

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel

**"Molekulare Charakterisierung der intrazerebralen Immunantwort
und des neuronalen Zelltodes unter verschiedenen Modalitäten der
Komplement-Inhibition im Schädel-Hirn-Trauma-Modell."**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades

Doctor rerum medicarum

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Iris Leinhase

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel

1. Korreferent: Prof. Dr. F.U. Schade

2. Korreferent: Prof. Dr. R. Heilbronn

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 07. Dezember 2007

meiner Tochter Lara Samira Leinhase

INHALTSVERZEICHNIS	1
PUBLIKATIONEN ZUR PROMOTION	2
ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONSPROMOTION	
ABSTRACT	3
ABKÜRZUNGEN	4
EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	5
METHODEN	6
ERGEBNISSE	9
DISKUSSION	12
LITERATUR	13
ANTEILSERKLÄRUNG	16
PUBLIKATION 1	17
Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and neurological outcome after traumatic brain injury. (<i>Exp Neurol.</i> , 2006)	
PUBLIKATION 2	28
Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation. (<i>BMC Neurosci.</i> , 2006)	
PUBLIKATION 3	40
Inhibition of the alternative complement activation pathway in traumatic brain injury by a monoclonal anti-factor B antibody: a randomized placebo-controlled study in mice. (<i>J Neuroinflammation</i> , 2007)	
EKLÄRUNG	52
DANKSAGUNG	53
LEBENS LAUF	54

PUBLIKATIONEN ZUR PROMOTION

- 1. Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and neurological outcome after traumatic brain injury.**

Leinhase I, Schmidt OI, Thurman JM, Hossini AM, Rozanski M, Taha ME, Scheffler A, John T, Smith WR, Holers VM, Stahel PF.

Exp Neurol. 2006 Jun, 199(2):454-64, Impact 3,767

- 2. Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation.**

Leinhase I, Holers VM, Thurman JM, Harhausen D, Schmidt OI, Pietzcker M, Taha ME, Rittirsch D, Huber-Lang M, Smith WR, Ward PA, Stahel PF.

BMC Neurosci. 2006 Jul 14; 7:55, Impact 2,73

- 3. Inhibition of the alternative complement activation pathway in traumatic brain injury by a monoclonal anti-factor B antibody: a randomized placebo-controlled study in mice.**

Leinhase I, Rozanski M, Harhausen D, Thurman JM, Schmidt OI, Hossini AM, Taha ME, Rittirsch D, Ward PA, Holers VM, Ertel W, Stahel PF.

J Neuroinflammation, 2007 May; 4:13, Impact 4,36

ABSTRACT

Das schwere Schädel-Hirn-Trauma (SHT) führt zur intrakraniellen Aktivierung des Komplementsystems und zum sekundären Zelltod (Apoptose). Die funktionelle Beziehung zwischen Komplement-Aktivierung und intrazerebraler Apoptose ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Die molekularbiologische Relevanz der unterschiedlichen Stufen der Komplementkaskade bei den Folgereaktionen auf ein SHT sollten in einem standardisierten Modell des geschlossenen SHT an der Maus durch gezielte Blockade des Komplementsystems auf verschiedenen Ebenen untersucht werden: (1) durch pharmakologische Blockierung aller C3-Konvertasen mittels des Komplement-Inhibitors *Crry-Ig* und durch selektive Inhibition des alternativen Komplement-Aktivierungsweges mittels (2) genetischer und (3) pharmakologischer Ausschaltung des Schlüsselproteins *Faktor-B*. Die Blockierung des Komplementweges auf C3-Level mittels *Crry-Ig* führte zur signifikanten Verbesserung des posttraumatischen neurologischen Verhaltens der Versuchstiere. Weiterhin konnte eine deutliche Protektion der neuronalen Kortex-Gliederung im verletzten Gehirn sowie eine intrazerebrale Hochregulation Komplementregulatorischer Gene (C1-Inh, CD55, und CD59) und des anti-apoptotischen Bcl-2 Gens nachgewiesen werden. Die genetische und pharmakologische Ausschaltung von *Faktor B* im alternativen Aktivierungsweg führten zur signifikanten Inhibition der Komplement-Aktivität, einhergehend mit einer Reduktion der systemischen C5a-Konzentration. Darüber hinaus zeigten *Faktor B* *-/-* und *anti-Faktor B* behandelte SHT-Tiere eine deutlich verminderte neuronale Apoptoserate. Die morphologisch sichtbare Neuroprotektion war zudem assoziiert mit einer verstärkten Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins und einer Suppression des proapoptotischen Fas-Rezeptors post Trauma. Die erhaltenen Erkenntnisse veranschaulichen die Bedeutung der Komplement-Aktivierung in der Vermittlung sekundärer Hirnschäden nach SHT. Die pharmakologische Inhibition der Komplement-Aktivierung in einer frühen Phase scheint ein viel versprechender Ansatz zur Reduktion der posttraumatischen sekundären Inflammation zu sein.

