

**Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im  
Zentralen Nervensystem**

**HABILITATIONSSCHRIFT**

**ZUR ERLANGUNG DER LEHRBEFÄHIGUNG  
FÜR DAS FACH**

**ANATOMIE UND ZELLBIOLOGIE**

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin  
der Humboldt-Universität zu Berlin**

**von**

**Dr. med. Nicolai E. Savaskan  
aus Berlin**

Präsident: Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

eingereicht am: 23. November 2005

Datum der Habilitation: 18. Dezember 2006

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. Klaus Unsicker, Universität Heidelberg
2. Prof. Dr. med. Michael Frotscher, Universität Freiburg i.Br.

## INHALTSVERZEICHNIS

### 1. EINLEITUNG

<b>1.1 Neuroprotektion und axonale Regeneration im ZNS</b>	<b>6</b>
1.1.1. Historische Aspekte	6
1.1.2. Modellsysteme zur Untersuchung der Neuroregeneration	8
1.1.3. Anatomie der Schädigung	9
<b>1.2 Molekulare Mechanismen der zellulären Neuroprotektion im ZNS</b>	<b>13</b>
1.2.1 Zellschaden und Apoptose	13
1.2.2 Mechanismen der Neuroprotektion	14
1.2.3 Die Rolle von Selen bei neurologischen Erkrankungen	17
1.2.4 Die Rolle von Selen in der Tumorthherapie	18
<b>1.3 Molekulare Mechanismen axonaler Regeneration</b>	<b>20</b>
1.3.1 Molekulare Mechanismen axonaler Wegfindung	20
1.3.2 Inhibitoren axonalen Wachstums im adulten ZNS	22
<b>1.4 Strategien zur Identifizierung von Plasticity Related Genes</b>	<b>24</b>

### 2. ERGEBNISSE

<b>2.1 Selen und Selenoproteine im ZNS</b>	<b>27</b>
2.1.1 Die Verteilung von Selenoproteinen im ZNS	27
Bräuer & Savaskan, <i>Rev. Neurosci</i> , 15, 19 – 32, 2004 (Anlage I)	
Schweizer et al., <i>J. Nutriion</i> , 134, 707 – 710, 2004	
Schweizer et al., <i>Brain Res. Brain Res.Rev</i> , 45, 164 – 178, 2004 (Anlage II)	
2.1.2 Die Rolle von Selen bei exzitatorischen Zellschaden	29
Savaskan et al., <i>FASEB J</i> , 17, 112 – 114, 2003 (Anlage III)	
2.1.3 Die Rolle von Selen bei der Invasion von Gliomen	33
Savaskan et al., <i>under consideration</i> , 2005 (Anlage IV)	

<b>2.2 Myelin als Inhibitor axonalen Auswachsens</b>	<b>38</b>
2.2.1 Verteilung von Myelin im Hippocampus	38
Meier et al., <i>Cell Mol Life Sci</i> , 61, 1082 – 1094, 2004 (Anlage V)	
2.2.2 Die Rolle von Myelin beim axonalen Wachstum	41
Savaskan et al., <i>Eur J Neurosci</i> , 11, 316 – 326, 1999	
Meier et al., <i>FASEB J</i> , 17, 1153 – 1155, 2003 (Anlage VI)	
<b>2.3 Die Rolle der Plasticity Related Gens im ZNS</b>	<b>44</b>
2.3.1 Identifizierung der Plasticity Related Gens	44
Savaskan et al., <i>Eur J Neurosci</i> , 12, 1024 – 1032, 2000	
Bräuer & Savaskan et al., <i>Nature Neurosci</i> , 6, 572 – 578, 2003 (Anlage VII)	
2.3.2 Die Familie der Plasticity related Gens und axonales Auswachsen	49
Savaskan et al., <i>Eur J Neurosci</i> , 19, 212 – 220, 2004 (Anlage VIII)	
Savaskan et al., <i>Eur J Neurosci</i> , in revision, 2005 (Anlage IX)	
<b>3. DISKUSSION UND AUSBLICK</b>	<b>54</b>
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>6. DANKSAGUNG</b>	<b>71</b>
<b>7. ANHANG</b>	
7.1 Lebenslauf	73
7.2 Publikationsverzeichnis	74
7.3 Stipendien und Preise	79
7.4 Lehre	79
7.5 Drittmittel	80
7.6 Patente und klonierte Gene	80

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

7.7	Wissenschaftlicher Werdegang	81
7.8	Eidesstattliche Erklärung	82
8.	<b>AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN</b>	83

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Neuroprotektion und axonale Regeneration im ZNS**

#### **1.1.1. Historische Aspekte**

Das menschliche Nervensystem ist eine ausserordentlich komplexe Struktur, und gerade die Dinge, die wir im Leben am meisten schätzen wie das Wahrnehmen und Interagieren mit der Umwelt sowie unsere Kognition hängen ultimativ von der korrekten Verschaltung von Nervenzellen ab. Neurone leiten Information über ihre Axone, die mit den Zielregionen in Kontakt stehen. Das Nervensystem kann in zwei unterschiedliche Komponenten eingeteilt werden, das Zentrale Nervensystem (ZNS) mit dem Gehirn und dem Rückenmark sowie das Periphere Nervensystem (PNS), das aus peripheren Nerven besteht und die Verbindung vom ZNS zum Körper herstellt. Ein entscheidender Unterschied des ZNS zum PNS besteht in der Kapazität zur Regeneration nach Schädigung. Im Unterschied zum PNS, bei dem Axone nach einer akuten Schädigung/Axotomie oft wieder ausheilen und zu ihren ursprünglichen Zielgebiet auswachsen und terminieren, kommt es im Gehirn und Rückenmark zu einem Verlust von axonalen Verbindungen und damit von neuronalen Schaltkreisen (Koeberle & Bähr, 2005; Meinecke & Exner, 1997). Dies führt in der Konsequenz, je nach Lokalisation, zum Verlust von motorischen, sensiblen oder kognitiven Funktionen. Eine akute Schädigung kann initial zu neuronalem Zelltod führen, obgleich viele Neurone über Monate bis Jahre nach Schädigungen überleben, besonders dann, wenn sich die Lokalisation der Axotomie weiter entfernt vom Zellkörper befindet.

Das Zentrale Nervensystem des Menschen enthält etwa  $10^{12}$  Neurone, die mit ca.  $10^{15}$  Synapsen in Kontakt stehen (Kandel et al., 1991). Die Komplexität des ZNS liegt also nicht allein in der grossen Anzahl an Neuronen, sondern vielmehr in den funktionellen, hochspezifischen Verbindungen zueinander. Mit den epochalen Untersuchungen von Ramon y Cajal (1911, 1929) zur Entwicklung des ZNS wurde erstmals gezeigt, dass die axonale Konnektivität im ZNS einer hochspezifisch räumlich-zeitlichen Ordnung unterliegt. Seitdem wurde die Entwicklung des Nervensystems mit dem Ziel studiert, die zugrundeliegenden Mechanismen und Moleküle des axonalen Wachstums und der Verschaltung zu identifizieren. Nach Abschluss des Entwicklungsprozesses sind Neurone hochspezialisiert und nicht mehr

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

teilungsfähig. So entstand auch die Vorstellung bis Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts, dass das ZNS als ein fest verdrahtetes Netzwerk mit stabilisierten Axonen in seiner Anatomie nicht weiter verändert werden kann. Diese Sicht änderte sich mit den Untersuchungen von Geoffrey Raisman 1969 im Septum und Carl Cotman 1973 im Hippocampus (Cotman et al., 1973; 1977; Nadler et al., 1977), in denen die strukturelle Plastizität im adulten ZNS erstmals nachgewiesen und ein valides Modellsystem etabliert wurde. Seit diesen konzeptverändernden Arbeiten haben sich Wissenschaftler mit den zugrundeliegenden Mechanismen des axonalen Wachstums und Verschaltens während der Entwicklung befasst und seit Mitte 1990 wurden die ersten Liganden und deren Rezeptoren identifiziert, die axonales Wachstum zielgerichtet fördern und steuern (Kennedy et al., 1994; Keino-Masu et al., 1996; Muller, 1999). Mit der Entdeckung der molekularen Determinanten des axonalen Wachstums wurde evident, dass viele entwicklungsabhängig exprimierte Axonlenkungsmoleküle auch nach einer Schädigung im adulten ZNS vorliegen und damit prinzipiell eine axonale Regeneration im Sinne einer Restitutio ad integrum möglich ist (Aubert et al., 1995). Weiterhin haben komparative Studien eine phylogenetische Komponente in der Regenerationskapazität nachweisen können. So zeigt das ZNS von höheren Wirbeltieren keine oder nur eine schwache Regeneration, während viele phylogenetisch niedrigere Vertebraten wie Salamander und Molche nach einer Schädigung komplett regenerieren (Ferretti et al., 2003). Grund zum Optimismus geben jedoch die Befunde von Studien in jungen Säugetiergehirnen. So können Säugetiere in der postnatalen Phase Schädigungen kompensieren und vollständig funktionell regenerieren (Savio & Schwab, 1989; Raineteau & Schwab, 2001; Ferretti et al., 2003). Diese Daten deuten also darauf hin, dass die unterschiedliche Regenerationskapazität im ZNS von Vertebraten ein Resultat der jüngsten evolutionären Entwicklung ist, die entweder aufgrund der unterschiedlichen Expression von konservierten Genen oder durch die Präsenz von spezifischen Proteinen in Vertebraten zu erklären ist.

Die in dieser Schrift zusammengefassten Arbeiten sollten durch die Entdeckung einer neuen Molekülklasse, der PRGs, sowie der Rolle des Spurenelements Selen zu einem erweiterten molekularen und funktionellen Verständnis der Neuroprotektion und Regeneration im adulten ZNS beitragen. Es ist zu hoffen, dass die vorliegenden und daraus folgenden Untersuchungen einen Beitrag

zu neuen Ansätzen in der Intervention und Therapie von traumatischen Hirn- und Rückenmarksschädigungen leisten.

### **1.1.2. Modellsysteme zur Untersuchung der Neuroregeneration**

Mit den Arbeiten von Raisman (1969) und Cotman et al. (1973) wurde der Prozess des Aussprossens im adulten ZNS als Beispiel für die strukturelle Plastizität und Regenerationsfähigkeit nach einer Schädigung angesehen (Lynch et al., 1973; Parnavelas et al., 1974). Obgleich wissenschaftskonzeptionell nicht neu, wurde der Ansatz der stereotaktisch geführten mechanischen Schädigung weiterentwickelt und auf anatomisch gut untersuchbare Hirnstrukturen angewandt. So hat sich der Hippocampus als ein weitverbreitetes Modell zum Studium der Regeneration im ZNS etabliert (Frotscher et al., 1995, 1997; Kelley & Steward, 1997; Savaskan & Nitsch, 2001). Da in der vorliegenden Arbeit viele Studien mit diesem Modellsystem durchgeführt wurden, wird im Folgenden näher auf die Anatomie eingegangen.

Der Hippocampus ist die zentrale Schaltzentrale des limbischen Systems und erhält isocortikale Informationen über den entorhinalen Cortex. Die Hippocampusformation umfasst sechs cytoarchitektonisch distinkte Regionen: Entorhinaler Cortex, Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum, Gyrus dentatus und den Hippocampus selbst. Durch Schädigung des entorhinalen Cortex, wie sie in frühen Stadien der Alzheimer'schen Erkrankung oder der Temporallappenepilepsie vorkommt (Hyman et al., 1984; Braak & Braak, 1990; Van Hoesen et al., 1991; Du et al., 1995), kommt es zum Untergang von Axonen im Gyrus dentatus und der CA Regionen und damit zum Verlust von Synapsen in diesen Regionen. Da die Anatomie der Schädigung vergleichbar ist zu anderen Schädigungsmodellen im ZNS, wird darauf unter 1.1.3 gesondert eingegangen. Weiterhin hat sich die Analyse der retinotectalen Projektion als verifizierbares Axotomiemodell etabliert (Bähr, 2000). Hierbei wird der Nervus opticus stereotaktisch durchtrennt oder gequetscht und sowohl die direkt geschädigte Region als auch die denervierte Region im Tectum analysiert. Mit der Weiterentwicklung und Verfeinerung des Spinal Cord Injury (SCI) Modell hat die Gruppe von Martin Schwab ein klinisch hochrelevantes Tiermodell etabliert, bei dem der Tractus corticospinalis auf Höhe von T8 durchtrennt oder gequetscht wird (Schnell & Schwab, 1990; Schwab et al., 1993). Basierend auf den Erkenntnissen



dieses Tiermodells wurden nun erste klinische Studien an Primaten durchgeführt (Novartis, FIDIA, Proneuron u.a.). Ein weiteres Modell zur Untersuchung der Regeneration im ZNS ist die Induktion von epileptischen Anfällen durch chemische Substanzen. So hat sich die intraperitoneale Applikation von Kainatsäure oder Pilocarpin in Mäusen als relevantes und gut reproduzierbares Modell herausgestellt. Bei der Substanz Kainatsäure handelt es sich um einen bluthirnschrankengängigen Agonisten von Glutamatrezeptoren, der innerhalb kürzester Zeit zur ungehemmten Entladung von Neuronen führt. Dies sowie die intraperitoneale Applikation von Pentylentretazol, ein GABA Rezeptor Antagonist, führen zu neuronaler Aktivierung mit nachfolgenden strukturellen Umbauvorgängen. Die Anatomie der Schädigungen ist allen hier vorgestellten Schädigungsmodellen gemein und wird im Folgenden unter 1.1.3 näher behandelt.

### **1.1.3 Anatomie der Schädigung**

Axone des ZNS sind normalerweise umhüllt von isolierenden Lipidschichten, dem sogenannten Myelin, das von Oligodendrozyten während der postnatalen Entwicklung gebildet wird. Mit einer akuten Schädigung im ZNS kommt es zu einer komplexen zellulären Reaktion im

- I. Epizentrum der Schädigung
- II. In den Ursprungsregionen der axotomierten Neurone
- III. In den anterograden Axonstümpfen, die Kontakt zu ihren Zellkörpern verloren haben
- IV. In den axotomierten Zielstrukturen, die ihren synaptischen Input verloren haben.

Diese zellulären Reaktionen laufen zeitlich geordnet in einer Weise, die wie folgt zusammengefasst werden kann (**Abb. 1**):

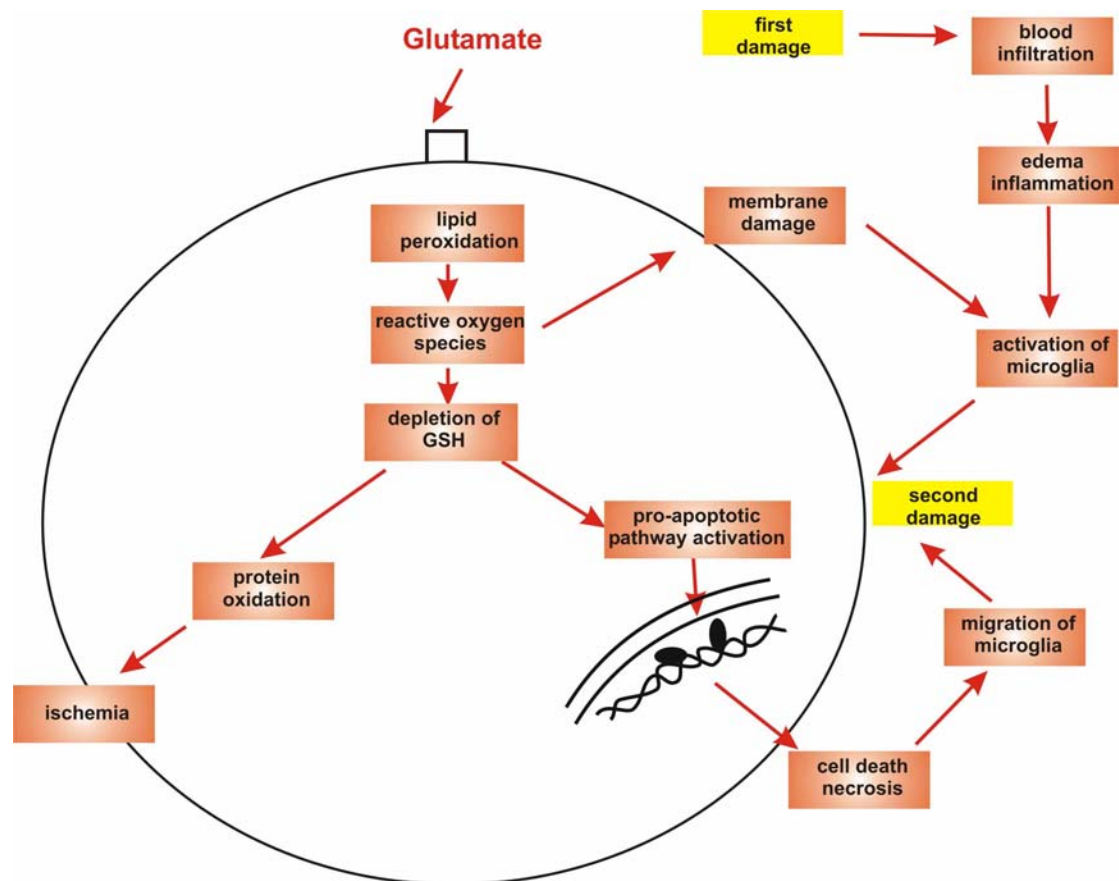
- I. Die hochakute Reaktion in den ersten 12 Stunden des Insults (Phillips & Belardo, 1994).
- II. Die frühe Schadensreaktion mit Beginn des neuronalen Zelltods und der Waller'schen Degeneration und initialer glialer Reaktion (Meyer et al., 2004; Silver & Miller, 2004).

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

- III. Die Phase der Ödembildung, des Zelltods und Inflammation mit Einwanderung von Entzündungszellen ins Epizentrum der Läsion, die sogenannte ‘second hit’ Phase (Schnell et al., 1994; Mabuchi et al., 2000).
- IV. Das kritische Zeitfenster der axonalen Regeneration mit Aussprossung und Synapsenbildung (Scheff & Cotman, 1977; Bräuer et al., 2003).
- V. Die Stabilisierungsphase mit Abklingen der Inflammation und Bildung einer glialen Narbe (Stichel & Müller, 1999; Silver & Miller, 2004; Bradbury et al., 2002).

Mit der Schädigung beginnt also die hochakute Phase, die gekennzeichnet ist von der Expression von ‘immediate early genes’ und neuronalem Zelltod (Liu et al., 1997). Nach einer Läsion treffen im Moment des Regenerierens geschädigte Axone und Kollaterale auf ein unterschiedliches Terrain. Dabei treffen sie sowohl auf bestehende Komponenten des ZNS als auch auf neue, durch die Läsion induzierte Moleküle (Aubert et al., 1995; Bähr & Wizenmann, 1996). Diese können proteinerger als auch lipidartiger Natur sein (Pannu et al., 2005). Die distalen axotomierten Stümpfe unterlaufen einer Waller’schen Degeneration. Der Debris der umliegenden Myelinscheiden persistiert länger, bis dieser durch einwandernde Mikroglia und Makrophagen abgeräumt wird (Kreuzberg, 1996).

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem



**Abb. 1: Zelluläre Schadenskaskade im ZNS.** Diese Schema fasst die zellulären Prozesse nach Axotomie und exzitatorischen Zellschaden zusammen.

Obgleich das PNS strukturelle Eigenschaften mit dem ZNS teilt, gibt es wesentliche Unterschiede in der zellulären und molekularen Komposition. So werden Axone des PNS durch Schwann'sche Zellen myelinisiert, während dies im ZNS von Oligodendrozyten übernommen wird. Beide Zellpopulationen unterscheiden sich voneinander morphologisch und in ihrem Proteinexpressionsmuster. So sind Myelin-Associated Glycoprotein, Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein, Chondroitin Sulfate Proteoglycans und die Nogo Proteine ausschliesslich im ZNS exprimiert. ZNS und PNS Schädigungen unterscheiden sich weiterhin in der Eliminationskinetik von Debris. Die Aufräumreaktion von Debris und axonalen Fragmenten erfolgt wesentlich schneller im PNS; ein Phänomen, das durch die unterschiedlichen zellulären Mitspieler und durch die unterschiedliche Erreichbarkeit des Immunsystems zu erklären ist. Die Histologie der Schädigung im ZNS ist generell dominiert durch die Infiltration von Entzündungszellen wie Mikroglia, Makrophagen, endotheliale Zellen und Fibroblasten. Umschlossen wird dieses Areal mit Astrozyten, Oligodendrozyten Vorläuferzellen und Mikroglia. Astrozyten in dieser Region machen eine

morphologische Transformation durch und werden hypertroph, ein Zustand der als reaktive Astrozytose bezeichnet wird. In diesem Zustand bilden diese reaktiven Astrozyten ein dichtes Netzwerk um die Läsion und bilden eine gliale Narbe. Diese Glia-Narbenbildung ist einzigartig für das ZNS und nicht im PNS zu finden, u.a. da der astrozytäre Zelltyp im PNS nicht existiert.

Verschiedene Forschungslinien deuten darauf hin, dass die gliale Narbe als Regenerationsblock für auswachsende Axone wirkt. So zeigen dissoziierte Neurone, die in Läsionsbereiche des ZNS appliziert wurden, dass die Transplantate über längere Distanzen auswachsen aber im Bereich der glialen Narbe stoppten. Eine Anzahl von extrazellulären Molekülen der Chondroitinsulfat Proteoglykan (CSPG) Familie konnte im Narbengewebe identifiziert werden, was zum Konzept der glialen Wachstumsinhibition führte. Konsistent mit diesem Befund sind Ergebnisse aus den Studien mit Chondroitinase ABC, ein Enzym das selektiv CSPG degradiert. Dieses Enzym steigert deutlich die axonale Regeneration *in vivo* (Silver & Miller, 2004; Bradbury et al. 2002). Diese Befunde zeigen einen direkten Effekt des läSIONALen Epizentrums auf die Auswachskapazität von Axonen. Nichtsdestotrotz darf nicht vergessen werden, dass CSPGs hochgeladene Moleküle darstellen und verschiedene andere extrazelluläre Moleküle binden, so dass die axonale Wachstumsinhibition auch durch distinkte Faktoren bedingt ist, die nicht zur Klasse der CSPGs gehören.

Aus der anatomischen Schadenskaskade und den bisherigen molekularen Erkenntnissen daraus zeigen sich also folgende experimentell-klinische Forschungslinien und Therapieansätze auf:

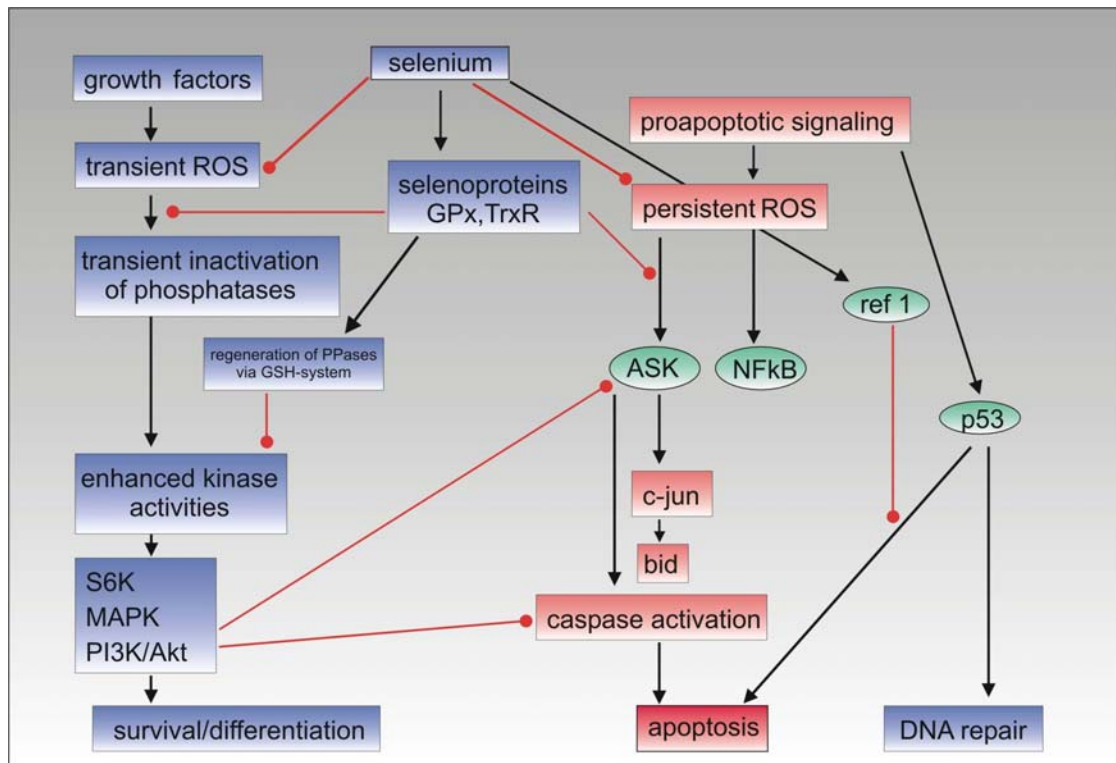
- I. **Die Reduktion des neuronalen Zelltods (*Neuroprotektion*)**
- II. **Minimierung des Sekundärschadens (*Neuroprotektion, Immunmodulation*)**
- III. **Aktivierung der intrinsischen, neuronalen Auswachskapazität (*Neuroregeneration*)**
- IV. **Förderung einer auswachsstimulierenden Umwelt durch regenerierende Axone mit der Blockierung von Auswachs-inhibitoren (*Neuroregeneration*).**

## **1.2.1 Molekulare Mechanismen der zellulären Neuroprotektion im ZNS**

### **1.2.1. Zellschaden und Apoptose**

Allen unter 1.1.2 genannten Schädigungen sowie den Hirninfarkt und Schädel-Hirn Trauma ist gemein, dass initial ein primärer Schaden von Hirnparenchym vorliegt. Damit verbunden ist der Untergang von geschädigten Neuronen. Es folgt die Phase der Invasion von mikroglialen Zellen und Makrophagen ins Epizentrum, die grosse Mengen an zytotoxischen Faktoren wie Zytokine, Glutamat, sowie freie Sauerstoffradikale freisetzen (oxidativer Stress) und dadurch zu einem weiteren neuronalen Zelltod beitragen (Mabuchi et al., 2000). Die Phase wird aus diesem Grunde auch 'second hit' genannt. Sie ist gekennzeichnet durch die oxidative Schädigung initial überlebender Neurone und trägt wesentlich zum Verlust von funktionellen Gewebe und damit zur Ausprägung einer Schädigung bei (Stichel & Müller, 1999, Mabuchi et al., 2000; Ullrich et al., 2001).

