste europäische Gliazell-Kongreß in Heidelberg, von Herrn Kettenmann organisiert, statt.

Die genannten Gruppen konzentrieren sich auf die Analyse der Funktion von Gliazellen bei der Hirnreifung, immunologischen Prozessen, Vorgängen während degenerativer Vorgänge und metabolischen sowie homeostatischen Vorgängen. Eine so konzentrierte Auseinandersetzung mit pathogenen Mechanismen im ZNS wie in Berlin findet allerdings in den genannten Gruppen nicht statt.

5. BERÜHRUNGSPUNKTE MIT ANDEREN FORSCHUNGSVORHABEN

5.1 Förderung der bestehenden Programme:

In den geplanten Sonderforschungsbereich sollen eine ganze Reihe bereits geförderter Vorhaben aufgenommen werden. Dabei handelt es sich um die Projekte von Heinemann, Grantyn, Lippold u.a. Bei der großen Mehrzahl der Projekte handelt es sich um neue, bisher nicht von dritter Seite geförderte Projekte.

5.2.1 Schwerpunktprogramme:

Hier ist der Gliaschwerpunkt von Herrn Kettenmann zu nennen, der aber klinisch orientierte Projekte ausschließt und sich vor allem mit Grundfunktionen von Gliazellen auseinandersetzt, während bei uns auch Endothelzellen interessieren.

5.2.2 Sonderforschungsbereiche

Das vorgeschlagene Forschungskonzept grenzt sich klar von neu gegründeten und bestehenden Sonderforschungsbereichen ab. Auch gegenüber einigen älteren auslaufenden Sonderforschungsbereichen bestehen wesentliche Unterschiede. Diese Feststellung beruht auf der Auseinandersetzung mit folgenden SFBs.

SFB 194 Strukturveränderungen und Dysfunktion im Nervensystem, Düsseldorf

Der Düsseldorfer SFB, an dessen Gründung Herr Heinemann beteiligt war, hat sich zum Ziel gesetzt, den Zusammenhang zwischen strukturellen Läsionen im ZNS und dort bevorzugt im motorischen System und Funktionsveränderungen zu beschreiben. Er zielt auf ein Verständnis der adaptiven Prozesse, die zusammen mit Läsionen zu veränderten motorischen Symptomen führen. dabei interessieren Gliazellen insofern, als sie bei der Steuerung re- und degenerativer Prozesse im Nervensystem eine Rolle spielen. Dabei stehen Reaktionen von Mikrogliazellen im Vordergrund. Der SFB hat offensichtliche Berührungspunkte zum geplanten Berliner SFB, ist aber in seiner Stoßrichtung auf ein anderes Erkenntnisinteresse gerichtet. Es ist die erklärte Absicht des SFB's Störungen in motorischen System des Menschen zu verstehen und daraus abgeleitet, neue Therapiestrategien zu entwickeln. Dies Interesse ist primär neuronal. Herr Heinemann wird im Rahmen seines Projektes die bestehende und erfolgreiche Zusammenarbeit mit den Gruppen Witte, Fischer und Hadding fortsetzen.

SFB Molekulare Grundlagen neurologischer Erkrankungen , Bonn.

Der neu beantragte Bonner SFB versucht mit molekularbiologischen Methoden zu einer Reihe neurologischer Erkrankungen beizutragen. Dabei werden molekulare Aspekte der Rezeptoren Pharmakologie, der Entstehung von Hirntumoren und Mechanismen der Entstehung von Epilepsien

bearbeitet. In dem geplanten SFB befinden sich auch 4 Teilprojekte die sich mit den Eigenschaften nichtneuronaler Zellen auseinandersetzen. Teilweise sind mit diesen Gruppen bereits Kooperationen begonnen worden oder geplant. Dies betrifft einerseits Projekte von Herrn Heinemann in Berlin und Herrn Willeke in Bonn und andererseits Projekte von Herrn Kettenmann in Berlin und Herrn Wiestler in Bonn.

SFB 352 Molekularbiologie neuraler Mechanismen und Interaktionen. Heidelberg

Der Heidelberger SFB setzt sich sehr stark mit molekularen Mechanismen an Nervenzellen auseinander und dort insbesondere mit den Eigenschaften von Rezeptormolekülen und interzellulärer Interaktion. Nachdem Herr Kettenmann aus dem Heidelberger SFB ausscheidet, werden in diesem SFB Probleme nichtneuronale Zellen im Nervensystem nicht mehr bearbeitet.

SFB 220 Funktionsgerichtete Anpassung und Differenzierung neuronaler Systeme. München

Dieser SFB befindet sich wohl in der Auslaufförderung. Er richtet sein Hauptaugenmerk auf verschiedene Ebenen neuronaler Interaktion und beschäftigt sich nur im Projekt von Frau Grantyn mit Prozessen der Differenzierung von Glia- und Nervenzellen. Dieses Projekt wird in modifizierter Form in unseren SFB aufgenommen.

SFB 325 Modulation und Lernvorgänge in neuronalen Systemen.

Dieser auslaufende SFB beschäftigt sich in zwei Teilprojekten mit Eigenschaften von Glia- bzw. Mikrogliazellen. Keines dieser Projekte steht in unmittelbarer Beziehung zu den hier beantragten Projekten.

Unter den geplanten SFB's ist der Göttinger SFB Synaptische Interaktionen in neuronalen Netzwerken noch in der Antragsphase. Er schließt die Beschäftigung mit Glia- und Endothelzellen ausdrücklich in seinem Antragskonzept aus.

6. STELLUNG INNERHALB DER HOCHSCHULE

Der stark von der Charité, Medizinisch Fakultät der Humboldt Universität, getragene Antrag wird die Position der klinisch orientierten Neurowissenschaften an der Charité stark unterstützen. Es ist erklärtes Ziel der Charité und des Berliner Senats, an der Charité einen neurowissenschaftlichen Schwerpunkt anzusiedeln. Dies kommt auch in der beabsichtigten Gründung eines interdisziplinären Zentrums für neurologische Grundlagenforschung zum Ausdruck. Die Berufungsverfahren an der Charité sind noch nicht abgeschlossen und es steht noch die Berufung von zwei Neuroanatomen, einem Psychiater, einem Neuropathologen und einem Neuropharmakologen aus. Der geplante SFB zieht bereits jetzt Heisenberg-Stipendiaten wie Herrn Schmidt-Kastner an, der ebenfalls zu diesem SFB beitragen wird, aber wegen seines Auslandsaufenthaltes noch nicht an der Antragstellung beteiligt werden konnte. Herr

Veh, der voraussichtlich den Lehrstuhl für Neuroanatomie an der Charite übernehmen wird, wird sich ebenfalls mit ein oder zwei Projekten seiner Arbeitsgruppe am geplanten SFB beteiligen können.

Innerhalb der Berliner Forschungslandschaft hat aus finanziellen Gründen die Charité gegenwärtig um ihr Überleben zu kämpfen. Je eher es gelingt, zu zeigen, daß die Charite über ein hohes wissenschaftliches Potential verfügt, umso sicherer ist der weitere Ausbau der Charité.

Der SFB wird auch die Interaktion zwischen Charité, Max Dellbrück Zentrum und Freier Universität stärken können und so zur Überwindung von Gegensätzen beitragen.

6.1 Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses und der Lehre.

Der SFB wird beachtliches in der Nachwuchsförderung leisten, da 17 der 22 Antragsteller unter 40 Jahre alt sind und viele davon auch jünger als 35 Jahre alt sind. Im Bereich der Lehre wird die Anbindung von Gruppen aus dem Max Dellbrück Zentrum diesen erlauben, auch bezug zu klinischer Forschung zu halten und Unterrichtsaufgaben zu übernehmen. Darüber hinaus wird der SFB erhebliches zur Doktoranden-Ausbildung beitragen können.

Die im SFB angestellten wissenschaftlichen Mitarbeiter werden darüber hinaus am vorklinischen und klinischen Unterricht beteiligt werden. Die Themenstellung des SFB's fördert dabei die Interaktion zwischen klinischen und vorklinischem Unterricht, wie dies vom Wissenschaftsrat und anderen gewünscht wird.

6.2 Räumliche und personelle Grundausrüstung.

Die Arbeitsgruppen am Max Dellbrück Zentrum, der Freien Universität und im Institut für molekulare Pharmakologie sind räumlich gut untergebracht und verfügen über eine gute räumliche und apparative Ausstattung. Die personelle Situation ist sehr gut bis befriedigend.

An der Charité werden zur Zeit die ersten Labors für die Neurophysiologie hergerichtet und die Aussichten sind gut, daß bis zum Beginn des Projektes die räumlicher Ausstattung in der Anatomie, Neurologie und Physiologie befriedigend sein wird. Die personelle Situation in der Anatomie und Physiologie ist durch Überhangstellen und durch übernommene Mitarbeiter belastet. Im Bereich des Tierstalles werden zur Zeit große Anstrengungen unternommen, die Situation zu verbessern. Die apparativen Voraussetzungen sind gut.

7. STELLUNGNAHME DER UNIVERSITÄT

Der Dekan der Charité, Herr Prof. Mau und der Verwaltungsdirektor Herr Taegert haben ihre Unterstützung bei der Gründung des SFB's zugesagt. Herr Senatsdirigent Eckey hat ebenfalls seine Unterstützung angekündigt. Die Präsidentin der Humboldt Universität wird uns ebenfalls unterstützen, wie Vizepräsident Presper versicherte.

8. JÄHRLICH ERWARTETE MITTEL

8.1. Übersicht über beantragte Mittel (in TDM)

	Beantragte Stellen		Beantragte Investitionen	Beantragte Sach- und Reisemittel (pro Jahr)	Summe
A1 Dirnagl/Back	1 BAT IIa, 1 BAT VIb	73 + 42	50	45	210
A2 Villringer/Arnold	1 BAT IIa, 1 Stud. HK	73 + 15	75	15	178
A3 Heinemann/Grantyn	1 BAT IIa, 2 Stud. HK	73 + 30	70	30	203
A4 Einhäupl/Weber	1 BAT IIa, 1 Stud. Hk	73 + 15	50	50	188
A5 Blasig	1 BAT IIa , 1 BAT IIa/2	73 + 36	25	50	184
A6 Paul	1 BAT IIa/2, 1 BAT VIb	36 + 42	40	5	123
B1 Kettenmann	1 BAT IIa, 1 BAT VIb, 1 Stud. HK	73 + 42 +15		45	175
B2 Hanisch	1 BAT IIa/2	36	30	18	84
B3 Boegner/ Schumacher	1 BAT VIb	42	20	30	92
B4 Reszka/Walther	1 BAT IIa	73	30	45	148
B5 Grantyn	1 BAT IIa, 1 BAT VIb	73 + 42	60	60	235
C1 Lippoldt/Ganten	1 BAT IIa/2, 1 BAT VIb	36 + 42		50	128
C2 Nitsch	1 BAT IIa, 1 BAT VIb	73 + 42	90	40	245
C3 Heinemann/Ficker	1 BAT IIa, 1 BAT IIa/2	73 + 36	90	50	249
GESAMT im 1. Jahr					2442
alle weiteren Jahre					1909