ABKÜRZUNGEN

anti-Faktor B	monoklonaler Maus anti-Faktor B Antikörper (AK1379)
Crry-IG	complement receptor type 1-related protein γ -Antikörper
DAPI	4',6'- d iamino-2- p henylindole
ELISA	e nzyme- l inked i mmunosorbent a ssay
GFAP	g lia f ilament a cidic P rotein
NeuN	N euron-specific N uclear Protein
Nil	unbehandelte Kontrolltiere
NSS	N eurological S everity S core
PBS	p hosphate b uffered s aline
real-time RT-PCR	real-time R everse T ranscriptase P olymerase C hain R eaction
SDS-PAGE	sodium d odecyl sulfate- p olyacrylamide G el E lektrophorese
Sham	schein-operierte Kontrolltiere
SHT	S chädel- H irn- T rauma
TUNEL	T erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End- L abeling

EINLEITUNG

Das schwere **Schädel-Hirn-Trauma (SHT)** ist die häufigste Todesursache junger Menschen (1). Die hohe Sterblichkeit der SHT-Patienten von 35 % bis 50 % beruht vorwiegend auf der Entstehung "*sekundärer Hirnschäden*" nach einem initialen "*primären Trauma*". Diese entstehen durch intrazerebrale Entzündungsprozesse und führen schlussendlich zu zerebraler Ischämie und zum neuronalen Zelltod (2). Bis heute sind die pathophysiologischen Zusammenhänge nur ungenügend geklärt.

Einen möglichen Ansatzpunkt für die Reduktion sekundärer Entzündungsprozesse bietet die Inhibition des Komplementsystems (1,3). Das **Komplementsystem** ist der zentrale Vermittler der angeborenen, unspezifischen Immunantwort und stellt die immunologische Erstantwort gegen Infektionen dar (4,5). Die Aktivierung erfolgt innerhalb weniger Sekunden über die Spaltung verschiedener Komplementfaktoren (4,6). Dem Komplementsystem wird ein entscheidender Einfluss auf die Pathogenese inflammatorischer Prozesse im Gehirn zugeordnet (5). Sowohl klinische, als auch experimentelle Studien haben gezeigt, dass die posttraumatische intrazerebrale Komplement-Aktivierung signifikant zum Ausmaß der sekundären Hirnschäden beiträgt (3,7-11). Als Komplement-vermittelte Effekte im verletzten Gehirn werden die Rekrutierung inflammatorischer Zellen aus der Peripherie, die Induktion der Blut-Hirn-Schranken-Störung über die Anaphylatoxine C3a und C5a, die Vermittlung des programmierten Zelltodes (Apoptose) von Neuronen und die Komplement-vermittelte Zellyse über den "membrane attack complex" (MAC) genannt (9,12-18). Insbesondere die Komplement-Proteine **C3** und **Faktor B** konnten in erhöhter Konzentration im Liquor von SHT-Patienten nachgewiesen werden (19,20). Beiträge aus der aktuellen Literatur verweisen zudem auf den hohen Stellenwert des alternativen Aktivierungsweges in anderen Krankheitsmodellen und im humanen System (21-23).

ZIELSETZUNG

In dieser Arbeit sollten die Mechanismen der intrazerebralen Immunantwort und des neuronalen Zelltodes in einem standardisierten experimentellen Modell des geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas (SHT) an der Maus unter Verwendung verschiedener Modalitäten der Komplement-Inhibition charakterisiert werden:

1. durch pharmakologische Inhibition aller Komplement-Aktivierungswege mittels *Crry-Ig*.
2. durch genetische Blockierung der alternativen Komplement-Aktivierungskaskade in *Faktor B-defizienten* Mäusen.
3. durch Inhibierung des alternativen Aktivierungsweges mittels systemischer *anti-Faktor B* Injektion nach SHT.

Die Experimente sollten, im Hinblick auf einen potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt, die Bedeutung des Komplementsystems und speziell des alternativen Komplement-Aktivierungsweges in Bezug auf die posttraumatischen Folgereaktionen genauer definieren.

METHODEN

Für alle Experimente wurde ein experimentelles Modell des geschlossenen fokalen Schädel-Hirn-Traumas an der Maus eingesetzt (24,25).

Tierstämme

Wildtyp (C57BL/6)

Charles River Laboratories, USA

Faktor B -/- und Faktor B +/- (Stamm:C57BL/6)

Dr. V.M. Holers, Colorado, USA

Um reproduzierbare, möglichst standardisierte Ergebnisse zu erhalten, wurden nur männliche Tiere mit einem Mindestgewicht von 25g und einem Alter von ca.12-30 Wochen eingesetzt.

Schädel-Hirn Trauma

Das Trauma wurde den narkotisierten Tieren mittels eines "weight drop" Apparates auf die freigelegte Schädelkalotte appliziert. Bei genügender Narkosetiefe erfolgten eine subkutane Lokalanästhesie, eine mediane Inzision der Kopfweichteile und die Applikation des SHT durch den freien Fall eines Stempels aus einer Höhe von 2-3 cm auf die linke Schädelseite. Bis zum Erwachen aus der Narkose wurden alle Versuchstiere unter 100% Sauerstoff-Beatmung stabilisiert. Kontroll-operierte "Sham"-Tiere erhielten analog zu den SHT-Tieren das Schmerzmittel und die mediane Inzision nach Narkoseeinleitung mit Isofluran® jedoch kein SHT. Zur Beurteilung der Basisparameter dienten unbehandelte Kontroll-Tiere ("Nil").

(*Exp Neurol.*, S.455-56; *BMC Neurosci.*, S.8; *J Neuroinflammation*, S.2)

Die systemische peritoneale Injektion der Komplement-Inhibitoren (**Crry-Ig** und **anti-Faktor B**) erfolgte eine Stunde nach Trauma, in Korrelation zu einer signifikanten Blut-Hirn-Schranken-Störung von 4 bis 24 Stunden nach Trauma. SHT-Tiere, die sieben Tage post Trauma getötet wurden, erhielten eine weitere Injektion der Inhibitoren nach 24 Stunden. Die Dosierung beider Substanzen betrug 1mg/kg Körpergewicht in 0,4ml physiologischer Trägerlösung (PBS) pro Maus und Zeitpunkt. Als Kontrolltiere dienten hier zusätzlich PBS-injizierte SHT-Tiere.