Der Untergang von Neuronen nach Schädigung läuft über einem energieabhängigen, aktiven Prozess, der als programmierter Zelltod oder Apoptose definiert wird. Dieser Zelltod ist unter physiologischen Bedingungen mit Wachstums- und Entwicklungsprozessen während der Embryogenese verbunden. So werden während der Entwicklung des ZNS mehr als doppelt so viele Neurone gebildet als im adulten ZNS vorhanden sind (Oppenheim, 1991). Die Reduktion der überschüssigen Neurone erfolgt über den programmierten Zelltod. Nach einem Insult jedoch ist dieser Prozess durch die Invasion von inflammatorischen Zellen getriggert und kostet dem Organismus kostbare Neurone, die nicht wieder ersetzt werden können. Daraus ist das Konzept der Neuroprotektion als therapeutischer Ansatz entwickelt worden und wird in klinischen Studien verfolgt (Short et al., 2000; Acorda in Phase 3; Proneuron in Phase 2; Aventis in Phase 1): Eine Zusammenfassung der Aktivatoren und Exekution der Apoptose ist in **Abb. 2** zusammengefasst:



**Abb. 2 (aus Schweizer et al., 2004): Schema und Hypothese von Selen und die Regulation der intrazellulären Signalkaskaden.** Dieses Schema fasst die Effekte von Selen während der Zelldifferenzierung, Apoptose und DNA Reparatur zusammen. Selen in seiner inorganischen und organischen Form kann freie Radikale direkt reduzieren oder wirkt indirekt über die Expressionsregulation von Selenoproteinen. Diese wiederum können Phosphatasen (PPases), Kinasen (MAPK, S6K, PI3K, ASK), Proteasen (Caspase-3 u.a.) und Transkriptionsfaktoren (NFκB, c-jun/AP-1) in ihrer Aktivität verändern.

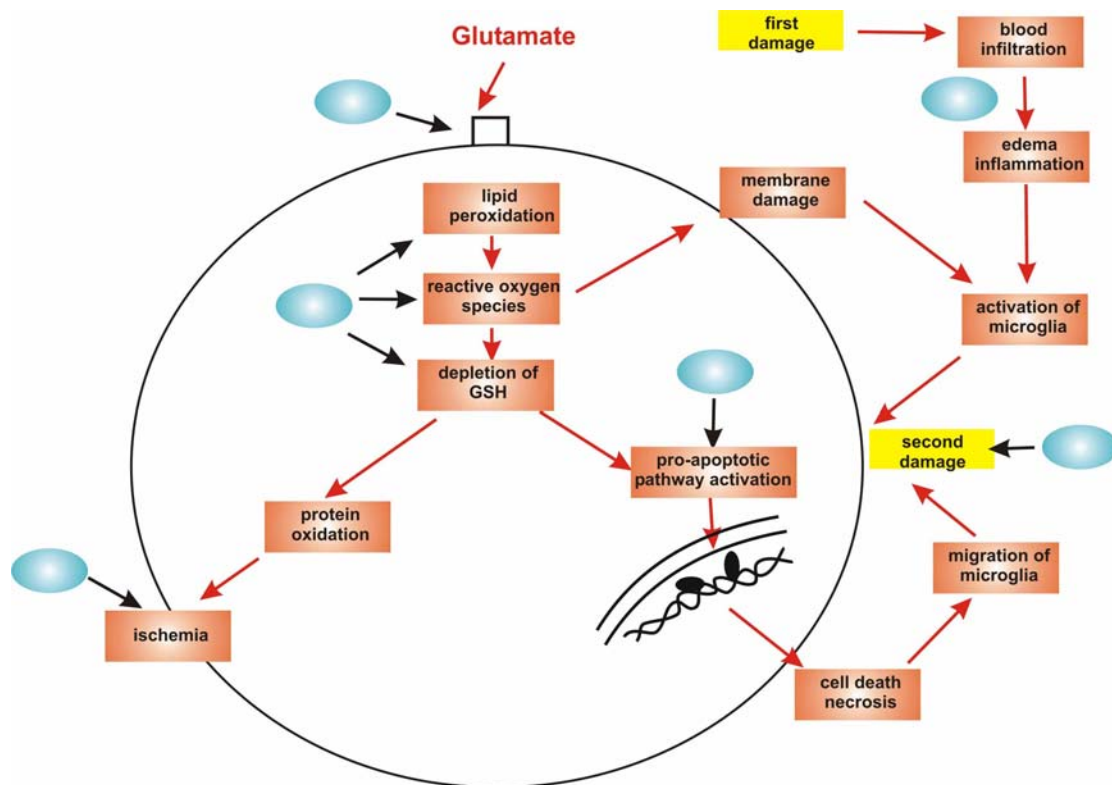
### 1.2.2. Mechanismen der Neuroprotektion

Im Moment der Schädigung kommt es im Zentrum und Epizentrum des ZNS zur Axonerreißung und -quetschung mit nachfolgender Einblutung, Ischämie und Ödembildung, die sich durch den Untergang von Neuronen und Gliazellen kennzeichnet. Für den Untergang von Neuronen sind sowohl pathophysiologische Prozesse des primären Schadens als auch sekundäre Schadensprozesse verantwortlich. In beiden Prozessen kommt es zur Freisetzung von Glutamat in den Extrazellulärraum, Inflammation und Sauerstoffradikalbildung. Dies hat zur Folge, dass es durch die erhöhte Glutamatfreisetzung zu einem exzitotoxischen und oxidativen Schaden kommt, der verstärkt durch die mikrogliale und Makrophagen-

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Infiltration zu einem irreversiblen Zellschaden mit neuronalen Zelltod führt. Die exzitatorischen Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Homozystein aktivieren Glutamatrezeptoren (NMDA-R, AMPA-R), die zur Induktion einer  $\text{Ca}^{2+}$  Überladung und schlussendlich in einem massiven  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  Influx und  $\text{K}^+$  Efflux resultiert. Zusammen mit dem Aufkommen von freien Sauerstoffradikalen führt dies zur Erschöpfung des Energie- und Glutathionhaushalts und damit zum oxidativen und exzitatorischen Stress, zusammengefasst unter dem Terminus Exzitotoxizität. Mit den in Zellmembranen freigesetzten Phospholipiden und dem vasogenen Thrombin wird weiterhin der Entzündungsprozess in Gang gehalten, Glutamat und Sauerstoffradikale freigesetzt und damit im Sinne eines Circulus vitiosus der neuronale Zelltod potenziert. Dieser sich selbst entkoppelnde Prozess, der sich ausgehend vom Primärschaden nun unabhängig weiter entwickelt, wird als *second hit* bezeichnet und verursacht einen bedeutend grösseren Zellschaden als der initiale, primäre Schaden.

Die Strategien der Neuroprotektion leiten sich demzufolge aus den pathophysiologischen Prozessen ab. Wie in **Abb. 3** zusammengefasst, richten sich klinisch in Testung befindende oder experimentelle Ansätze auf der Ebene der Glutamatrezeptorblockierung (GK-11 [Beaufor-Ipsen]; Riluzol [Aventis]; Dexanabinol [Pharmos], u.a.), der Reduktion von Sauerstoffradikalen (Vitamin E; Selen), Regulation der Energiebilanz, Inhibition der neuronalen Apoptose (Erythropoetin; LIF [Neurosciences Vect.]), Inhibition der Inflammation (COX-2 Inhibition) und Aufhebung der Blutung und Ischämie (**Abb. 3**). So erklärt sich auch das Konzept der klinischen Neuroprotektion durch Gabe von Methylprednisolon in der Akutphase bei Schädel-Hirn Traumata (Short et al., 2000). Hierbei ist das Ziel, das zytotoxische Ödem, die Inflammation sowie die Freisetzung von Glutamat und Sauerstoffradikalen zu reduzieren. In den USA wird diese Therapie flächendeckend angewandt, obgleich in Europa dieser Ansatz bis heute aufgrund der möglichen Komplikationen (Ulcus ventriculi mit Blutungen, Pankreatitis, Wundinfektionen und Pneumonien) nicht unumstritten und Gegenstand aktueller klinischer Phase-3 Studien ist (Short, 2000; Yale University/M. Bracken).



**Abb. 3: Zelluläre Schadenskaskade im ZNS und therapeutische Interventionsstrategien.** Die roten Pfeile markieren schädigende Ereignisse, die blauen Ovals stellen mögliche Interventionsstrategien zur Schadensbegrenzung dar.

Weiterhin in Testung befinden sich Zykllooxygenasehemmer (COX-2 Inhibitoren, Indometacin, Ibuprofen) zur Reduktion proentzündlicher Eikosanoide und damit zum Anheben des Glutathionpools (de la Houssaye et al., 1999). Neben anti-inflammatorisch wirksamen und Sauerstoffradikalbildung hemmenden Eigenschaften wurde Erythropoetin als glia- und neuroprotektives Pharmakon identifiziert (Goldman & Nedergaard, 2002). Erythropoetin wirkt über die Aktivierung des anti-apoptotischen Janus Kinase 2 Signalwegs in Neuronen und Gliazellen als auch über die Normalisierung des Gefäßtonus (Erbayraktar et al. 2003).



### 1.2.3 Die Rolle von Selen bei neurologischen Erkrankungen

Selen wurde als essentielles Spurenelement für den Säugetierorganismus erst 1957 identifiziert (Schwarz & Folz, 1957). Selendefizienz kann mit erhöhter Gabe von Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) zeitweise kompensiert werden, was sich auf die Interpretation von nutritiven Daten ohne Wissen der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen als schwierig erweist. Mit der Entdeckung und Identifizierung des Selens als zentralen Bestandteil von Selenoproteinen wie der Glutathionperoxidasen (1-4), Deiodinasen, Thioredoxinreduktasen und Phospholipidperoxidasen (Schweizer et al., 2004; Hatfield & Gladyshev, 2002) wurde ein molekularer Zugang zur physiologischen Wirkung von Selen möglich.

Selen existiert in der Natur in organischer Form (Selenomethionine, Selenocysteine) als auch in anorganischer Form (Selenit, Selenat, Selenide) (Birringer et al., 2002). Im Speziellen wurde nachgewiesen, dass der Selengehalt im Plasma von neurochirurgischen Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen erniedrigt ist (Walther et al., 2000). Trotzdem ist bis heute noch ungeklärt,

- I. **wie und in welcher Form Selen ins ZNS gelangt**
- II. **in welcher Form Selen im ZNS gespeichert wird und**
- III. **welche Zellpopulation am stärksten von normalen Selenwerten abhängig ist.**

Die überzeugendsten klinischen Daten zu Selen wurden von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen reportiert. So korrelierte der erniedrigte Selenstatus mit dem Schweregrad kindlicher Krampfanfälle (Weber et al. 1991). In einer weiteren Studie von Ramaekers und Koarbeitern 1994 zeigte sich in ähnlichen Fällen, dass die Krampfanfälle mit dem Schweregrad des Selenmangels korrelierten und, wichtiger, dass sich die Krampfhäufigkeit als auch die Krampfstärke durch das Spurenelement Selen kontrollieren liessen (Ramaekers et al., 1994). Wurde die Therapie mit Selen bei den kindlichen Patienten abgesetzt, kam es wieder zu Krampfanfällen und der klinische Status verschlechterte sich (Ramaekers et al., 1994).

Eine Beziehung des Selenstatus zu epileptischen Anfällen wurde weiterhin beobachtet bei Patienten, die langfristig auf eine totale parenterale Ernährung angewiesen waren (Kien & Ganther, 1983). So erhöhte sich das Krampfanfallsrisiko bei Patienten mit parenteraler Versorgung dramatisch bis standardmässig Selen in die

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Ernährungsformel eingeführt wurde (Kien & Ganther, 1983). So gehört heute Selen zu den essentiellen Bestandteilen jedweder parenteraler Nahrungsformel unabhängig vom Hersteller. Weitere Evidenzen für die Bedeutung von Selen im ZNS kommt aus unabhängigen Untersuchungen an Tiermodellen der Parkinson'schen Erkrankung. Es ist weitläufig akzeptiert, dass oxidativen Mechanismen bei der Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra eine entscheidende Rolle zukommt. Durch die Formation von Peroxiden durch die MAO-B und der Autooxidation von Dopamin selbst kommt es zu einer oxidativen Belastung von Neuronen, die zum Zelltod führt (Grunblatt et al., 2000). So kann die intraperitoneale und orale Gabe von Selen den dopaminergen Zelltod massiv reduzieren und die Verhaltensdefizite aufheben (Kim et al., 2000). In einer neuropathologischen Untersuchung an Hirnen von Alzheimer Patienten konnte weiterhin ein Mangel an Selen in Bereichen von Läsionen nachgewiesen werden (Cornett et al., 1998). Die gegenwärtige klinische Studie SELECT (32.800 Patienten monitort über 12 Jahre) hat zum Ziel, den Zusammenhang von Selen und Vitamin E auf die Inzidenz von Demenzen vom Alzheimer Typ näher zu untersuchen (PREADVICE). Der genaue Wirkmechanismus und die Selektivität von Selen sind jedoch bisher unbekannt.

### **Bisher wurde noch nicht untersucht,**

- **ob und wie der Selenstatus die Krampfanfallshäufigkeit beeinflusst,**
- **ob Selenmangel strukturelle Veränderungen nach sich zieht,**
- **welche molekularen Mechanismen durch Selen aktiviert werden,**
- **ob Selen direkt wirkt oder über den Einbau in Proteine,**
- **ob Selen protektive Eigenschaften für Neurone besitzt und**
- **ob Selen auch in Rescue Ansätzen eine Wirkung zeigt.**

### **1.2.4 Die Rolle von Selen in der Tumorthherapie**

Tumorzellen sind im verstärktem Masse oxidativen Stress durch einen erhöhten Metabolismus ausgesetzt (McEligot et al., 2005). Dies stellt gleichwohl einen

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

verwundbaren Punkt von Tumorzellen dar und wird daher in der Therapie mithilfe von Chemotherapeutika ausgenutzt (McEligot et al., 2005). Dabei wird das Chemotherapeutikum intrazellulär metabolisiert und beeinflusst so oder direkt Redox-Cycling Reaktionen, die einen direkten Effekt auf das Chromatin haben. Die reaktiven Sauerstoffradikale reagieren mit cytosolischen Proteinen sowie Transkriptionsfaktoren als auch direkt mit Chromatinstrukturen. So ist bekannt, dass Selen direkt oder über Selenoproteine Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität und DNA-Bindungsaffinität beeinflussen kann (Savaskan et al., 2003). Verschiedene Studien demonstrierten einen antiproliferativen Effekt von Selen in androgen-sensitiven Prostata Carzinomzellen, in androgen-resistenten Prostata Zelllinien wie DU-145 und PC3, in Hepatocarcinomen und in Mammacarcinomzellen (Novoselov et al., 2005). Weiterhin haben erste klinische Supplementationsstudien mit Selen einen reduzierenden Effekt auf die Inzidenz von Prostatacarcinom, Colonicarcinom und Bronchialcarcinomen gezeigt, während Selen keinen Effekt auf die Inzidenz von Melanoma hat (Clark et al., 1996).

Ogleich die chemopräventiven Effekte des Selen in Tiermodellen und in klinischen Testungen mehrfach von unabhängigen Laboren gezeigt wurden, sind die biochemischen und molekularen Mechanismen, über die Selen in Tumorzellen wirkt, noch nicht klar verstanden. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen sind zwei Konzepte entwickelt worden. Einerseits werden die chemopräventiven Effekte auf die Wirkung der niedrigmolekularen Selenverbindungen wie Selenite, Selenat und andere zurückgeführt (Ganther, 1999). Andererseits führt Selen zu einer verstärkten Expression von selenhaltigen Proteinen, den Selenoproteinen (Kryukov et al., 2003). So sind beide Konzepte konsistent mit den bekannten Effekten von Selen und Selenoproteinen in der antioxidativen Detoxifikation und Reparatur von beschädigten Makromolekülen (Gladyshev & Hatfield, 2002).

Zusammengefasst lassen sich die biochemischen Effekte von Selen in folgende Kategorien klassifizieren: I. redox-abhängige und unabhängige Regulation des Zellzyklus, II. Caspase-abhängige Inhibition der Apoptose, III. Protein Kinase und Phosphatase Regulation. So wirkt Selen inhibitorisch auf den MAPK und ERK Signalweg und beeinflusst die Aktivität von Cyclin A und D1 sowie p16 und p27 (Schweizer et al., 2004). Maligne Gliome gehören zu den aggressivsten Krebsformen, und obgleich sie sehr selten ausserhalb des ZNS metastasieren, sind sie bekannt für

ihre hohe Invasion und neurodestruktive Natur. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob Selen einen chemotherapeutischen Effekt auf primäre Tumoren des ZNS hat.

**Bisher wurde noch nicht untersucht,**

- **ob und wie Gliomzellen die neuronale Integrität beeinflussen,**
- **über welchen Mechanismus Gliomzellen neurotoxisch wirken,**
- **ob Selen einen antiproliferativen Effekt auf Gliome hat,**
- **ob Selen die Invasion von Gliomen beeinflusst und**
- **ob Selen selektiv zelltyp-spezifisch wirkt.**

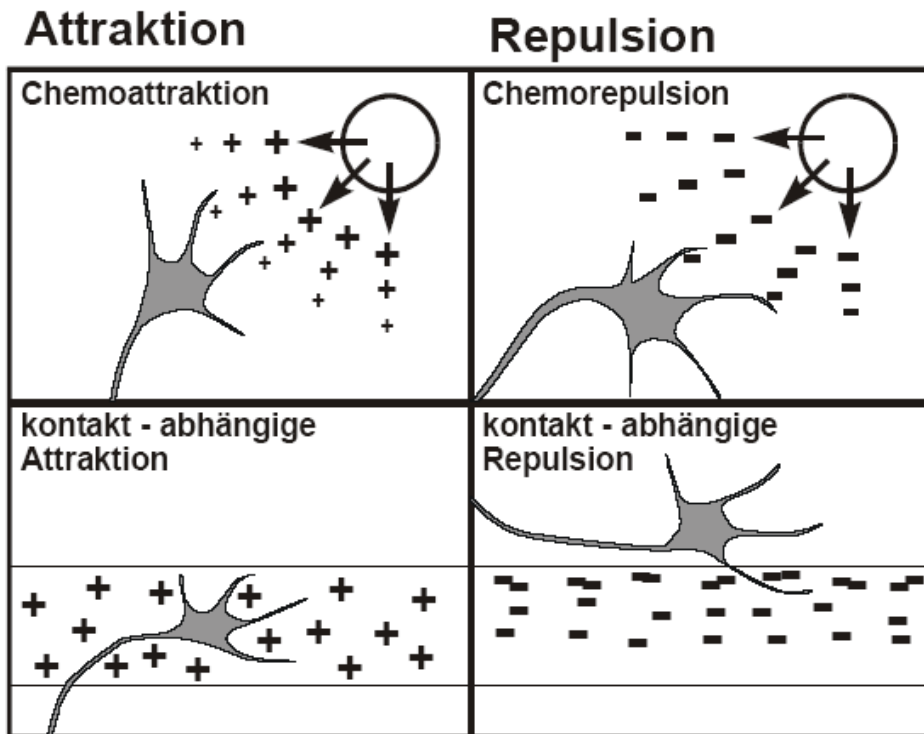
## **1.3 Molekulare Mechanismen axonaler Regeneration**

### **1.3.1 Molekulare Mechanismen axonaler Wegfindung**

Das zielgerichtete Wachstum von Axonen zu ihrem Zielgebiet ist ein hochspezifischer Prozess, der in einer so wundersamen Weise wie in der Entwicklung des menschlichen Gehirns exemplifiziert wird. In gerade einmal neun Monaten entwickelt sich das embryonale Gehirn von der Grösse eines Stecknadelkopfes mit wenigen hundert Neuronen zu einem hochkomplexen, fast eine Trillion Neurone enthaltenden und spezifisch verknüpften Gebilde (Nedivi, 1999). Das bedeutet, dass Neurone zum richtigen Zeitpunkt am rechten Ort auftreffen müssen um funktionell sinnvolle Kontakte miteinander zu bilden. Um diese gewaltige Aufgabe mit genügender Präzision zu bewältigen, bedarf es spezifischer Erkennungsmoleküle. So hat Ramon y Cajal als erster theoretisch die Chemoaffinitätshypothese formuliert (Ramon y Cajal, 1911). Dabei werden Axone entweder:

- I. kontakt-abhängig angezogen,**
- II. kontakt-abhängig abgestossen sowie**
- III. über Distanz chemisch angezogen oder**
- IV. über Distanz chemisch abgestossen.**

Diese Modell ist schematisch dargestellt in **Abb. 4**.



**Abb. 4: Axonales Wegfindungsmodell.** Zielgerichtetes axonales Wachstum kann im Prinzip durch vier Mechanismen beschrieben werden: Axone können über direkten Kontakt oder über Distanz angezogen werden oder über Distanz oder Kontakt abgestossen werden. Die Spezifität eines solch zielgerichteten Auswachsprozesses ist durch die differentielle Expression der Liganden und Rezeptoren gegeben und wird weiter um eine Dimension komplexer, wenn die Modifizierung von Liganden und der Rezeptoren hinzugenommen wird.

Mit der Identifizierung und Klonierung der ersten Axonlenkungsmoleküle (axon guidance molecules) während der Entwicklung ist es gelungen, dieses zentrale Konzept der Entwicklungsbiologie auf einer molekularen Ebene zu heben und die prinzipiellen Mechanismen zu verstehen (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). So wurden attraktiv wirkende, kontakt-abhängige Faktoren (Cadherine, NCAM [Cremer et al., 1994, 1997], L1 [Tomasiewicz et al., 1993; Ono et al., 1994; Zang et al., 1994], Neurotractin [Schäfer et al., 2005]; Reggie [Schulte et al., 1997]) als auch über Distanz wirkende und in Gradienten vorliegende Faktoren (Netrine [Serafini et al., 1994], Slits und Robos [Kidd et al., 1998a, 1998b; Li et al., 1999; Wang et al., 1999], Laminin [Silver & Miller, 2004], HGF/SF [Ebens et al., 1996], Shh [Charron et al., 2003]) im ZNS identifiziert.

Weiterhin wurden im Laufe der Identifizierung von axonalen Lenkungsmolekülen nachgewiesen, dass auch repulsive Faktoren das directionale

Wachstum von Axonen kontaktabhängig als auch über Distanz steuern können. So wurde die Familie der Semaphorine, Netrine und Ephrine mit ihren Rezeptoren im sich entwickelnden ZNS identifiziert (Plexine, Neuropiline, L1, DCC, Neoginin, Eph-Rezeptoren; Püschel et al., 1995; Drescher et al., 1995; Keino-Masu et al., 1994).

Mit der Identifizierung der Axonlenkungsmoleküle (the 'big four': Netrins, Slits, Ephrins und Semaphorins sowie den Wachstumsfaktoren) im sich entwickelnden ZNS stellt sich die Frage, ob dieselben Moleküle auch im adulten ZNS nach einer Schädigung präsent sind. Eine der ersten Arbeiten zeigte auf, dass in der Tat entwicklungsabhängig exprimierte Faktoren wieder nach einer Läsion reexprimiert werden (Bovolenta et al., 1997). So sind auch die Semaphorine der Klasse 3 nicht nur während der ZNS Entwicklung, sondern auch nach einer Rückenmarksläsion exprimiert (Pasterkamp & Verhaagen, 2001).

Die Frage bleibt, ob diese bisher klonierten Faktoren alle Moleküle darstellen, die bei der Verschaltung des ZNS beteiligt sind oder ob es noch weitere unbekannte Faktoren gibt, die es zu identifizieren gilt. Auf diese Frage wird später unter 1.4 näher eingegangen.