(*Exp Neurol.*, S.456; *J Neuroinflammation*, S.2,4)

Alle Tiere (Nil, Sham und SHT-Tiere) wurden 4 Stunden, 24 Stunden oder 7 Tage nach SHT durch eine Überdosierung des Narkosegases getötet, dekapitiert und Blut, Gehirn, Leber und Milz für weitere Analysen entnommen.

(*Exp Neurol.*, S.455; *BMC Neurosci.*, S.8; *J Neuroinflammation*, S.4)

Inhibitoren

Crry-Ig, mAB anti-Faktor B (AK1379)

Drs. V.M. Holers, J.M.Thurman, Colorado, USA

"Complement receptor type 1-related Protein y" (**Crry**) ist ein gut charakterisierter maus-spezifischer Komplement-Inhibitor, der funktionell den humanen Komplement-regulatorischen Proteinen CD55 (Decay accelerating factor; DAF) und CD46 (Membrane cofactor protein; MCP) ähnlich ist. **Crry** besitzt inhibitorische Eigenschaften für den klassischen und alternativen Komplement-Aktivierungsweg auf der Ebene der C3-Konvertasen (26,27). Für die pharmakologische Anwendung wurde ein rekombinantes chimerisches Fusionsprotein **Crry-Ig** hergestellt (28). Die Anwesenheit des IgG-Teils verlängert die Halbwertszeit der Substanz ($t_{1/2}$ = 40h) und macht es zu einem potenten Komplement-Inhibitor für *in vivo* Anwendungen (28-30).

Faktor B ist ein 93-kDa Glykoprotein, welches essentiell für die Aktivierung des alternativen Komplementweges ist. Zur Herstellung des spezifischen **anti-Faktor B**-Antikörpers (AK1379) wurde **Faktor B** *-/-* Mäusen ein Fusionsprotein, welches die zweite und dritte kurze Konsensus Wiederholungsdomäne (short consensus repeat; SCR) des murinen **Faktor B** beinhaltet, injiziert. Hybridomas wurden hergestellt aus Splenozyten der immobilisierten Maus (31). Das entstandene Protein ist gebunden an die Maus IgG1-Fc-Domäne. Die Blockierung des alternativen Komplement-Aktivierungsweges in **Faktor B defizienten** Tieren und durch diesen neutralisierenden **anti-Faktor B** Antikörper wurde bereits in anderen tierexperimentellen Modellen untersucht (31,32).

Neurological Severity Score (NSS)

Das neurologische Verhalten der Tiere nach experimentellem SHT wurde mittels eines standardisierten Parcours (NSS) erstmalig eine Stunde nach Applikation des Traumas erfasst und mit dem Verhalten unbeeinflusster Kontrolltiere (Nil) verglichen. Der NSS dient zur objektiven Beurteilung der Beeinträchtigung der Tiere nach SHT und beruht auf 10 essentiellen klinischen Parametern. Für das Nicht-Erfüllen eines getesteten Parameters wird ein Punkt erteilt, während 0 Punkte der Bewältigung einer jeweiligen Aufgabe zugeordnet werden. Nil-Tiere sind dabei in der Lage, alle Aufgaben zu erfüllen. Der maximal zu erreichende Score von 10 Punkten entspricht demnach einer schwerwiegenden posttraumatischen neurologischen Störung. Ein NSS > 8 galt bereits als Abbruchkriterium für das Experiment. Nach primärer Feststellung der initialen neurologischen Störung wurde der NSS 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach dem Trauma erneut aufgenommen. Anhand der NSS-Werte nach einer Stunde wurden die Tiere dem späteren Analysezeitpunkt zugeordnet.

(*Exp Neurol.*, S.456-57; *J Neuroinflammation*, S.4)

Zur Auswertung der Experimente wurde neben dem NSS die Auswirkung des Traumas auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht und das Ausmaß der posttraumatischen Veränderungen mittels Immunhistochemie, TUNEL-Assay, Western Blot-Analysen, ELISA, und real-time RT-PCR ermittelt.

Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie erfolgte zunächst die Beurteilung des Traumas in wichtigen einzelnen Hirnarealen (Cortex und Hippocampus) und auf die verschiedenen Zelltypen - Neuronen (anti-NeuN; anti neuronal nuclei AK), Astrozyten und Gliazellen (anti-GFAP; anti-glia filament acidic protein) und Entzündungszellen (anti-CD11b) - im verletzten Gehirn. Von den entnommenen "Schock"-gefrorenen und in TissueTec (Sakura) eingebetteten Gehirnen wurden horizontale 8µm Schnitte am Cryostat angefertigt und das Gewebe mit den spezifischen Zelltypen-Markern markiert. Die immunhistochemische Analyse der Schnitte wurde im Anschluss mittels des Vectastain ABC Elite Kit und Vectastain DAB Substrat Kit (Vector) durchgeführt. Zur Beurteilung der strukturellen und zellulären Gewebeschädigung nach SHT wurden die gefärbten Schnitte mikroskopisch untersucht und verglichen.

(*Exp Neurol.*, S.458; *BMC Neurosci.*, S.9; *J Neuroinflammation*, S.4)

TUNEL Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End-Labeling)

Der TUNEL Assay (In situ cell death detection kit, Fluorescein, Roche AG) dient dem Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen. Bei der Apoptose kommt es zum Abbau von genomischer DNA in der Zelle; es entstehen Doppelstrangbrüche die mittels des TUNEL Assays durch Markierung mit einem modifizierten Nukleotid sichtbar gemacht werden. Von SHT- und Kontrolltieren wurden Folgeschnitte der immunhistochemischen Färbung untersucht. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen; 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Emission bei 460nm) und TUNEL Fluoreszenz (Emission bei 520nm). Hierbei diente die DAPI-Färbung zur vergleichenden Darstellung der Zellkerne aller Zellen im Gewebe.