### **1.3.2 Inhibitoren axonalen Wachstums im adulten ZNS**

Wie eingangs erörtert, ist die Umgebung, auf die ein Axon im adulten ZNS trifft, grundlegend verschieden zu der Umgebung des sich entwickelnden ZNS und des PNS. Mit den Pionierarbeiten von Ramon y Cajal, Raisman und Cotman wurde gezeigt, dass nach einer Schädigung Axone grundsätzlich zum Auswachsen in der Lage sind (regeneratives Aussprossen). Dies belegen weiterhin Befunde, in denen nach einer Axotomie Axone mit Wachstumskegeln nachweisbar sind. Diese neu aussprossenden Axone kollabieren jedoch nach einer kurzen Wachstumsphase, nämlich dann, wenn sie in Kontakt mit der Läsion und der weissen Hirnsubstanz treten (Caroni & Schwab, 1988a, 1988b).

Was also führt dazu, dass auswachsende Axone im adulten ZNS nicht in der Lage sind, verlorengegangene Verbindungen zu ersetzen?

Durch die Pionierarbeiten von Martin Schwab wurde das von Oligodendrozyten gebildete Myelin als Wachstumsbarriere erstmals identifiziert (Caroni & Schwab,

1988a). In weiteren Purifikationsschritten aus bovinem Myelin gelang es der Gruppe um Martin Schwab (Zürich), neutralisierende Antikörper und schliesslich das inhibitorische Protein Nogo zu identifizieren (Caroni & Schwab, 1988b; Chen et al., 2000; Raineteau & Schwab, 2001). So sind für die inhibitorische Umgebung des ZNS myelinassoziierte Faktoren verantwortlich. So exprimieren Oligodendrozyten Nogo-A, Myelin Associated Glycoprotein (MAG), und Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein (OMgp), für die alle auswachsinhibitorische Effekte beschrieben wurden (McKerracher et al., 1994; Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000; Wang et al., 2002). Mit dem Einwandern von Fibroblasten und Astrozyten werden regenerierende Axone weiterhin mit Sema4D/CD100, Bamacan, Sema 6B, RGM sowie Ephrin 3B exponiert, also Faktoren, die axonales Wachstum konzentrationsabhängig inhibieren. Weiterhin stellen die unter 1.1.3 vorgestellten CSPGs sowie Tenascin-R molekulare Wachstumsbarrieren dar.

Als initial nicht im ZNS vorliegende, sondern durch die Schädigung über das Blut eingebrachte Faktoren sind Thrombin und das Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA) entdeckt worden (Jalink et al., 1994; Savaskan et al., 2005). Beide Faktoren haben einen stark repulsiven Effekt auf Axone (Jalink et al., 1994; Bräuer et al., 2003). So liegen eine Reihe von axonalen Wachstumsinhibitoren vor, die einzigartig für das adulte ZNS sind und die limitierte Wachstumskapazität erklären können. Durch die Aufklärung der intrazellulären Signalkaskaden ist inzwischen bekannt, dass eine Vielzahl des Kanons von axonalen Inhibitoren wie Nogo-A, MAG, Omgp, CSPG, Ephrin-A5 sowie Thrombin und LPA die RhoA GTPase rekrutiert und damit den axonalen Kollaps einleitet (Fournier et al. 2001; Kranenburg et al., 1999; Muller, 1999). Damit besteht ein pharmakologischer Ansatz zur Steigerung der axonalen Regeneration in der Blockade der RhoA abhängigen Kaskade (Dergham et al., 2002; Fournier et al., 2003).

## 1.4 Strategien zur Identifizierung von Plasticity Related Genes

Die Frage, ob die bisher klonierten Faktoren alle Moleküle darstellen, die bei der Verschaltung des ZNS beteiligt und, wichtiger, beim regenerativen Auswachsen identifiziert sind, kann nur experimentell beantwortet werden. Durch die kontroversen Regenerationsresultate der murinen Gendelektionsmutanten für Nogo wurde deutlich, dass möglicherweise nicht nur ein Faktor allein die Regenerationskapazität von null auf eins anschaltet wie vielleicht initial vermutet wurde (Simonen et al., 2003; Zheng et al., 2003; Kim et al., 2003). Diese Ergebnisse bedeuten nicht, dass Nogo als Inhibitionsblocker Nummer 1 keine Rolle bei der Inhibition regenerativen Aussprossens spielt, sondern verdeutlichen vielmehr die konzeptionelle Schwierigkeit des transgenen loss-of-function Beweisansatzes. So kommt dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere als auch die Kompensationsleistung des Organismus beim konstitutiven Fehlen eines Gens eine viel grössere Rolle zu als es bisher angenommen wurde. In gain-of-function Experimenten wurde deutlich, dass ektopisch exprimiertes Nogo-A in Schwann Zellen des PNS die Regeneration plötzlich dramatisch verschlechtert, vergleichbar wird zu der Situation im ZNS (Pot et al., 2002). So ist denn auch zu vermuten, dass eine Monotherapie zur Behandlung von Schädel-Hirn Traumata im Sinne einer *magic bullet* unwahrscheinlich bleibt.

In der **Tabelle 1** sind Daten zu den bisherigen Erkenntnissen der Genregulation im Hippocampus zusammengefasst, die mithilfe unterschiedlicher Techniken entdeckt wurden (Savaskan & Nistch, 2001).

Genfamilie/ Molekülklasse	Gen/Protein	Regulation	Referenzen
Immediate-early genes	c-jun	2 h - 4 h erhöht	Haas et al., 1999b
	Arc mRNA	4 h - 3 dal erhöht	Steward et al., 1998
	c-fos mRNA	15 min - 4 h erhöht	Nitsch & Frotscher, 1992
Membran-assoziierte Moleküle, Adhäsionsmoleküle	eNCAM (PSA- NCAM)	15 h - 60 dal erhöht	Miller et al., 1994
	NCAM 120/140 mRNA	2 - 4 dal erhöht	Jucker et al., 1995
	L1	30 dal erhöht	Styren et al., 1995
	MHCclass I + II	1 - 7 dal erhöht	Jensen et al., 1994; 1997
	CD86	ab 5 dal erhöht	Bechmann et al., 2001
	LFA-1 und VLA-4	1 - 7 dal erhöht	Hailer et al., 1997
	CD45	2 - 14 dal erhöht	Jensen et al., 1997
	Sulfated glycoprotein-2 (clusterin)	2 - 14 dal erhöht	Lampert-Etchells et al., 1991



## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

	CR3/CD11b	1 - 7 dal erhöht	Jensen et al., 1997
	Apolipoprotein E mRNA	2 - 6 dal erhöht 10 - 14 dal erniedrigt	Poirier et al., 1992; Zarow & Finch, 1995
	ICAM-1	3 - 7 dal erhöht	Hailer et al., 1997
<b>Neutrophine/ Zytokine</b>	bFGF-2	2 - 15 dal erhöht	Gomez-Pinilla et al., 1992; Fagan et al., 1997
	TGF- $\beta$ 1 mRNA	1 - 10 dal erhöht	Morgan et al., 1993
	FGF-2	8 h - 7 dal erhöht	Fagan et al., 1997
	IL-1	1 - 4 dal erhöht	Fagan u. Gage, 1990
	CNTF	3 - 7 dal erhöht	Guthrie et al., 1997
	ILGF-1 mRNA	8 h - 7 dal erhöht	Guthrie et al., 1997
<b>Neuronale, auswachs- assoziierte Moleküle</b>	Stathmin mRNA	2 - 15 dal erhöht	Bräuer et al., 2001
	RB3 mRNA	1 - 5 dal erhöht	Beilharz et al., 1998
	GAP-43	2 - 20 dal erniedrigt	Benowitz et al., 1990
	SCG 10 mRNA	2 - 10 dal erhöht	Zarow & Finch, 1995
<b>Zytoskelettale Moleküle</b>	tau-alpha-1 mRNA	1 - 15 dal	Miller & Geddes, 1990
	NF 68	1 - 12 dal erhöht	Steward, 1995
	GFAP mRNA	2 - 30 dal erhöht	Steward et al., 1993
	Vimentin	2 - 10 dal erhöht	Jucker et al., 1995
	Beta-Amyloid Precursor Protein	3 - 7 dal erhöht	Krohn et al., 1995
	MAP2	8 dal erhöht	Banati et al., 1994 Caceres et al., 1988
	<b>Synapsen-assoziierte Moleküle</b>	SNAP 25	1 - 20 dal erniedrigt
5'-nucleotidase Enzym		10 - 40 dal erhöht	Schoen & Kreutzberg, 1994
PDP 95		1 - 30 dal erniedrigt	Sampedro et al., 1982
<b>Rezeptoren</b>	GABAAR $\beta$ -subunit	3 - 30 dal erniedrigt	Mizukami et al., 1997
	NMDA R1	5 - 9 dal erhöht	Gazzaley et al., 1997
	HCN1	1 dal erniedrigt	Bräuer et al., 2001b
	Adenosine A1Receptor	14 dal erhöht	Kahle et al., 1993
<b>Extrazelluläre Matrixmoleküle</b>	Neurocan mRNA	2 dal - 6 Monate erhöht	Haas et al., 1999
	Brevican mRNA	1 dal - 6 Monate erhöht	Thon et al., 2000
	Tenascin-C mRNA	2 - 21 dal erhöht	Deller et al. 1997
<b>Extrazelluläre und cytosolische Proteasen</b>	Cathepsin S mRNA	um 8 dal erhöht	Petanceska et al., 1996
	Calpain	1 dal erhöht	Ray et al., 2000
	TPA	30 min erhöht	Qian et al., 1993
	MMP 2	1 - 7 dal erhöht	Kherif et al., 1999
	MMP 9	1 - 7 dal erhöht	Kherif et al., 1999
<b>Gene des Intermediärstoffwech- sels</b>	Nucleosid Diphosphatase	2 - 21 dal erhöht	Jensen et al., 1994
	Glutamate-Dehydrogenase	2 - 100 dal erhöht	Kugler et al., 1995

**Tabelle 1 (entnommen und modifiziert aus Savaskan & Nitsch, 2001): Veränderte Gen/Proteinexpression nach Schädigung im Hippocampus.** Aufgelistet sind die in der Literatur beschriebenen Faktoren, die nach Schädigung des Hippocampus eine veränderte Expression zeigen.

So lassen sich prinzipiell zwei unterschiedliche Strategien zur Identifizierung von Molekülen anwenden. Im sogenannten *reverse genetic approach* (vom Protein zum Gen) wird im Zentrum ein funktioneller Assay verwendet, bei dem die biologische Aktivität des Zielfaktors mit jeder Aufreinigung weiter getestet wird. Mit der

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Purifikation des Proteins lässt sich dann die Aminosäuresequenz und dann das Gen identifizieren. Mit diesem Ansatz wurden so wichtige Faktoren wie RAGS, RGM, Netrine sowie das Nogo identifiziert (Drescher et al., 1995; Serafini et al., 1994; Chen et al., 2000). Schwierigkeiten dieses Ansatzes liegen klar in der Purifikation des Proteins und in der Reproduzierbarkeit des Funktionsassays.

In einem anderen Ansatz, der in der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde, geht man den umgekehrten Ansatz. Im sogenannten *genetic forward approach* screent man nach differentiell exprimierten mRNAs in zwei zu vergleichenden Populationen (Bräuer et al., 2003; Savaskan et al., 2004). Hierbei liegt der Vorteil in dem hohen Durchsatz der zu testenden Populationen und der direkten Sequenzinformation, die durch die gute Datenbanklage schnell auf die putative Funktion des Zielgens zu validieren ist. Der Nachteil dieser Methode liegt in der personalintensiven Arbeit und gleichzeitig in der Fülle an Daten, die nur bewältigt werden kann, wenn klare und scharfe Kriterien zur Analyse vorab definiert sind. So haben wir auf der Suche nach Plastizitätsabhängigen Genen folgende Kriterien definiert:

- **membranständige Proteine,**
- **ZNS-spezifische Expression,**
- **läsionsregulierte Expression,**
- **entwicklungsabhängige Expression und**
- **neue, noch nicht bekannte Sequenz.**

Mit diesen Kriterien in der Hand wurden neue Gene (MAF, Neurotractin) und Genfamilien (Plasticity Related Genes, PRGs) identifiziert, von denen hier nun die PRGs näher vorgestellt und beschrieben werden.

## 2. ERGEBNISSE

### 2.1 Selen und Selenoproteine im ZNS

#### 2.1.1. Die Verteilung von Selenoproteinen im ZNS

Bräuer & Savaskan, *Rev. Neurosci*, 15, 19 – 32, 2004

Schweizer et al., *J. Nutrion*, 134, 707 – 710, 2004

Schweizer et al., *Brain Res. Brain Res.Rev.*, 45, 164 – 178, 2004

In diesen Arbeiten wurde die Synthese, Verteilung und Expression selenabhängiger Moleküle im ZNS und deren Signalwege untersucht. So stellt oxidativer Stress ein gemeinsamer Pathomechanismus in neurodegenerativen und akuten Schädigungen wie beim Schlaganfall, der Epilepsie und der Parkinson'schen Erkrankungen dar. Mit Hilfe von bioinformativen Analysen sind bis heute 25 Selenoproteine im menschlichen Genom identifiziert und anschliessend kloniert worden (Kryukov et al., 2003). In biochemischen Analysen mit <sup>75</sup>Se Radioaktivmarkierungen *in vivo* hat die Gruppe von Kyriakopoulos und Behne mehr als 30 Selenoproteine identifiziert, was auf die Identität weiterer, im bioinformativen Algorithmus nicht gefundener Sequenzen und auf das mögliche posttranskriptionelle Splicing und die posttranslationale Modifizierung von Selenoproteinen hinweist. So lassen sich eine Reihe von Selenoproteinen im ZNS nachweisen, obgleich für einige Selenoproteine noch keine Daten vorliegen. In **Tabelle 2** sind die Befunde zusammengefasst.

Selenoproteins	tissue distribution	localization in the brain	sub-cellular distribution	functions
cytosolic glutathione peroxidase (GPx1)	ubiquitous	microglia, activated astrocytes, low in neurons	cytosolic	antioxidant
gastrointestinal glutathione peroxidase (GPx2)	gastrointestine	-	cytosolic	antioxidant
plasma glutathione hydroperoxidase (GPx3)	kidney, plasma	-	extracellular	plasma antioxidant
phospholipid hydroperoxide glutathione (GPx4)	various tissues including the brain,	neurons and astroglia	cytosol and membrane-associated	intracellular antioxidant
sperm nuclei	testis,	n.t.	nucleus	antioxidant

**Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem**

<b>glutathione peroxidase (snGPx)</b>	spermatozoa			
<b>human GPx6</b>	olfactory epithelium, Bowmans gland	n.t.	n.t.	antioxidant
<b>thioredoxin reductase 1 (TRx1)</b>	various tissues including the brain	astrocytes, neurons	cytosol, mitochondria	multiple roles
<b>thioredoxin reductase 2 (TRx2)</b>	various tissues	n.t.	mitochondria	multiple roles
<b>thioredoxin reductase 3 (TRx3)</b>	various tissues	n.t.	cytosolic	multiple roles
<b>thyroid hormone deiodinase 1 (Dio1)</b>	mainly in the thyroid, liver kidney and pituitary		membrane associated	catalyses the conversion of T4 to T3
<b>thyroid hormone deiodinase 2 (Dio2)</b>	mainly in the brain, brown adipose tissue, the pituitary and placenta	mainly expressed in glial cells	membrane associated	catalyses the conversion of T4 to T3
<b>thyroid hormone deiodinase 3 (Dio3)</b>	mainly in the CNS; placenta and skin	neuronal	membrane associated	catalyses the conversion of T4 to reverse T3 and of T3 to T2
<b>selenophosphatase synthetase 2 (SPS2)</b>	various tissues	n.t.	cytosol	catalyses the production of selenophosphate
<b>15 kDa Selenoprotein (Sel15)</b>	various tissues, brain	n.t.	endoplasmic reticulum	unknown
<b>18 kDa Selenoprotein (Sel18)</b>	various tissues			unknown
<b>Selenoprotein M (SelM)</b>	various tissues including the brain	n.t.	perinuclear	unknown
<b>Selenoprotein N (SelN)</b>	skeletal muscle, liver, brain, heart, stomach	n.t.	endoplasmic reticulum	cell proliferation and regeneration?
<b>Selenoprotein P (SelP)</b>	liver is main source of plasma SelP ; ubiquitous	neurons	secreted protein, binds to heparin	Se transport, antioxidant?
<b>Selenoprotein R (SelR, MsrB)</b>	various tissues including the brain	n.t.	cytosolic	R-methionine-sulfoxide-reductase
<b>Selenoprotein T (SelT)</b>	various tissue	n.t.		unknown
<b>Selenoprotein W (SelW)</b>	mainly in the skeletal muscle, heart muscle, brain, testis and spleen	neurons	cytosolic	anti-oxidant ?

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

<b>Selenoprotein H</b>	various tissue	n.t	cytosol	unknown
<b>Selenoprotein O</b>	various tissue	n.t.	cytosol	unknown
<b>Selenoprotein I</b>	various tissue	n.t.	cytosol	hypothetical CDP-alcohol phosphatidyltrans ferase
<b>Selenoprotein K</b>	various tissue	n.t.	plasma membrane	unknown
<b>Selenoprotein S</b>	various tissue	n.t.	plasma membrane	unknown
<b>Selenoprotein V</b>	only testis	n.t.	cytosol	unknown
<b>Selenoprotein Y</b>	heart & brain	n.t.		
<b>Selenoprotein Z</b>	various tissue including the brain	n.t.	cytosol	unknown

**Tabelle 2 (aus Schweizer et al., 2004): Übersicht aller bekannten Selenoproteine im Säugetierreich und deren Verteilung im ZNS.** Berücksichtigt wurde vornehmlich die Expression im ZNS. Abkürzungen: n.t. - not tested; Sel – Selenoprotein.

Ogleich die Funktion aller Selenoproteine bei Weitem noch nicht vollständig untersucht wurde, zeigt sich bei den besser charakterisierten Selenoproteinen die essentielle Funktion für den Organismus. Die Selenoproteine Glutathionperoxidase I – IV, Thioredoxinreduktasen, Selenoprotein W und Selenoprotein P u.a. sind essentiell bei der antioxidativen Abwehr und der intrazellulären Redoxregulation beteiligt. Deren Wegfall durch Gendisruption oder siRNA mediiertem Knockdown führt zu erhöhter Suszeptibilität und niedriger Resistenz gegenüber oxidativen Noxen (Schomburg et al., 2003; Schweizer et al, 2004; Bräuer & Savaskan, 2004).

### **2.1.2. Die Rolle von Selen bei exzitatorischen Zellschaden**

#### Savaskan et al., FASEB J, 17, 112-124, 2003

Das Spurenelement Selen ist essentiell für den menschlichen Organismus (Rayman, 2000). So sind pathologische Ereignisse wie virale Infektionen, Immundysfunktionen, Myopathien, kardiovaskuläre Erkrankungen und epileptische Anfälle verbunden mit einer Selendefizienz des Organismus (Beck et al., 2001; Weber et al., 1991). Selen wurde weiterhin als Überlebensfaktor für kultivierte Zellen *in vitro* im fötalen Kälberserum identifiziert (Yan & Barrett, 1998). So verwundert

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

dann auch nicht, dass alle kommerziellen Zellkulturmedien und im Speziellen jene, die optimiert wurden zur Serum-freien Kultivierung, Selen als zentralen Bestandteil enthalten. Auf der anderen Seite wurde reportiert, dass Selen in höheren Konzentrationen im millimolaren Bereich Apoptose in Säugetierzellen induziert (Bräuer & Savaskan, 2004).

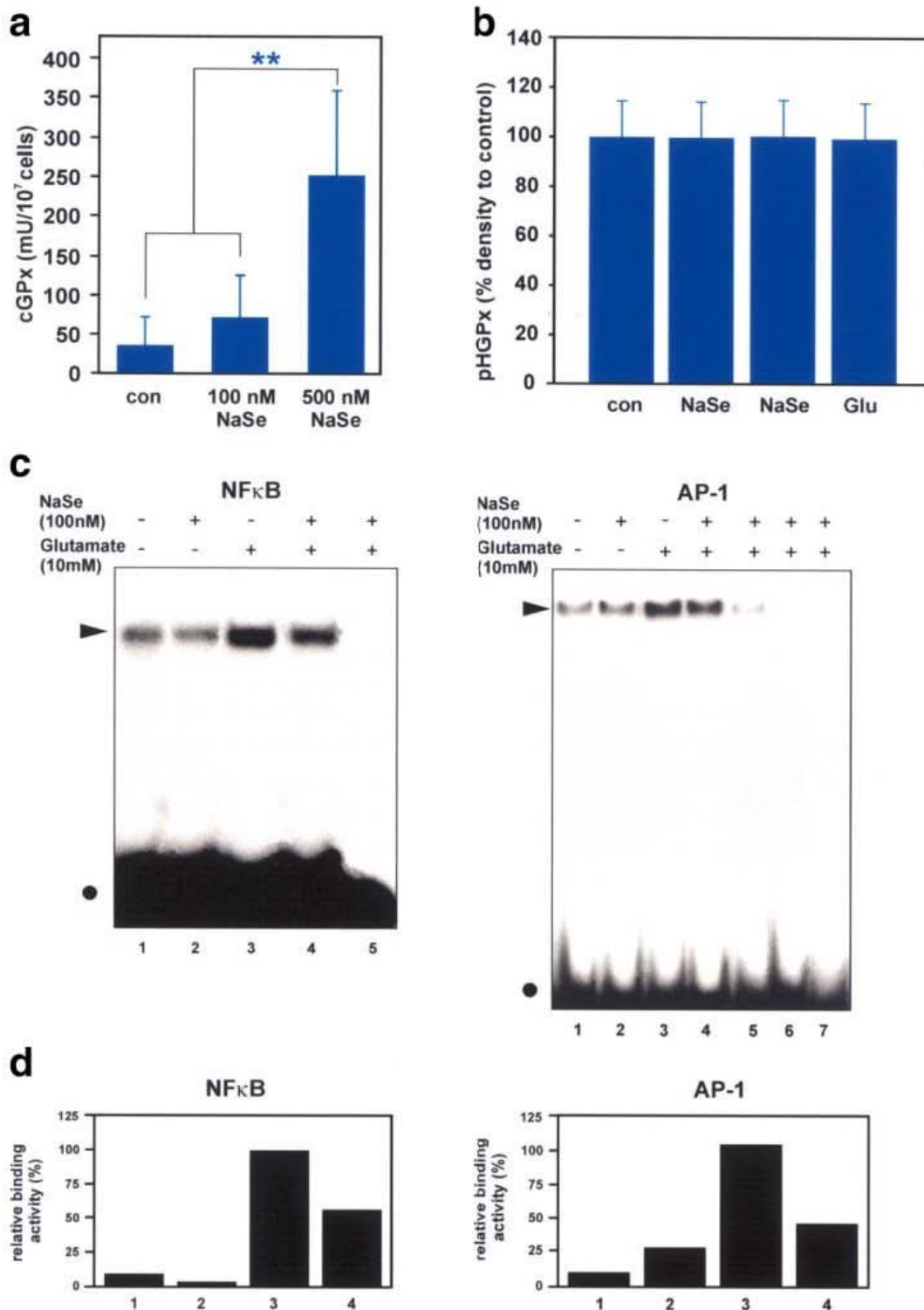
In dieser Studie haben wir die Rolle von Selen unter exzitatorischen Bedingungen untersucht. Exzitatorische Zellschäden, wie sie bei epileptischen Anfällen, Schädel-Hirntraumata oder Hirninfarkten vorkommen, führen zum massiven Zelltod von Neuronen. Diese Ereignisse werden eingeleitet durch die massive Freisetzung von Glutamat, was zur Übererregung und erhöhten oxidativen Stress in Neuronen führt. So kann Selen in anorganischer Form von Natriumselenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) und Natriumselenat ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) Neurone vor Glutamat-induziertem Zelltod schützen. Die neuroprotektiven Effekte von Selen sind hochpotent. So wirken schon 10 nM Selenit neuroprotektiv. Die identifizierten Konzentrationen von Selen sind damit nicht nur experimentell sondern auch medizinisch relevant, da sie pharmakologisch im Menschen erreicht werden können.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass Selen nicht direkt anti-apoptotisch wirkt, sondern es der aktiven *de novo* Proteinsynthese bedarf. So kann der protektive Effekt von Selen fast gänzlich aufgehoben werden, wenn die Proteinsynthese nach Selengabe inhibiert wird. Ein weiteres Indiz für die Proteinsynthese-abhängige Zellprotektion ergaben Untersuchungen mit Selenat, das chemisch inert ist und keine direkten anti-oxidativen Eigenschaften besitzt. So wirkt auch Selenat konzentrationsabhängig neuroprotektiv. Da Glutamat seine toxische Wirkung über den oxidativen Signalweg mit der Depletion des Glutathionhaushalts mediiert, stellte sich die Frage, auf welcher molekularen Ebene Selen wirkt. So schützt Selen Neurone auch dann, wenn es zur Erschöpfung des intrazellulären Glutathionpools kommt. Selen senkt zusätzlich die Formation von reaktiven Oxygenspezies.