(*BMC Neurosci.*, S.9; *J Neuroinflammation*, S.4-5)

Western Blot

Western Blot-Analysen dienten der Bestätigung der Knockout-Tiere und zur Untersuchung der intrazerebralen Proteinregulation. Um die Deletion des gewünschten Proteins in den **Faktor B** *-/-* Mäusen zu bestätigen, wurden deren Seren analysiert. Die Hirne aller Tiere (SHT- und Kontrolltiere) wurden in einem speziellen Lysepuffer homogenisiert und die isolierten Proteine mittels BCA Protein Assay (Pierce/Perbio Science) im Lysat gemessen. Im Weiteren erfolgte die Analyse Apoptose-regulatorischer Proteine (Bcl-2, Bax und Fas) in den Hirnlysaten aller Versuchsgruppen im standardisierten SDS-Page Western Blot System. Zur Detektion der Proteine wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper in Verbindung mit einer Chemilumineszenz-Lösung (ECL-Lösung, Amersham) verwendet. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte auf β -Aktin, welches als "housekeeping" Protein fungierte.

(*Exp Neurol.*, S.457-58; *BMC Neurosci.*, S.9)

ELISA

Die Aktivität des alternativen Komplementweges (Zymosam-Assay) und die systemische C5a-Konzentration in den Seren aller Versuchstiere wurde von Kooperationspartnern in den USA bestimmt (28,31,33).

(*Exp Neurol.*, S.457; *BMC Neurosci.*, S8; *J Neuroinflammation*, S.4)

real-time RT-PCR

Die Untersuchung der intrazerebralen Expression regulatorischer Gene der Apoptose (Bcl-2, Bax, Fas und Fas-L) und des Komplementsystems (CD55, CD59 und C1-Inh.) und inflammatorischer Gene (IL1- β , IL6, IL18 und TNF- α) erfolgte mittels semi-quantitativer real-time RT-PCR. Hierbei wurden kommerzielle und selbst hergestellte Primer-Probe Systeme verwendet. Von den in Qiazol (Qiagen, Deutschland) homogenisierten Hirnhälften wurde mittels RNeasy® Mini-Kit (Qiagen) die total-RNA isoliert und deren Konzentration am Photometer gemessen. Die Qualität der RNA wurde am Bioanalyser (2100 Bioanalyser, Agilent Technologies, USA) verifiziert. Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mittels Omniscript RT Kit und QuantiTect Reverse Transkription Kit® (Qiagen). Die real-time RT-PCR Messungen wurden mittels optimierter Protokolle am Opticon® real-time PCR Cycler (MG Research, Bio-Rad) vorgenommen. Die Ergebnisse der PCR sind als Prozent GAPDH ("housekeeping gene") angegeben.

(*Exp Neurol.*, S.457; *J Neuroinflammation*, S.5)

ERGEBNISSE

Inhibition aller C3-Konvertasen des Komplementsystems mittels *Crry-Ig*

Im klinischen Verlauf (NSS) der Versuchstiere über 7 Tage (Abb. 2; *Exp Neurol*, S.459) zeigte sich deutlich, dass sowohl die Narkose, als auch die Schmerztherapie keinen Einfluss auf das physiologische Verhalten der "Sham"-operierten Tiere hatte. SHT-Tiere beider Injektionsgruppen entwickelten jedoch signifikante neurologische Störungen, gekennzeichnet durch einen mittleren NSS-Wert von 5,5 zum Zeitpunkt 1 Stunde post Trauma. Die intraperitoneale Injektion von 1mg/kg des rekombinanten Fusionsproteins *Crry-Ig* resultierte in einer deutlichen Verbesserung des neurologischen Verhaltens der SHT-Tiere (NSS von 5,5; 1h nach Trauma auf einen NSS von 1,7; 7d nach Trauma) im Vergleich zu der PBS-behandelten Kontrollgruppe (NSS von 5,5; 1h nach Trauma auf einen NSS von 2,5; 7d nach Trauma).

Weiterhin konnte durch die Injektion von *Crry-Ig* im Vergleich zur Placebo-injizierten Kontrollgruppe (Abb. 1; *Exp Neurol*, S.458) eine deutliche Inhibition der Komplement-Aktivität im Serum erzielt werden, gemessen mittels Zymosan-Assay, was beweist, dass es *in vivo* auch zu einer systemischen Komplement-Inhibition kommt.

Histologisch wurde im verletzten Gehirn der Kontrollgruppe (PBS-injizierte SHT-Tiere) von 4 Stunden bis eine Woche nach Trauma ein massiver Verlust der neuronalen Kortexgliederung (NeuN-Färbung) und eine erhöhte Astrogliose (GFAP-Immunhistochemie) im Vergleich zu den SHT-**Crry-Ig** und "Sham"-operierten Tieren nachgewiesen (Abb. 3; *Exp Neurol*, S.459). Der protektive Effekt der posttraumatischen **Crry-Ig**-Injektion zeigte sich besonders deutlich hinsichtlich der neuronalen Kortexgliederung und der Formation der hippocampalen Neuronen in der *cornu ammonis* CA3/4-Region zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Trauma.