Gel shift Analysen zeigten weiter, dass Selen die stressinduzierte NF $\kappa$ B und AP-1 Aktivierung inhibiert. Bei der Suche nach Kandidatenproteinen, über die Selen neuroprotektiv wirken kann, fanden wir keine Regulation der zellprotektiven Phospholipid-Glutathionperoxidase. Die zelluläre Glutathionperoxidase Aktivität jedoch wird konzentrationsabhängig reguliert und erhöht sich erst signifikant bei höheren, aber noch physiologischen Konzentrationen von Selen. Dies deutet

**Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem**

daraufhin, dass andere Selenoproteine durch Selen reguliert und in die anti-apoptotischen Signalwege eingreifen (Abb. 5).

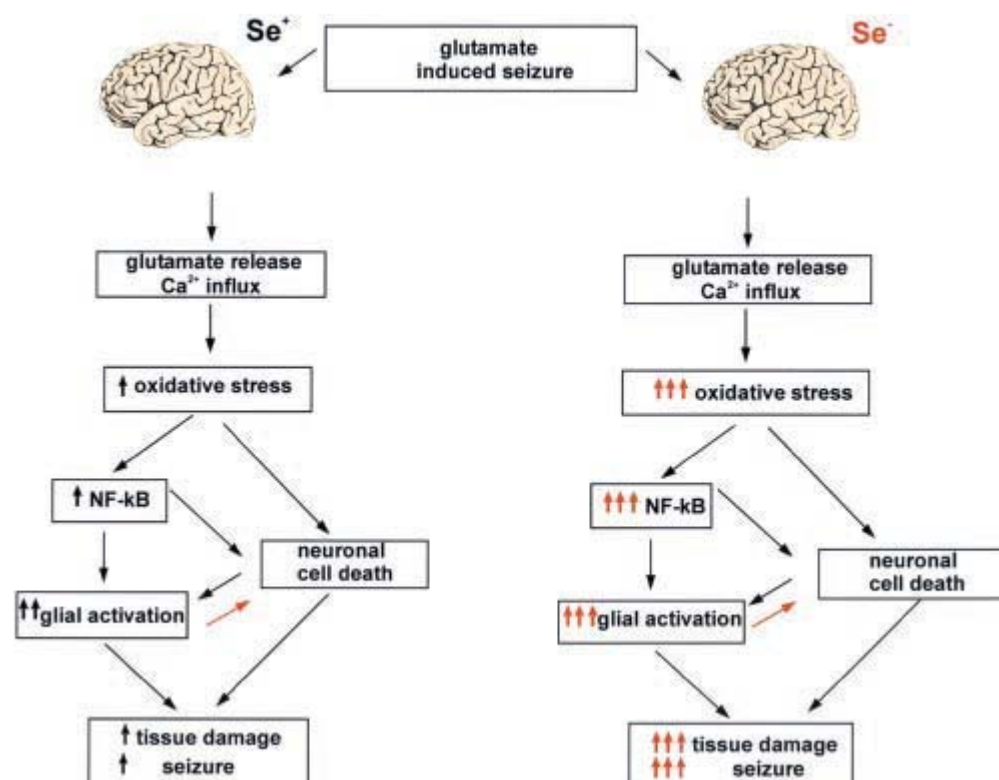


**Abb.5 (aus Savaskan et al., 2003): Selen reduziert die stress-induzierte NFκB und AP-1 Aktivierung.** In A ist die Aktivität von der zellulären GPx in HT22 Zellen unter Kontrollbedingungen (con) und nach Gabe von 100 nM sowie 500 nM Selenit bestimmt.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

worden. **B**, die Expression der Phospholipid-Glutathionperoxidase in Zellsaten von HT22 unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von 100 nM Selen und 10 mM Glutamat. **C** zeigt repräsentative Electromobility Shift Assays zur Detektion der aktivierten NFκB und AP-1 Transkriptionsfaktoren. **D**, Quantifikation der NFκB und AP-1 DNA-Bindungsmessung.

In *in vivo* Experimenten mit Selen-defizienten Ratten konnten wir erstmals zeigen, dass der Selenmangel zu einer erhöhten Krampfanfälligkeit führt. Weiterhin hat der Selenmangel auch strukturelle Konsequenzen: So zeigen Ratten mit einem Selenmangel unter exzitotoxischen Bedingungen erhöhte Caspase-3 Aktivität und einen Zellverlust u.a. in der CA1 Region des Hippocampus (**Abb. 6**). Diese Untersuchungen weisen als erste auf die Wichtigkeit des Spurenelements Selen für die normale Physiologie des ZNS hin und eröffnen die Möglichkeit des Selens als klinische Option für die Prävention und Therapie von neurologischen Erkrankungen mit exzitatorischen Schädigungen.



**Abb.6 (aus Savaskan et al., 2003): Schematische Zusammenfassung und Konzept der Selen-Defizienz im ZNS.** Auf der linken Seite ist die Situation unter Selen-adequater Versorgung dargestellt und auf der rechten Seite die Situation unter Selen-Defizienz.



### 2.1.3. Die Rolle von Selen bei der Invasion von Gliomen

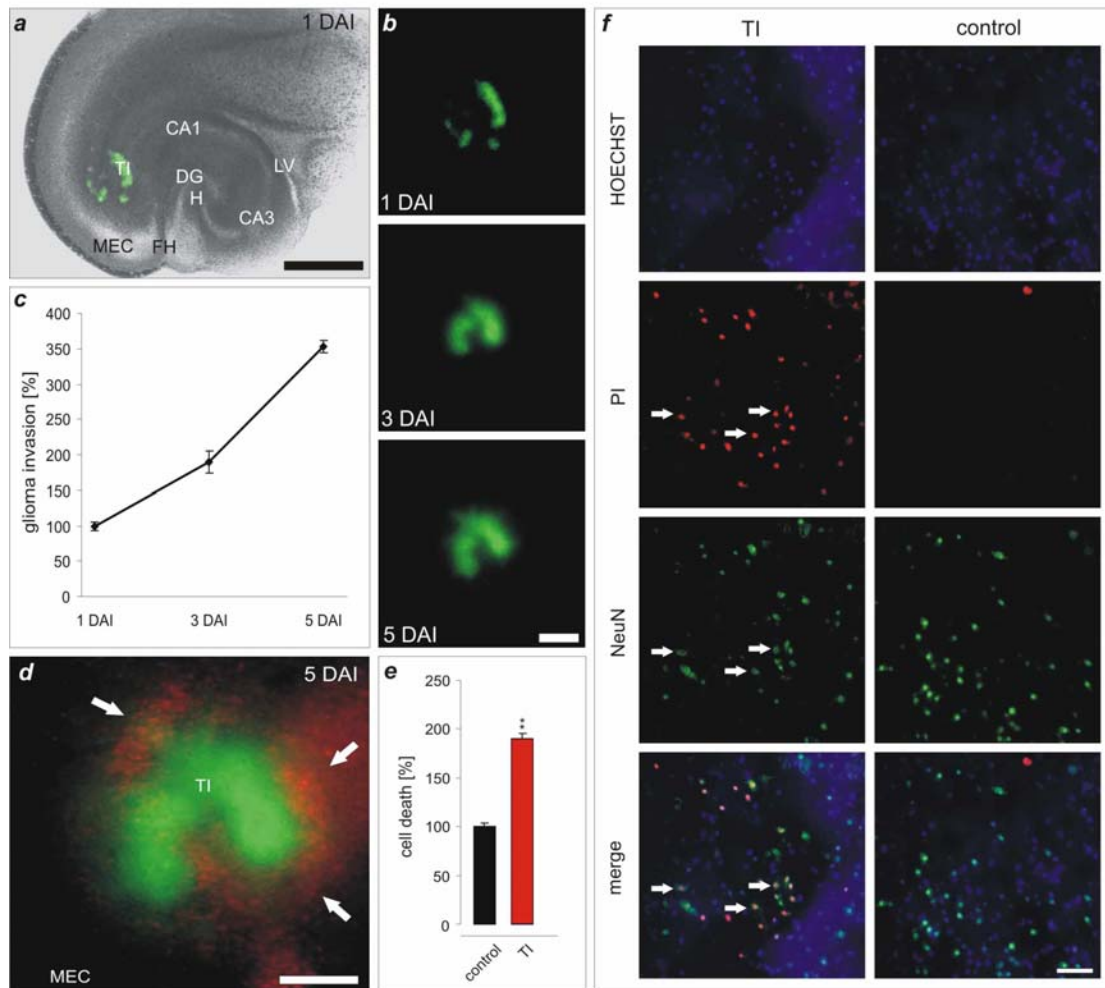
Savaskan et al., *under consideration*, 2005

Ein Charakteristikum maligner Gliome ist ihre hohe Motilität und aggressive Expansion ins Hirnparenchym, obgleich sie sehr selten ausserhalb des ZNS metastasieren. Neben der massiven Zellproliferation und diffusen Invasion ist der peritumorale Zelltod ein wesentliches Merkmal von malignen Gliomen (Sontheimer, 2003). Die zugrundeliegenden Mechanismen des peritumoralen Zelltods sind bisher nicht bekannt gewesen. So wurde bisher vermutet, dass Gliome entweder durch den limitierten Raum des Neurocraniums oder durch die Sezernierung neurotoxischer Faktoren neuronalen Zelltod induzieren. Weiterhin war bisher nicht bekannt, ob Selen einen chemotherapeutischen Effekt auf primäre Tumoren des ZNS hat.

In dieser Arbeit wurde ein neuer Glioma-Invasions Assay entwickelt, bei dem das Tumorwachstum in der organotypischen Hirnschnittkultur im *live image* Modus analysiert werden kann (OGIM – *organotypic glioma invasion assay*). Dabei bedienen wir uns eines Tricks, um die Interaktion zwischen Gliomzellen und Neuronen zu analysieren. So wurden Gliomzellen, die das Green Fluorescent Protein (GFP) exprimieren, auf den entorhinalen Cortex von organotypischen Hirnschnittkulturen gebracht und deren Invasionsverhalten und die Interaktion mit neuronalen Zellen im Echtzeit Modus unter einem Epifluoreszenzmikroskops oder einem konfokalen Mikroskop beobachtet. Durch die Vormarkierung der Gliomzellen lassen sich diese eindeutig in der organotypischen Umgebung der Hirnschnittkulturen identifizieren und deren Migrationsverhalten im Echtzeit Modus über Stunden bis Tage studieren.

Hierbei konnte der klinische und neuropathologische Befund des peritumoralen Zelltods verifiziert und sekretierte Faktoren der Gliome aus dem Medium analysiert werden (**Abb. 7**). Durch pharmakologische Inhibitionstests mit verschiedenen neuroprotektiven Substanzen liess sich der peritumorale Zelltod durch die Blockade der Glutamatrezeptoren aufheben, was darauf schliessen liess, dass der Zelltod exzitatorisch vermittelt ist.

Figure 1 - Savaskan et al.



**Abb. 7 (aus Savaskan et al., 2005): Gliomzellen wachsen invasiv und neurodestruktiv ins organotypische Hirngewebe ein und verursachen neuronalen Zelltod.** A, Implantation von GFP-exprimierenden Gliomzellen (grün) in die organotypische Schnittkultur zeigt infiltratives Einwachsen in die normotypische Neuroarchitektur. B, C, Lebendzeitverlaufsstudie der Invasion von Gliomzellen ein, drei und fünf Tage nach Implantation. D, E, Gliomzellen induzieren neuronalen Zelltod. Eine peritumorale Randzone von toten Zellen (in rot) erscheint um den Tumor (grün). Quantifizierung der toten Zellen in Gliomzellen implantierten versus Implantation nichtmaligner Zellen zeigt einen doppelten Anstieg. F, Die immunocytochemische Untersuchung ergibt, dass die meisten toten Zellen NeuN-positiv und damit Neurone sind. Dargestellt ist der Durchschnitt  $\pm$  SEM,  $P < 0,05$  (Mann Whitney U-test).

In weiteren *High Pressure Liquid Chromatography* Analysen wurde das Medium von verschiedenen Gliomzellen und Kontrollzellen *in vitro* und im OGIM untersucht. Dabei konnte die exzitatorische Aminosäure Glutamat identifiziert werden. So

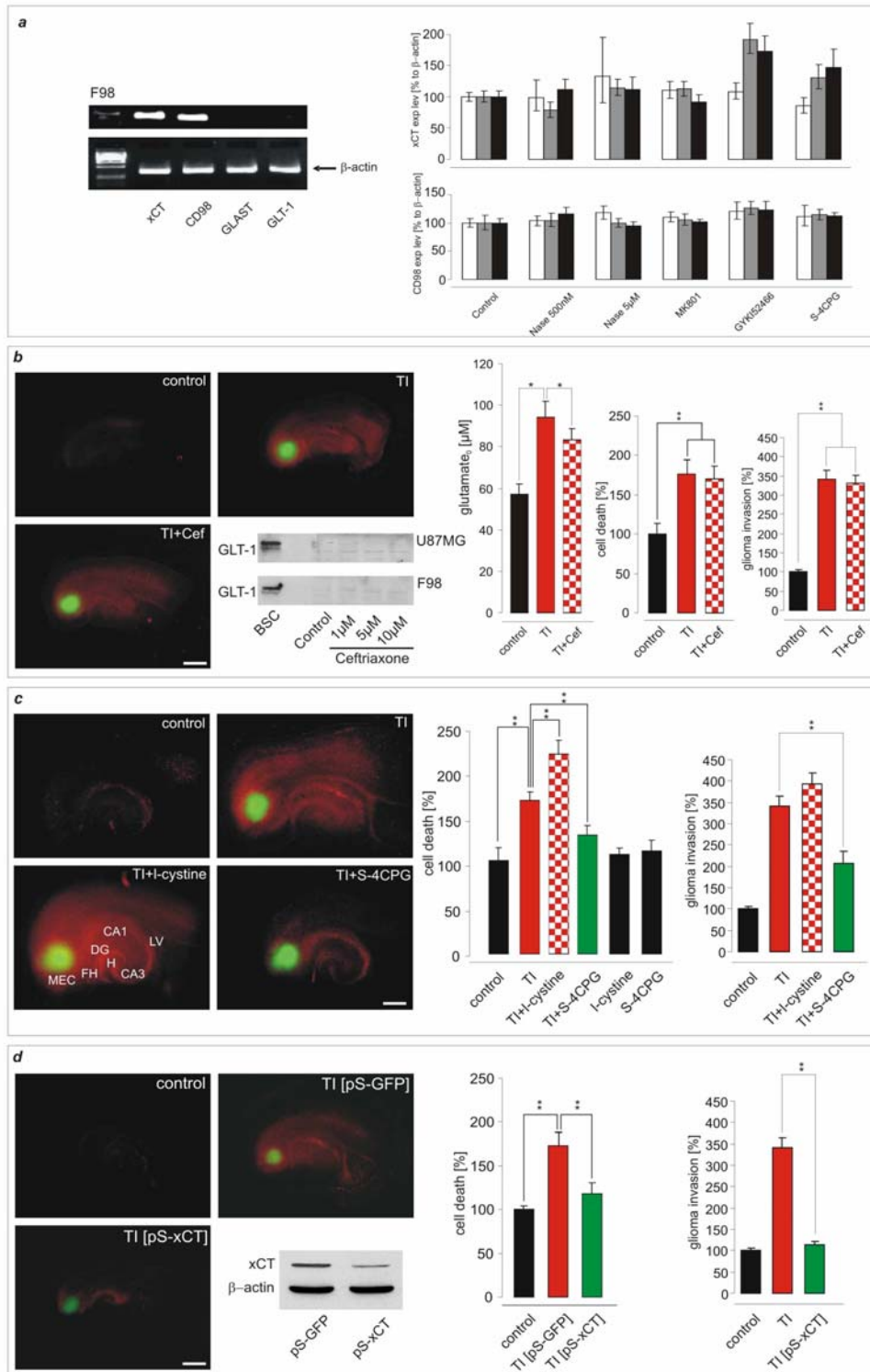
## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

sezernieren Gliomzellen massiv Glutamat in neurotoxischen Konzentrationen (bis zu 60  $\mu\text{M}$  und mehr) in den extrazellulären Raum. Die Behandlung der Glioma-transplantierten organotypischen Hirnschnittkulturen mit Selen in physiologischen Konzentrationen ergab zwei wesentliche Befunde:

- Durch die Behandlung mit Selen konnte der neurotoxische Effekt von Gliomzellen und damit der neuronale Zelltod signifikant reduziert werden und
- die Invasion von Gliomen ins Parenchym reduziert und zum Regress gebracht werden.

Bei der weiteren Analyse der Glutamatsekretion in Gliomzellen identifizierten wir den Cystine/Glutamat Transporter xCT als essentiellen Plasmamembran Antiporter. So verwenden Gliomzellen diesen Antiporter, um Glutamat im Austausch von Cystine zu sekretieren. Das Cystine selbst dient den Gliomzellen dabei als Metabolit zur Glutathionsynthese, das durch den erhöhten Metabolismus verstärkt benötigt wird. Wir bedienten uns eines *loss-of-function* Ansatzes und deletierten den xCT Transporter mittels small interference RNA. Dabei zeigten Gliomzellen mit reduzierter xCT Expression eine verringerte Glutamatsekretion und keinen peritumoralen Zelltod im OGIM (**Abb. 8**). Weiterhin zeigte sich die genetische und pharmakologische Inhibition des xCT effektiv in der Reduktion der Gliomazellproliferation. Selen selbst wirkt über die Inhibition des xCT Transporters neuroprotektiv.

Figure 4 - Savaskan et al.



**Abb. 8 (aus Savaskan et al., 2005): Interferenz mit der Glutamatsekretion und der Knock down des xCT Transporters inhibieren den Glioma-induzierten Zelltod und die parenchymale Invasion.** A, Real time RT-PCR Expressionanalyse der Glutamat Transporter in Gliomzellen nach 12, 24 und 36 Stunden. B, Gliomzellen (in grün) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Ceftriaxone behandelt und der Zelltod konsekutiv mit Propidium Iodid (in rot) gemessen. C, Blockade der Glutamatsekretion durch Gabe vom xCT

## **Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem**

Antagonisten S4CPG verhindert den Tumor-induzierten Zelltod. D, small interference RNA gegen xCT inhibiert den peritumoralen Zelltod und die Tumorinvasion. Im Immunoblot sind die Proteinmengen von xCT in Gliomzellen nach Transfektion mit Kontroll siRNAs (pS-GFP) und mit der xCT-spezifischen siRNA (pS-xCT) dargestellt. Dargestellt ist der Durchschnitt  $\pm$  SEM,  $P < 0,05$  (Mann Whitney U-test).

Es konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass Gliome Glutamat in neurotoxischen Konzentrationen sekretieren. Der peritumorale Zelltod ist somit wesentlich durch die glutamatvermittelte Exzitotoxizität induziert. Weiterhin liess sich der Transporter xCT für die Glutamatsekretion identifizieren. Die pharmakologische und genetische Inhibition des xCT Transporters führte zu einer signifikanten Reduktion des peritumoralen Zelltods und einer Reduktion der Tumorinvasion. Das essentielle Spurenelement Selen kann in physiologischen Konzentrationen den Tumor-induzierten Zelltod verhindern. Weiterhin wirkt Selen über die xCT Expression und reduziert die Proliferation von Gliomen. Mit diesen Befunden bietet sich eine neue therapeutische Option in der Behandlung von primären Hirntumoren, bei der die Blockierung der Tumorinvasion und des peritumoralen Zelltods im Vordergrund steht.

## 2.2. Myelin als Inhibitor axonalen Auswachsens

### 2.2.1. Verteilung von Myelin im Hippocampus

Meier et al., Cell Mol Life Sci, 61, 1082 – 1094, 2004

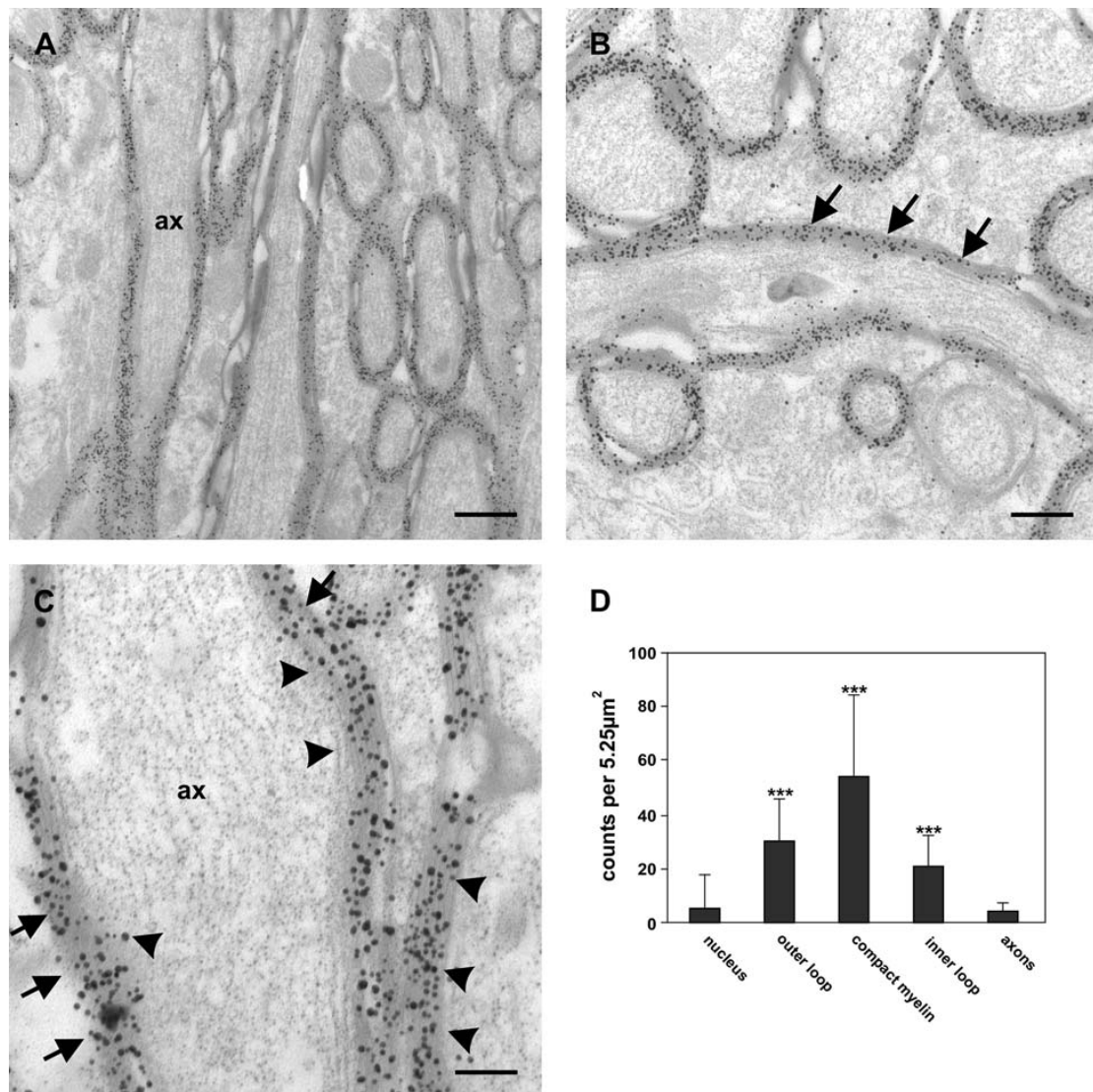
In dieser Arbeit wurde die Verteilung von myelinisierten Axonen im sich entwickelnden Hippocampus mit Hilfe eines neuen Farbstoffes untersucht. Myelin ist essentiell für die Stabilisierung und Funktion von Axonen im ZNS. Nichtsdestotrotz wirken Myelinkomponenten als Wachstumsbarrieren auf auswachsenden Axone. So wird Myelin zu den entscheidenden Faktoren für das Fehlen axonaler Regeneration im ZNS gezählt. Da jedoch im Hippocampus als eines der wenigen Regionen des adulten ZNS noch ein hohes Mass an axonaler Plastizität existiert und darüber hinaus die Kenntnisse zur Myelinisierung nur ungenügend sind, bestand der Bedarf zu einer detaillierten und systematischen Analyse.

Wir etablierten und optimierten den neuen, auf Goldchlorid basierenden Farbstoff Black Gold. So färbt Black Gold spezifisch Myelin an, während Neurone und Mikroglia sowie Astrozyten ungefärbt bleiben. Auch zeigen Organe, die keine Myelin-assoziierte Proteine exprimieren, keine Black Gold-positiven Strukturen. Mittels Trypsin und Proteinase-K Verdau von Hirnschnitten konnten wir weiter zeigen, dass Black Gold im Unterschied zu in der Routine verwendeten Myelinfarbstoffen wie Luxol Fast Blue eine spezifische Affinität zu proteinergen Anteilen des Myelins besitzt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass Black Gold im gleichen Masse innere und äussere Schichten sowie kompaktes Myelin anfärbt (**Abb. 9**).

So lassen sich die ersten myelinisierten Axone im Hippocampus zum ersten Mal in der zweiten postnatalen Woche licht- und elektronenmikroskopisch nachweisen. In der weiteren Entwicklung kommt es zur Zunahme von myelinisierten Axonen. Am postnatalen Tag 25 dann ist das Verteilungsmuster und die Densität der Myelinisierung vergleichbar zu der im adulten Stadium. Interessanterweise identifizierten wir in ultrastrukturellen Analysen im Stratum lucidum der CA3 Region myelinisierte Fasern (**Abb. 9**). Diese Region ist bisher als myelin-freie Zone bekannt gewesen, die durchzogen wird vom Moosfasertrakt. Diese Beobachtung lässt die

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Annahme zu, dass möglicherweise myelinisierte Axone aus anderen Regionen durch das Stratum lucidum ziehen. Weiterhin fanden wir viele myelinisierte Axone im Hilus, so dass möglicherweise ein Teil der Körnerzellaxone und damit des Moosfasertrakts doch myelinisiert ist. Da an dieser Stelle der Ursprung der myelinisierten Fasern nicht eindeutig beantwortet werden kann, bleibt es in stereotaktischen Traceranalysen in Kombination mit der Myelindetektion zu beweisen, ob der Moosfasertrakt myelinisiert ist.

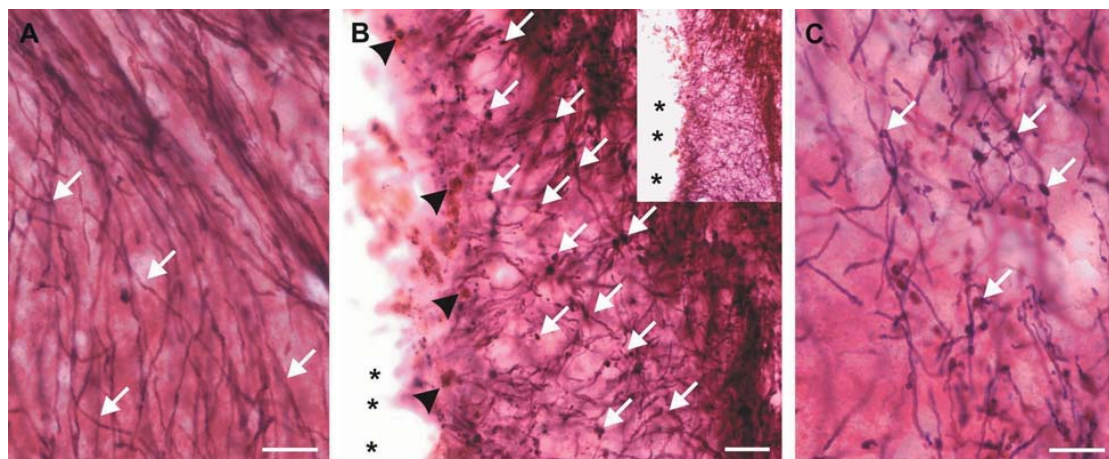


**Abb. 9 (aus Meier et al., 2004): Ultrastrukturelle Analyse der Myelinverteilung im Hippocampus mittels Black Gold. A,** Übersicht der Verteilung von Black Gold Partikeln im Hilus. Zellkörper zeigen keine Partikel. **B,** Black Gold Partikel Verteilung im Stratum radiatum der CA3 Region. **C,** Ausschnittsvergrößerung aus der Hilusregion. Die Black Gold Partikel sind spezifisch verteilt an Myelinschichten. Pfeile markieren die äusseren Schichten

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

des Myelins, Pfeilspitzen markieren die innere Schicht des Myelins und dem Axonlemma. **D**, Quantifizierung der Anzahl von Black Gold Partikeln in verschiedenen subzellulären Kompartimenten (im Nukleus, Axoplasma, innere und äussere Schicht des Myelins, kompaktes Myelin). Abk.: ax, Axon. Statistische Differenzen sind mit Sternen markiert (Durchschnitt  $\pm$  SD, \*\*\*P < 0.001, Mann-Whithney U-test). Massstab in A: 5  $\mu$ m; in B: 3  $\mu$ m; in C: 0,6  $\mu$ m.

Die Black Gold Analyse nach stereotaktischer Axotomie ergab das Auftreten von pathologischen Myelinstrukturen, den sogenannten *retraction bulbs* (**Abb. 10**). In Zeitverlaufsanalysen zeigte sich ferner, dass es zu einem langanhaltenden Verlust des Myelins kommt. Die quantitative Auswertung des Myelins und der Myelinabbauprodukte nach verschiedenen Schädigungszeitpunkten ergab, dass eine enge Korrelation zwischen der Degenerations- und Regenerationsphase mit Zunahme der Myelinfasern besteht.



**Abb. 10 (aus Meier et al., 2004): Läsionsinduzierte Myelinpathologien dargestellt mit Black Gold.** A, Eine Vergrösserung des entorhinalen Cortex einer adulten Kontrolle. Die Pfeile weisen auf die scharf umgrenzten myelinisierten Axone. B, Zehn Tage nach entorhinaler Cortex Läsion tauchen sogenannte *retraction bulbs* (Pfeile) in der Region der Läsion auf. Die korrespondierende Übersicht ist als Insert rechts oben gegeben. C, Ausschnittsvergrösserung aus B. Pfeilspitzen markieren invadierende Blutzellen, Sterne markieren die Seite der Läsion. Massstab in A: 10  $\mu$ m; in B: 21  $\mu$ m; in C: 7  $\mu$ m.

Im Unterschied zur Axotomie ergab die elektrokonvulsive Krampfinduktion eine kürzere Demyelinierungs- und schnellere Remyelinisierungsphase. Diese Daten beschreiben in systematischer Weise die Myelinisierung des Hippocampus während



der Entwicklung und nach Axotomie. Die Myelinisierung erfolgt in einer zeitlich geordneten Abfolge. Weiterhin kommt es zu einer Demyelinisierung nach unterschiedlichen Insulten wie Axotomie und Krampfanfällen. Die Remyelinisierung korreliert zeitlich mit der Phase des axonalen Aussprossens. Mit dem neuen Black Gold Farbstoff lässt sich zusammenfassend sagen, dass hiermit eine sensitive und für lichtmikroskopische sowie elektronenmikroskopische Analysen valide Methode vorliegt, die hochaffin für proteinerge Komponenten des Myelins ist.

### **2.2.2 Die Rolle von Myelin beim axonalen Wachstum**

**Savaskan et al., *Eur J Neurosci*, 11, 316 – 326, 1999**

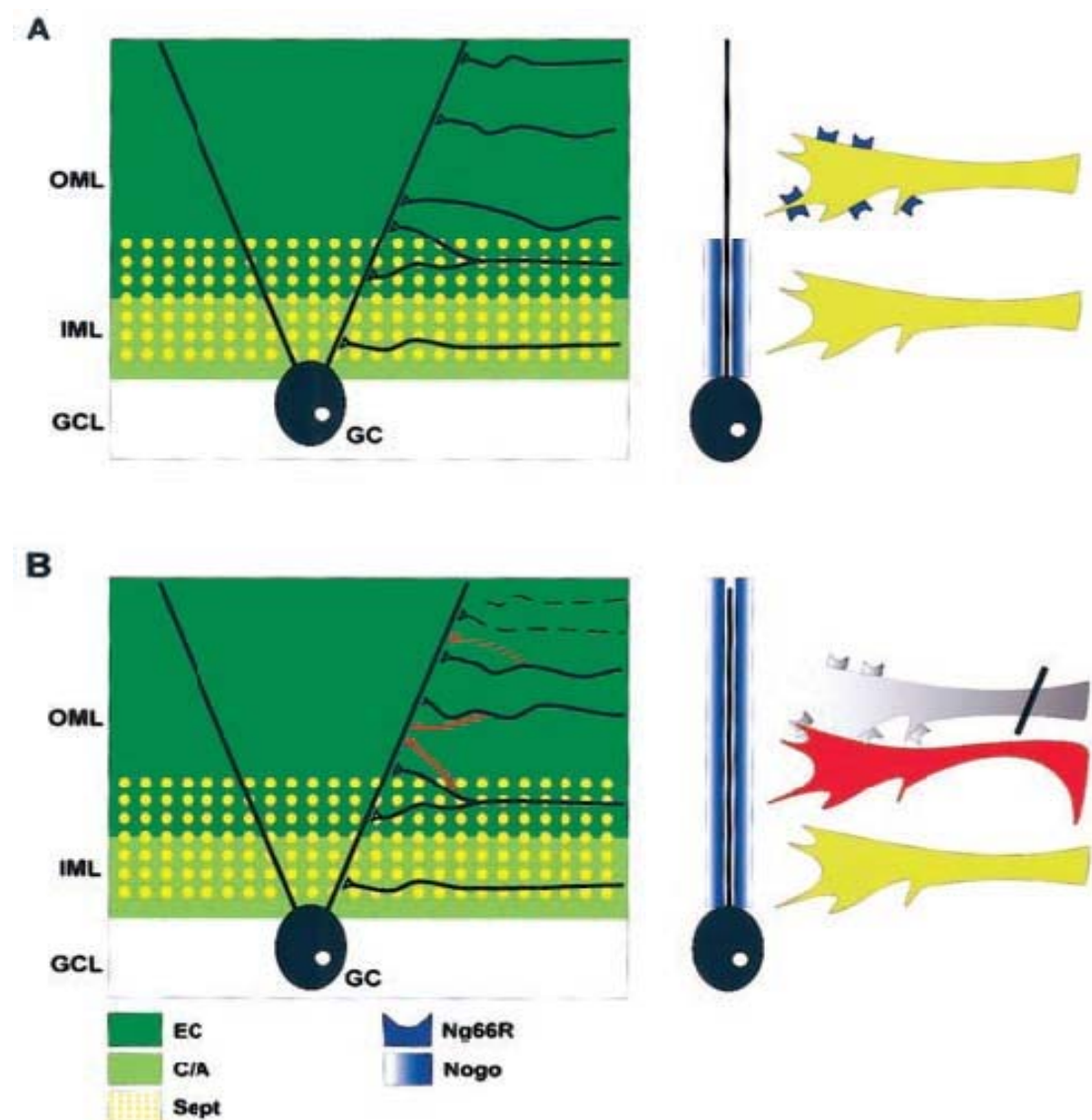
**Meier et al., *FASEB J*, 17, 1153 – 1155, 2003**

In initialen Experimenten mit dem Streifenauswachsassay wurden die Auswachseigenschaften von Axonen des ZNS auf Myelin und myelinfreien Membranen hin getestet. Dabei zeigte sich, dass Myelin ein starker Auswachs-inhibitor für Neurone des ZNS darstellt. Wurde jedoch das Myelin durch physikalische Separation aus der Membranfraktion von adultem Hirngewebe entfernt, bildete die verbliebene Membranpräparation ein gutes Auswachssubstrat für Axone (Savaskan et al., 1999). Mit dem IN-1 Antikörper, der Nogo-A neutralisiert, konnte weiterhin der auswachsinhibitorische Effekt des Myelins komplett aufgehoben werden.

Die Frage stellte sich, ob Myelin und damit Nogo-A auch das zielgerichtete Auswachsen von Axonen beeinflussen kann. Im Streifenassay zeigte sich, dass Myelin zwar die Länge der auswachsenden Axone beeinflusst, nicht jedoch deren direktionales Wachstum. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Myelin einen generell inhibitorischen Effekt auf Axone mit der Eigenschaft besitzt, axonales Wachstum zu verlangsamen oder gar komplett zu inhibieren, jedoch ohne die Eigenschaft, Axonen eine direktionale Information zu geben. Die Spezifität kann jedoch auch durch die differentielle Präsenz des Rezeptors selbst bestimmt sein, da nur solche Neurone auf Myelin responsiv sind, die auch den Rezeptor (Nogo-66R) selbst exprimieren (GrandPre et al., 2001). So analysierten wir die Expression der Nogo Transkripte und deren Rezeptor Nogo-66R im sich entwickelnden und adulten ZNS. Die Transkripte

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

für Nogo-A, Nogo-B und Nogo-66R sind schon vor Beginn der Myelinisierung postnatal präsent, während Nogo-C erst spät postnatal exprimiert wird. Im murenen ZNS sind alle Nogo Transkripte sowie der Nogo-66 Rezeptor exprimiert. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass Nogo-A nicht nur von Myelin-produzierenden Oligodendrozyten exprimiert wird, sondern auch von Neuronen. Nach Axotomie im ZNS zeigen alle Nogo Transkripte eine isoform-spezifische temporale Expressionsregulation im Sinne einer Hochregulation. Im Gegensatz zeigt der Nogo66-Rezeptor eine transiente Erniedrigung nach Schädigung. Nach Kainat-induzierten Krampfanfällen zeigt Nogo-A eine Hochregulation in neuronalen Zellen. Diese Resultate unterstützen die Hypothese, dass Nogo über die wachstumshinhibitorische Funktion hinaus möglicherweise bei der Entwicklung und Formation neuronaler Schaltkreise eine Rolle im ZNS spielt (**Abb. 11**).



**Abb. 11 (aus Meier et al., 2003): Hypothese zur Nogo Regulation nach ZNS Schädigung.**  
**A**, Durch die differentielle Expression von Nogo-A und Nogo66 Rezeptor auf Axonen und Dendriten könnte die schichten-spezifische Innervation zustande kommen. **B**, Nach einer Schädigung kommt es zum regenerativen Auswachsen von Axonen, die möglicherweise keinen Nogo66R exprimieren. Dadurch sind die Axone nicht mehr responsiv auf den Liganden, der verstärkt in der Zielregion exprimiert wird. So kann erklärt werden, warum nur einige Axone überhaupt wieder auswachsen, während andere nach einer Schädigung retrahieren.

## 2.3 Die Rolle der Plasticity Related Gens im ZNS

### 2.3.1 Identifizierung der Plasticity Related Gens

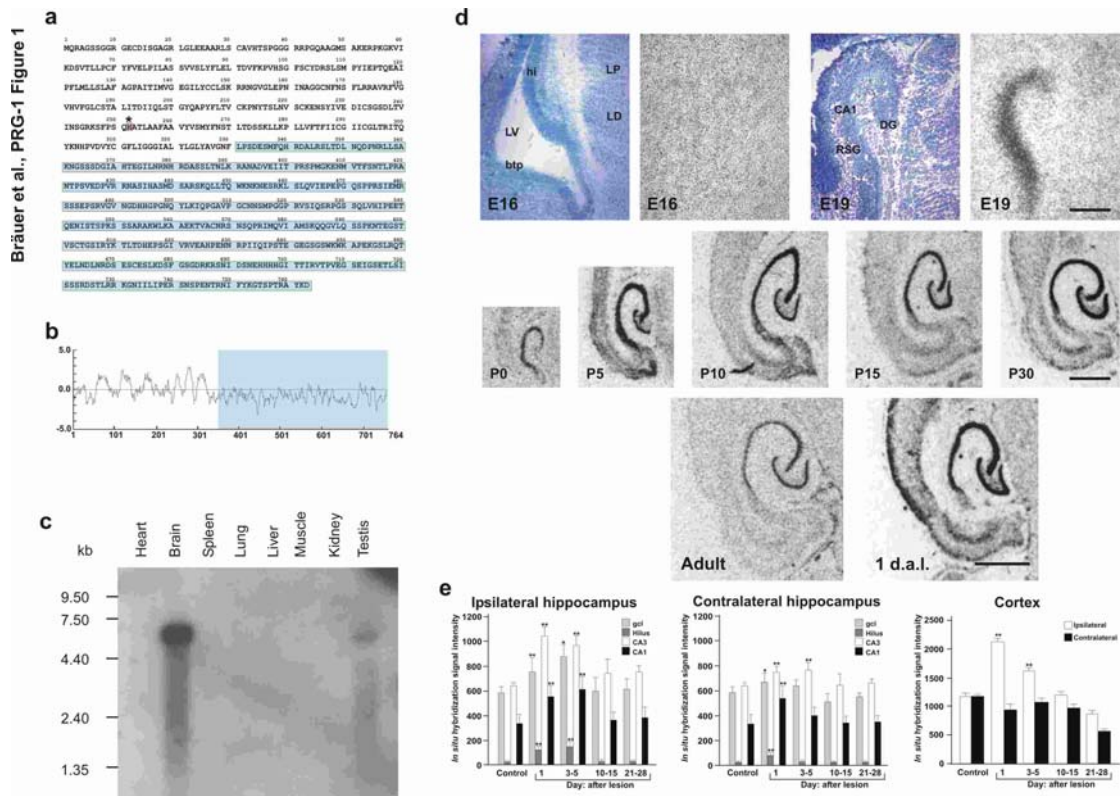
Savaskan et al., *Eur J Neurosci*, 12, 1024 – 1032, 2000

Bräuer & Savaskan et al., *Nature Neurosci*, 6, 572 – 578, 2003

Die Analyse der Auswachseigenschaften von Membranproteinen im Hippocampus ergab, dass nach Schädigung im adulten ZNS auswachsfördernde und Zielerkennungsmoleküle reexprimiert werden (Savaskan et al., 2000). Aufgrund dieser Befunde wurde eine cDNA Bibliothek aus mRNAs von geschädigten Hippocampi angelegt und nach differentiell exprimierten Genen gescreent. Wie unter Punkt 1.4 beschrieben, wurde mit folgenden Kriterien die Gruppe der Kandidatengene weiter eingegrenzt:

- **membranständiges Protein**
- **ZNS-spezifische Expression**
- **läsionsregulierte Expression**
- **entwicklungsabhängige Expression**
- **neue, noch nicht bekannte Sequenz.**

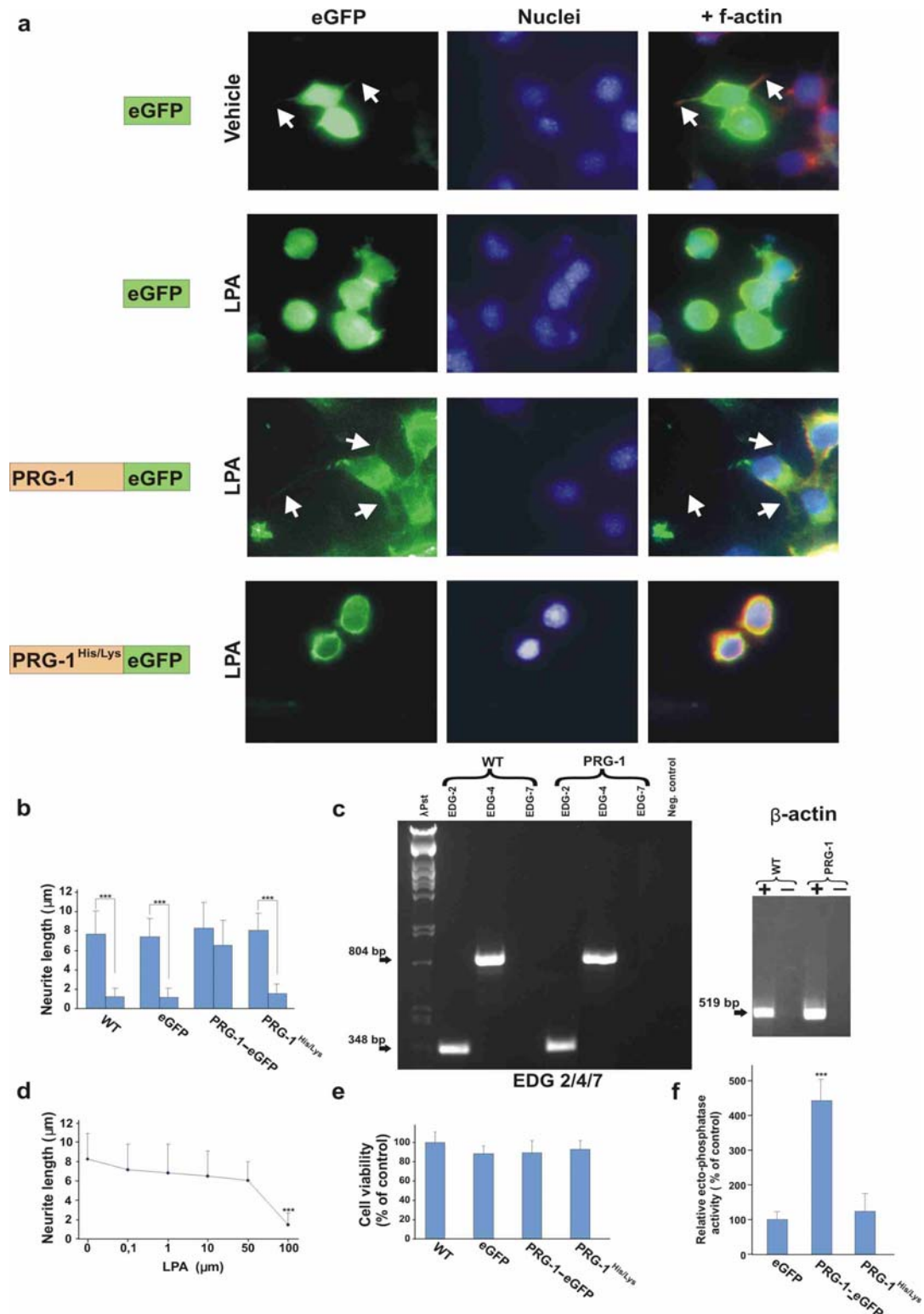
Hierbei identifizierten wir eine neue Genfamilie, die alle Kriterien erfüllte und deswegen von uns Plasticity-Related Genes (PRGs) genannt wurde. PRG-1 ist ein 764 Aminosäuren langes Membranprotein mit Homologien zu den Lipid Phosphat Phosphatasen (**Abb. 12**). Es wird nach Schädigung im ZNS auf wieder auswachsenden Axonen exprimiert (**Abb. 12**). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben weiterhin, dass PRG-1 in Wachstumskolben von auswachsenden Axonen zu finden ist.



**Abb. 12 (aus Bräuer & Savaskan et al., 2003): Identifizierung von PRG-1 im ZNS und die Regulation nach Schädigung.** A, B, Die humane PRG-1 Sequenz (GenBank acc. no.: AF51281). Die ersten 300 aa sind hochkonserviert während der C-Terminus (blau markiert) keine Homologie zu bekannten Proteinen zeigt. C, Northern Blot Analyse von PRG-1 mRNA in verschiedenen Organen. D, PRG-1 mRNA Verteilung im sich entwickelnden und geschädigten Hippocampus. E, Statistische Auswertung der PRG-1 mRNA Expression im Hippocampus und Cortex nach Läsion (dal = days after lesion). (Durchschnitt  $\pm$  SD, \*\*\*P < 0.001, Two Tailed t-test). Masstab in D E19: 850  $\mu$ m; in P30: 740  $\mu$ m; in 1 d.a.i.: 500  $\mu$ m.

Aufgrund der Homologien zu den Lipid Phosphat Phosphatasen war anzunehmen, dass auch PRG-1 katalytisch aktiv ist und Phospholipide wie Lysophosphatidylsäure (LPA), Sphingosine-1-Phosphat (S1P) oder Phosphatidatsäure (PA) dephosphorylieren kann. So wurde die Wirkung von LPA auf Neurone hin getestet. Hierbei zeigte sich, dass LPA eine starke Retraktion in Neuronen auslöst und zum Axonkollaps innerhalb von Minuten führt (**Abb. 13**). Die Überexpression von PRG-1 in diesen Zellen jedoch verhinderte die LPA-induzierte Retraktion und Axone blieben in ihrer Morphologie unverändert. Um auszuschliessen, dass es sich bei diesem Effekt um einen Artefakt oder einen indirekten Effekt der PRG-1 Überexpression handelt, testeten wir die LPA Rezeptorexpression vor und nach PRG-1 Transfektion. Dabei zeigte sich, dass PRG-1 die LPA Rezeptorexpression nicht

verändert (Abb. 13). Auch war die Zellvitalität durch PRG-1 Überexpression nicht alteriert.