Die Untersuchung der intrazerebralen Expression neuroprotektiver Gene in Hirnhomogenaten mittels real-time RT-PCR (Abb. 4; *Exp Neurol*, S.460) zeigte eine Hochregulation der Komplement-regulierenden Gene CD59 und CD55 in der **Crry-Ig**-behandelten Gruppe entgegen den entsprechenden Kontroll-Tieren (Nil, Sham und PBS-injizierte SHT-Tiere). Die Expression von CD55 war dabei signifikant zu allen Zeitpunkten erhöht, während CD59 eine Signifikanz nur 24 Stunden post Trauma zeigte. Der Komplement-Inhibitor des klassischen Aktivierungsweges C1-Inhibitor wies zudem eine erhöhte mRNA-Expression 4 Stunden nach SHT auf im Vergleich zur PBS-SHT-Gruppe auf; dieser Effekt zeigte sich jedoch 24 Stunden bis 7 Tage post Trauma nicht mehr.

Bezüglich der Regulation der intrazerebralen Apoptose, wiesen die Hirnhomogenate der **Crry-Ig** behandelten SHT-Tieren sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene eine deutliche Veränderung des Gleichgewichts der mitochondrialen anti- und pro-apoptotischen Faktoren bis zu 7 Tage nach Trauma im Vergleich zur Placebo-Gruppe auf (Abb. 5; *Exp Neurol*, S.460). Die **Crry-Ig**-Injektion führte dabei zu einer signifikanten Erhöhung der anti-apoptotischen Bcl-2 Genexpression zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Trauma (und tendenziell auch zu den weiteren Analysezeitpunkten) in Korrelation mit einer signifikanten Erhöhung der Bcl-2 Proteinexpression (Abb. 5; *Exp Neurol*, S.460). Die pro-apoptotischen Faktoren (Bax, Fas und Fas-L) blieben hingegen weitestgehend unreguliert (unpublizierte Daten).

Inhibition des alternativen Komplement-Aktivierungsweges in *Faktor B* ^{-/-} Mäusen und mittels anti-*Faktor B* Injektion

Faktor B defiziente Tiere und **anti-Faktor B**-injizierte Mäuse zeigten nach SHT keine erhöhte Mortalität im Vergleich zu den entsprechenden SHT-Kontrollgruppen. Das neurologische Verhalten der Tieren nach Trauma, ermittelt anhand des NSS, konnte jedoch durch die alleinige selektive Blockierung des alternativen Komplementweges auf Ebene von **Faktor B** nicht verbessert werden (nicht publizierte Daten und Abb. 4; *J Neuroinflammation*). Alle SHT-Tiere wiesen ferner einen signifikanten Gewichtsverlust von etwa 10% ihres Körperausgangsgewichtes (Refuktion um 2,5g bis 4g) mit einen Peak zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma auf (nicht publizierte Daten und Abb. 5; *J Neuroinflammation*).

Nach experimentellem SHT zeigten sowohl die **Faktor B defizienten** Tiere, als auch die **anti-Faktor B**-behandelten Tiere eine signifikant verringerte Komplement-Aktivität im Serum, verglichen mit den entsprechenden SHT-Kontrollgruppen (**Faktor B** +/- und PBS-injizierte SHT-Tiere), gemessen mittels quantitativem Zymosan-Assay (nicht publizierte Daten und Abb. 3; *J Neuroinflammation*). Dieser inhibitorische Effekt war durch die vollständige Deletion von **Faktor B** in den Knockout-Tieren über alle Analysenzeitpunkte existent. Dagegen war die Hemmung der Komplement-Aktivität in der **anti-Faktor B**-behandelten Gruppe trotz erneuter Injektion des Antikörpers (24h post Trauma) nicht während des gesamten Versuchsverlaufs nachweisbar. Die systemische Komplement-Aktivität stellte sich zum Zeitpunkt 7 Tage nach Trauma auf den gleichen Level ein wie in der SHT-Kontrollgruppe.

Ferner konnte im spezifischen ELISA eine signifikante Aktivierung der Komplement-Kaskade über eine systemische Freisetzung des Komplement-Anaphylatoxins C5a im Serum von Wildtyp- und Placebo-injizierten SHT-Tieren zu allen Zeitpunkten post Trauma gemessen werden (Abb. 2, *BMC Neurosci.* und Abb. 2; *J Neuroinflammation*). In Korrelation zu den Daten des Zymosan-Assays wiesen **Faktor B** -/- Tiere bis 7 Tage nach Trauma keine relevante systemische C5a-Expression im Serum auf. Die Proteinwerte für C5a waren sogar mit den Basiswerten der Kontrollgruppen (Nil) vergleichbar (Abb. 2, *BMC Neurosci.*). Gleichermäßen kam es durch die pharmakologische Inhibition mit **anti-Faktor B** zu einer signifikanten Reduktion des systemischen C5a-Serumlevels (Abb. 2; *J Neuroinflammation*); jedoch wurde der Effekt wiederum nur für die ersten 24 Stunden post Trauma verzeichnet und ließ sich durch eine erneute Injektion mit **anti-Faktor B** nicht verlängern.

Morphologische Gewebsanalysen mittels Immunhistochemie (NeuN-, GFAP und CD11b-Färbung) und TUNEL-Histochemie zeigten massive Veränderungen der neuronalen Kortex- und Hippocampus-Struktur in den verletzten Gehirnen der Kontrolltiere (**Faktor B** +/- und Placebo-behandelte SHT-Tiere) verglichen mit "Sham"-operierten Mäusen (Abb. 3+4, *BMC Neurosci.* und Abb. 6; *J Neuroinflammation*). Zudem wurde deutlich, dass es sich bei den apoptotischen Zellen in den verletzten Gehirnen vorwiegend um Neuronen handelte, während Astrozyten und inflammatorische Zellen kaum betroffen waren. Im Gegensatz dazu resultierte die Deletion von **Faktor B** in den **Faktor B-defizienten** und in den **anti-Faktor B** behandelten SHT-Tieren in einer deutlichen Protektion der neuronalen Gliederung und einer signifikant reduzierten Apoptoserate bis zu einer Woche nach Trauma.