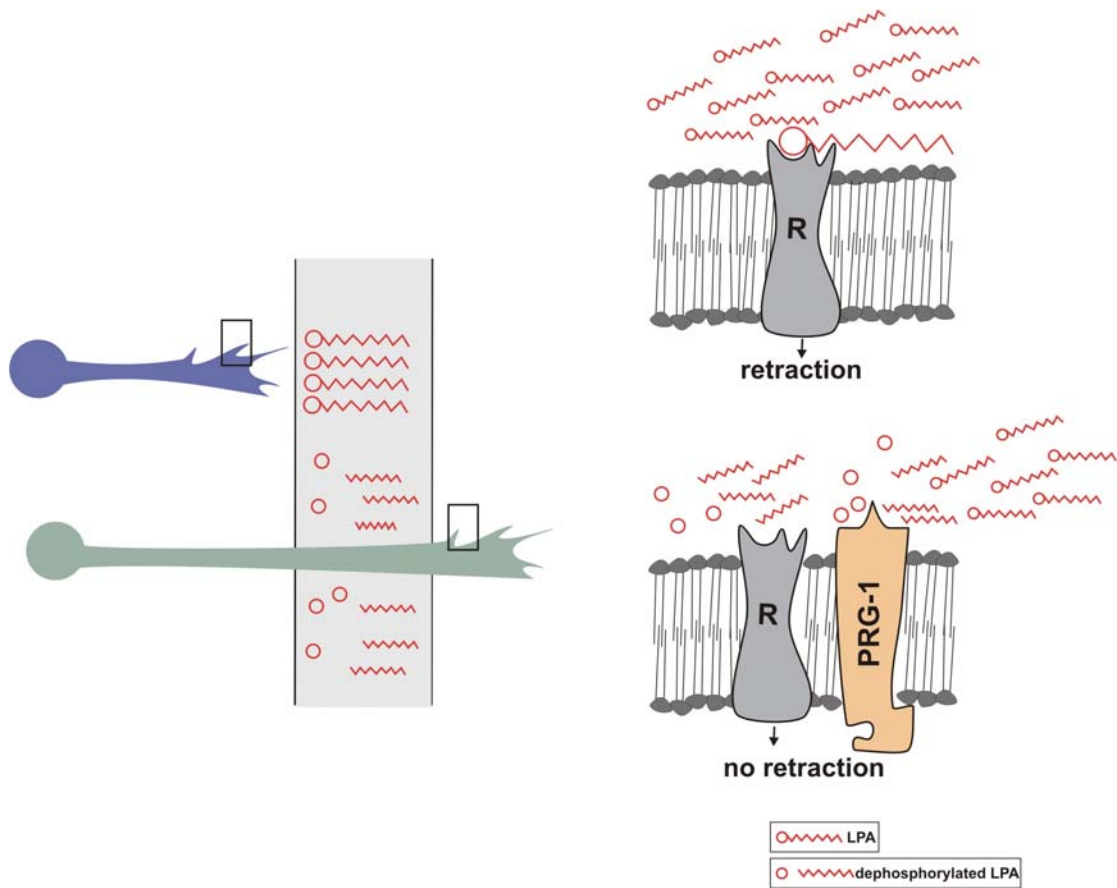
**Abb. 13 (aus Bräuer & Savaskan et al., 2003): PRG-1 schützt vor LPA-induziertem Axonkollaps. A, B, Axonkollapsassay in neuronalen Zellen, die mit dem Kontrollvektor, PRG-1 und der punktmultierten PRG-1 Variante transfiziert wurden. C, RT-PCR Analyse der**

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

LPA Rezeptorexpression. **D**, Dosis-Wirkungskurve von LPA in PRG-1 exprimierenden Zellen. **E**, Zellvitalitätsmessung in PRG-1 exprimierenden Zellen. **F**, Ecto-Phosphatase Assay in intakten Zellen, die GFP, PRG-1 und die PRG-1 Mutante exprimieren (Durchschnitt  $\pm$  SD, \*\*\*P < 0.001, Two Tailed t-test).

Aufgrund dieser Befunde und den Homologien zu den bona fida Lipid Phosphat Phosphatasen nahmen wir an, dass PRG-1 möglicherweise direkt auf LPA wirkt und so die Rezeptoraktivierung verhindert. Um dies experimentell zu beweisen, verwendeten wir den Kollapsassay sowie die biochemische Analyse. So zeigte sich, dass die punktmutierte PRG-1 Variante, bei der das putative katalytische Zentrum durch Austausch des Histidins zu Lysin zerstört wurde, den LPA-induzierten Kollaps nicht verhindern konnte (**Abb. 13**). Im sogenannten Ectophosphatase Assay wurde weiterhin die Dephosphorylierung von radioaktiv markiertem LPA in Kontrollen und PRG-1 transfizierten Zellen gemessen. PRG-1 exprimierende Zellen zeigten hierbei eine vierfach höhere Dephosphorylierungsaktivität zu den Kontrollen. Die punktmutierte PRG-1 Variante zeigte in diesen Assays keine signifikante Hydrolyseaktivität zu Kontrollzellen (**Abb. 13**).

Damit konnten wir ein bis dahin unbekanntes Membranprotein beschreiben, dass während der Entwicklung und nach Schädigung im ZNS auf Axonen exprimiert wird. Weiterhin wiesen wir nach, dass LPA ein starker Wachstumsinhibitor für ZNS Neurone darstellt und in hohen Konzentrationen einen Axonkollaps induziert. PRG-1 kann diesen LPA-induzierten Axonkollaps durch eine Ectophosphataseaktivität verhindern. Durch Zerstörung des katalytischen Zentrums verliert PRG-1 seinen Axon-schützenden Effekt. Dies stellt einen neuen Mechanismus des axonalen Wachstums dar bei dem Axone in der Lage sind, den lokalen LPA Spiegel zu kontrollieren und damit die wachstumsinhibitorische Umgebung des Extrazellulärraums zu überkommen (**Abb. 14**). Erste Experimente mit den isolierten C-terminus von PRG-1 deuten jedoch auch darauf hin, dass PRG-1 intrazellulär in die RhoA Kaskade eingreift und damit den Axonkollaps verhindern kann (N. Savaskan, unveröffentlichte Daten).



**Abb. 14 (aus Bräuer & Savaskan et al., 2003): Ein neues Regenerationskonzept für auswachsende Axone.** Auswachsende Axone treffen auf eine inhibitorische Umwelt, die als Wachstumsbarriere fungiert. Dies sind proteinerge Liganden oder Lipide, die rezeptorvermittelt axonales Wachstum verlangsamen oder gar zum Stoppen und Kollabieren bringen. Im Falle von PRG-1 exprimierenden Neuronen jedoch sind Axone zumindest gegen LPA resistent und können somit LPA-reiche Regionen, wie sie nach einer Schädigung auftreten, durchbrechen und so zu ihrer Zielregion wieder gelangen. Die Wachstumsförderung erfolgt über die Verhinderung der Rezeptoraktivierung extrazellulär. Erste Daten deuten jedoch auch darauf hin, dass PRG-1 in die RhoA Kaskade eingreift und somit den Axonkollaps verhindert (N. Savaskan, unveröffentlichte Daten).



### 2.3.2 Die Familie der Plasticity Related Gens und axonales Auswachsen

Savaskan et al., *Eur J Neurosci*, 19, 212 – 220, 2004

Savaskan et al., *Eur J Neurosci*, in revision, 2005

Mit der Entdeckung von PRG-1 ging die Jagd nach neuen Mitgliedern der Plasticity-Related Genes (PRGs) weiter. Durch *in silico* Analysen wurden drei homologe humane expressed sequence tags (ESTs) entdeckt und mittels degenerierter Primer RT-PCR kloniert (PRG-2, 3 und 4). Auffallend an den beiden neuen PRG Mitgliedern PRG-3 und PRG-4 ist deren relativ kurzer C-terminale Schwanz im Vergleich zu PRG-1 und PRG-2 (**Abb. 15**). PRG-3 ist am stärksten im ZNS exprimiert, wobei sich auch Transkripte in der Leber, Niere und im Hoden nachweisen lässt. Die nähere Analyse von PRG-3 im ZNS ergab, dass dieses Gen entwicklungsabhängig exprimiert wird und schon am Embryonaltag 16 vorliegt. Die stärkste Expression liegt in der Zeit um Embryonaltag 17 bis zur ersten postnatalen Woche.

**Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem**

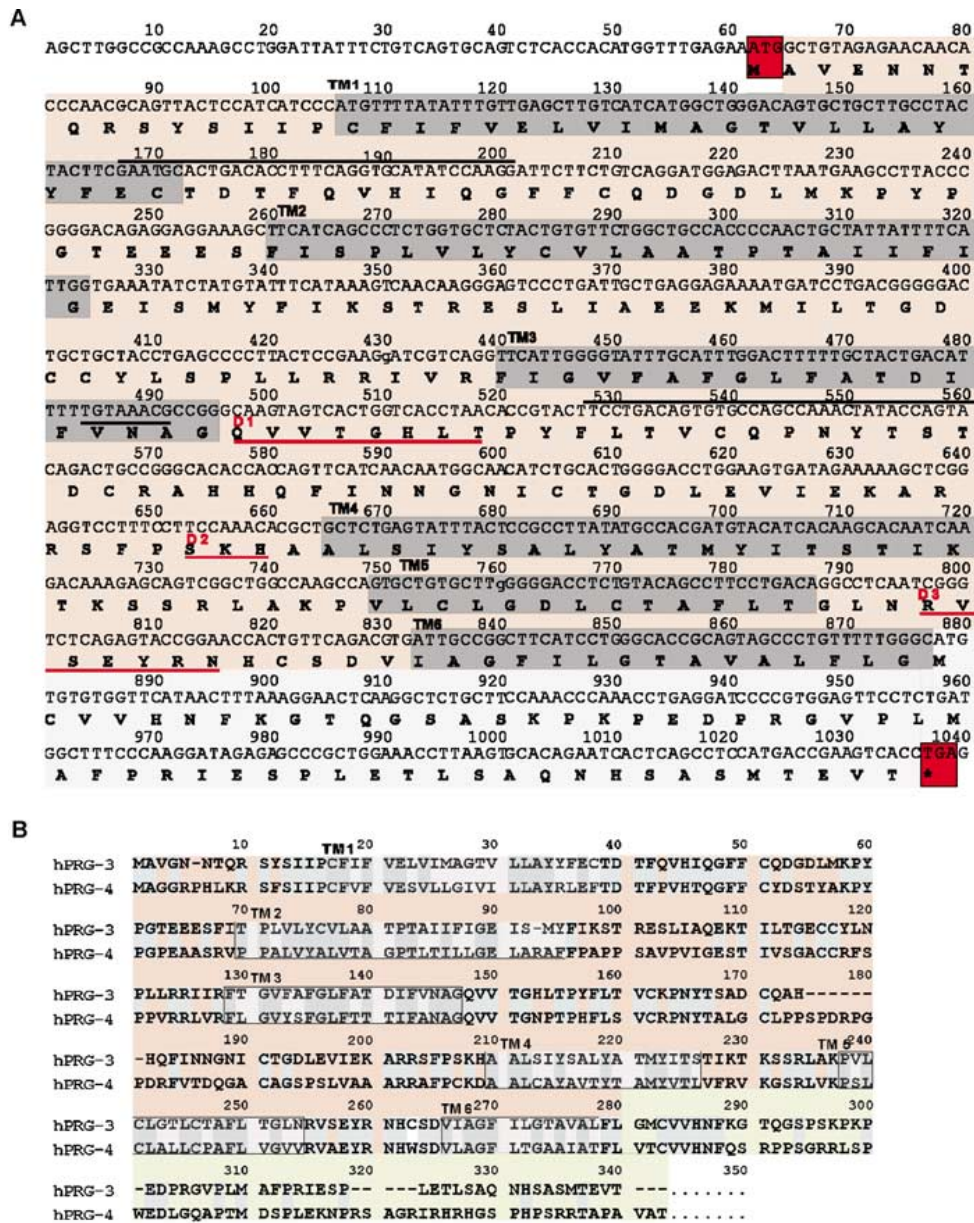


Abb. 15 (aus Savaskan et al., 2004): Die Aminosäuresequenz von PRG-3 (GenBank acc. no.: AY299399). **A**, Die Aminosäuresequenz von PRG-3 der Ratte. Start und Stopcodons sind mit roten Boxen markiert. Die *in situ* Hybridisierungssonde ist mit einem schwarzen Strich gekennzeichnet. **B**, Die humanen Sequenzen von PRG-3 und PRG-4. **C**, Hydropathieplot von PRG-3 mit Hilfe des Kyte-Doolittle Algorithmus. Der C-terminale

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Schwanz ist in blau markiert. **D**, Phylogenetischer Stammbaum der Plasticity-Related Gene Familie und der bona fida Lipid Phosphat Phosphatasen.

Nach einer exzitatorischen Stimulation mit Kainatsäure, einem Glutamat Agonisten, wird PRG-3 transient reprimiert. Dieser Prozess erfolgt sechs Stunden nach Stimulation. Die Expression erreicht wieder Kontrollniveau fünf Tage nach Stimulation. Da die *in situ* Hybridisierung auf eine neuronale PRG-3 Expression hindeutete, wurde die Prozessierung von PRG-3 *in vitro* studiert. Dabei zeigte sich, dass PRG-3 in neuronalen Ausläufern zu finden ist (**Abb. 16**). Darüber hinaus induziert PRG-3 massiv die Filopodienbildung und das Neuritenwachstum. Um einen möglichen Überexpressions Artefakt auszuschliessen, wurde die PRG-3 Expression auch in nichtneuronalen Zellen getestet. Dabei zeigte sich, dass PRG-3 die Morphologie unabhängig vom Entwicklungsursprung der Zelle beeinflusst und Neuritenwachstum induziert und das Längenwachstum steigert (**Abb. 16**). Die Zellvitalität wurde durch die PRG-3 Expression nicht beeinflusst.

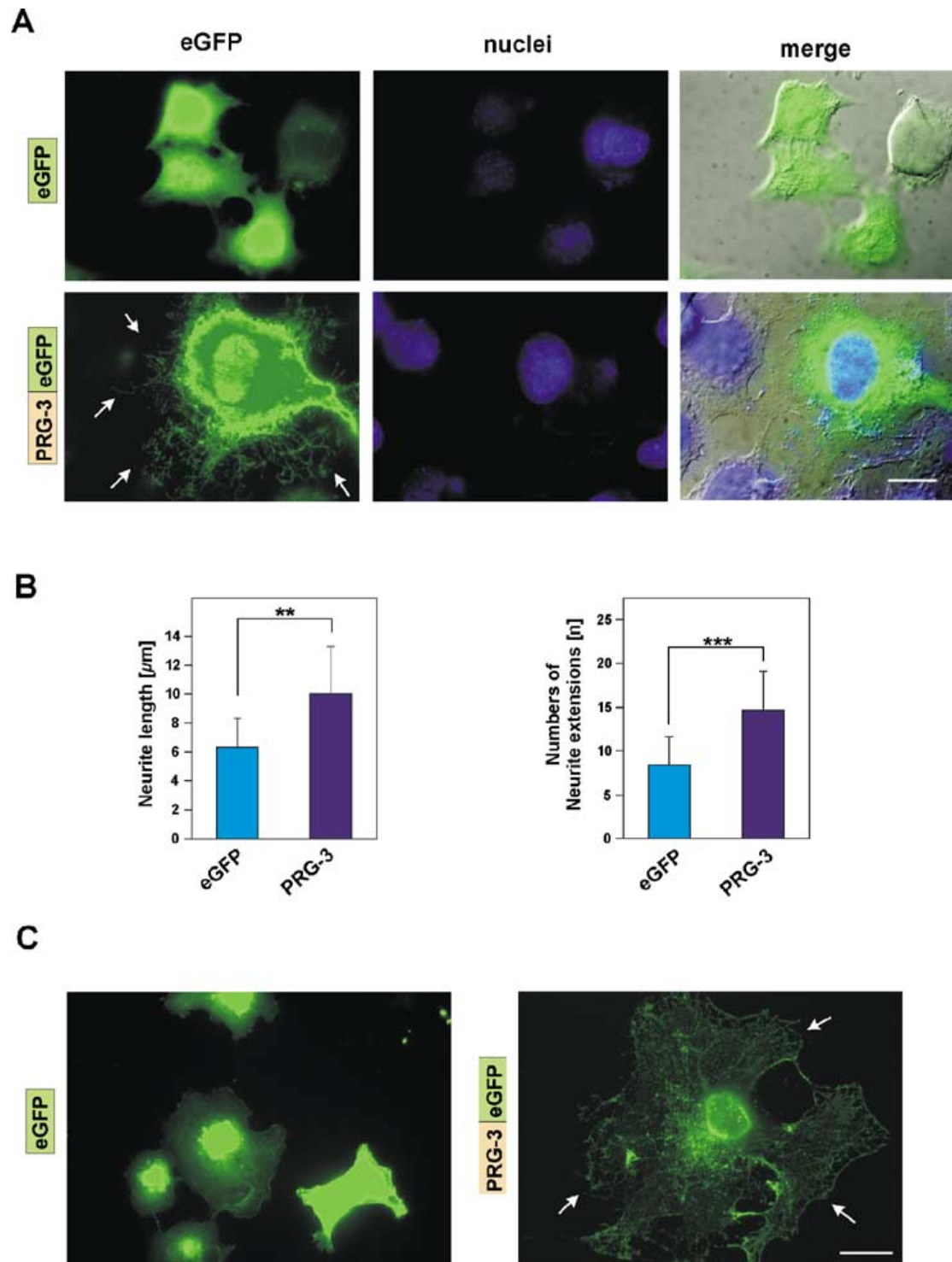
Eine wichtige Frage war, ob PRG-3 ähnlich wie PRG-1 die LPA-induzierte Signaltransduktion durch ecto-enzymatische Aktivität beeinflussen kann. In Dünnschichtchromatographischen Analysen zeigte sich, dass PRG-3 im Unterschied zu PRG-1 keine Ecto-Enzymaktivität besitzt. Die neuritenstimulierende Wirkung von PRG-3 ist also nicht auf eine mögliche Phosphatase Aktivität zurück zu führen. Diese Befunde deuten also darauf hin, dass die PRG Familie ZNS-spezifisch exprimiert wird und in neuronalen Ausläufern lokalisiert ist. Darüber hinaus stellen die PRGs eine auf die Zellmorphologie hin funktionell divergente Familie dar.

Wir sind der Frage weiter nachgegangen, den Ursprung von LPA im ZNS zu identifizieren. LPA ist ein bioaktives Signallipid, das im Serum und in der zerebrospinalen Flüssigkeit vorkommt. LPA evoziert ähnliche Reaktionen auf Zellen wie Wachstumsfaktoren. So wirkt LPA aktivierend auf Mikrogliazellen und induziert Hypertrophie und Stressfasern in Astrozyten (Ramakers & Moolenaar, 1998). Vor allem wird LPA impliziert in Prozessen wie der Neuritenretraktion, Demyelinisierung und der Inhibition von regenerativen Axonwachstum. Als zentrales Enzym zur Synthese von rezeptoraktiven LPA wurde Autotaxin identifiziert (Tokumura et al., 2002). Die Expressionsanalyse ergab, dass Autotaxin (ATX) schon frühembryonal im ZNS existiert und vornehmlich im Plexus choroideus und myelinreichen Zonen wie der Commissura anteriore und Corpus callosum lokalisiert ist. Immunocytochemische

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Analysen ergaben weiter, dass ATX spezifisch von leptomeningealen Zellen und Oligodendrozyten exprimiert wird. Neurone, Astrozyten und Mikroglia waren immunonegativ für ATX. Die weitere Untersuchung der Oligodendrozytenentwicklung ergab, dass ATX vornehmlich in NG2-positiven Oligodendrozyten exprimiert wurde, während CC1 positive Oligodendrozyten ATX negativ waren. Das bedeutet, dass ATX vornehmlich in Progenitoren der Oligodendrozytenlinie vorkommt.

Während im adulten ZNS ATX nur sehr schwach in Immunoblots vorliegt, kommt es nach einer ZNS Schädigung zu einer massiven Zunahme der ATX Expression. Zusätzlich kommt es nach einer Schädigung zu einem zellulären Wechsel der Expression: Reaktive Astrozyten exprimieren plötzlich ATX. Diese Befunde deuten darauf hin, dass unter physiologischen Bedingungen während der Hirnentwicklung ATX spezifisch von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird. Im adulten ZNS wird LPA wahrscheinlich von den Leptomeningen und dem Epithel des Plexus choroideus produziert. Diese Studie weist zusätzlich auf, dass als Folge der erhöhten ATX Expression nach Schädigung LPA erhöht im Schadenszentrum vorliegt und die axonale Regeneration behindert.



**Abb. 16 (aus Savaskan et al., 2004): PRG-3 induziert Neuritenwachstum. A, B, PRG-3 induziert Filopodien und verstärktes Neuritenwachstum. Als Kontrolle diente die Expression des enhanced green fluorescent protein (eGFP). C, PRG-3 induziert Veränderungen der Zellmorphologie in COS-7 Zellen. Statistische Unterschiede wurden mit dem Two Tailed t-test ermittelt worden (Durchschnitt  $\pm$  SD, \*\*<math>P < 0.01</math>; \*\*\*<math>P < 0.001</math>).**

### 3 DISKUSSION UND AUSBLICK

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Daten konnten die Beteiligung eines essentiellen Spurenelements bei der Neuroprotektion nachweisen und es konnte eine neue Genfamilie identifiziert werden. Damit verbunden sind hier zwei neue Konzepte der Neuroprotektion und der Regeneration im ZNS.

So kommt es nach einer Schädigung im adulten ZNS zur Axotomie von Neuronen. Dies geht einher mit der Freisetzung von Glutamat und anderen exzitatorischen Substanzen und der zielgerichteten Migration von Mikroglia und Makrophagen. So sind axotomierte Neurone sublethal geschädigt und durch die äusseren Effekte entscheidet sich, ob es zum Überleben oder zum neuronalen Zelltod kommt. In diese Kaskade werden weiterhin initial nichtbeteiligte Neurone involviert, die als Bystanders in die Aufräumreaktionen der Gliazellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Dies verursacht einen im Ausmass grösseren Schaden als der Initiale. Vor diesem Hintergrund ist der Selenmangel in einigen europäischen Regionen sowie in Nordamerika nicht irrelevant (Rayman, 2000). Epileptische Krampfanfälle bei Kindern mit reduzierten Blutselenwerten profitierten substantiell von der Selensubstitution und ihr klinischer Verfall sowie die EEG Werte besserten sich deutlich (Weber et al., 1991; Ramaekers et al., 1994). So liess sich tierexperimentell nachweisen, dass Ratten unter Selenmangel eine erhöhte Krampfanfälligkeit gegenüber Kainatsäure zeigten im Vergleich zu Kontrollratten mit normalen Selenwerten (Savaskan et al., 2003). Zusätzlich zu den Verhaltensanalysen zeigten sich auch morphologische Veränderungen. Selenmangel-Ratten hatten einen erhöhten Zellschaden und einen verstärkten Verlust von neuronalen Zellen nach exzitatorischen Insult. Eine Erklärung dieser Befunde könnte sein, dass Selendefizienz nicht nur Neurone sondern auch Gliazellen betrifft. So ist bekannt, dass die Mikroglia im aktivierten Zustand den initialen Zellschaden dramatisch erhöhen kann (Ullrich et al., 2001). Der sekundäre Schaden ist jedoch abhängig vom Ausmass des initialen Schadens. Selen selbst hat auch anti-inflammatorische Effekte und greift in den Cyclooxygenase und Lipoxygenasestoffwechsel ein und beeinflusst die Cytokinexpression (Schweizer et al., 2004). Die *in vitro* Untersuchungen ergaben

ferner, dass Selen auch nach Stunden der Schadenssetzung im nanomolaren Bereich neuroprotektiv wirkt.

Die neuroprotektiven Effekte von Selen sind weiterhin Proteinsynthese abhängig und bedürfen keiner erhöhten Glutathionmengen. So agiert Selen nicht einfach als weiterer Sauerstoffradikalfänger wie  $\alpha$ -Tocopherol oder Ebselen, sondern es bedarf einer *de novo* Proteinsynthese (Muller et al., 1984; Post et al., 1998). Die *in vivo* Experimente sowie die *in vitro* Befunde lassen also darauf schliessen, dass Selen die Expression von neuroprotektiven Selenoproteinen induziert und damit auf Ebene der Lipidperoxidation, Membranprotektion und anti-apoptotischen Signaltransduktion wirkt. Dass Selen allein die Expression von Selenoproteinen beeinflusst, ist nicht notwendigerweise so. So zeigen Untersuchungen mit kultivierten Oligodendrozyten, dass eine Selengabe die Expression von Differenzierungsmarkern verändert (Gu et al., 1997). Die laufenden Untersuchungen haben nun zum Ziel, die molekularen Mechanismen der Selen-vermittelten Neuroprotektion weiter aufzuklären und die beteiligten Proteine zu identifizieren.

Die klinische Relevanz der Befunde wird deutlich bei der Effektivität von Selen. So wirkt Selen schon in nanomolaren Dosen auch bei Glutathionmangel protektiv. Der Glutathionmangel selbst bildet die gemeinsame 'Todesstrecke' vieler neuropathologischer Prozesse wie bei der Ischämie und epileptischen Krampfanfällen. Zusammengenommen ist also die adequate Selenzufuhr eine wichtige Strategie zur Verhinderung von neuronalem Zellschaden und bietet eine neue Alternative zu den bekannten antioxidativen Substanzen.

Mit der Entdeckung der PRG Familie ist eine neue Proteinfamilie im ZNS mit auswachsfördernden Effekten nachgewiesen worden. So ist PRG-1 in Neuronen exprimiert und während der Entwicklung axonaler Verbindungen hochreguliert. Im adulten ZNS ist die PRG-1 Expression wieder reduziert. Wir konnten nachweisen, dass PRG-1 nach einer Schädigung in auswachsenden Axonen exprimiert ist und dort im Wachstumskolben lokalisiert ist. Aufgrund der Homologien von PRG-1 zu den *bona fida* Ecto-Enzymen, den Lipid Phosphat Phosphatasen, testeten wir die Wirkung von PRG-1 auf die LPA-induzierten Effekte. LPA und das LPA-synthetisierende Enzym ATX kommen im Extrazellulärraum des ZNS vor (Fukushima et al., 2000; Savaskan et al., 2005). Die Konzentration von LPA steigt weiterhin nach einer Schädigung im ZNS an und LPA induziert rezeptorabhängig einen Axonkollaps und vermittelt die Inhibition von Neuritenwachstum (Jalink et al., 1994). Die Expression

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

von PRG-1 in Neuronen schützt vor dem LPA-induzierten Kollaps. Dieser Effekt ist weiterhin abhängig von der Integrität der katalytischen Domäne. Punktmutiert man diese, dann ist das mutierte PRG-1 nicht mehr in der Lage, vor dem LPA-induzierten Axonkollaps zu schützen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass PRG-1 in der Lage ist, die LPA-Rezeptoraktivierung zu regulieren und damit die RhoA Signalkaskade zu beeinflussen. Darüber hinaus induziert PRG-3, ein weiteres Mitglied der PRG Familie, das Neuritenwachstum und steigert das Längenwachstum. Somit stellt die PRG Familie intrinsische, neuronale Auswuchsproteine dar, die die Bildung von Neuriten fördern und die LPA-vermittelte Auswachs-inhibition überkommen können.

Bevor hierbei an eine klinische Anwendung gedacht werden kann, muss weiter geklärt werden, ob die Expression von PRG-1 auch die Myelin-vermittelte Auswachs-inhibition verhindern kann. Laufende Untersuchungen beinhalten die Auswachs-analyse von PRG-1 in der Präsenz klinisch relevanter Auswachs-inhibitoren wie Nogo-A, Myelin und Thrombin. Durch die weitere Untersuchung an PRG-1 Knockout Tieren und Mäusen, die PRG-1 neuron-spezifisch verstärkt exprimieren, wird die Frage beantwortbar sein, ob PRG-1 bei der neuroregenerativen Therapie über den experimentellen Status hinaus Bestand haben wird.



## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Das ZNS ist ein komplex verschaltetes System, bei dem die sinnvollen Verbindungen zwischen den Neuronen untereinander entscheidende Voraussetzung für das Funktionieren und die höheren Leistungen sind. Eine akute Schädigung führt zum Verlust von neuronalen Verbindungen und kann schliesslich zu neuronalem Zelltod führen. Nach Abklingen der akuten Phase kommt es im ZNS nur zum spärlichen Wiederauswachsen von Axonen und damit zum dauerhaften Verlust von Funktionen. Daher ist das therapeutische Ziel, Neurone vor dem Zelltod zu bewahren und die neuronale Regeneration mit dem Ziel der Restitutio ad integrum zu fördern, und damit die verlorengegangenen Funktionen wiederzuerlangen.

So ist der Gegenstand dieser Schrift die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Zellprotektion von Selen und der Regeneration durch die neu identifizierten Plasticity-Related Genes (PRGs). Es konnte in den vorgestellten Arbeiten das Spurenelement Selen als neuroprotektive Substanz identifiziert werden, dass Neurone vor dem exzitatorischen und oxidativen Zelltod bewahrt. Selen erweist sich dabei als hochpotent. So sind schon nanomolare Konzentrationen an Selen effektiv. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Selen nicht einfach als Sauerstoffradikalfänger wirkt, sondern es zur Neuroprotektion der *de novo* Proteinsynthese bedarf. Da die neuroprotektiven Effekte von Selen in die 'Todesstrecke' vieler neuropathologischer Prozesse (wie Ischämie und epileptischen Krampfanfälle) eingreifen, ist die adequate Selenzufuhr eine wichtige Strategie zur Prävention von neuronalem Zellschaden. Darüber hinaus bietet Selen eine neue Alternative zu den Antioxidantien und könnte durch die hohe Potenz bei exzitatorischen Schäden klinische Anwendung finden.

Mit der PRG Familie wurde eine neue Proteinfamilie im ZNS mit auswachsfördernden Effekten entdeckt. Dabei zeigte sich, dass PRG-1 im sich entwickelnden und in regenerierenden Neuronen exprimiert wird und vor dem LPA-induzierten Axonkollaps schützt. LPA selbst ist im ZNS nach einer Schädigung vorhanden und inhibiert axonales Wachstum. PRG-1 ist in der Lage, die LPA-Rezeptoraktivierung zu regulieren und damit in die RhoA Signalkaskade einzugreifen. Somit können PRG-1 exprimierende Neurone die auswachsinhibitorische Umgebung überkommen und in ihr Zielgebiet wieder einwachsen. Darüber hinaus induziert PRG-

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

3, ein weiteres Mitglied der PRG Familie, das Neuritenwachstum und steigert das Längenwachstum. Weitere Untersuchungen mit genetisch veränderter PRG-1 Expression werden in Zukunft die Rolle von PRG-1 *in vivo* aufklären und die Möglichkeit einer klinischen Anwendung prüfen.

**Schlagwörter:** ZNS, neuronale Regeneration, Selen, Plasticity-Related Genes, LPA, Myelin.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

Aubert,I., Ridet,J.L., and Gage,F.H. (1995). Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 625-635.

Bahr,M. and Wizenmann,A. (1996). Retinal ganglion cell axons recognize specific guidance cues present in the deafferented adult rat superior colliculus. *J. Neurosci.* 16, 5106-5116.

Bahr M. (2000). Live or let die – retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS. *trends Neurosci* 23, 483-490.

Banati,R.B., Gehrman,J., and Kreutzberg,G.W. (1994). Glial beta-amyloid precursor protein: expression in the dentate gyrus after entorhinal cortex lesion. *Neuroreport* 5, 1359-1361.

Bandtlow,C.E. and Schwab,M.E. (2000). NI-35/250/nogo-a: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia* 29, 175-181.

Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R. Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J.* 2001 Apr;15(6):1086-8.

Beck M.A., et al., (2001). Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. *FASEB J.* 15, 1481-1483.

Beilharz,E.J., Zhukovsky,E., Lanahan,A.A., Worley,P.F., Nikolich,K., and Goodman,L.J. (1998). Neuronal activity induction of the stathmin-like gene RB3 in the rat hippocampus: possible role in neuronal plasticity. *J. Neurosci.* 18, 9780-9789.

Benowitz,L.I., Rodriguez,W.R., and Neve,R.L. (1990). The pattern of GAP-43 immunostaining changes in the rat hippocampal formation during reactive synaptogenesis. *Brain Res. Mol Brain Res.* 8, 17-23.

Birringer M., Pilawa S., and Flohe L., (2002). Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.* 19, 693-718.

Bovolenta,P., Fernaud-Espinosa,I., Mendez-Otero,R., and Nieto,S. (1997). Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur. J. Neurosci.* 9, 977-989.

Braak,H. and Braak,E. (1990). Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in cases of presenile and senile dementia. *Acta Neuropathol. (Berl)* 80, 479-486.

Bradbury E.J., Moon L.D., Popat R.J. et al. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord lesion. *Nature* 416, 636-640.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Brauer,A.U., Savaskan,N.E., Plaschke,M., Prehn,S., Ninnemann,O., and Nitsch,R. (2000). IG-molecule Kilon shows differential expression pattern from LAMP in the developing and adult rat hippocampus. *Hippocampus* 10, 632-644.

Brauer,A.U., Savaskan,N.E., Plaschke,M., Ninnemann,O., and Nitsch,R. (2001). Perforant path lesion induces up-regulation of stathmin messenger RNA, but not SCG10 messenger RNA, in the adult rat hippocampus. *Neuroscience* 102, 515-526.

Bräuer AU, Savaskan NE\*, Kühn H, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R. (2003). The novel phospholipid PRG-1 is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nature Neurosci* 6, 572-8.

Brauer AU, Savaskan NE. (2004). Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element. *Rev Neurosci.* 15, 19-32.

Brown M.R., Cohen H.J., et al. (1986). Proximal muscle weakness and selenium deficiency associated with long term parental nutrition. *Am J. Clin Nutr.* 43, 549-554.

Caceres,A., Busciglio,J., Ferreira,A., and Steward,O. (1988). An immunocytochemical and biochemical study of the microtubule-associated protein MAP-2 during post-lesion dendritic remodeling in the central nervous system of adult rats. *Brain Res.* 427, 233-246.

Caroni,P. and Schwab,M.E. (1988a). Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1, 85-96.

Caroni,P. and Schwab,M.E. (1988b). Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol.* 106, 1281-1288.

Clark L.C., Combs G.F., et al., (1996). Selenium trial. *J. Am. Med. Assoc.* 276, 1957-1963.

Charron F., Stein E., Jeony J., McMahon A.P. and Tessier-Lavigne M. (2003). The morphogen Sonic Hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113, 11-23.

Chen,M.S., Huber,A.B., van der Haar,M.E., Frank,M., Schnell,L., Spillmann,A.A., Christ,F., and Schwab,M.E. (2000). Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403, 434-439.

Cornett C.R., Markesbery W.R., and Ehmann W.D. (1998). Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer,s disease brain, *Neurotoxicology* 19, 339-345.

Cotman C.W.,Matthews D.A., Taylor D. and Lynch G. (1973). Synaptic rearrangement in the dentate gyrus: histochemical evidence of adjustments after lesions in immature and adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 70, 3473-3477.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

- Cotman C., Gentry C., and Steward O. (1977). Synaptic replacement in the dentate gyrus after unilateral entorhinal lesion: electron microscopic analysis of the extent of replacement of synapses by the remaining entorhinal cortex. *J. Neurocytol.* 6, 455-464.
- Cotman,C.W., Geddes,J.W., and Kahle,J.S. (1990). Axon sprouting in the rodent and Alzheimer's disease brain: a reactivation of developmental mechanisms? *Prog. Brain Res.* 83427-34, -34.
- Cremer,H., Lange,R., Christoph,A., Plomann,M., Vopper,G., Roes,J., Brown,R., Baldwin,S., Kraemer,P., Scheff,S., and et,a. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459.
- Cremer,H., Chazal,G., Goridis,C., and Represa,A. (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol. Cell Neurosci.* 8, 323-335.
- Dasheiff,R.M. and McNamara,J.O. (1982). Electrolytic entorhinal lesions cause seizures. *Brain Res.* 231, 444-450.
- de La Houssaye BA, Mikule K, Nikolic D, Pfenninger KH Thrombin-induced growth cone collapse: involvement of phospholipase A(2) and eicosanoid generation.*J Neurosci.* 1999 Dec 15;19(24):10843-55.
- Deller,T., Haas,C.A., Naumann,T., Joester,A., Faissner,A., and Frotscher,M. (1997). Up-regulation of astrocyte-derived tenascin-C correlates with neurite outgrowth in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience* 81, 829-846.
- Drescher,U., Kremoser,C., Handwerker,C., Loschinger,J., Noda,M., and Bonhoeffer,F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82, 359-370.
- Ebens A., Brose K., Leonardo E.D., Hanson M.G., Bladt F., Birchmeier C., Barres B. and Tessier-Lavigne M. (1996). Hepatocyte growth factor/scatter factor is an aconal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17, 1157-1172.
- Erbayraktar S., Grasso G., Sfacteria et al., (2003). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6741-6746.
- Fagan,A.M. and Gage,F.H. (1990). Cholinergic sprouting in the hippocampus: a proposed role for IL-1. *Exp. Neurol.* 110, 105-120.
- Fagan,A.M., Suhr,S.T., Lucidi-Phillipi,C.A., Peterson,D.A., Holtzman,D.M., and Gage,F.H. (1997). Endogenous FGF-2 is important for cholinergic sprouting in the denervated hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 2499-2511.
- Ferretti P., Zhang F., and O'Neill P. (2003). Changes in spinal cord regenerative ability through phylogenesis and development: lessons to be learnt. *Dev Dyn.* 226, 245-256.

- Fournier,A.E., GrandPre,T., and Strittmatter,S.M. (2001). Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341-346.
- Fournier,A.E., Takizawa B.T., and Strittmatter,S.M. (2003). Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J. Neurosci.* 23, 1416-1423.
- Frotscher,M. and Heimrich,B. (1993). Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10400-10403.
- Frotscher,M., Heimrich,B., Deller,T., and Nitsch,R. (1995). Understanding the cortex through the hippocampus: lamina-specific connections of the rat hippocampal neurons. *J. Anat.* 187, -45.
- Frotscher,M., Heimrich,B., and Deller,T. (1997). Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci.* 20, 218-223.
- Ganther H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20, 1657-1666.
- Gazzaley,A.H., Benson,D.L., Huntley,G.W., and Morrison,J.H. (1997). Differential subcellular regulation of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection. *J. Neurosci.* 17, 2006-2017.
- Geddes,J.W., Hess,E.J., Hart,R.A., Kesslak,J.P., Cotman,C.W., and Wilson,M.C. (1990). Lesions of hippocampal circuitry define synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) as a novel presynaptic marker. *Neuroscience* 38, 515-525.
- Giannelli,G., Falk-Marzillier,J., Schiraldi,O., Stetler-Stevenson,W.G., and Quaranta,V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225-228.
- Goldman S.A., and Nedergaard M. (2002). Erythropoietin strikes a new cord. *Nat. Med.* 33, 785-787.
- Gomez-Pinilla,F., Lee,J.W., and Cotman,C.W. (1992). Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J. Neurosci.* 12, 345-355.
- Grunblatt E., Mandel S., and Youdim M.B. (2000). MPTP and 6-hydroxydopamine induced neurodegeneration as models for Parkinson's disease: neuroprotective strategies. *J. Neurol.* 247, II95-II102.
- Gu J., Royland J.E., Wiggins R.C., and Konat G.W. (1997). Selenium is required for normal upregulation of myelin genes in differentiating oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 47, 626-635.
- Guthrie,K.M., Woods,A.G., Nguyen,T., and Gall,C.M. (1997). Astroglial ciliary neurotrophic factor mRNA expression is increased in fields of axonal sprouting in deafferented hippocampus. *J. Comp Neurol.* 386, 137-148.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Haas,C.A., Rauch,U., Thon,N., Merten,T., and Deller,T. (1999). Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 9953-9963.

Hailer NP, Bechmann I, Heizmann S, and Nitsch R. Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus.* 1997;7(3):341-9.

Hatfield D.L. and Gladyshev V.N. (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol.Cell Biol.* 22, 3565-3576.

Hirsch,S. and Bahr,M. (1999). Growth promoting and inhibitory effects of glial cells in the mammalian nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468:199-205, -205.

Hyman,B.T., Van Hoesen,G.W., Damasio,A.R., and Barnes,C.L. (1984). Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225, 1168-1170.

Jalink K. van Corven E.J., Hengeveld T., Morii N., Narumiya S., and Moolenaar W.H. (1994). Inhibition of lysophosphatidate and thrombin induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J. Cell Biol.* 126, 801-810.

Jensen,M.B., Gonzalez,B., Castellano,B., and Zimmer,J. (1994). Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp. Brain Res.* 98, 245-260.

Jensen MB, Finsen B, Zimmer J. Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with blood-brain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol.* 1997;143(1):103-16.

Jucker,M., Mondadori,C., Mohajeri,H., Bartsch,U., and Schachner,M. (1995). Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia. *Brain Res. Mol Brain Res.* 28, 149-156.

Kandel E., Schwartz J.H., and Jessel T.M. (1991). *Principles of Neural Science*, McGraw-Hill Companies, Health Professions Division, USA.

Kahle,J.S., Ulas,J., and Cotman,C.W. (1993). Increased sensitivity to adenosine in the rat dentate gyrus molecular layer two weeks after partial entorhinal lesions. *Brain Res.* 609, 201-210.

Keino-Masu K., Masu M., Hinck L., Leonardo D., Chan S., Culotti J., and Tessier-Lavigne M. (1996). Deleted in colorectal carcinomas encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.

Kelley,M.S. and Steward,O. (1997). Injury-induced physiological events that may modulate gene expression in neurons and glia. *Rev. Neurosci.* 8, 147-177.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

- Kennedy T.E., Serafini T., de la Torre J., and Tessier-Lavigne M. (1994). Netrins are diffusable chemotrophic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-436.
- Kherif S. Lafuma C., Dehaupas M., Lachkar S., Fournier J.G., Verdiere-Sahuque M., Fardeau M. and Alameddine H.S. (1999). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol.* 205, 158-170.
- Kidd T., Brose K., Mitchell K.J., Fetter R.D., and Tessier-Lavigne (1998a). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205-215.
- Kidd T., Russell C., Goodman C.S., and Tear G. (1998b). Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20, 25-33.
- Kien C.L., and Ganther H.E. (1983). Manifestations of chronic selenium deficiency in a child receiving total parental nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 319-328.
- Kim J.E., GrandPre T., Qiu D., and Strittmatter S.M. (2003). Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 38, 187-199.
- Kim H. Jhoo W., Shin E, and Bing G. (2000). Selenium deficiency potentiates methamphetamine-induced nigral neural loss, comparison with MPTP model. *Brain res.* 862, 247-252.
- Koeberle P.D. and Bähr M (2004). Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone? *J. Neurobiol.* 59, 162-180.
- Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell.* 1999 Jun;10(6):1851-7.
- Kreuzberg G. (1996). The microglia: sensor of pathologies in the brain. *Trends Neurosci* 3, 23-26.
- Krohn, K., Laping, N.J., Morgan, T.E., and Finch, C.E. (1995). Expression of vimentin increases in the hippocampus and cerebral cortex after entorhinal cortex lesioning and in response to transforming growth factor beta 1. *J. Neuroimmunol.* 56, 53-63.
- Kryokov G.V., Castellano S., Novoselov S.V. Lobanov A.V., Zehtab R., Guigo R., and Gladyshev V.N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300, 1439-1443.
- Kugler, P., Weeger, T., and Horvath, E. (1995). Glutamate dehydrogenase in astrocytes of the rat dentate gyrus following lesion of the entorhinal cortex. *Neuroscience* 64, 173-182.



## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Lampert-Etchells M, McNeill TH, Laping NJ, Zarow C, Finch CE, May PC. Sulfated glycoprotein-2 is increased in rat hippocampus following entorhinal cortex lesioning. *Brain Res.* 1991 Nov 1;563(1-2):101-6.

Li H.S., Chen J.H., Wu W., Fagaly T., Zhou L., et al. (1999). Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96, 807-818.

Liu X.Z., Xie X.M., Hu R., et al. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci* 17, 5395-5406.

Lynch,G., Deadwyler,S., and Cotman,G. (1973). Postlesion axonal growth produces permanent functional connections. *Science* 180, 1364-1366.

McEligot A.J., Yang S., and Meykens F.L. (2005). Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu.Rev. Nutr.* 25, 261-295.

McKerracher,L., David,S., Jackson,D.L., Kottis,V., Dunn,R.J., and Braun,P.E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13, 805-811.

Mabuchi T. et al., (2000). Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31, 1735-1743.

Meier S, Brauer AU, Heimrich B, Nitsch R, Savaskan NE. (2004). Myelination in the hippocampus during development and following lesion. *Cell Mol Life Sci.*; 61(9):1082-94.

Meinicke F.W. and Exner G. (1997). Treatment of patients with spinal cord lesions in Germany 1996-state of the art. *Spinal Cord* 35, 411-414.

Miller,F.D. and Geddes,J.W. (1990). Increased expression of the major embryonic alpha-tubulin mRNA, T alpha 1, during neuronal regeneration, sprouting, and in Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 86:321-30, -30.

Miller,P.D., Styren,S.D., Lagenaur,C.F., and DeKosky,S.T. (1994). Embryonic neural cell adhesion molecule (N-CAM) is elevated in the denervated rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* 14, 4217-4225.

Mizukami,K., Ikonovic,M.D., Mishizin,A., Sheffield,R., Grayson,D.R., and Armstrong,D.M. (1997). Alterations of GABA(A)beta2/3 immunoreactivity in the dentate gyrus after perforant pathway lesion. *Neuroreport* 8, 3379-3383.

Morgan,T.E., Nichols,N.R., Pasinetti,G.M., and Finch,C.E. (1993). TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp. Neurol.* 120, 291-301.

Mueller,B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:51-88, -88.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Mukhopadhyay,G., Doherty,P., Walsh,F.S., Crocker,P.R., and Filbin,M.T. (1994). A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13, 757-767.

Nadler,J.V., Cotman,C.W., Paoletti,C., and Lynch,G.S. (1977). Histochemical evidence of altered development of cholinergic fibers in the rat dentate gyrus following lesions. II. Effects of partial entorhinal and simultaneous multiple lesions. *J. Comp Neurol.* 171, 589-604.

Nedivi,E. (1999). Molecular analysis of developmental plasticity in neocortex. *J. Neurobiol.* 41, 135-147.

Nitsch,R. and Frotscher,M. (1992). Reduction of posttraumatic transneuronal "early gene" activation and dendritic atrophy by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5197-5200.

Novoselov S.V., Calvisi D.V. et al., (2005). Selenoprotein deficiency and high levels of selenium compounds can effectively inhibit hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Oncogene online*, 1-9.

Ono,K., Tomasiewicz,H., Magnuson,T., and Rutishauser,U. (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13, 595-609.

Oppenheim R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501.

Pannu R, Singh AK, Singh I. A novel role of lactosylceramide in the regulation of tumor necrosis factor alpha-mediated proliferation of rat primary astrocytes. Implications for astrogliosis following neurotrauma. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13742-51.

Parnavelas,J.G., Lynch,G., Brecha,N., Cotman,C.W., and Globus,A. (1974). Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature* 248, 71-73.

Pasterkamp R.J., and Verhaagen J. (2001). Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35, 36-54.

Petanceska,S., Canoll,P., and Devi,L.A. (1996). Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *J. Biol Chem.* 271, 4403-4409.

Phillips,L.L. and Belardo,E.T. (1994). Increase of c-fos and ras oncoproteins in the denervated neuropil of the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 58, 503-514.

Poirier J, Dea D, Baccichet A, and Gauthier S. Modulation of gamma-actin and alpha 1-tubulin expression by corticosterone during neuronal plasticity in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;15(3-4):263-8.

Pot C., Simonen M., Weinmann O., Schnell L., Christ F., Stoeckle S., Berger P., Rüllicke T., Suter U., and Schwab M.E. (2002). Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J. Cell Biol.* 159, 29-35.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Puschel, A.W. (1996). The semaphorins: a family of axonal guidance molecules? *Eur. J. Neurosci.* 8, 1317-1321.

Qian Z., Gilbert M.E., Colicos M.A., Kandel E.R., and Kuhl D. (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long term potentiation. *Nature* 361, 453-457.

Raineteau, O. and Schwab, M.E. (2001). Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 263-273.

Raisman G. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 1969; 14(1):25-48.

Ramakers G.J. and Moolenaar W.H. (1998). Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp. Cell res.* 245, 252-262.

Ramaekers V.T., Calomme D., Vanden Berghe D., and Makropoulos W. (1994). Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics* 25, 217-223.

Ramon y Cajal S. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés.*, Maloine, ed. (Paris).

Ramon y Cajal S. (1929). *Degeneration and Regeneration of the nervous system.* (New York: Hafner).

Ray S.K., Matzelle D.D., Wilford G.G., Hogan E.L., and Banik N.L. (2000). Increased calpain expression is associated with apoptosis in rat spinal cord injury: calpain inhibitor provides neuroprotection. *Neurochem Res.* 25, 1191-1198.

Rayman M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233-241.

Sampedro M.N., Bussineau C.M., and Cotman C.W. (1982). Turnover of brain postsynaptic densities after selective deafferentation: detection by means of an antibody to antigen PSD-95. *Brain Res.* 251, 211-220.

Savaskan NE, Plaschke M, Ninnemann O, Spillmann AA, Schwab ME, Nitsch R, Skutella T. (1999). Myelin does not influence the choice behaviour of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length in vitro. *Eur J Neurosci.* 11, 316-26.

Savaskan, N.E., Eyupoglu, I.Y., Brauer, A.U., Plaschke, M., Ninnemann, O., Nitsch, R., and Skutella, T. (2000a). Entorhinal cortex lesion studied with the novel dye fluorograde. *Brain Res.* 864, 44-51.

Savaskan NE, Skutella T, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R. (2000). Outgrowth-promoting molecules in the adult hippocampus after perforant path lesion. *Eur J Neurosci.* 12, 1024-32.

Savaskan NE & Nitsch R. (2001). Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus following perforant path lesion. *Rev Neurosci.* 12: 195-215.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Savaskan NE, Brauer AU, Kühbacher M, Eyüpoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, Behne D, Nitsch R. (2003). Selenium deficiency increases the susceptibility to excitatory cell death. *FASEB J*, 10.1096/fj.02-0067fje.

Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R. (2004). Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a novel member of the plasticity-related gene family. *Eur J Neurosci* 19(1), 212-220.

Savaskan NE, Klein L, Kotter MR, van Meeteren L, Kishi Y, Aoki J, Moolenaar WH, Nitsch R, Brauer AU. (2005). Autotaxin/lysophospholipase D (NPP2): Developmental expression of the LPA-generating ectoenzyme in the brain. *Eur J Neurosci* (2005, in revision).

Savio, T. and Schwab, M.E. (1989). Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth. *J. Neurosci.* 9, 1126-1133.

Schafer M, Brauer AU, Savaskan NE, Rathjen FG, Brummendorf T. (2005) Neurotractin/kilon promotes neurite outgrowth and is expressed on reactive astrocytes after entorhinal cortex lesion. *Mol Cell Neurosci.* 29(4):580-90.

Scheff, S.W. and Cotman, C.W. (1977). Recovery of spontaneous alternation following lesions of the entorhinal cortex in adult rats: possible correlation to axon sprouting. *Behav. Biol.* 21, 286-293.

Schnell L., and Schwab M.E. (1990). Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibition. *Nature* 343, 269-272.

Schnell L., Schneider R., Kolbeck R., Barde Y.A., and Schwab M.E. (1994). Neutrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after spinal cord lesion. *Nature* 367, 170-173.

Schoen, S.W. and Kreutzberg, G.W. (1994). Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. *Exp. Neurol.* 127, 106-118.

Schomburg, L., Schweizer U., Holtmann B., Flohe L., Sendtner M., and Kohrle J. (2003). Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem. J.* 370, 397-402.