Western-Blot-Analysen homogenisierter Gehirne ergaben eine tendenzielle Veränderung der Expression von anti- und pro-apoptotischen Proteinen nach SHT (Abb. 5, *BMC Neurosci.*). Hierbei konnte eine Hochregulation des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins mit einem Peak zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma und Reduktion der pro-apoptotischen Fas-Proteinexpression über alle Untersuchungszeitpunkte in den **Faktor B** -/- Tieren verzeichnet werden (Abb. 5, *BMC Neurosci.*).

Eine Proteinexpressionsregulation in Richtung Neuroprotektion konnte auf mRNA-Ebene durch pharmakologische Inhibition mittels *anti-Faktor B*-Injektion gezeigt werden (Abb. 7; *J Neuroinflammation*). Verglichen mit "Sham"-operierten und PBS-behandelten SHT-Tieren, wiesen die *anti-Faktor B*-injizierten Tiere post Trauma eine signifikant gesteigerte intrazerebrale Expression des Bcl-2 Gens und des komplement-regulierenden Gens C1-Inh. zu allen Untersuchungszeitpunkten auf. Auch die Suppression des Fas-Gens konnte tendenziell, wenn auch nicht signifikant nach *anti-Faktor B*-Injektion gemessen werden (Abb. 7; *J Neuroinflammation*).

DISKUSSION

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bieten einen Ausblick auf ein mögliches neues pharmakologisches Therapiekonzept für Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma, hinsichtlich der Entwicklung spezifischer Komplement-Inhibitoren. Das Therapieziel ist hierbei die Minderung der schwerwiegenden "**sekundären Hirnschäden**" bei SHT-Patienten. Darüber hinaus liefern die erhaltenen Erkenntnisse erste klare Hinweise auf die Relevanz des Komplementsystems und dessen einzelner Aktivierungswege im traumatisierten Gehirn.

Die pharmakologische Blockade der Komplement-Aktivierung auf dem Level von C3 mittels *Crry-IG* während der frühen Phase nach SHT scheint eine viel versprechende Strategie zur Vermeidung sekundärer Hirnschäden und einem verbesserten neurologischen Verhalten nach SHT darzustellen. Die pharmakologische Inhibition aller C3-Konvertasen des Komplementsystems mittels posttraumatischer systemischer Injektion des rekombinanten Fusionsmoleküls *Crry-Ig* führte zu einer signifikanten Verbesserung des neurologischen Outcomes der Tiere gemessen am Neurological Severity Score. Darüber hinaus resultierte die Behandlung mit *Crry-Ig* im Vergleich zu Kontrolltieren, in einer deutlichen Reduktion der neuronalen Destruktion der CA3/4 Regionen im Hippocampus und zu einer intrazerebralen Hochregulation Komplement-regulatorischer Gene (CD55, CD59 und C1-Inh.) sowie des anti-apoptischen Bcl-2 Gens. Ähnliche Erkenntnisse wurden bereits in einer Studie mit transgenen *GFAP-sCrry* Tieren, die *Crry* in Abhängigkeit der astrozytären Aktivierung nach experimentellem SHT exprimieren, gewonnen (10). Die Studie ergab ein signifikant verbessertes neurologisches Verhalten und eine deutliche Verbesserung der Blut-Hirn-Schranken-Funktion in den transgenen Tieren nach SHT. In Korrespondenz mit den neuroprotektiven Effekten von *Crry-IG* im hier angewandten murinen SHT-Modell, zeigte die Administration von *Crry-IG* auch in anderen Modellen, wie Lupus, Inflammation der Atemwege und Arthrose, erste wirkungsvolle therapeutische Eigenschaften (29,30,34-36).

Die Ausschaltung des alternativen Komplement-Aktivierungswegs in *Faktor B defizienten* Tieren und mittels des neutralisierenden monoklonalen *anti-Faktor B*-Antikörpers zeigte ähnliche Erfolge. Obwohl das physiologische Verhalten der Tiere nach Trauma nicht sichtlich

verbessert werden konnte, wurde jedoch eine signifikante Reduktion der systemischen Komplement-Aktivierung und der Expression des Komplement-Anaphylatoxins C5a nach SHT erzielt. Protein- und Genexpressionsanalysen der Hirne von **Faktor B** *-/-* und **anti-Faktor B**-behandelten SHT-Tieren resultierten in einer posttraumatischen Hochregulation neuroprotektiver Faktoren (Bcl-2, C1-Inh.) und einer Reduktion des pro-apoptotischen Mediators Fas. Histologisch bestätigte sich zudem die Verringerung des neuronalen Zelltodes und der Erhalt neuronaler Strukturen im verletzten Gehirn im ähnlichen Ausmaß, wie durch Inhibition der C3-Konvertasen mit **Crry-Ig**. Diese Ergebnisse suggerieren, dass der alternative Komplement-Aktivierungsweg entscheidend zum Ausmaß der Neuropathologie nach SHT beiträgt. Die Relevanz des alternativen Komplementweges bei der Aktivierung der Komplementkaskade bis zur Entstehung des "membrane attack complexes" wurde bereits in experimentellen Modellen der rheumatoiden Arthritis, Ischemie/Reperfusion und bei Autoimmunerkrankungen außerhalb des Gehirns vermutet und beschrieben (21,31,32).

Zusammenfassend scheint die Hemmung der Komplement-Kaskade ein viel versprechendes neues Konzept zur Reduktion der Neuroinflammation und der sekundären Hirnschäden nach SHT darzustellen. Die therapeutische Komplement-Inhibition im günstigen Zeitfenster von 1h bis 24h nach Trauma stellt ferner ein klinisch relevantes Modell dar.

LITERATUR

1. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, et al: Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev* 48(2):388-399, 2005.
2. Gaetz M: The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol* 115(1):4-18, 2004.
3. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T: The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev* 27(3):243-256, 1998.
4. Morgan BP, Marchbank KJ, Longhi MP, et al: Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol Lett* 97(2):171-179, 2005.
5. Stahel PF, Barnum, S.R.: The role of the complement system in CNS inflammatory diseases. *Expert Rev Clin. Immunol.* 2(3):445-456, 2006.
6. Ember JA, Hugli TE: Complement factors and their receptors. *Immunopharmacology* 38(1-2):3-15, 1997.
7. Bellander BM, von Holst H, Fredman P, et al: Activation of the complement cascade and increase of clusterin in the brain following a cortical contusion in the adult rat. *J Neurosurg* 85(3):468-475, 1996.
8. Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, et al: Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J Neurotrauma* 18(12):1295-1311, 2001.
9. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Perez D, et al: Intrathecal levels of complement-derived soluble membrane attack complex (sC5b-9) correlate with blood-brain barrier dysfunction in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 18(8):773-781, 2001.
10. Rancan M, Morganti-Kossmann MC, Barnum SR, et al: Central nervous system-targeted complement inhibition mediates neuroprotection after closed head injury in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(9):1070-1084, 2003.

11. Raghupathi R: Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 14(2):215-222, 2004.
12. Farkas I, Baranyi L, Takahashi M, et al: A neuronal C5a receptor and an associated apoptotic signal transduction pathway. *J Physiol* 507 (Pt 3):679-687, 1998.
13. Lindsberg PJ, Ohman J, Lehto T, et al: Complement activation in the central nervous system following blood-brain barrier damage in man. *Ann Neurol* 40(4):587-596, 1996.
14. Lynch NJ, Willis CL, Nolan CC, et al: Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. *Mol Immunol* 40(10):709-716, 2004.
15. Nataf S, Stahel PF, Davoust N, et al: Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci* 22(9):397-402, 1999.
16. Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK: Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 17(10):927-938, 2000.
17. van Beek J, Elward K, Gasque P: Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 992:56-71, 2003.
18. Stahel PF, Kariya K, Shohami E, et al: Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-alpha following closed head injury in mice. *J Neuroimmunol* 109(2):164-172, 2000.
19. Stahel PF, Nadal D, Pfister HW, et al: Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet* 349(9069):1886-1907, 1997.
20. Kossmann T, Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, et al: Elevated levels of the complement components C3 and factor B in ventricular cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* 73(1-2):63-79, 1997.
21. Thurman JM, Ljubanovic D, Edelstein CL, et al: Lack of a functional alternative complement pathway ameliorates ischemic acute renal failure in mice. *J Immunol* 170(3):1517-1523, 2003.
22. Thurman JM, Holers VM: The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol* 176(3):1305-1310, 2006.
23. Holers VM, Thurman JM: The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting. *Mol Immunol* 41(2-3):147-152, 2004.
24. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, et al: An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma* 13(10):557-568, 1996.
25. Stahel PF, Shohami E, Younis FM, et al: Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(2):369-380, 2000.
26. Foley S, Li B, Dehoff M, et al: Mouse Crry/p65 is a regulator of the alternative pathway of complement activation. *Eur J Immunol* 23(6):1381-1394, 1993.
27. Molina H: The murine complement regulator Crry: new insights into the immunobiology of complement regulation. *Cell Mol Life Sci* 59(2):220-229, 2002.
28. Quigg RJ, Kozono Y, Berthiaume D, et al: Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with Crry-Ig, a soluble murine complement inhibitor. *J Immunol* 160(9):4553-4560, 1998.
29. Rehrig S, Fleming SD, Anderson J, et al: Complement inhibitor, complement receptor 1-related gene/protein γ -Ig attenuates intestinal damage after the onset of mesenteric ischemia/reperfusion injury in mice. *J Immunol* 167(10):5921-5937, 2001.

30. Alexander JJ, Bao L, Jacob A, et al: Administration of the soluble complement inhibitor, Crry-Ig, reduces inflammation and aquaporin 4 expression in lupus cerebritis. *Biochim Biophys Acta* 1639(3):169-176, 2003.
31. Thurman JM, Kraus DM, Girardi G, et al: A novel inhibitor of the alternative complement pathway prevents antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss in mice. *Mol Immunol* 42(1):87-97, 2005.
32. Thurman JM, Royer PA, Ljubanovic D, et al: Treatment with an inhibitory monoclonal antibody to mouse factor B protects mice from induction of apoptosis and renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 17(3):707-715, 2006.
33. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, et al: Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12(6):682-697, 2006.
34. Taube C, Rha YH, Takeda K, et al: Inhibition of complement activation decreases airway inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 168(11):1333-1341, 2003.
35. Banda NK, Kraus D, Vondracek A, et al: Mechanisms of effects of complement inhibition in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 46(11):3065-3075, 2002.
36. Bao L, Haas M, Kraus DM, et al: Administration of a soluble recombinant complement C3 inhibitor protects against renal disease in MRL/lpr mice. *J Am Soc Nephrol* 14(3):670-679, 2003.

ANTEILSERKLÄRUNG

Frau Dipl.-Ing. Iris Leinhase ist als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Charité, Campus Benjamin Franklin mit der Leitung des Labors für Experimentelle Neurotraumatologie betraut.