Schwarz K., and Foltz C.M. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Nutrition* 15, 255-264.

Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R, Savaskan NE. (2004). Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev.* 45(3):164-78.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Serafini T., Kennedy T., Galko M., Mirzayan C., Jessel T., and Tessier-Lavigne M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C.elegans*. *Cell* 78, 409-424.

Short D.J., El Masry W.S., and Jones P.W. (2000). High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury- a systemic review from a clinical perspective. *Spinal Cord* 38, 273-286.

Silver J. and Miller J.H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci* 5, 146-156.

Simonen M. Pedersen V. Weinmann O., Schnell L., Buss A., Ledermann B. Christ F., Sansig G., van der Putten H. and Schwab M.E. (2003). Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38, 201-211.

Schulte,T., Paschke,K.A., Laessing,U., Lottspeich,F., and Stuermer,C. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* 124 , 577-587.

Schwab,M.E., Kapfhammer,J.P., and Bandtlow,C.E. (1993). Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:565-95, -95.

Sontheimer H., (2003). Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. *Trends Neurosci.* 26, 543-549.

Steward,O., Kelley,M.S., and Torre,E.R. (1993). The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: temporal relationship between changes in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Exp. Neurol.* 124, 167-183.

Steward,O. (1995). The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: gene expression by neurons during the period of lesion-induced growth. *J. Comp Neurol.* 359, 391-411.

Steward,O., Wallace,C.S., Lyford,G.L., and Worley,P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21, 741-751.

Stichel C.C., and Muller H.W. (1998). The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue res.* 294, 1-9.

Styren,S.D., Miller,P.D., Lagenaur,C.F., and DeKosky,S.T. (1995). Alternate strategies in lesion-induced reactive synaptogenesis: differential expression of L1 in two populations of sprouting axons. *Exp. Neurol.* 131, 165-173.

Tessier-Lavigne,M. and Goodman,C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.

Thon,N., Haas,C.A., Rauch,U., Merten,T., Fassler,R., Frotscher,M., and Deller,T. (2000). The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2547-2558.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Tokumura A., Majima E., Kariya Y., Tominaga K., Kogure K., Yasuda K and Fukuzawa K. (2002). Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J. Biol Chem.* 277, 39436-39442.

Tomasiewicz,H., Ono,K., Yee,D., Thompson,C., Goridis,C., Rutishauser,U., and Magnuson,T. (1993). Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM- 180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, 1163-1174.

Ullrich O., Distel A., Eyupoglu I.Y. and Nitsch R. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Nature Cell Biol* 3, 1035-1042.

Van Hoesen,G.W., Hyman,B.T., and Damasio,A.R. (1991). Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 1, 1-8.

Walther L.E., Winnefeld K., and Solch O. (2000). Determinations of iron, copper, zinc, magnesium and selenium in plasma and erythrocytes of neurosurgical patients. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 14, 92-95.

Wang K.H., Brose K., Arnott D., Kidd T., Goodman C.S., Henzel W., and Tessier-Lavigne M. (1999). Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96, 771-784.

Wang K.C., Koprivica V., Kim J.A., Sivasankaran R., Guo Y., Neve R.L., and He Z. (2002). Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417, 941-944.

Weber G.F., Maertens P., Meng X.Z., and Pippenger C.E. (1991). Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet* 337, 1443-1444.

Yan J., and Barrett J.N. (1998). Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central nervous neurons and its identification as selenoprotein P. *J. Neurosci.* 18, 8682-8691.

Zarow,C. and Finch,C.E. (1995). Limited responses of neuronal mRNAs to unilateral lesions of the rat entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* 185, 87-90.

Zheng B., Ho C., Keirstead H., Steward O., and Tessier-Lavigne M. (2003). Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38, 213-224.

## 6 DANKSAGUNG

Meine hier vorgestellten Arbeiten sind die Früchte langer und wunderbarer Zusammenarbeit mit exzellenten Kollegen und Mitarbeitern, deren Arbeiten hier zitiert wurden. Im Besonderen danke ich jemandem, der etwas sehr seltenes besitzt, was für den Erkenntnisgewinn unabdingbar ist: Mut für das Neue und die Ausdauer, den Weg trotz aller Hindernisse zu fördern.

Denn: Welche Leistung führt einzig zum Erkenntnisgewinn in der Forschung? Es ist nicht die Konzeptarbeit, nicht das Katalogisieren vorhandener Daten, nicht das Zusammenfassen bisheriger Befunde, es ist das Experiment. Das Experiment gibt die Antwort auf die Frage. Das Experiment entscheidet. So war manche Idee, die ich experimentell umsetzen wollte, im ersten Moment abwegig, so gar nicht *in line* mit dem Mainstream. Aber Robert sagte nur: 'Just do it! Und Du wirst sehen was das Experiment Dir bringen wird'. So hat mich mein Mentor vor manchem Misserfolg nicht bewahrt, aber er hat mir vor allem damit das Wunderbarste beschert, was es im Forscherleben überhaupt nur gibt, nämlich: Die Entdeckung von etwas ganz Neuem!

Dank gebührt meiner langjährigen Kollegin und Kooperationspartnerin Anja Bräuer. Mit ihr habe ich manches Wahnsinnsprojekt gestartet und dank unserer Ergänzung und dem Spass am Experimentieren haben wir viele davon auch erfolgreich abgeschlossen. Weiterhin danke ich meinen Kollegen und Mitarbeitern Jan Csupor, Tobias Thiele, Miriam Petzold, Bettina Brokowski, Rike Dannenberg, Sabine Lewandowski, Dore Wachenschwanz, Brigitte Mannsfeld, Susan Meier, Tanja Velmans, Martina Plaschke, Olaf Ninnemann, Anne Bennert, Linda Klein, Gisela Duwe, Trina Irico, Kimberly Rosegger, Andrew Mason, Marni Pollrich, Lauran Oomen, Trudi Hengeveld und Henk Hilkmann.

Weiterhin konnte ich von der Expertise und Freundschaft wunderbarer Kooperationspartner profitieren. Hierbei seien namentlich zu nennen: Ilker Eyüpoğlu (Erlangen), Eric Hahnen (Köln), Martin Schwab und Lisa Schnell (Zürich), Bernd Heimrich (Freiburg), Markus Kühbacher, Lisa Dalla-Puppa, Antonius Kyriakopoulos und Diedrich Behne (alle Berlin), Michael Schäfer (Marseille), Frauke Zipp (Berlin), Thomas Skutella (Tübingen), Hartmut Kühn und Astrid Borchert (Berlin), Ulrich

## **Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem**

Schweizer, Joseph Köhrle und Lutz Schomburg (Berlin), David Brindley (Edmonton), Junken Aoki (Tokyo), und meine neuen Kollegen in Amsterdam am NKI: Wouter Moolenaar , Catelijne Stortelers, David Jones, Amra Hajdo-Milasinovic, Nullin Divecha und Jonathan Halstead.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie besonderen Dank für die grosse Unterstützung und die Neugier, mit der sie meine Arbeit verfolgte. Vor allem aber danke ich einem Menschen im besonderen, mit dem ich das spannendste Experiment lebe: D.S.



## **7 ANHANG**

### **7.1 Lebenslauf**

**Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.**

## 7.2 Publikationsverzeichnis

Savaskan NE, Rocha L, Kotter MR, Lubec G, Baer A, van Meeteren L, Kishi Y, Aoki J, Moolenaar WH, Nitsch R, Brauer AU. Autotaxin/lysophospholipase D (NPP2): Developmental expression of the LPA-generating ectoenzyme in the brain.

**Cell Mol Life Sci (2006, in press).**

Savaskan NE, Heckel A, Buchfelder M, Ganslandt O, Moolenaar WH, Nimsy C, Eyüpoglu. Inhibition of glioma brain invasion and neuronal cell death by targeted xCT interference.

**under consideration.**

Schafer M, Brauer AU, Savaskan NE, Rathjen FG, Brummendorf T. Neurotractin/kilon promotes neurite outgrowth and is expressed on reactive astrocytes after entorhinal cortex lesion.

**Mol Cell Neurosci. 2005 Aug;29(4):580-90.**

Eyüpoglu IY, Hahnen E, Buslei R, Siebzehnruhl FA, Savaskan NE, Luders M, Trankle C, Wick W, Weller M, Fahlbusch R, Blumcke I. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo.

**J Neurochem. 2005 May;93(4):992-9.**

Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel PM, Infante-Duarte C, Brocke S, Zipp F. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis.

**J Immunol. 2004 Nov 1;173(9):5794-800.**

Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison.

**Brain Res Brain Res Rev. 2004; 45(3):164-78.**

Meier S, Brauer AU, Heimrich B, Nitsch R, Savaskan NE. Myelination in the hippocampus during development and following lesion.

**Cell Mol Life Sci. 2004; 61(9):1082-94**

Brauer AU, Nitsch R, Savaskan NE. Identification of macrophage/microglia activation factor (MAF) associated with late endosomes/lysosomes in microglial cells.

**FEBS Lett. 2004;563(1-3):41-8.**

Schweizer U, Schomburg L, Savaskan NE. The neurobiology of selenium: lessons from transgenic mice. **J Nutr. 2004 Apr;134(4):707-10.**

Brauer AU, Savaskan NE. Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element.

**Rev Neurosci. 2004;15(1):19-32.**

Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R. Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a novel member of the plasticity-related gene family.

**Eur J Neurosci 2004 Jan; 19(1): 212-220.**

Bräuer AU, Savaskan NE\*, Kühn H, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R. The novel phospholipid PRG-1 is involved in axon growth and regenerative sprouting.

**Nature Neurosci 2003; 6(6):572-8.**

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Bräuer AU, Savaskan NE, Plaschke M., Ninnemann O., Nitsch R. CCK expression in the brain Molecular evidence revealed by Differential Display RT-PCR.

**Neurosci. 2003, 121(1):111-21..**

Eyupoglu IY, Savaskan NE\*, Brauer AU, Nitsch R, Heimrich B. Identification of neuronal cell death in a model of degeneration in the hippocampus.

**Brain Res Brain Res Protoc. 2003;11(1):1-8.**

Meier S, Bräuer AU, Heimrich B, Schwab ME, Nitsch R, Savaskan NE. Molecular analysis of Nogo genes in the hippocampus.

**FASEB J 2003 Jun;17(9):1153-5.**

Borchert A, Savaskan NE, Kuhn H. Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements.

**J Biol Chem. 2003 Jan 24;278(4):2571-80.**

Savaskan NE, Brauer AU, Kühbacher M, Eyüpoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, Behne D, Nitsch R. Selenium deficiency increases the susceptibility to excitatory cell death.

**FASEB J 2002, 10.1096/fj.02-0067fje.**

Savaskan NE, Alvarez-Bolado G, Glumm R, Nitsch R, Skutella T & Heimrich B. Impaired postnatal development of hippocampal neurons and axon projections in the Emx2P<sup>-P</sup> mutants.

**J Neurochem 2002, ;83(5):1196-207.**

Eyupoglu IY, Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R, Heimrich B. Fluoro-Jade staining as an marker for neuronal degeneration.

**Brain Res Prot. 2003, Mar;11(1):1-8.**

Bräuer AU, Savaskan NE\*, et al. Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion.

**FASEB J 2001, 15: 2689-2701.**

Savaskan NE & Nitsch R. Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus following perforant path lesion.

**Rev Neurosci. 2001, 12: 195-215.**

Brauer AU, Savaskan NE\*, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R.

Perforant path lesion induces upregulation of stathmin mRNA, but not SCG10 mRNA, in the adult rat hippocampus.

**Neurosci. 2001, 102 (3): 515-526.**

Brauer AU, Savaskan NE\*, Plaschke M, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R.

The Ig-molecule Kilon shows a differential expression pattern to LAMP in the developing and adult hippocampus.

**Hippocampus. 2000, 10: 632-644.**

Savaskan NE, Eyupoglu IY, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R, Skutella T. Entorhinal cortex lesion studied with the novel dye fluoro-jade.

**Brain Res. 2000 May 2;864(1):44-51.**

Savaskan NE, Skutella T, Brauer AU, Plaschke M, Ninnemann O, Nitsch R.

Outgrowth-promoting molecules in the adult hippocampus after perforant path lesion.

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

**Eur J Neurosci. 2000 Mar;12(3):1024-32.**

Steup A, Lohrum M, Hamscho N, **Savaskan NE**, Ninnemann O, Nitsch R, Fujisawa H, Puschel AW, Skutella T. Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation.

**Mol Cell Neurosci. 2000 Feb;15(2):141-55.**

Stein E, **Savaskan NE\***, Ninnemann O, Nitsch R, Zhou R, Skutella T. A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting.

**J Neurosci. 1999 Oct 15;19(20):8885-93.**

Skutella T, **Savaskan NE\***, Ninnemann O, Nitsch R. Target- and maturation-specific membrane-associated molecules determine the ingrowth of entorhinal fibers into the hippocampus.

**Dev Biol. 1999 Jul 15;211(2):277-92.**

Steup A, Ninnemann O, **Savaskan NE**, Nitsch R, Puschel AW, Skutella T. Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons.

**Eur J Neurosci. 1999 Feb;11(2):729-34.**

**Savaskan NE**, Plaschke M, Ninnemann O, Spillmann AA, Schwab ME, Nitsch R, Skutella T. Myelin does not influence the choice behaviour of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length in vitro.

**Eur J Neurosci. 1999 Jan;11(1):316-26.**

*\*contributed equally as first author.*

### **Vorträge**

**N.E. Savaskan:** Outgrowth-promoting molecules following lesion in the hippocampus. **14. Arbeitstagung Der Anatomischen Gesellschaft. Würzburg 1997.**

**N.E. Savaskan:** Glutamate-induced cell death is attenuated by adequate selenium supplementation. **Verhandlungen Der Anatomischen Gesellschaft. Halle 2002.**

**N.E. Savaskan:** Plasticity-related gene 1: Identification and functional characterization of a novel neuron-specific messenger RNA. **Berlin Neuroscience Forum 2002.**

**N.E. Savaskan:** Identifizierung und Charakterisierung eines neuen axonalen Auswuchsproteins (Plasticity-related gene 1). **19. Arbeitstagung Der Anatomischen Gesellschaft. Würzburg 2002.**

**N.E. Savaskan:** Selenium im Zentralen Nervensystem: Schutz vor exzitatorischen Zellschaden. **Berliner Herbsttagung 2002, Metalloproteine und Metalloideproteine.**

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

**N.E. Savaskan:** A novel lipid phosphate phosphatase, PRG-1; involved in axon growth and regeneration. **GRK, IFN Magdeburg, March 2003.**

**N.E. Savaskan:** Plasticity Related Gens (PRG): a new molecule class involved in axonal outgrowth. **GRK, Göttingen, August 2003.**

**N.E. Savaskan:** Plasticity-related gene-3: Ein neues auswachsförderndes Protein aus der PRG Familie. **20. Arbeitstagung Der Anatomischen Gesellschaft. Würzburg 2003.**

**N.E. Savaskan:** Plasticity Related Gens (PRG): a new gene family involved in axon growth and LPA signaling. **Leopoldina Symposium, Ittingen, Schweiz, Mai 2004.**

**N.E. Savaskan:** Selenium inhibits glioma brain invasion and peritumoral cell death. **Berliner Herbsttagung 2005, Spurenelemente und Metalloproteine.**

### **Abstracts & Kongressbeiträge**

**N.E. Savaskan, T. Skutella:** Axon guidance of entorhinal fibers is dependent on maturation specific membrane-bound molecules. **Histochemistry and Cellbiology, September Vol.108, 1997.**

**Savaskan N.E, Ninnemann O., Nitsch R., Skutella T.:** Pathfinding of entorhinal fibers is dependent on target- and maturation specific membrane-bound molecules. **Society for Neuroscience (New Orleans, USA) 1997.**

Skutella T. , **N.E. Savaskan**, O. Ninnemann, R. Nitsch: Das Einwachsen entorhinaler Fasern ist abhängig von ziel- und gewebspezifisch exprimierten membrangebundenen Faktoren. **Verhandlungen Der Anatomischen Gesellschaft. Würzburg 1997.**

Skutella T., **N.E. Savaskan**, O. Ninnemann, R. Nitsch: Appearance of guidance and growth-promoting cues after lesion in the CNS. **Verhandlungen Der Anatomischen Gesellschaft, Greifswald 1998.**

**N.E. Savaskan**, M. Plaschke, O. Ninnemann, A. A. Spillmann, M. E. Schwab, R. Nitsch, T. Skutella: Myelin does not influence the choice behavior of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length. **Forum of the European Neuroscience Society (Berlin, Germany) 1998.**

**N.E. Savaskan**, T. Skutella, O. Ninnemann, R. Nitsch: Reappearance of guidance and growth-promoting cues for regenerating axons in the deafferented hippocampus after perforant path lesion studied *in vitro*. **Forum of the European Neuroscience Society (Berlin, Germany) 1998.**

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

Steup A., **N.E. Savaskan**, O. Ninneman, R. Nitsch, A. Püschel, T. Skutella: Semaphorin D act as a repulsive guidance cue in the developing hippocampal formation. **Forum of the European Neuroscience Society (Berlin, Germany) 1998.**

**N.E. Savaskan**, T. Skutella, O. Ninnemann, R. Nitsch: Guidance and growth-promoting molecules in the deafferented hippocampus after perforant path lesion studied *in vitro*. **Society for Neuroscience (Los Angeles, USA) 1998.**

**Savaskan N.E**, Plaschke M., Ninnemann O., Nitsch R.: MHC class I in the hippocampus. **Society for Neuroscience (Miami, USA) 1999.**

**Savaskan N.E**, Eyüpoglu I., Bräuer A.U., Plaschke M., Ninnemann O., Skutella T, Nitsch R.: Fluoro-Jade staining in the deafferented hippocampus. **Society for Neurochemistry (Berlin, Germany) 1999.**

Bräuer A.U., **Savaskan N.E**, Plaschke M., Prehn S., Ninnemann O., Nitsch R: Kilon, a novel IgCAM in the hippocampus. **European Society for Neuroscience (Brighton, UK) 2000.**

**Savaskan N.E**, Bräuer A.U.; Plaschke M., Ninnemann O., Nitsch R.: ESA is upregulated in reactive astrocytes following lesion in the hippocampus. **Society for Neuroscience (New Orleans, LO, USA) 2000.**

**Savaskan N.E**, Bräuer A.U.; Ninnemann O., Nitsch R.: Selenium protects neurons from glutamate-induced cell death. **Society for Neuroscience (San Diego, CA, USA) 2001.**

Bräuer A.U., **Savaskan N.E**, Ninnemann O., Nitsch R.: Selenoprotein W expression in the rodent brain during development and following lesion. **Society for Neuroscience (San Diego, CA, USA) 2001.**

**Savaskan N.E**, Bräuer A.U., Behne D., Ninnemann O., Nitsch R.: Selenium-deficiency potentiates glutamate-induced cell death. **European Society for Neuroscience (Paris, France) 2002.**

Bräuer A.U., **Savaskan N.E**, Ninnemann O., Nitsch R.: Regional and cellular distribution of selenoproteins in the hippocampus. **European Society for Neuroscience (Paris, France) 2002.**

**Savaskan N.E**, Bräuer A.U.; Borchert A., Kühn H. & Nitsch R.: Phospholipid hydroxidperoxide glutathione peroxidase in the central nervous system: its cellular distribution and regulation following lesion. **Society for Neuroscience (Orlando, FL, USA) 2002.**

**Savaskan N.E**, Bräuer A.U., Moolenaar WH: A novel role for PRG-2 in neurogenesis. **Route 28 Summer School (Chiemsee, D) 2004.**

Bräuer A.U.; Savaskan N.E., & Nitsch R.: PRGs: A diverse gene family with different effects on axon growth. **Society for Neuroscience (Washington, USA) 2005.**

### **7.3 Stipendien und Preise**

1997-2001	<b>Stipendiat des Graduiertenkolleg GRK 238</b>
1998-2000	<b>Stipendiat der Charité Forschungsförderung</b>
2001-2002	<b>Stipendiat der Charité Forschungsförderung</b>
2002	<b>Humboldt Preis für die beste Promotion 2002</b>
2003-2004	<b>Habilitationsstipendium der Charité</b>
2003	<b>International Schrauzer Prize on Selenium Research</b>
2003	<b>Keystone Scholarship (Axonal Connections)</b>
2003	<b>Boehringer Ingelheim Scholarship</b>
2004	<b>Route 28- travel grant for Summit in Neurobiology</b>
2004	<b>Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)</b>
2005	<b>Stipendiat des Human Frontiers Science Program (HFSP)</b>

### **7.4 Lehre**

#### **Wintersemester 2001/2002**

Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)

Kursus der makroskopischen Anatomie (Neuroanatomie/Hirnkurs)

#### **Sommersemester 2002**

Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)

Kursus der Histologie und mikroskopischen Anatomie (Seminar/Vorlesung)

#### **Wintersemester 2002/2003**

Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)

Kursus der Histologie und mikroskopischen Anatomie (Seminar/Vorlesung)

## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

### **Sommersemester 2003**

Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)

Kursus der Histologie und mikroskopischen Anatomie (Seminar/Vorlesung)

### **Wintersemester 2003/2004**

Kursus der makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)

Kursus der Histologie und mikroskopischen Anatomie (Seminar/Vorlesung)

### **Wintersemester 2004/2005**

Kursus der makroskopischen Anatomie (dissection course Locomotor System)

### **Sommersemester 2005**

Kursus der makroskopischen Anatomie (dissection course Urogenital System)

## **7.5 Drittmittel**

2001 – 2006	DFG-Schwerpunkt Program: Selenoproteine (DFG SA1041/4-2)
2004	DFG Auslandsstipendium (DFG SA1034/3-2)
2004 – 2007	Forschungsstipendium des Human Frontiers Science Program (HFSP: SA580LT)

## **7.6 Patente und klonierte Gene**

### **Patent**

PCT/EP03/10228: Lipid phosphatases and uses thereof for treating neuronal diseases.

### **Klonierte Gene**

AF541279 - AF541282 (PRG-1)

AY266266 - AY266268 (PRG-2)

AY300027, AY337718 (hPRG-3)



## Molekulare Mechanismen der Zellprotektion und Regeneration im Zentralen Nervensystem

AY339628 (hPRG-4)

AY341260 (mJP-4a)

AY341261 (rJP-4a)

AY344068 (hJP-4)

AF540876 (rMDF/MAF)

AF540877 (rTetraspanin-5),

### **7.7 Wissenschaftlicher Werdegang**

1993 – 1994	Studium der Mathematik und Umweltwissenschaften, Brandenburger Technische Universität, Cottbus, Germany
1994 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin
1996 – 2001	Wissenschaftliche Ausbildung in den Arbeitsgruppen: <ul style="list-style-type: none"><li>• Prof. Dr. T. Skutella, Charité</li><li>• Prof. Dr. R.Nitsch, Charité</li><li>• PD Dr. B.K. Müller, MPI Tübingen</li></ul>
2001 – 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zell- & Neurobiologie, Charité
2003 – 2004	Arbeitsgruppenleiter am Institut für Zell- & Neurobiologie, Charité
seit 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande

## 7.8 Eidstattliche Erklärung

### EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäss §4 Abs.3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Amsterdam, den 23. November 2005,

---

Dr. med. Nicolai E. Savaskan

## 8 AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN

### Anlage I

Brauer AU, Savaskan NE.

*Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element. Rev Neurosci. 2004;15(1):19-32.*

### Anlage II

Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R, Savaskan NE.

*Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. Brain Res Brain Res Rev. 2004; 45(3):164-78.*

### Anlage III

Savaskan NE, Brauer AU, Kühbacher M, Eyüpoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, Behne D, Nitsch R.

*Selenium deficiency increases the susceptibility to excitatory cell death. FASEB J 2003, 17, 112 – 114.*

### Anlage IV

N. E. Savaskan, A. Heckel, M. Buchfelder, O. Ganslandt, W. H. Moolenaar, C. Nimsky & I. Y. Eyupoglu.

*Inhibition of glioma brain invasion and neuronal cell death by targeted xCT interference. under consideration, 2006.*

### Anlage V

Meier S, Brauer AU, Heimrich B, Nitsch R, Savaskan NE.

*Myelination in the hippocampus during development and following lesion. Cell Mol Life Sci. 2004; 61(9):1082-94*

### Anlage VI

Meier S, Bräuer AU, Heimrich B, Schwab ME, Nitsch R, Savaskan NE.

*Molecular analysis of Nogo genes in the hippocampus. FASEB J 2003 Jun;17(9):1153-5.*

### Anlage VII

*Bräuer AU, Savaskan NE\*, Kühn H, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R.*

*\*both authors contribute equally to this work and are listed alphabetically.*

*A new phospholipid PRG-1 is involved in axon growth and regenerative sprouting. Nature Neurosci 2003; 6(6):572-8.*

### Anlage VIII

*Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R.*

*Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a novel member of the plasticity-related gene family. Eur J Neurosci 2004 Jan; 19(1): 212-220.*

### Anlage IX

*Savaskan NE, Rocha L, Kotter MR, Lubec G, Baer A, van Meeteren L, Kishi Y, Aoki J, Moolenaar WH, Nitsch R. & Bräuer AU*

*Autotaxin (NPP2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. Cell Mol Life Sci 2006 (in press).*