Nach Zuordnung des Forschungsprojekts durch den Doktorvater und Seniorautor (Prof. Dr. med. W. Ertel und PD Dr. med. P.F. Stahel) trug die Doktorandin die zentrale Verantwortung innerhalb der Projekte. Die einzelnen Projektabschnitte wurden von ihr eigenständig geplant, koordiniert und durchgeführt. Dazu gehörten die Planung, Vorbereitung und persönliche Durchführung aller Tierexperimente und deren Dokumentation, incl. der Erhebung der neurologischen Scores. Zudem etablierte die Doktorandin die wesentlichen verwendeten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden (Immunhistochemie, TUNEL Assay und real-time RT-PCR) und nahm deren Anpassung an das Tier-Modell vor.

Die Doktorandin hat die Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse aller drei Publikationen selbstständig ausgewertet und für die Publikationen zusammengestellt. Zudem war die Doktorandin bei der statistischen Umsetzung der Fragestellungen behilflich.

Die drei Publikation wurde gemäß der vorgegebenen Aufgabenstellung durch die Doktorandin in wesentlichen Zügen im Dialog mit dem Seniorautor besprochen und verfasst. In analoger Weise konnte das Reviewverfahren der ersten beiden Publikationen erfolgreich absolviert werden. Die dritte Publikation bedurfte keines Reviewverfahrens.

Die Ergebnisse aus diesem Dissertationsthema wurden in drei international renommierten Fachjournalen publiziert. Der für eine Publikationspromotion erforderliche Eigenanteil wurde durch die Doktorandin im weit überdurchschnittlichen Maß erbracht wurde. Somit kann der Antrag auf Erteilung der Promotion uneingeschränkt unterstützt werden.

Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel
(Doktorvater)

Dipl.-Ing. Iris Leinhase
(Doktorandin)

Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and neurological outcome after traumatic brain injury.

Leinhase I, Schmidt OI, Thurman JM, Hossini AM, Rozanski M, Taha ME, Scheffler A, John T, Smith WR, Holers VM, Stahel PF.

Exp Neurol. 2006 Jun, 199(2):454-64

Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation.

Leinhase I, Holers VM, Thurman JM, Harhausen D, Schmidt OI, Pietzcker M, Taha ME, Rittirsch D, Huber-Lang M, Smith WR, Ward PA, Stahel PF.

BMC Neurosci. 2006 Jul 14; 7:55

Inhibition of the alternative complement activation pathway in traumatic brain injury by a monoclonal anti-factor B antibody: a randomized placebo-controlled study in mice.

Leinhase I, Rozanski M, Harhausen D, Thurman JM, Schmidt OI, Hossini AM, Taha ME, Rittirsch D, Ward PA, Holers VM, Ertel W, Stahel PF.

J Neuroinflammation, 2007 May; 4:13

ERKLÄRUNG

Ich, Iris Leinhase, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

"Molekulare Charakterisierung der intrazerebralen Immunantwort und des neuronalen Zelltodes unter verschiedenen Modalitäten der Komplement-Inhibition im Schädel-Hirn-Trauma-Modell."

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

An erster Stelle sei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel, herzlichst gedankt für die Möglichkeit in seiner Klinik meine Dissertation anzufertigen und für die Betreuung der thematischen Fragestellung.

Besonders sei weiterhin Herrn PD Dr. med. Philip Stahel vom Dept of Orthopaedic Surgery; Denver Health Medical Center in Denver gedankt. Er gab mir die einmalige Möglichkeit dieses interessante Arbeitsgebiet kennen zu lernen und vertraute mir die Leitung des Labors an. Ebenso danke ich ihm für die kritische Diskussion der Ergebnisse und seine aktive Unterstützung beim Verfassen der Publikationen.

Ein großes Dankeschön, insbesondere für seine Geduld und Unterstützung beim Einlernen in die Tierexperimente, geht an Dr. med. Oliver Schmidt, aber auch für die zahlreichen angenehmen Stunden auf den gemeinsamen Kongressen.

Vielen Dank auch an Drs. Michael Holers und Joshua Thurman vom Department of Medicine and Immunology, University of Colorado Health Sciences Center in Denver für die Bereitstellung der Antikörper und der Knockout-Tiere.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich hier nicht versäumen, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre zu danken. Besonderer Erwähnung gebührt meiner Kollegin Frau Claudia Conrad, nicht nur für die exzellente technische Mitarbeit in den Projekten, sondern auch dass sie mich stets moralisch unterstützt und motiviert hat. Auch allen Studenten: Denise Harhausen, Michal Rozanski, Malte Pietzcker und Mohy E. Taha, die während dieser Zeit im Labor tätig waren und an diesem großen Projekt mitgewirkt haben, möchte ich hier danken.

Mein größter Dank gebührt aber meiner Mutter, Frau Ingrid Frank, ohne deren unermüdliche Unterstützung ich nie die Möglichkeit gehabt hätte, so viel Zeit in die wissenschaftliche Arbeit zu investieren.

Meinem Freund Paul Kyle verdanke ich, dass er mich in dieser Zeit stets liebevoll daran erinnert hat, dass die Forschung nur eine von vielen Möglichkeiten ist, sich die Welt zu erschließen.

Nicht zuletzt möchte ich meine Tochter Lara Samira erwähnen. Meine Liebe zu ihr war die stärkste Motivation. Sie musste wohl die meiste Toleranz aufbringen, wenn diese Arbeit mich wieder einmal von ihr fernhielt. Du bist großartig!

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

CURRICULUM VITAE

"Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen
Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht."