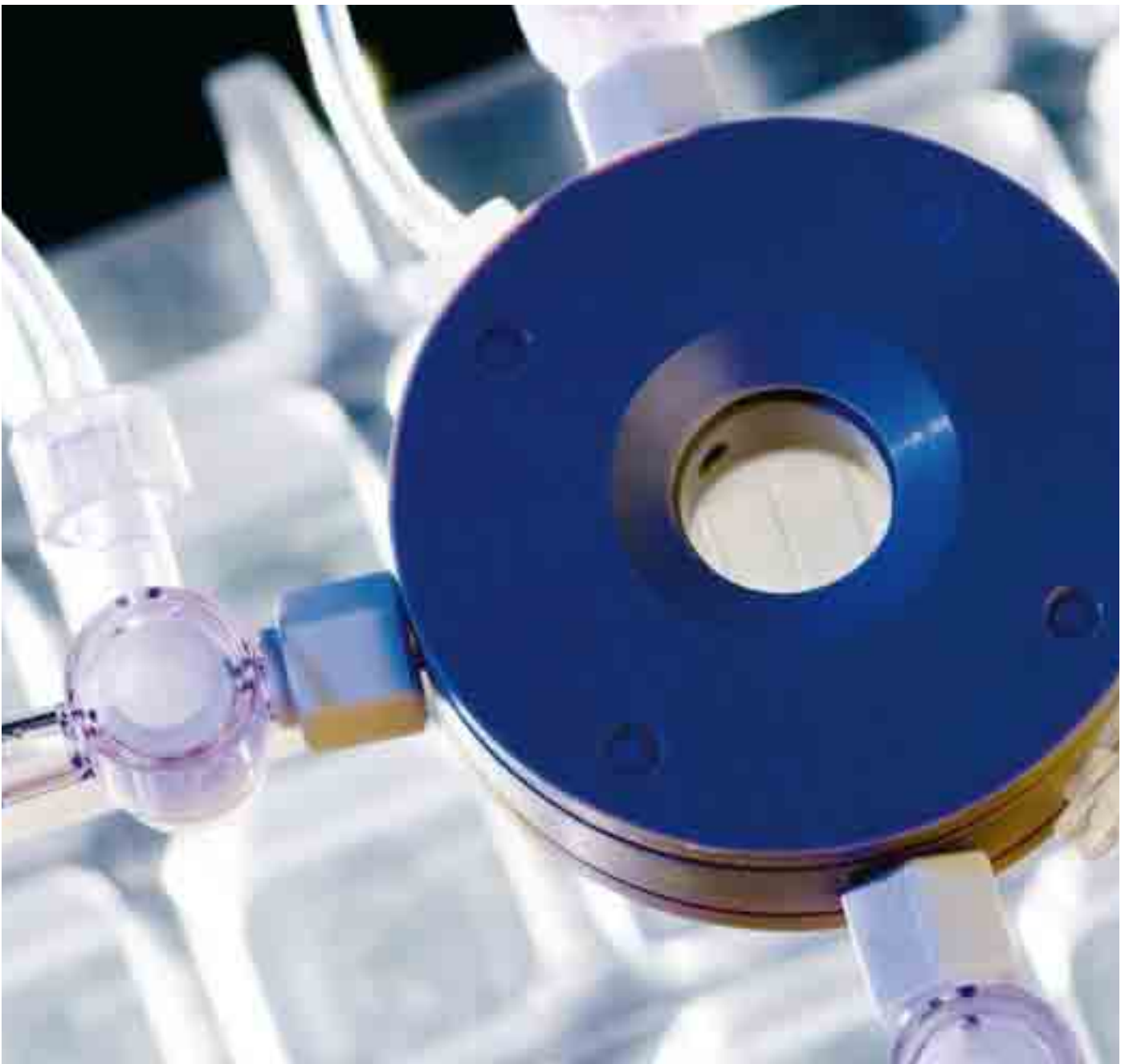




Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

NACHRICHTEN



Jahrgang 39 • 2/2007

Biologie im Forschungszentrum Karlsruhe

**Im Inhaltsverzeichnis verwendete
Abkürzungen:**

IBG	Institut für Biologische Grenzflächen
IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik
ITG	Institut für Toxikologie und Genetik

Herausgeber:

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640 · 76021 Karlsruhe
Telefon 07247 82-0

Redaktion:

Dr. Joachim Hoffmann

Redaktionsbeirat:

Prof. Dr. K. Beheng, IMK
Dr. W. Breitung, IKET
Prof. Dr. E. Dinjus, ITC-CPV
Dr. K. Gompper, INE
Dr. G. Metzger, FTU
Prof. Dr. M. Noe, ITP
Dr. W. Pfleging, IMF-I
Prof. Dr. V. Saile, IMT (Vorsitzender)
Dr. K.-F. Weibezahn, IMB

Layout, Grafik und Satz:

Stolz Grafisches Atelier · Karlsruhe

Druck:

Wilhelm Stober GmbH · Eggenstein

Nachdruck mit Genehmigung des
Forschungszentrums Karlsruhe GmbH
unter Nennung der Gesellschaft und
des Autors gestattet. Beleg erbeten.

Die NACHRICHTEN
können kostenlos über die
Hauptabteilung Bibliothek und Medien
des Forschungszentrums bezogen
werden.

Printed in the Federal Republic of
Germany



Der am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelte CellChip ist eine mikrostrukturierte Gerüststruktur für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen.

Inhalt / Contents

■ **Biologie im Forschungszentrum Karlsruhe** 91
Biology at the Forschungszentrum Karlsruhe

U. Strähle, ITG

■ **CellChip-basierte Bioreaktoren für die extrakorporale Organunterstützung** 93
CellChip-based Bioreactors for extracorporeal Organ Support

E. Gottwald, S. Giselbrecht, B. Lahni, B. Hiebl, K.-F. Weibezahn, IBG

Organ failures are life-threatening conditions that, depending on the organ involved, sooner or later lead to death. Some types, like renal failure, can already appropriately be treated whereas others, like liver failure, can not. This is due to the fact that in contrast to kidney, the liver is the largest metabolic organ with about 600 enzymatic functions known so far that can not be mimicked technically. In the future, chips that are cultivated in suitable bioreactors and are capable of providing an organotypic environment for long term liver cell cultures, could take over some important aspects of liver function that could either lead to a regeneration of the diseased organ or bridge the time to transplantation.

■ **Bioabbaubare dreidimensionale Gerüststrukturen für die Zellkultur** 98
Biodegradable 3D Scaffolds for Tissue Engineering

A. Welle, E. Pindel, IBG; M. Kröger, Freudenberg Forschungsdienste, Weinheim;
K. Niederer, Johannes Gutenberg Universität, Mainz;
I. S. Chronakis, Swedish Institute for Fiber and Polymer Research Mölndal, Schweden

Two aliphatic polycarbonates, Poly(propyl carbonate) (PPC), and Poly(cyclohexyl carbonate) (PCHC), were synthesised from CO₂ and the respective epoxides and subjected to electrospinning to obtain nanofibers. Subsequently, low-power deep UV irradiations were performed to modify surface and, in case of PPC, bulk properties of the nanofibers. Surface modifications of both polymers affected plasma protein adsorption and photochemical bulk modifications are indicating the possibility of spatial control of biodegradation rates, hence allow for control of the progression of host/implant interactions in vivo.

■ **Mikrothermogeformte Polymerfolien für die 3D-Kultur in Bioreaktoren** 103
Microthermoformed Polymer Films for 3D Cultures in Bioreactors

S. Giselbrecht, E. Gottwald, A. Welle, K.-F. Weibezahn, IBG; R. Truckenmüller, IMT; C. Trautmann, GSI, Darmstadt

Forschungszentrum Karlsruhe has developed a microstructured cell carrier (CellChip) which is designed for three-dimensional cultivation of cells. In addition to micro injection moulding, microthermoforming is a new, high throughput capable manufacturing technology being used in the fabrication process. Due to the permanent coherence of the polymer during this forming process, it is possible to produce 3D microstructures with high lateral resolution surface modifications arranged in patterns or gradients. These may be used for example to produce biomimetic scaffolds for directed and efficient differentiation of stem cells.

■ **Leben mit gestückelten Genen**
Living with Split Genes

108

H. König, ITG

The split nature of genes in higher organisms requires the removal of non-coding sequences from messenger (m)RNA molecules during gene expression, in a process called splicing. Splicing requires two complex parallel machineries, and splicing of mRNAs in various ways is an important means to expand the coding capacity of genomes. Misregulation of splicing leads to important diseases. Our work aims at understanding how splicing is regulated and why higher organisms require two parallel splicing systems.

■ **Die Rolle von Chemokinen in der Etablierung der immunologischen Synapse**
The Role of Chemokines in Establishment of the Immunological Synapse

113

J. Adam, M. Cramer, J. Fuchs, S. Weg-Remers, ITG

To understand mechanisms of cellular communication we investigate the cell to cell signal exchange in the immunological synapse between T-lymphocyte and antigen-presenting cell. Recently, chemokine receptors like CXCR4 have been shown to play an important role in the formation of the immunological synapse and in the subsequent signaling events. Utilizing a human inherited immunodeficiency disease model, in which the intracellular part of CXCR4 is deleted, we dissect signaling cascades activated through CXCR4 and elucidate their impact on synapse formation and signal transduction.

■ **Mechanismen der Erkrankung der Skelettmuskulatur**
Mechanisms Underlying Muscular Disorders

118

I. V. Röder, J. Roll, Y. Petersen, J. Martin, R. Rudolf, ITG

Neuromuscular disorders are amongst the most severe and life-threatening conditions in humans and contribute a major burden to health care systems. An important group within these diseases are the muscle dystrophies. Although their genetic origin is relatively well understood there are still big caveats in the understanding of the functional links between the observed gene mutations and muscle symptoms. We use a combination of molecular nanosensors and two-photon microscopy in skeletal muscle to get insights into the physiological mechanisms underlying these diseases.

■ **Von der Grundlagenforschung zur Entwicklung metastasenspezifischer Peptide**
From Basic Science to the Development of Tumor Metastasis Specific Peptides

123

H. Ponta, V. Orian-Rousseau, ITG

CD44 v6 was detected 17 years back as one of the first tumor metastasis specific proteins at the ITG. This induced an explosion of research activities world wide. Nonetheless it was only recently that we discovered its function as a coreceptor for growth factor receptors. The molecular analysis of this function helped us to identify peptides that in a very specific way interfere with the coreceptor function and prevent metastatic spreading of tumor cells in animals. These peptides are now new tools to develop strategies to inhibit tumor metastases formation.

■ **Psychologie der Nahrungsaufnahme in Fliegen und Menschen**
Towards Understanding the Psychology of Feeding in Flies and Man

128

R. Bader, C. Melcher, S. Buch, M. Bülow, M. Peters, M. Glöck, M. Bauer, B. Pankratz, A. Schröck, S. Kurzhals, S. Walther, O. Simakov, M. Pankratz, ITG

Feeding as a fundamental activity in all animals can be regulated by a variety of external sensory stimuli such as olfaction and gustation as well as by systemic internal signals on feeding status and metabolic needs. Facing a major health epidemic in feeding related conditions such as obesity and diabetes, our necessity of dissecting and understanding the complex regulatory network underlying the multiple aspects of feeding behavior is ever increasing. In this article, we highlight the use of *Drosophila* in studying neural circuits that control feeding behavior.

■ **Regulation der Genexpression**
Regulation of Gene Expression

133

U. Strähle, M. März, S. Rathnam, S. Rastegar, ITG

Many processes in our body are controlled by differential expression of genes. Although we know all genes after the complete sequencing of the human genome, we are far from understanding the regulatory mechanisms that control the expression of genes and gene networks. An important step to advance our knowledge in this direction is the systematic analysis of the regulatory switches that control the expression of genes.

■ **Mechanismen der biologischen und toxischen Wirkungen von Nanopartikeln**
Mechanisms of Biological and Toxicological Effects of Nanoparticles

140

S. Diabaté, C. Weiss, ITG

The reasons for adverse health effects of inhaled particles, in particular of nanoparticles < 100 nm are not well understood. Despite the variety of chemical compositions of particles a common mechanism seems to exist, the induction of oxidative stress in cells. Identification of biological actions and causal particle characteristics is important to assess and possibly avoid the toxicological potential of new nanomaterials.

Biologie im Forschungszentrum Karlsruhe

U. Strähle, ITG

Unser Verständnis molekularbiologischer Prozesse ist in den letzten drei Jahrzehnten geradezu explodiert. Nach Physik und Chemie war die Biologie die letzte naturwissenschaftliche Disziplin, die in einem geradezu revolutionären Erkenntnisstrom ihre Geheimnisse preisgegeben hat. Ein wesentlicher Beitrag dabei war sicherlich die Anwendung der Genetik und das Verständnis, dass Gene als Informationseinheiten isoliert und manipuliert werden können. Dies erlaubte hypothesengetriebene Eingriffe in natürliche Prozesse, um damit neue Erkenntnisse zu gewinnen. Unser Verständnis biologischer Prozesse wurde aber auch dadurch vorangetrieben, dass neue interdisziplinäre Ansätze und Technologien in der Biologie in Anwendung gebracht wurden. Beispiele dafür sind die Arbeiten von Watson und Crick, die es ermöglichten die DNA-Struktur aufzuklären und somit den Grundstock legten zur Entschlüsselung des genetischen

Kodes. Ein anderes Beispiel ist der Einsatz des Elektronenmikroskops, mit dem wir die Grenzen der Lichtmikroskopie überschreiten und mit molekularer Auflösung biologische Strukturen untersuchen können. Oder erst die Vorarbeiten in der Informatik und den Ingenieurwissenschaften schufen die Voraussetzungen für die DNS-Sequenzierung im Hochdurchsatzmaßstab, die schließlich zur Entschlüsselung des genetischen Kodes des gesamten Genoms des Menschen und vieler Tiere und Pflanzen führte.

Wir haben große Fortschritte gemacht. Wir sind aber dennoch weit davon entfernt, Prozesse in solchem Detail zu verstehen, dass wir sie gezielt manipulieren können, um somit zum Beispiel genetische Erkrankungen oder umfassend Krebs zu heilen oder in größerem Maßstab Organe zu reparieren. Die Herausforderungen der Biologie des 21. Jahrhunderts sind, nach Entschlüsselung des gesamten

Genoms des Menschen, nun die Funktion der Gene und ihre Wechselwirkung zu verstehen. Die Erkenntnisse der modernen Molekularbiologie lassen Technologieentwicklung erwarten, die ähnlich wie die Erkenntnisse aus der Physik und Chemie unser Leben vollständig verändern werden. Das Ziel der Biologie des 21. Jahrhunderts wird daher auch sein, diese Prozesse so zu verstehen, dass wir sie für technische Anwendungen und für innovative Diagnostik und Therapien einsetzen können.

Die biologische Forschung im Forschungszentrum Karlsruhe, wie sie in beispielhafter Weise in diesem Heft der „Nachrichten“ dargestellt ist, ist bestens auf diese Herausforderungen der Zukunft vorbereitet. Es gibt wahrscheinlich nur wenige Forschungsstätten, wo international renommierte biologische Grundlagenforschung an der Schnittstelle zu herausragender Forschung in Chemie, Physik, Nanotechnologie, Informatik



Abb. 1: Kalottenmodell eines Ausschnitts aus der DNS-Doppelhelix.

und Ingenieurwissenschaften betrieben wird wie hier im Karlsruhe Institute of Technology. Dieses interdisziplinäre Umfeld gilt es zu nutzen und in der Zukunft weiter auszubauen. Wir müssen biologische Prozesse in solcher Tiefe verstehen lernen, dass diese Er-

kenntnisse in synthetischen Ansätzen zur Anwendung kommen können. Erst wenn man in der Lage ist, biologische Phänomene gezielt zu steuern und zu kopieren, wird man diese Prozesse wirklich verstehen. Wir werden dadurch nicht nur neue Erkenntnisse in der

Biologie gewinnen sondern auch neue Technologien für die Märkte der Zukunft schaffen. Das Karlsruhe Institute of Technology bietet dazu die besten Voraussetzungen.

CellChip-basierte Bioreaktoren für die extrakorporale Organunterstützung

E. Gottwald, S. Giselbrecht, B. Lahni, B. Hiebl, K.-F. Weibezahn, IBG

Einleitung

Der Mangel an geeigneten Spenderorganen macht die Entwicklung organunterstützender Systeme erforderlich. Für einige Zielorgane, wie die Niere, gibt es seit Jahrzehnten zuverlässig arbeitende Systeme, die den damit behandelten Menschen das Überleben mit einer akzeptablen Lebensqualität ermöglichen. Ein Grund für den frühen Erfolg der Hämodialyse stellt der relativ einfache Aufbau und die Funktion der Niere dar, die, bis auf wenige synthetische Funktionen, hauptsächlich als Filter arbeitet. Diese Filterfunktion lässt sich durch die Verwendung halbdurchlässiger Membranen relativ leicht mit einem rein technischen System gut nachbilden. Sollen aber auch synthetische Funktionen abgebildet werden, müssen die Systeme lebendes Gewebe enthalten – man spricht von hybriden Systemen [1]. Hybride Systeme sind aber komplizierter im Aufbau, da die optimale Versorgung des im Bioreaktor enthaltenden Gewebes oberste Priorität besitzt.

Bioreaktoren, die insbesondere für die Kultur von Leberzellen (Hepatozyten) kreiert worden sind, befinden sich erst in der klinischen Erprobung. Einer der erfolgversprechendsten Ansätze stellt dabei die Kultivierung von Hepatozyten in Hohlfasermembranen dar. Hohlfasern erlauben die dreidimensionale Kultivierung von Zellen entweder im inneren Hohlraum der Fasern oder im interkapillären Raum. Die Nährstoff- und Gasversorgung erfolgt dann entweder über den interkapillären Raum, das Faserlumen oder über separate Fasern. Allen

Systemen gemein ist jedoch der den Hohlfasersystemen inhärente Nachteil: Das Einströmen des Nährmediums und der Versorgungsgase erfolgt zwangsweise an einem Ende der Hohlfaser. Während des Durchtritts durch die Faser verstoffwechseln die Zellen das Nährmedium und den Sauerstoff. Es kommt also zur Gradientenbildung zwischen Anfang und Ende der Kapillare. Es muss deshalb immer ein Kompromiss zwischen Faserlänge und Zellzahl gefunden werden, um eine Unterversorgung der am Faserende liegenden Zellen auszuschließen. Idealerweise wären also alle Zellen eines Kultursystems an allen Positionen im Bioreaktor gleich gut mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Darüberhinaus sollten insbesondere Hepatozyten dreidimensional definiert kultiviert werden, da die Dreidimensionalität zu einem deutlichen längeren Erhalt der organotypischen Funktionen der Zellen führt. Werden die Zellen im interkapillären Raum kultiviert, bilden sich undefinierte Gewebsschichten aus, die nur durch die Größe des interkapillären Raumes beschränkt sind und unter Umständen die für eine Versorgung über Diffusion begrenzte mittlere freie Weglänge überschreiten.

Der CellChip

Der am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG) entwickelte, mittlerweile als CellChip bekannte Ansatz soll die Nachteile von Hohlfasersystemen umgehen und wurde als Mikrosystem realisiert, das durch seinen Aufbau (Abb. 1) einige deutliche Vorteile gegenüber anderen Systemen in sich vereint, die im folgenden erläutert werden

sollen. Der CellChip ist als Einwegartikel konzipiert, der aus gut im Mikrospritzguss verarbeitbaren Materialien, wie Polycarbonat oder Polymethylmethacrylat, hergestellt werden kann. Der aus diesem Prozess resultierende cp-Chip (Abb. 1, oberes Schema) ist durch ein Gitter charakterisiert, das bis zu 900 Mikrocontainer auf einer Grundfläche von 1 cm² enthalten kann. Jeder Mikrocontainer mit den Maßen 300 × 300 × 300 µm kann 5 bis 10000 Zellen aufnehmen, dies entspricht ca. 4,5 bis 9 Mio. Zellen pro Chip (Abb. 2). Die damit erreichte Zelldichte beträgt ca. 50 % der Zelldichte einer intakten Leber [2].

Da diese Variante des CellChips, der hinterher noch gelasert werden musste, um Poren für die Mediumversorgung einzubringen, sehr aufwändig zu fertigen war, wurde der Herstellungsprozess derart vereinfacht, dass der Boden durch eine vorkonfektionierte Membran ersetzt wurde. Der so entstandene cf-Chip (Abb. 1, mittleres Schema) unterschied sich nicht von den Mikrocontainermaßen. Jedoch wurde die Anzahl der Mikrocontainer auf bis zu 1156 erhöht. Die maximal kultivierbare Zellzahl stieg damit auf bis zu knapp 12 Mio. Zellen an, was für die spätere Anwendung im Bioreaktor für ein extrakorporales Organunterstützungssystem ein wichtiger Schritt war. Es muss auf möglichst kleine Volumina des Reaktorkreislaufs hingearbeitet werden, um einerseits auf den Einsatz von Plasmaexpandern verzichten zu können und andererseits das Kreislaufvolumen klein bleibt, um die von den Zellen in den Kreislauf abgegebenen Proteine nicht zu stark zu verdünnen.

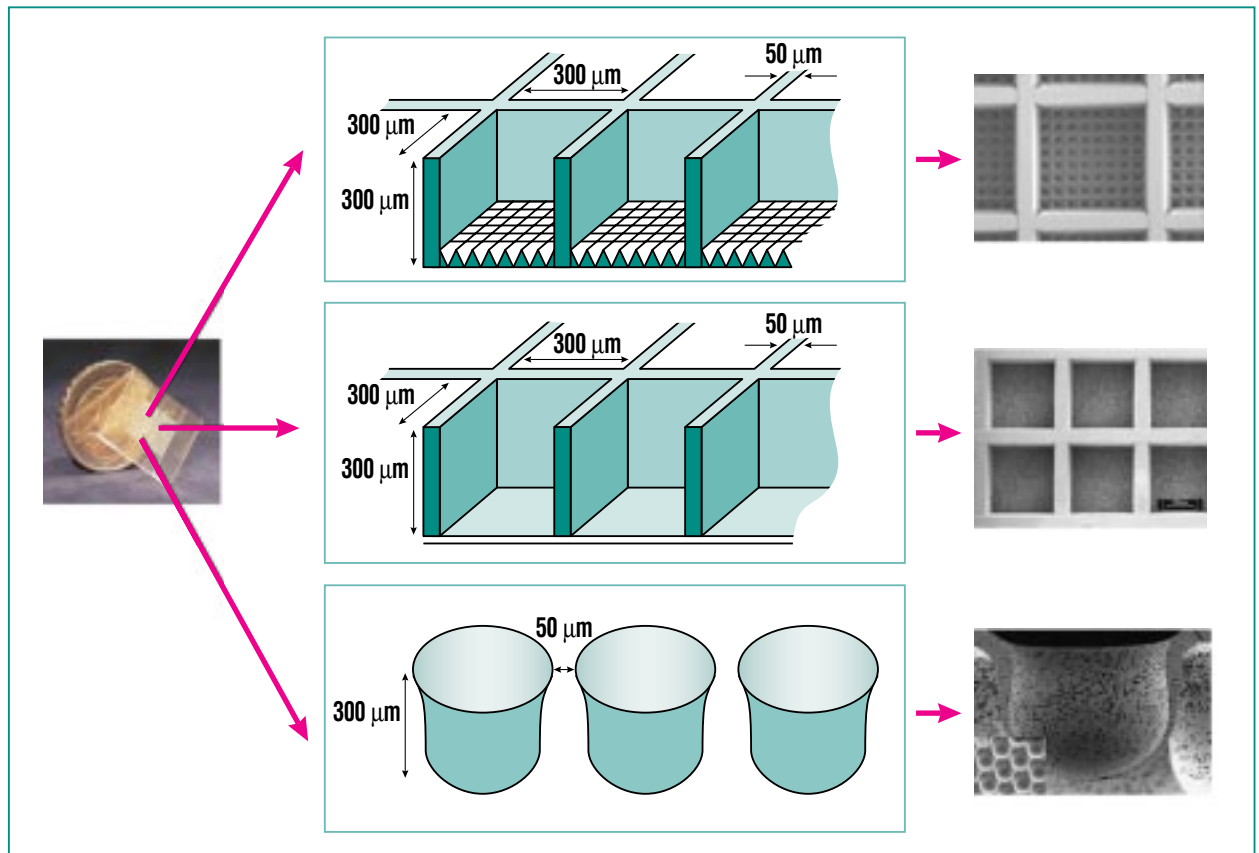


Abb. 1: CellChip-Varianten. Das obere Schema zeigt den sog. cp-Chip, der durch seine pyramidalen Vertiefungen charakterisiert ist. In der mittleren Variante, dem cf-Chip, wurde der pyramidenförmig ausgestaltete Boden durch einen flachen Boden ersetzt, der durch eine poröse Membran gebildet wird. Die untere Variante, der r-Chip, ist durch seine runden Kavitäten charakterisiert. Durch den SMART-Prozess ist die Herstellung des Chips wesentlich vereinfacht worden.

Die dritte Variante des CellChips, als r-Chip bezeichnet, unterscheidet sich nicht nur durch den Herstellungsprozess, sondern auch im Design der Mikrokontainer. Der Herstellungsprozess wurde durch die Einführung eines am IBG, IMT und GSI (Gesellschaft für Schwerionenforschung) entwickelten und auf Mikrothermoformen basierenden Prozesses zur SMART-Technologie (Surface Modification And Replication by Thermoforming) weiterentwickelt. In diesem Prozess werden Membranen nahe ihrer Glasübergangstemperatur verstreckt. Der Vorteil dieses Pro-

zesses ist nicht nur die wenige Schritte umfassende Prozesskette, sondern auch die Möglichkeit der Oberflächen- und Vollmaterial-Modifikation des Materials vor dem Verstrecken der Folien. Damit sind nun hochaufgelöste Polymermodifikationen in 3D-Strukturen realisierbar, sogar in solchen mit echten Hinterschnitten. Ein weiterer Vorteil des SMART-Prozesses besteht in der Möglichkeit die Größe der Poren sehr genau einstellen zu können, da die Ätzbedingungen der latenten Spuren nach dem Schwerionenbeschuss die Porengröße definieren. Damit sind

geeignete Porenanzahlen und -größen für alle möglichen Zellen einstellbar [3] (für weitere Einzelheiten siehe auch Artikel von S. Giselbrecht in dieser Ausgabe der „Nachrichten“).

Bioreaktoren

Für eine definierte Versorgung der Zellen mit Nährmedium und Sauerstoff werden die CellChips in eigens dafür konstruierte Bioreaktoren eingebaut [4]. Je nach Anwendungszweck lassen sich ein oder mehrere CellChips in einem Bioreaktor unterbringen. Für eine

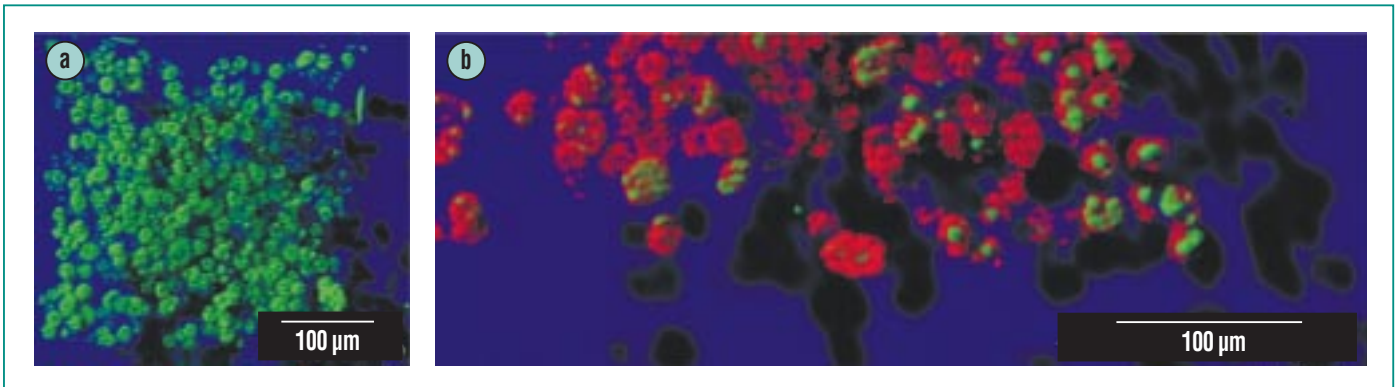


Abb. 2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Aufsicht) von Hepatozyten (Hep G2) in einem Mikrocontainer eines cf-Chips. a) Färbung der Zellkerne mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff, der die Zelldichte im Chip widerspiegelt. b) Darstellung des Cytoplasmas durch Nachweis eines cytoplasmatischen Proteins, das mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gelabelt wurde (Querschnitt).

Anwendung als extrakorporales Organunterstützungssystem geht man im Falle der Leber von einer erforderlichen Zellmasse von mindestens 10 % des Lebergewichts aus. Die Leber eines 75 kg schweren Menschen wiegt ca. 1,5 kg und besteht aus $2,5 \times 10^{11}$ Zellen. Für einen Bioreaktor wäre demnach eine Leberzellmasse von

150 g, entsprechend $2,5 \times 10^{10}$ Zellen erforderlich. Mit dem derzeitigen CellChip-Design wären also gut 2000 CellChips erforderlich, um eine ausreichende Zellmasse für humane therapeutische Anwendungen zu erreichen.

Um die Realisierbarkeit zu testen, wurden zunächst Bioreaktoren ent-

wickelt, die eine ausreichende Zellzahl für eine Anwendung am Kleintier aufnehmen können (Abb. 3). Der 32 CellChips fassende Bioreaktor beherbergt knapp 400 Mio. Zellen. Dies entspricht der Gesamtzellzahl einer jugendlichen Rattenleber. Der Bioreaktor ist segmentiert, d. h. er fasst jeweils vier CellChips in acht Gruppen zu-

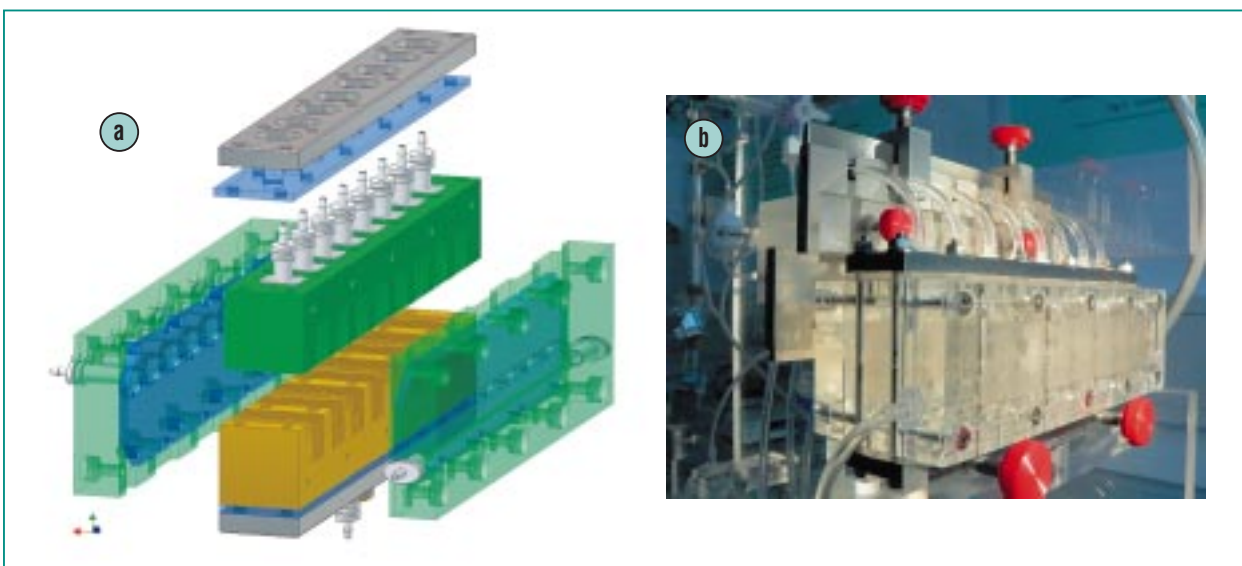


Abb. 3: Bioreaktor für die Anwendung am Kleintier, wie beispielsweise der Ratte. a) Explosionszeichnung des Bioreaktors. Der Bioreaktor kann 32 CellChips aufnehmen (acht Segmente à vier CellChips), entsprechend knapp 400 Mio. Zellen, der Zellzahl einer kompletten Rattenleber. b) Bioreaktor in zusammengesetztem und verschlauchtem Zustand.

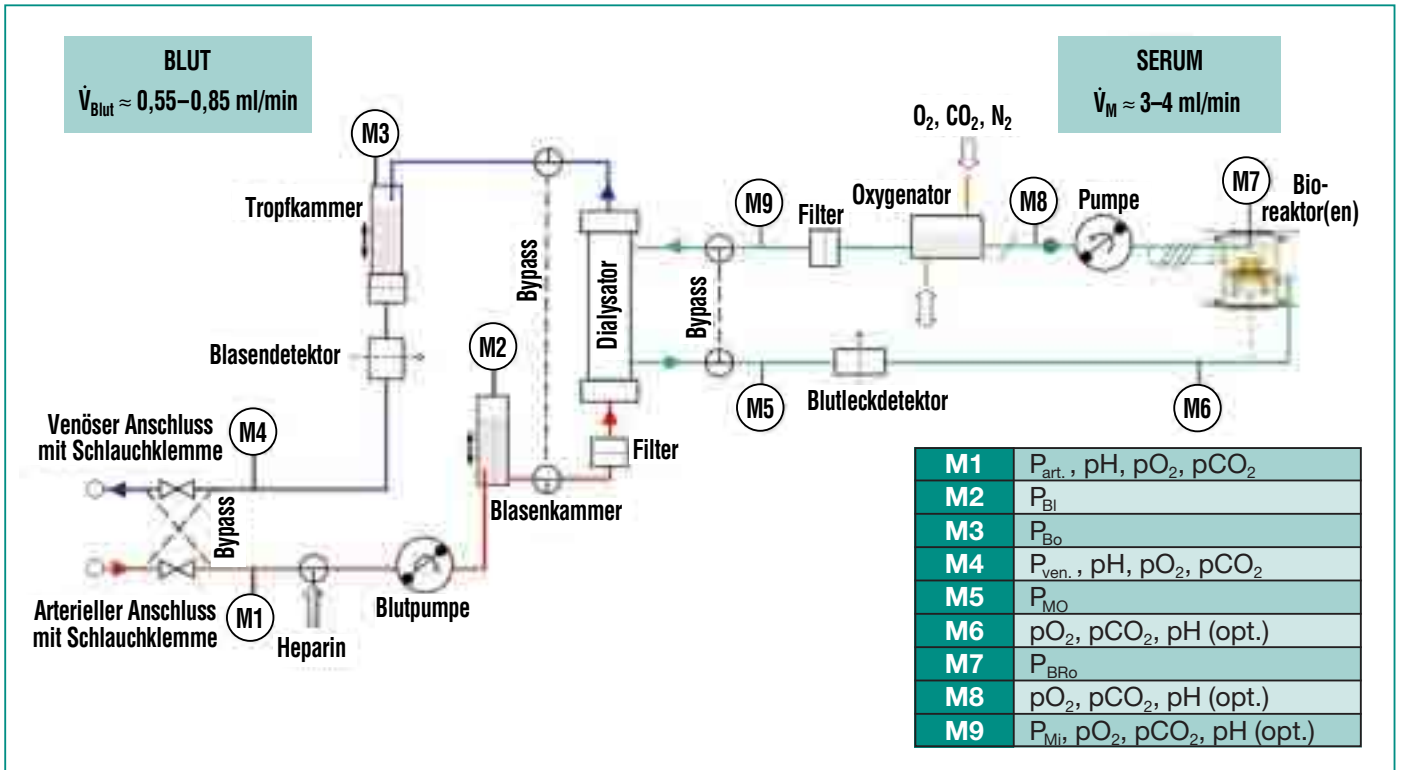


Abb. 4: Extrakorporalkreislauf für die Anwendung am Kleintier.

sammen, die unabhängig voneinander durchströmt werden können. Der Bioreaktor stellt zwar den zentralen Teil eines Extrakorporalkreislaufs dar, ist aber nur ein Bestandteil des Gesamtsystems. Eine weitere wichtige Komponente stellt das Dialysatormodul bzw. der Plasmaseparator (Abb. 4) dar, der

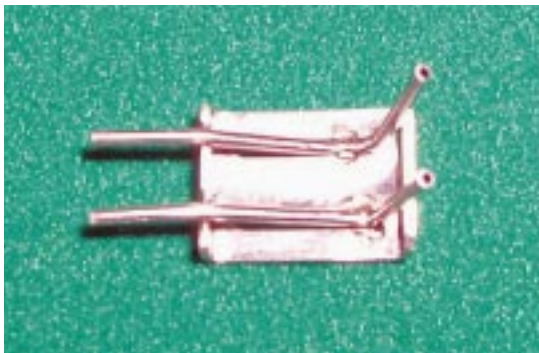


Abb. 5: Schädelimplantat für die Entnahme und Rückführung des Blutes aus bzw. in den Körperkreislauf des Versuchstieres.

das für den Sekundärkreislauf notwendige Fluid aus dem Vollblut separiert. Es stellt darüberhinaus die Schnittstelle zwischen dem Primärkreislauf (Blut) und Sekundärkreislauf (Plasma) dar. Um das gereinigte Plasma dem Tier unbeschadet zuführen zu können, sind ferner Module wie Pumpen, Blutleckdetektoren, Blaskammern, Sensoren für Druck, Sauerstoff usw. notwendig, die an verschiedenen Stellen des Kreislaufs integriert sind.

Da am Kleintier kein Anschluss des Extrakorporalkreislaufs analog zur humanen Situation erfolgen kann, nämlich über einen sogenannten arterio-venösen Shunt (Verbindung einer Vene mit einer Arterie) im Unterarm, mussten zunächst Operationstechniken für die Blutentnahme sowie dessen Rückführung ent-

wickelt werden. Erfolgreich verliefen Versuche zur Entnahme und Rückführung des Blutes über geeignete Gefäße im Kopfbereich des Tieres. Dazu wird den Tieren zunächst eine Hilfskonstruktion in das Schädeldach implantiert, die den Anschluss der notwendigen Schläuche ermöglicht (Abb. 5). Nach dem Wiedererwachen kann sich das Tier damit sogar frei bewegen, da störende Schläuche über eine Halterung nach oben geführt werden. Die Methoden zur Charakterisierung der zellulären Funktionen im Bioreaktor sind bereits seit Jahren etabliert und orientieren sich sowohl an klinischen Tests als auch an pharmakologisch relevanten Tests zur Stoffwechselfähigkeit.

Ausblick

Erste Tierversuche sollen zunächst zeigen, ob Tiere, denen lediglich ein Teil der Leber (ca. 75 %) entfernt worden ist, sogenannte teilhepatektomierte Tiere, nach Anschluss an das System überleben können. Weitere Evaluierungen sehen dann Versuche an total hepatektomierten Tieren vor, also solchen, denen die Leber komplett entfernt wurde. Da solche Tiere auch ohne Leber

drei bis fünf Tage überleben können, werden diese Versuche über mindestens sieben Tage laufen.

Das CellChip-System eignet sich darüberhinaus auch für die Kultur anderer Zellen, wie wir in zahlreichen Experimenten zeigen konnten [5]. Beabsichtigt ist ferner der Einsatz als Stammzellplattform. Autologe Stammzellen könnten zunächst expandiert und anschließend differenziert werden, um sie schließlich transplantieren zu kön-

nen. Da der CellChip auch aus bioresorbierbaren Materialien hergestellt und in seinem Design sehr variabel gestaltet werden kann, könnten im CellChip in vitro differenzierte autologe Stammzellen nach Expansion und Differenzierung direkt, also ohne Entnahme aus dem CellChip transplantiert werden.

Literatur

- [1] E. Gottwald, *Spektrum der Wissenschaft* 2002, 1: 44–51
- [2] G. Knedlitschek, F. Schneider, E. Gottwald, TH. Schaller, E. Eschbach, K.-F. Weibezahn, *Journal of Biomechanical Engineering*, 121(1999) S. 35–39
- [3] S. Giselbrecht, T. Gietzelt, E. Gottwald, C. Trautmann, R. Truckenmüller, K.-F. Weibezahn, A. Welle, *Biomed. Microdev.* 2006, 8: 191–199
- [4] E. Eschbach, S.S Chatterjee, M. Nöldner, E. Gottwald, H. Dertinger, K.-F. Weibezahn, G. Knedlitschek, *J. Cell. Biochem.* 2005, 95: 243–255 (2.946)
- [5] E. Gottwald, S. Giselbrecht, C. Augspurger, N. Dambrowsky, R. Truckenmüller, V. Piotter, T. Gietzelt, O. Wendt, W. Pflöging, A. Welle, A. Rolletschek, A.M. Wobus, K.-F. Weibezahn, *Lab Chip* 2007, 7, 777–785 DOI 10.1039/b618488j

Bioabbaubare dreidimensionale Gerüststrukturen für die Zellkultur

A. Welle, E. Pindel, IBG; M. Kröger, Freudenberg Forschungsdienste, Weinheim;
K. Niederer, Johannes Gutenberg Universität Mainz;
I. S. Chronakis, Swedish Institute for Fiber and Polymer Research Mölndal, Schweden

Einleitung

Komplexe dreidimensionale Strukturen sind einer der auffälligsten Unterschiede zwischen der einfachen Zellkultur in Petrischalen, wie sie seit über hundert Jahren eingesetzt werden [1], und dem modernen „Tissue engineering“ [2, 3], das heißt der Züchtung größerer Zellverbände bis hin zu ganzen Organen in vitro oder in vivo nach Implantation eines mit Zellen vorbesiedelten Gerüsts. Wie schwierig diese Aufgabe immer noch ist, zeigt die geringe Zahl und die Art der bereits klinisch einsetzbaren Gewebe: Haut, Knochen, Knorpel, sowie Kiefer/Zahnfleisch.

Solche Gewebestrukturen können nur erhalten und stabilisiert werden, wenn neben den Zellen das oft vollsynthetische, bioabbaubare Gerüst sowie das Zusammenspiel zahlreicher Signaltransduktionswege im Organoid ex vivo beherrschbar werden. In den vergangenen zwanzig Jahren hat das Tissue engineering in allen diesen drei Bereichen eine rasante Entwicklung erfahren, zu der auch zahlreiche Arbeiten aus der Polymerchemie und den Materialwissenschaften beigetragen haben.

Ein noch nicht befriedigend gelöstes Problem im Falle vieler Gewebe, insbesondere stoffwechselaktiver Zellen in größeren Implantaten, stellt die Ausbildung neuer Blutgefäße (Neovaskularisierung) dar, die für den Anschluss des Implantats an das Blutgefäßsystem und somit für die Versorgung der Zellen im Gerüst mit Sauerstoff und Nährstoffen nötig ist [4].

Gegenwärtig sind zur Erzeugung dreidimensionaler Kunststoff-Gerüststrukturen verschiedene Methoden von größerer Bedeutung: Das 3D-Drucken [5], das Aufschäumen mit Treibgasen, die thermisch induzierte Phasenseparation (TIPS) [6], das „Solvent casting and particulate leaching“ (SCPL) oder kurz „Salt leaching“ [6], sowie das „Electrospinning“ [7, 8] (Tab.1). Teilweise sind auch Kombinationen dieser Verfahren möglich.

Das höchst aufwändige 3D-Drucken (Rapid prototyping) erlaubt zwar die Herstellung sehr definierter Gerüste, ist jedoch nicht für alle Polymere geeignet und liefert gegenwärtig nur verhältnismäßig grobe Strukturen im Bereich von größer 10 µm. Somit ist diese Technik für den Einsatz im Bereich Knochen

gut, für kleinskalige und weiche Gewebe dagegen weniger gut geeignet. Grundlegend für eine erfolgreiche Besiedelung des Netzwerks (Scaffold) mit Zellen ist dessen Offenporigkeit. Diese Interkonnektivität aller Hohlräume des Gerüsts ist bei einem schwammartigen Polymer, das durch Aufschäumen während der Polymerisation oder nach Aufschmelzen des fertigen Polymers beziehungsweise durch TIPS gewonnen wird, relativ schwierig zu erreichen. Demgegenüber liefert das Electrospinning ohne Weiteres ein filzartiges Gewebe welches keinerlei abgeschlossene Hohlräume aufweisen kann. Dennoch wurde kürzlich bezweifelt, dass die Porengröße in dickeren Geweben (< 1 mm), die per Electrospinning erzeugt wurden, für die Zellmigration ausreichend ist [4]. Unsere nachfolgend beschriebenen Experimente zeigen hier einen Lösungsweg auf.

Experimente und Ergebnisse

Um einige genannte Nachteile von Gerüststrukturen für das Tissue engineering zu umgehen, wurden im Rahmen einer Kooperation zwischen

	3D-Drucken	Treibgas-schäumen	TIPS	SCPL	Electro-spinning
Kontrolle d. Struktur	++	+	-	+	-
Offenporigkeit	++	--	-	++	++
Oberfläche/Volumen Verhältnis des Gerüsts	--	+	-	-	++
Geschwindigkeit, Skalierbarkeit	--	+	-	--	++
Vielseitigkeit	-	++	--	+	+

Tab. 1: Stärken und Schwächen der meistverwendeten Methoden zur Herstellung dreidimensionaler Polymergerüste für das Tissue engineering.

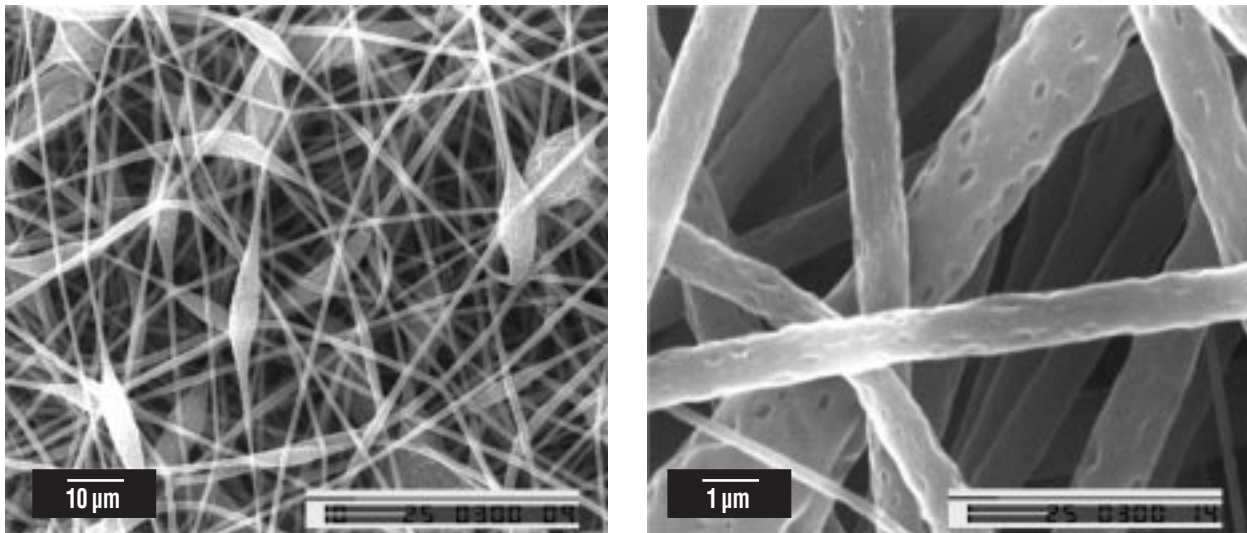


Abb. 1: PPC-Fasern die per Electrospinning erzeugt wurden.

dem Forschungszentrum (IBG und ITC-CPV) und dem Swedish Institute for Fiber and Polymer Research neuartige Gerüste aus aliphatischen Polycarbonaten per electrospinning erzeugt und auf ihre biologische Anwendbarkeit getestet [9].

Polymersynthese und -verarbeitung

Zwei Polycarbonate wurden in einer umweltfreundlichen Synthese ohne Lösungsmittel direkt aus CO₂ und Epoxiden hergestellt:

1. Poly(cyclohexyl carbonat), PCHC, wurde aus CO₂ und Cyclohexenoxid synthetisiert. Als homogener Katalysator diente hierbei ein im ITC-CPV neu entwickelter Zinkkomplex mit einem 3-Amino-2-cyanoimidazoacrylat-Liganden. Dieser Ligand wurde in einer dreistufigen Synthese aus Cyanoessigsäure gewonnen. Der katalytisch aktive Acetat-Komplex wur-

de durch die Reaktion dieses Liganden mit Diethylzink und nachfolgender Reaktion mit Essigsäure generiert. Die molekulare Struktur des Katalysators erlaubt eine homogen katalysierte lebende Polymerisation¹⁾, die zu einem Polymer mit enger Molekulargewichtsverteilung führt [10].

2. Poly(propyl carbonat), PPC, wurde durch heterogene Katalyse mit Zinkglutarat aus CO₂ und Propylenoxid erhalten. Der Katalysator wurde aus Zinkoxid hergestellt. Versuche andere Zinkkomponenten wie Diethylzink als Startmaterial zu verwenden, führten zu einem starken Verlust der katalytischen Aktivität. Durch die Verwendung eines heterogenen Katalysators zeigte das entstandene PPC eine breite Streuung des Molekulargewichtes. Dagegen war das mittlere Molekulargewicht des Polymers im Vergleich zum PCHC größer.

Beide Polymere wurden anschließend dem Electrospinning unterworfen. Bei diesem Prozess wird ein elektrisches Potenzial zwischen einer Polymerlösung, die am Ende einer Kapillare austritt, und einer geerdeten Metallplatte angelegt. Wenn das elektrische Feld eine bestimmte kritische Größe, die von der Oberflächenspannung der Polymerlösung abhängig ist, übersteigt, wird ein geladener Polymerstrahl kontinuierlich ausgestoßen der durch eine radiale Ladungsabstoßung in viele Teilstrahlen zerfällt, die dann durch die rasche Verdunstung des Lösungsmittels in erstarrtem Zustand als Nanofasern auf dem Kollektor auftreffen (siehe Abb. 1).

Chemisch/biologische Charakterisierung

Arbeiten verschiedener anderer Gruppen [11, 12] haben gezeigt,

¹⁾ Eine lebende Polymerisation (eng. polymerization) ist eine Kettenreaktion ohne Übertragungsreaktionen oder Abbruchreaktionen. Bei der lebenden Polymerisation bleiben nach Verbrauch des Monomers die Kettenenden aktiv, d. h. nach Zusatz von frischem Monomer wachsen die Ketten weiter. Bei den meisten lebenden Polymerisationen handelt es sich um anionische Polymerisationen, es gibt aber auch kationische und radikalische lebende Polymerisationen. Besondere Bedeutung hat die lebende Polymerisation bei der Herstellung von Blockcopolymeren.

dass aliphatische Polycarbonate unter milden Bedingungen zu einem gewissen Maß enzymatisch abgebaut werden. Ein Gewichtsverlust und die Änderung der Oberflächenstruktur und der Benetzbarkeit von PPC in biologischem Milieu sowie ein Gewichtsverlust von Polyethylencarbonat durch die Einwirkung von Lipasen zweier Rhizopus-Spezies wurden bereits gezeigt, so dass eine Bioabbaubarkeit des PPC erwartet werden kann. An PCHC wurde ein Hydrolyseexperiment durchgeführt, welches jedoch mittels Gelpermeationschromatographie keine signifikante Verringerung der mittleren molaren Masse zeigte. Daraus folgern wir eine im Vergleich zum PPC wesentlich höhere Beständigkeit des PCHC gegenüber Hydrolyse.

Beide Polymere wurden einem Biokompatibilitätstest gemäß EN ISO 10993-5 in ihrer ursprünglichen Form (aufgesponnen auf Glas) unterworfen. Der Agar Overlay Test mit L929-Zellen unter Standardbedingungen zeigte keine zytotoxischen Effekte des PPC und PCHC. Auch bei direkter Besiedelung verhielten sich beide Polymere zellfreundlich (Abb. 2). Sogar empfindliche primäre Rattenhepatozyten besiedelten spontan ein Kissen aus PPC-Nanofasern und zeigten gute Vitalitätsraten.

Polymermodifikation

Im Rahmen dieser Studie wurde die Modifikation der gesponnenen Fasern durch hartes UV-Licht untersucht. Die UV-Bestrahlung von Polymeroberflächen in Luft induziert bei Dosen von 1 bis 5 mJ/cm^2 üblicherweise Photooxidationen die zu Peroxiden und Carbonsäure-

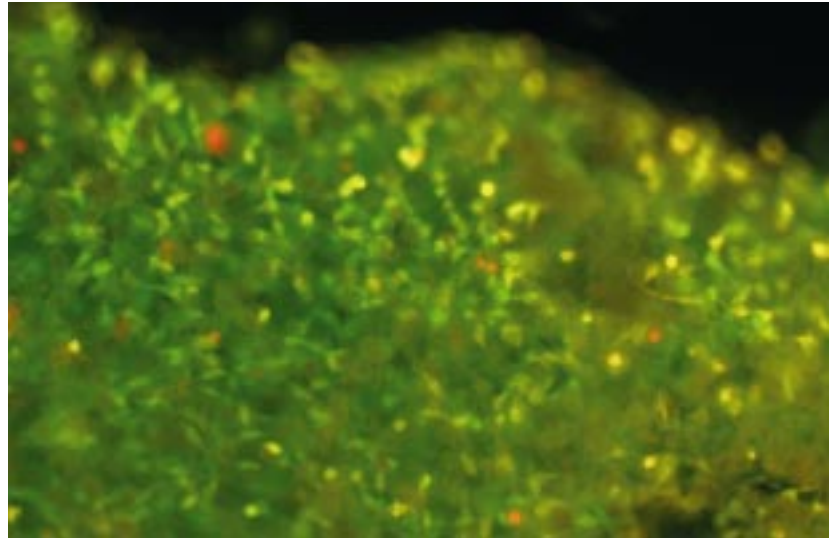


Abb. 2: Fluoreszenzaufnahme von L929-Fibroblasten in einem PPC-Gewebe, Kulturdauer: zwei Tage, Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid Doppelfärbung. Lebende Zellen erscheinen grün, abgestorbene rot.

gruppen führen, aber noch nicht zur Ablation, d. h. Massenverlust. Dosen $> 10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ bewirken einen Oberflächenabtrag bei Polystyrol und Poly(methylmethacrylat), haben jedoch offenbar keine erkennbaren Effekte auf tiefere Schichten der Materialien. Neben dieser bereits an den biostabilen Polymeren

beobachteten Photooxidation [13] konnte im Falle von PPC zusätzlich eine Veränderung im Inneren der Fasern nachgewiesen werden: Das mittlere Molekulargewicht des Polymers sank auf etwa die Hälfte, siehe Abb. 3. Bei PCHC sank das mittlere Molekulargewicht lediglich um ein Fünftel.

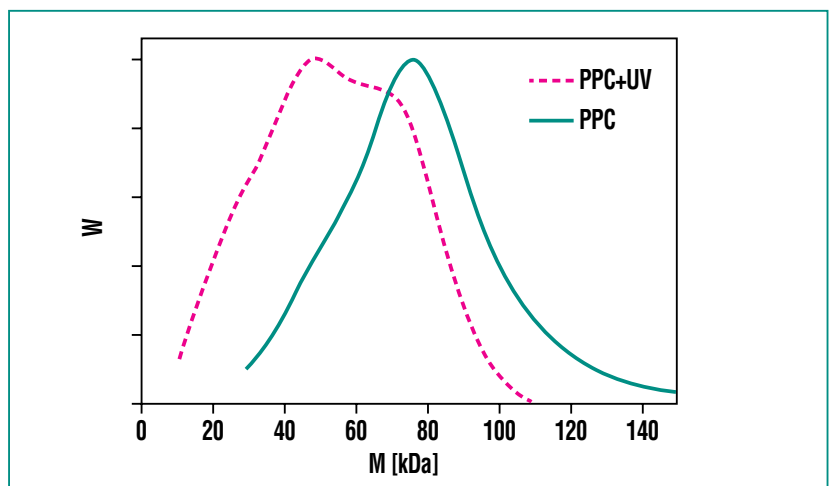


Abb. 3: Molekulargewichtsverteilung aus Gelpermeationschromatographien von nativem PPC und PPC-Nanofasern nach Bestrahlung mit hartem UV-Licht. (W: Häufigkeit; M: Molmasse, 1 kDa entspr. 1 kg/Mol).

Die Veränderung am Polymergerüst der PPC-Nanofasern hat deutliche Auswirkungen auf das Verhalten des besiedelten Substrats in vitro. Während unbestrahlte PPC-Fasern in der Zellkultur auch nach mehreren Tagen keine strukturellen Veränderungen zeigten, deutet ein Quellen und Erweichen der UV-bestrahlten Fasern innerhalb eines Tages nach Fibroblastenaussaat auf einen gesteigerten hydrolytischen und enzymatischen Abbau des modifizierten Polymers hin. Abb. 4 zeigt eine Schicht aus PPC-Nanofasern die mittels einer Maske, die UV-Licht in mäanderförmigen Bereichen durchlässt, mikrostrukturiert wurde.

Unter den mäanderförmigen, offenen Bezirken der Lithographiemaske ist das Fasergespinnst tiefem UV-Licht ($\lambda = 185 \text{ nm}$) ausgesetzt worden. Nach Einbringen in eine Fibroblastensuspension setzt innerhalb von 20 h die Änderung der Fasermorphologie ein. Die bestrahlten Fasern quellen auf und haften am Deckgläschen. In den unbelichteten Zonen bleibt die Morphologie der Fasern unverändert, jedoch lösen sich hier die Fasern von der Unterlage und das Gespinnst kontrahiert so dass offene Bereiche entstehen. Zellen adhären sowohl auf bestrahlten als auch auf unbestrahlten Fasern.

Zusammenfassung

Die hergestellten Fasern haben eine nanoskalige Morphologie und eine leicht poröse Oberflächenstruktur. Die erhaltenen Gerüste können sowohl ohne eine Nachbehandlung für die Zellkultur verwendet werden als auch mit zelladhäsionsunterstützenden Prote-



Abb. 4: Fotomontage. Oben: Durch UV-Bestrahlung modifizierte Schicht aus PPC-Nanofasern auf einem Deckgläschen. Mitte und unten: Die verwendete Lithographiemaske im gleichen Maßstab.

inen beschichtet werden. Bei PPC-Nanofasern führt eine photochemische Oberflächenmodifikation zur Steigerung der spontanen Adsorption adhäsionsstimulierender Plasmaproteine sowie zusätzlich zu Veränderungen der Volumeneigenschaften des Polymers (Molekularmassenverteilung). Es ist davon auszugehen, dass die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus in vivo, die von der Kettenlänge des Polymers abhängt, durch diese Technologie kontrollierbar ist. Dabei sollten maßgeschneiderte Gerüststrukturen und Abbauprofile mit einer lateralen Auflösung von

ca. $50 \mu\text{m}$ durch die UV-Nachbehandlung der PPC-Fliesstoffe erreichbar sein. Dadurch können zwei Fortschritte erreicht werden: 1. Verbesserte Zugangswege für das kontinuierliche Einwachsen der (Spender-) Zellen des Zielgewebes im In-vitro-Schritt und patienteneigener Zellen im In-vivo-Schritt des Tissue engineering. 2. Anlage von Blutgefäßen im implantierten Gewebe durch die gezielte Vorbereitung von Kanälen bei der Scaffold-Herstellung. Somit kann eine kritische Hürde für den Einsatz größerer konventioneller Implantate überwunden werden.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Simone Weigel für ihre exzellenten Beiträge zu dieser Arbeit, sowie Brigitte Lahni, Cordula Nies, Tim Scharnweber

und Michael Bruns für ihre wertvolle Unterstützung. I. S. Chronakis wurde von der Swedish Agency for Innovation Systems finanziell unterstützt.

Literatur

- [1] R.J. Petri, *Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens, Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde, 1887, 1: 279–80*
- [2] R. Langer, J.P. Vacanti, *Tissue Engineering, Science, 1993, 260: 920–6*
- [3] C.A. Vacanti, *History of Tissue Engineering and A. Glimpse Into Its Future, Tissue Eng., 2006, 12: 1137–42*
- [4] Y. Ikada, *Challenges in tissue engineering, J. R. Soc. Interface, 2006, 3: 589–601*
- [5] C.X.F. Lam, X.M. Mo, S.H. Teoh, D.W. Hutmacher, *Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer, Mater. Sci. Eng. C, 2002, 20: 49–56.*
- [6] Y. Cao, G. Mitchell, A. Messina, L. Price, E. Thompson, A. Penington, W. Morrison, A. O'Connor, Geoffrey Stevens, J. Cooper-White, *The influence of architecture on degradation and tissue ingrowth into three-dimensional poly(lactico-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo, Biomaterials, 2006, 27: 2854–64*
- [7] X.M. Mo, C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation, Biomaterials, 2004, 25: 1883–90*
- [8] K. Tuzlakoglu, N. Bolgen, A.J. Salgado, M.E. Gomes, E. Piskin, R.L. Reis, *Nano- and micro-fiber combined scaffolds: A new architecture for bone tissue engineering, J. Mat. Sci.: Mater. Med., 2005, 16: 1099–104*
- [9] A. Welle, M. Kröger, M. Döring, K. Niederer, E. Pindel, I.S. Chronakis, *Electrospun aliphatic polycarbonates as tailored tissue scaffold materials, Biomaterials, 2007, 28: 2211–9*
- [10] M. Kröger, C. Folli, O. Walter, M. Döring, *Alternating Copolymerization of Carbon Dioxide and Cyclohexene Oxide and Their Terpolymerization with Lactide Catalyzed by Zinc Complexes of N,N Ligands, Adv. Synth. Catal., 2006, 348: 1908–18*
- [11] L.C. Du, Y.Z. Meng, S.J. Wang, S.C. Tjong, *Synthesis and Degradation Behavior of Poly(Propylene Carbonate) Derived from Carbon Dioxide and Propylene Oxide, J. Appl. Polym. Sci., 2004, 92: 1840–6*
- [12] M. Zhou, M. Takayanagi, Y. Yoshida, S. Ishii, H. Noguchi, *Enzyme-catalyzed degradation of aliphatic polycarbonates prepared from epoxides and carbon dioxide, Polym. Bulletin, 1999, 42: 419–24*
- [13] A. Welle, E. Gottwald, *UV-Based Patterning of Polymeric Substrates for Cell Culture Applications, Biomed. Microdev., 2002, 4: 33–41*

Mikrothermogeformte Polymerfolien für die 3D-Kultur in Bioreaktoren

S. Giselbrecht, E. Gottwald, A. Welle, K.-F. Weibezahn, IBG; R. Truckenmüller, IMT; C. Trautmann, GSI, Darmstadt

Einleitung

Die Herstellung und der Erhalt dreidimensionaler Zellkulturen mit organotypischen Eigenschaften ist nicht nur in der Biologie ein zentrales Thema, sondern auch in engverwandten Bereichen wie der Medizin und der Pharmazie, z. B. als Gewebeersatz, als verbessertes Modell für Wirkstoff- und Toxizitätstests oder für biohybride Organunterstützungssysteme [1, 2]. Die Methoden und Ansätze zur Erzeugung und Kultivierung solcher funktionaler Gewebe im Labor wurden vor einigen Jahren unter dem Begriff „Tissue Engineering“ in einem neuem Wissenschaftsfeld zusammengefasst [3, 4]. Dieses sehr junge Feld basiert auf einem stark

interdisziplinären Ansatz aus den Bereichen der Biologie, Material- und Ingenieurwissenschaften. Eine enge und zielgerichtete Zusammenarbeit dieser Fachgebiete ist unerlässlich, um sowohl für die zellbasierte Anwendung, als auch für den Anwender geeignete und zuverlässige Gerüststrukturen und Bioreaktoren herstellen zu können. Viele Jahre wurde aber vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit auf die Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung und besonders mit technischen Oberflächen gelegt. Wie aktuelle Publikationen in diesem Bereich jedoch deutlich unterstreichen, ist gerade der Faktor der Mikroumgebung ein ganz entscheidender im Hinblick auf Entwicklung und Funktionalität der Zellen [5-7].

CellChip – Gerüststruktur im Chip-Format

Der am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelte CellChip ist eine mikrostrukturierte Gerüststruktur für die dreidimensionale Kultivierung von Zellen (siehe Abb. 1) [8, 9]. Die zentrale Idee der planaren Anordnung von gleich großen und identisch geformten Mikrocontainern mit porösem Boden dient dazu, möglichst alle Zellen, die in den Containern kultiviert werden, gleichmäßig mit Nährmedium versorgen zu können. Die Größe der Mikrocontainer (300 μm Kantenlänge im kubischen Design) ist dabei so gewählt, dass die maximale Diffusionsstrecke in den Zellaggregaten, ähnlich wie in vielen

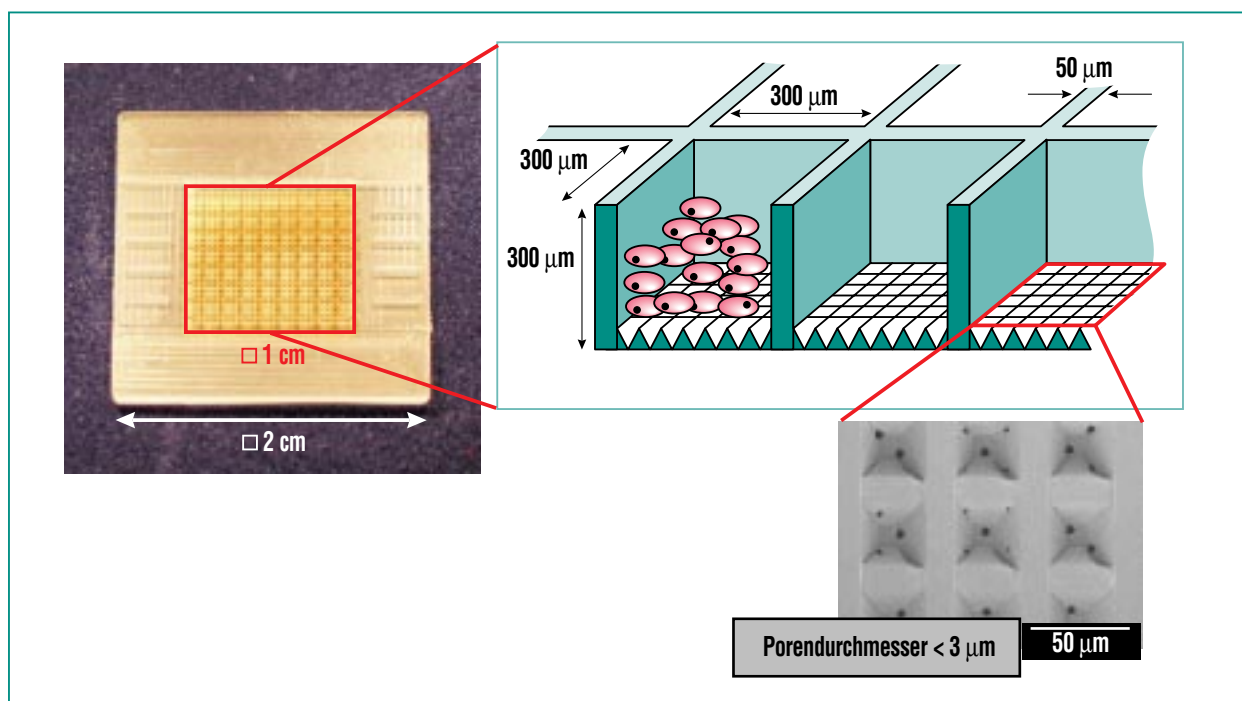


Abb. 1: Links: Foto eines mikrospritzgegossenen CellChips aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit den Außenabmessungen 2 x 2 cm². Die rechte schematische Abbildung zeigt Zellen dreidimensional kultiviert in kubischen Mikrocontainern mit einer Kantenlänge von 300 μm . Unten: Ausschnitt aus dem Bodenbereich eines Mikrocontainers (REM, Balken 50 μm). Eine aktive Versorgung der Zellen mit Nährmedium erfolgt u. a. durch den porösen Boden. Die Größe der Poren ist kleiner als 3 μm , damit Zellen nicht durch die Poren wandern können.

natürlichen Geweben, nicht mehr als 150 µm beträgt. Dies stellt sicher, dass selbst bei einer Versorgung nur durch Diffusion möglichst alle Zellen ausreichend mit Nährstoffen und Gasen versorgt werden und ein ausreichender Abtransport von Stoffwechselprodukten gewährleistet wird.

Die flächige, chipförmige Ausgestaltung ermöglicht zudem eine sehr hohe Variabilität hinsichtlich einer aktiven Umströmung der Zellkultur innerhalb speziell entwickelter Bioreaktoren. So können die Zellen mit Nährmedium ober- und/oder unterhalb parallel zur Fläche der Mikrocontainer angeströmt werden (Superfusion) oder das Medium kann flächig sowohl von der Oberseite als auch von der Unterseite homogen durch alle Mikrocontainer gepumpt werden (Perfusion). Zusätzlich können diese verschiedenen Varianten kombiniert werden, so dass eine große Anzahl von Freiheitsgraden bezüglich der Mediumversorgung besteht. Dadurch können z. B. physikalische oder chemische Gradienten (z. B. Sauerstoffpartialdruck) über dem künstlichen Gewebe erzeugt und gezielt genutzt werden.

Herstellung

Der CellChip ist als eine standardisierbare Zellkulturplattform konzipiert, die eine Langzeitkultivierung künstlicher Gewebe für Anwendungen in den Bereichen der Grundlagenforschung, der klinischen Forschung bzw. Therapie sowie der pharmazeutischen Forschung ermöglichen soll. Die Anforderungen an den Herstellungsprozess gehen damit weit über die bloße Sicherstellung der Biokom-

patibilität der Herstellungsverfahren und der verwendeten Materialien hinaus. Neben der unverzichtbaren biologischen Verträglichkeit des Systems muss eine hohe Reproduzierbarkeit der Geometrie der Strukturen und der Materialeigenschaften gewährleistet werden. Zusätzlich muss die Fertigung hoher Stückzahlen dieses Einwegproduktes, wie sie z. B. im Bereich der Wirkstoffforschung erwartet werden, auch ökonomischen Gesichtspunkten genügen.

Basierend auf der Spritzgusstechnologie wurde zusammen mit dem Institut für Materialforschung (IMF I und III) bislang nur eine kleinserientaugliche Fertigung des CellChips realisiert, da mit Hilfe dieses Prozesses nur eingeschränkt dünnwandige Mikrostrukturen hergestellt werden können. Aufgrund dessen konnten CellChips nur mit einem vergleichsweise dicken Boden gefertigt werden, der jedoch wiederum eine nachträgliche Mikroperforation (Porendurchmesser < 3 µm), beispielsweise per Laserablation, deutlich erschwert, sodass hier eine aufwändige Nachbearbeitung der Spritzgussteile unerlässlich ist.

Neues Verfahren

Ein neues, vielversprechendes Verfahren für die Fertigung des CellChips basiert auf dem Thermoformen dünner Kunststofffolien zur Herstellung dreidimensionaler und sehr dünnwandiger Produkte. Das makroskopische Verfahren wird bereits seit vielen Jahrzehnten industriell genutzt, beispielsweise um dünnwandige und leichte Verpackungen im Lebensmittelsektor, wie beispielsweise Trink- oder Joghurtbecher, herzustellen.

Am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) wurde vor einigen Jahren weltweit zum ersten Mal gezeigt, dass dieses Verfahren in modifizierter Weise auch zur Herstellung mikrotechnischer Produkte geeignet ist [10]. Daraufhin wurde fachübergreifend in einer engen Kooperation mit dem Institut für Biologische Grenzflächen dieses als Mikrothermoformen bezeichnete Verfahren insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Fertigung des CellChips charakterisiert und weiterentwickelt.

Erste Formwerkzeuge für das Thermoformen von CellChips wurden mikromechanisch am Institut für Mikroverfahrenstechnik (IMVT) gefertigt. Das Werkzeug besteht dabei aus zwei parallelen metallischen Platten, einer mikrostrukturierten Formplatte und einem Gegenwerkzeug, in welches Bohrungen für die Evakuierung und für das Druckgas sowie eine Silikonichtung integriert sind. Das Design des CellChips wurde für dieses Verfahren modifiziert. Die Negativ-Formwerkzeuge umfassen hierfür eine Anordnung von 25 x 25 zylinderförmigen Kavitäten mit einem Durchmesser und einer Tiefe von jeweils 300 µm. Zur Herstellung werden 25–100 µm dünne Kunststofffolien eingesetzt. Als Material kommen prinzipiell alle thermoplastisch verarbeitbaren und biokompatiblen Kunststoffe in Frage. Diese umfassen dabei sowohl biostabile als auch bioabbaubare Polymere (z. B. Polycarbonat, Polystyrol, Polymethylmethacrylat, Cycloolefin (Co-)Polymer, Polycaprolacton, Polymilchsäure). Letztere sind zukünftig insbesondere für spezielle Anwendungen im Bereich

der Implantationsmedizin interessant.

In einem ersten Schritt wird die Folie im evakuierten Werkzeug mit hoher Kraft zwischen den beiden Platten eingeklemmt und auf Formtemperatur geheizt. Bei amorphen Thermoplasten liegt die Formtemperatur typischerweise im Bereich der Glasübergangstemperatur und bei teilkristallinen nahe der Schmelztemperatur, d. h. die Folie wird erweicht aber nicht geschmolzen. Durch das einseitige Beaufschlagen der geklemmten Folie mit einem unter Druck stehenden Gas wird die Folie in die zuvor evakuierten Kavitäten der Formplatte verstreckt. Durch die Verstreckung der Folie wird ihre Dicke auf bis zu 5–10 µm im Bodenbereich reduziert (siehe Abb. 2). Nach dem Abkühlen des Formwerkzeuges kann das Druckgas entspannt und die Folie aus der Formplatte entformt werden.

Ein wichtiger Aspekt des Mikrothermoformens, der dieses Verfahren von bestehenden Verfahren der polymeren Mikroreplikation (z. B. Mikro-Spritzguss) abhebt, ist die Formung des Polymers in einer entropieelastischen Phase, d. h. das Polymer wird nicht geschmolzen und es besteht ein permanenter Materialzusammenhalt während des Formvorgangs. Daraus resultieren sehr spezifische Eigenschaften für das Formteil, wie sie mit anderen mikrotechnischen Verfahren nur sehr schwer oder bisher gar nicht realisiert werden konnten. So können z. B. sehr dünnwandige, flächige Mikrostrukturen mit sehr geringen Oberflächenrauigkeiten auch an Seitenwänden, mit hoher Flexibilität und hoher optischer Transparenz gefertigt wer-

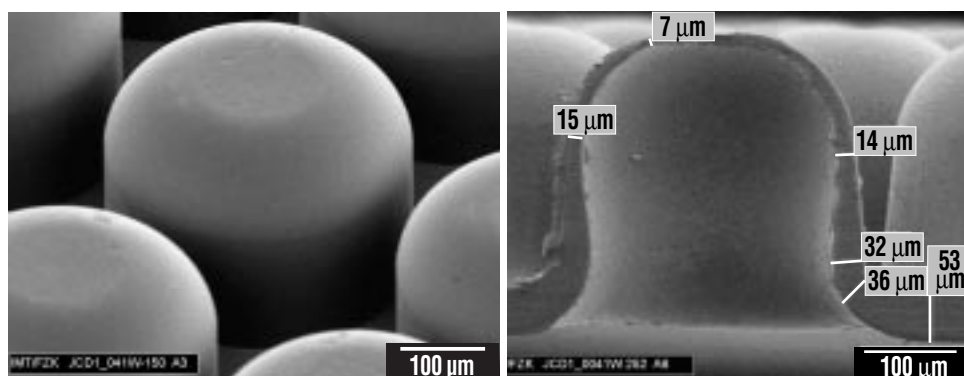


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mikrothermoformierter CellChips. Die linke Abbildung zeigt einige Mikrocontainer des CellChips von der Rückseite (Durchmesser und Tiefe der Mikrocontainer: ca. 300 µm, Material: Cycloolefin Polymer COP). Die rechte Abbildung zeigt die deutliche Wanddickenverteilung anhand eines einzelnen geschnittenen und auf den Kopf gedrehten Mikrocontainers.

den. Aufgrund der Dünnwandigkeit ist auch ein effektiver Wärmeaustausch trotz der Isolatoreigenschaften des Kunststoffes denkbar, so dass Medien in thermoformten Mikrostrukturen schnell erwärmt oder auch abkühlt werden können (beispielsweise für die Kryokonservierung von Zellen).

Auf der Grundlage dieser Materialkohärenz während des Formprozesses wurde das sogenannte SMART-Verfahren (Substrate Modification And Replication by Thermoforming, siehe Abb. 3) als eine spezielle Sequenz von Materialmodifikation und Mikrothermoformen entwickelt [11]. Ziel war es, mit diesem Verfahren hoch aufgelöste Muster (bio-)funktionaler Materialeigenschaften in einer dreidimensionalen Mikrostruktur wie z.B. dem CellChip erzeugen zu können. Dabei dient das Mikrothermoformen als zentraler Replikationsschritt in der Prozesskette, während vor- als auch nachgeschaltete Methoden zur Kunststoffmodifikation zur Anwendung kommen können. In nahezu allen etablierten formgeben-

den Verfahren der Mikrostrukturtechnik können Materialmodifikationen, z. B. mittels Plasma, Licht- oder Teilchenstrahlung, erst nach dem Formschnitt durchgeführt werden. Damit ist jedoch eine hohe laterale Auflösung, aufgrund einer eingeschränkten Zugänglichkeit beispielsweise zu innen liegenden Oberflächen oder aufgrund von Streuungs- und Beugungseffekten an Strukturdetails, nicht zu erzielen. Weiterhin können bei masken- oder stempelbasierten Modifikationsmethoden die Masken bzw. Stempel nicht oder nur sehr schwierig mit den dreidimensional geformten Flächen in direkten Kontakt gebracht werden. Im Fall lithografischer Verfahren mit Masken nimmt aufgrund des dadurch nicht zu vermeidenden Spalts zwischen Maske und zu strukturierender Fläche die maximal mögliche laterale Auflösung deutlich ab. Dieses Problem kann durch die neue Technologie wie im Folgenden beschrieben umgangen werden.

Da die Kunststoffolie sich beim Thermoformen nur in einer entropie-

SMART – Substrate Modification And Replication by Thermoforming

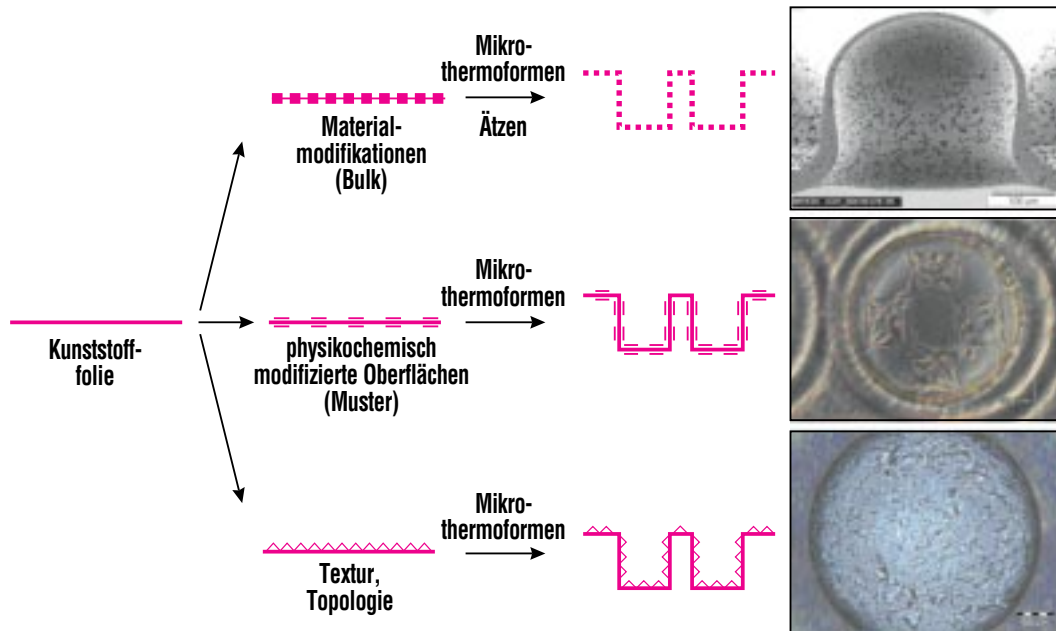


Abb. 3: Schema des SMART-Verfahrens. Dünne Kunststofffolien können vor dem Mikrothermoformen in noch flachem Zustand mit hoch auflösenden Methoden modifiziert werden. Diese Modifikationen bleiben aufgrund des materiellen Zusammenhaltes der Folie während des Formvorgangs erhalten. Die hier aufgeführten drei Beispiele umfassen die Kombination des Thermoformens mit der Ionen-spurtechnologie, Herstellung von Zelladhäsionsmustern durch lithografische UV-Belichtung und den Erhalt von mikro- oder nanoskaligen Texturen auf der Oberfläche (von oben nach unten, Durchmesser der thermogeformten Mikrocontainer jeweils ca. 300 µm).

pie- bzw. gummielastischen Phase befindet und nicht geschmolzen wird, kann sie vor dem Prozess in ihrem flachen, unstrukturierten Zustand modifiziert werden. Aufgrund der vergleichsweise moderaten Prozesstemperatur gibt es verschiedene Modifikationen, die den Formprozess überstehen und somit erhalten bleiben. Einer dieser stabilen Modifikationsprozesse ist die Bestrahlung der Folien mit energiereichen Schwerionen. Diese erzeugen beim nahezu geradlinigen Durchdringen der Folie sogenannte „latente Spuren“. Diese Spuren können nachträglich mit geeigneten Medien selektiv herausgeätzt

werden, sodass je nach Ätzbedingungen Poren definierter Größe entstehen. Beim SMART-Verfahren wird nun nach dem Bestrahlen und vor dem Ätzen die Folie mittels Mikrothermoformen strukturiert, ohne dass es dabei zu einem Ausheilen dieser Spuren durch die Temperatureinwirkung kommt. Vorteil dieses neuen Verfahrens ist in diesem Fall, dass Mikrokavitäten mit einer allseitigen Perforation hergestellt werden können (siehe Abb. 4). Dies ermöglicht eine Versorgung kultivierter Zellen von allen Seiten, sodass daraus kürzere

Versorgungswege resultieren. Der bedeutendste Vorteil des SMART-Verfahrens, der aus der permanenten Materialkohärenz und dem daraus folgenden Erhalt von Modifikationen resultiert, ist jedoch die mögliche Anwendung etablierter maskenbasierter Technologien. Dies ermöglicht es in Zukunft, Materialmodifikationen mit lithografischer Auflösung auch auf mikroskalige, dreidimensionale Membranstrukturen anwenden zu können. So kann z. B. die Bestrahlung der Folie mit Schwerionen über eine einfache, planare Maske durchgeführt werden. Durch

eine entsprechende positionierte Formung können so bestimmte Bereiche für die Perforation ausgenommen werden. Dies könnte beispielsweise die Beobachtung von Zellen durch definierte nicht-perforierte Bodenflächen mittels eines Lichtmikroskops erleichtern. Die Änderung des ursprünglich angelegten Musters aufgrund der Verstreckung der Folie lässt sich dabei entweder empirisch oder mit Hilfe von Simulationen durch die Anpassung des Ausgangsmusters kompensieren.

CellChip – Plattform für Stammzellforschung

Der Faktor der räumlichen Auflösung biofunktionaler Modifikationen wird in den nächsten Jahren speziell in der Stammzellbiologie hinsichtlich der Nachbildung der natürlichen Mikroumgebung von Zellen eine zentrale Rolle spielen. Neben löslichen Faktoren, wie z. B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren, sind auch matrixgebundene Signale (z. B. matrixgebundene Signalmoleküle bzw. Molekülgruppen aber auch z. B. die Elastizität der Matrix

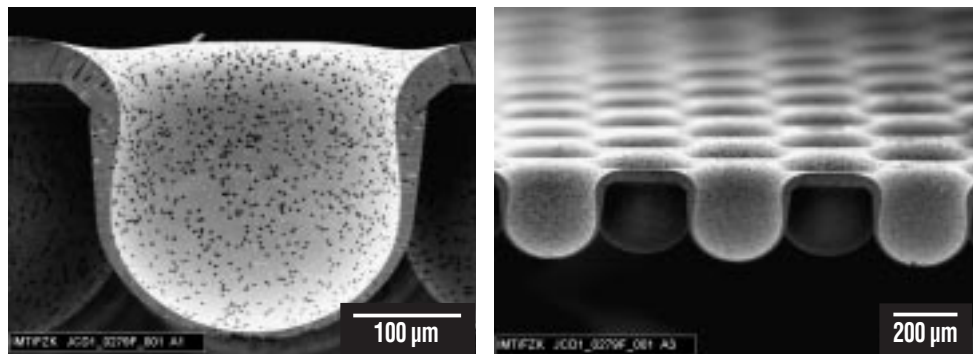


Abb. 4: REM-Aufnahmen von geschnittenen CellChips, die mit dem SMART-Verfahren hergestellt wurden. Durch die Kombination aus Bestrahlung mit beschleunigten Schwerionen, Mikrothermoformen und schließlich Ätzen der durch Schwerionenbeschuss erzeugten Spuren zu Poren, können hochporöse CellChips gefertigt werden, die sogar an den Seitenwänden Poren aufweisen.

[7]) entscheidende Aspekte dieser Mikroumgebung [12]. Die Nachbildung der natürlichen Entwicklung einer Zelle bzw. eines Gewebes im Labor bedeutet somit die Nachbildung einerseits der räumlichen Organisation aber letztlich auch der zeitlichen Abfolge dieser Faktoren und Signale. Umso mehr sind hier Technologien gefragt, die es ermöglichen, in dreidimensionalen Trägerstrukturen hoch aufgelöst die wichtigsten und für die Entwicklung und Reifung der Zellen relevanten Faktoren imitieren zu

können. Die raumzeitlich geordnete Abfolge von löslichen Faktoren der Mikroumgebung kann in vitro in Ergänzung zu den matrixgebundenen Signalen, z. B. durch die Integration der Gerüststrukturen in mikrofluidische Bioreaktoren, nachgeahmt werden. Dadurch ist neben einer aktiven Versorgung der Zellen mit Nährmedium auch ein gezielter Einfluss auf lokale Konzentrationsverhältnisse beispielsweise bioaktiver Signalmoleküle möglich.

Literatur

- [1] L. A. Kunz-Schughart, J.P. Freyer, F. Hofstaedter, R. Ebner, *J Biomol Screen* 9, 273-285 (2004)
- [2] E. Gottwald, *Spektrum der Wissenschaft*, 44-51 (2002)
- [3] R.M. Nerem, *Ann Biomed Eng* 19, 529-545 (1991)
- [4] R. Langer, J.P. Vacanti, *Science* 260, 920-926 (1993)
- [5] C.S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, D.E. Ingber, *Science* 276, 1425-1428 (1997)
- [6] C.J. Flaim, S. Chien, S.N. Bhatia, *Nat Methods* 2, 119-25 (2005)
- [7] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* 126, 677-689 (2006)
- [8] E. Eschbach, S.S. Chatterjee, M. Nöldner, E. Gottwald, H. Dertinger, K.-F. Weibezahn, G. Knedlitschek, *Journal of Cellular Biochemistry* 95, 243-255 (2005)
- [9] E. Gottwald, S. Giselbrecht, C. Augspurger, B. Lahni, N. Dambrowsky, R. Truckenmüller, V. Piotter, T. Gietzelt, O. Wendt, W. Pfleging, A. Welle, A. Rolletschek, A.M. Wobus, K.-F. Weibezahn, *Lab Chip*, 7, 777-785, (2007), DOI 10.1039/b618488j
- [10] R. Truckenmüller, Z. Rummler, T. Schaller, W.K. Schomburg, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 12, 375-379 (2002)
- [11] S. Giselbrecht, T. Gietzelt, E. Gottwald, C. Trautmann, R. Truckenmüller, K.-F. Weibezahn, A. Welle, *Biomed Microdevices* 8, 191-9 (2006)
- [12] F. M. Watt, B.L.M. Hogan, *Science* 287, 1427-1430 (2000)

Leben mit gestückelten Genen

H. König, ITG

Einleitung

Aussehen, Entwicklung und Funktionen von Lebewesen werden im Wesentlichen durch Proteine (Eiweiße) bestimmt. Sie steuern die biochemischen Vorgänge in den Zellen. Die Information für Proteine ist in den Genen verschlüsselt, welche aus einem doppelsträngigen Nukleinsäuremolekül, der DNA be-

stehen. Diese Information wird zunächst in ein Botenmolekül aus RNA (einer anderen Nukleinsäureform) umgeschrieben, von dem dann die Information für die Proteinherstellung durch eine komplexe zelluläre Maschinerie ausgelesen werden kann. Allerdings ist die Information zur Herstellung eines Proteins nur in den Genen von Bakterien (und in vielen Genen mancher

einzelliger Organismen, wie z. B. der Hefe) als zusammenhängende Abfolge niedergelegt.

Gestückelte Gene und Spleißen

In höheren Organismen (einschließlich des Menschen) wurde Ende der 1970er Jahre die erstaunliche Entdeckung gemacht, dass die allermeisten Gene gestückelt sind („Split Genes“) [1]. Das heißt, sehr kurze (für Teile eines Proteins) kodierende Blöcke, sogenannte Exons, sind von langen nicht kodierenden Bereichen (Introns) voneinander getrennt (siehe Abb. 1). Um die zusammenhängende Information zur Herstellung eines Proteins zu erhalten, müssen die kodierenden Stückchen zusammengebracht werden. Dies geschieht nach Umschreiben des gestückelten Gens in ein Vorläufer-RNA-Botenmolekül. Aus diesem werden dann die nicht-kodierenden Bereiche (Introns) herausgeschnitten und die kodierenden Stücke (Exons) zusammengefügt. Dieser Prozess heißt Spleißen und erfolgt in dem durch ein spezielles Membransystem abgegrenzten Bereich der Zellen, dem Zellkern, der auch die Gene enthält (Abb. 1). Danach wird das fertig gespleißte Boten-RNA-Molekül aus dem Zellkern ausgeschleust und steht zur Proteinherstellung bereit.

Spleißen erfordert hochkomplexe molekulare Maschinerien (die sogenannten Spleißosomen), bestehend aus mehr als 150 Proteinen und fünf kleinen RNA-Arten, den sogenannten „small nuclear (sn) RNAs“ (kleine Kern-RNAs) [2]. Die snRNAs spielen eine Schlüsselrol-

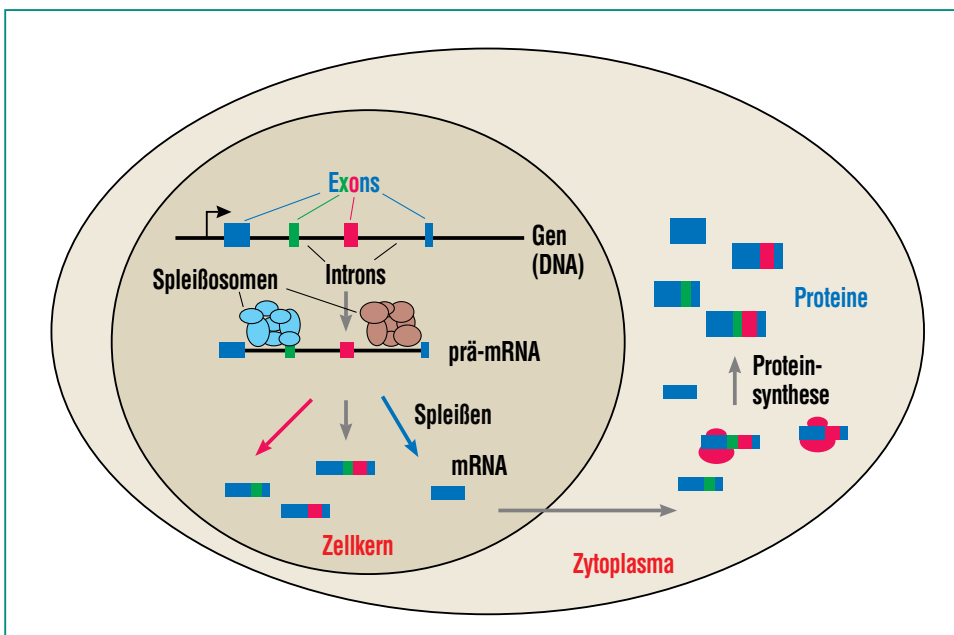


Abb. 1: Gestückelte Gene und Spleißen. Die Information für die Herstellung eines Proteins liegt in unseren Genen nicht als kontinuierliche Abfolge vor, sondern ist auf kurze Stückchen (sog. Exons) verteilt. Diese sind durch lange nicht-kodierende Genbereiche (sog. Introns) voneinander getrennt. Diese gestückelte Natur der Erbinformation bleibt bei der Abschrift (Transkription) des Gens in ein Vorläufer-Botenmolekül (prä-mRNA) zunächst erhalten. Um eine protein-kodierendes, reifes Botenmolekül (mRNA) zu erhalten, müssen die Intron-Bereiche herausgeschnitten und die Exon-Sequenzen zusammengefügt werden. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und findet im Zellkern statt. Spleißen erfordert zwei parallele molekulare Systeme, ein sog. „Major“- und ein „Minor“-Spleißosom. Die fertig gespleißte mRNA verlässt dann den Zellkern und steht im Zytoplasma für die Proteinherstellung zur Verfügung. In mindestens 40–60 % aller menschlichen Gene können die protein-kodierenden RNA-Stücke (Exons) in unterschiedlicher Weise zusammengefügt werden. Hierdurch können aus einem Gen bzw. einem Vorläufer-Botenmolekül unterschiedliche mRNAs und damit Proteine hergestellt werden. Durch solches alternatives Spleißen kann die Kapazität des Erbguts zur Kodierung von Proteinen in höheren Organismen stark erhöht werden.

le bei der Erkennung der Introns und beim Spleißprozess.

Beim Spleißen können manche kodierenden Stücke zusammen mit den Introns herausgeschnitten oder zusätzliche Stücke mit eingefügt werden. Durch solches alternatives Spleißen können aus einem Gen verschiedene RNA-Botenmoleküle und damit Proteine mit unterschiedlicher Funktion entstehen [3] (siehe Abb. 1). Tatsächlich werden die Botenmoleküle von mindestens 40–60 % aller menschlichen Gene alternativ gespleißt [4]. Die gestückelte Struktur von Genen und das exakte Spleißen von Botenmolekülen erforderten die Evolution sowie die Aufrechterhaltung komplexer und energieaufwändiger molekularer Systeme und Mechanismen. Im Gegenzug kann so die Kapazität des Erbguts zur Kodierung von Proteinen stark erweitert werden [5].

Diese Komplexität der Spleißmaschinerie und die Wichtigkeit von alternativem Spleißen spiegelt sich in immer mehr Krankheiten wieder, die durch Veränderungen im Spleißmuster von Botenmolekülen verursacht werden [6]. So betreffen mehr als 15 % der Veränderungen in Genen (Mutationen) bei Erbkrankheiten Gensequenzen, über die die Spleißmaschinerie (Spleißosom) Introns und Exons erkennt. Des Weiteren findet man Mutationen in Genen, die Komponenten der Spleißosomen oder assoziierte Proteine kodieren. Krankheiten, die auf verändertes Spleißen zurückzuführen sind, reichen von neurodegenerativen Erkrankungen, über Muskeldegeneration (Muskelatrophien, -dystrophien) bis zu Krebs [6].

Krebs und die Regulation von Spleißen

Eines der besten Beispiele für die Verbindung von veränderten Spleißmustern und der Entwicklung von Tumoren ist das Zelloberflächenmolekül CD44. Spleißvarianten von CD44, die durch alternatives Spleißen entstehen und normalerweise auf aktivierten oder wandernden Immunzellen vorkommen, werden während der Entwicklung von vielen Tumoren hergestellt und sind an

deren Metastasierung beteiligt [7]. Wie diese Spleißformen während der Tumorentwicklung entstehen können, ist eine unserer Fragestellungen. Wir fanden, dass das alternative Spleißen, das zu ihrer Herstellung führt, an einen zentralen Signalweg der Zelle gekoppelt ist [8] (Abb. 2). Diese in der Evolution hochkonservierte Signalkaskade steuert wichtige physiologische Prozesse wie die Zellteilung und überträgt Signale (z. B. von Wachstumsfaktoren) von der Zell-

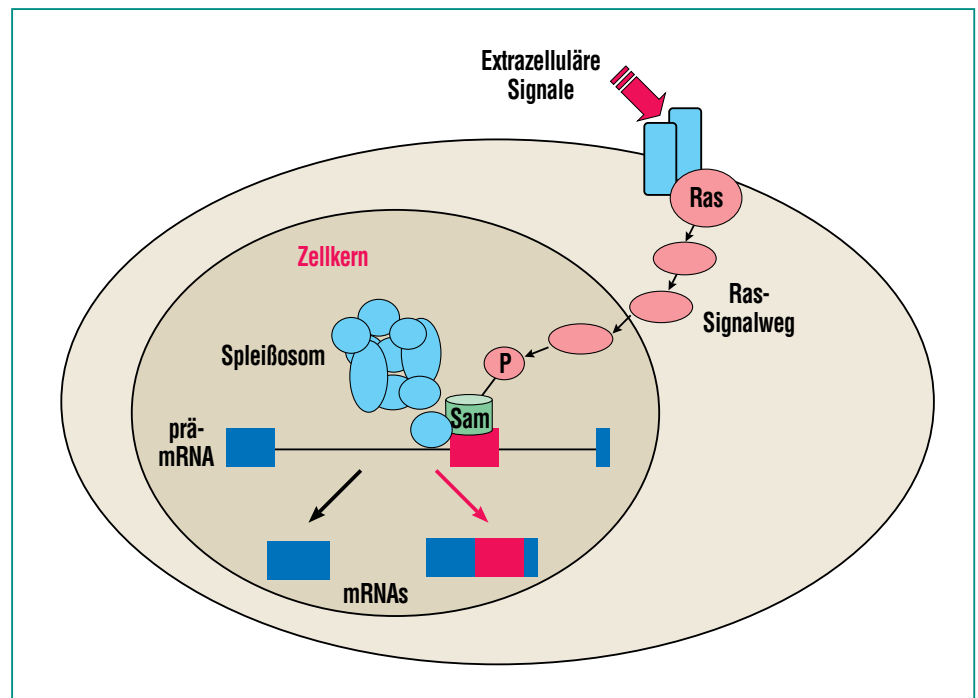


Abb. 2: Spleißen ist an zelluläre Signale gekoppelt. Wir konnten einen in der Evolution hochkonservierten zellulären Signalübertragungsweg identifizieren über den äußere Signale, wie z. B. Wachstumsfaktoren aber auch bestimmte krebsauslösende Substanzen (Tumorpromotoren), alternatives Spleißen von mRNA-Molekülen des Zelloberflächenmoleküls CD44 regulieren können. Der gefundene Signalweg beinhaltet das Produkt des ras-Krebsgenes (Ras), ein zentrales Signalmolekül der Zelle, welches in vielen Tumoren unkontrolliert aktiv ist. Des Weiteren fanden wir ein RNA-bindendes Spleißregulator-Protein (Sam68), das durch diesen Signalweg chemisch verändert (phosphoryliert) wird und dadurch den Zusammenbau von Spleißosomen an entsprechenden Bereichen der prä-mRNA aktiviert. Es kommt so zum Verbleib bestimmter Exons (rot) in der reifen CD44-mRNA und zur Bildung varianter CD44-Spleißformen, die bei der Entwicklung vieler Tumoren eine Rolle spielen.

oberfläche in den Zellkern [9]. Dort modifiziert sie Proteine durch Anhängen von Phosphat-Resten (Phosphorylierung) und verändert so deren Aktivität, z. B. beim Ablesen von Genen. Eine wichtige Komponente dieser Signalkette wird durch das Ras-Krebsgen ko-

diert, ein Gen das in vielen Tumoren verändert ist und dessen verändertes Proteinprodukt diese Signalkette ständig aktiviert. Wir konnten ein erstes Spleißregulatorprotein (Sam68) identifizieren, das durch diesen Signalweg phosphoryliert wird und so zur Bildung

alternativ-gespleißter CD44-Formen führt [10]. Unsere derzeitigen Arbeiten legen es nahe, dass die ausgelöste chemische Veränderung des Proteins den Zusammenbau von Spleißosomen an entsprechenden Stellen von Boten-RNA-Molekülen aktiviert (Abb. 2).

Parallele Spleißwelten

Vor ca. zehn Jahren wurde eine zweite parallele Spleißmaschinerie entdeckt, die eine seltene Klasse von Introns entfernt [11]. Dieses sogenannte „Minor“-Spleißosom teilt die meisten Proteinkomponenten mit dem klassischen (oder „Major“-) Spleißosom, besitzt aber andere snRNAs. Die Konzentration dieses zweiten Spleiß-Systems in Zellen ist zudem ca. 100-fach niedriger, und es spleißt RNA-Moleküle wesentlich langsamer. Die vom „Minor“-Spleißosom entfernten Introns scheinen in Wirbeltieren (Fische, Amphibien, Vögel, Säugtieren) am häufigsten vorzukommen. Beim Menschen repräsentieren sie ca. 0,3–0,4 % aller Introns, und viele solcher Introns scheinen während der Evolution in klassische Introns umgewandelt worden zu sein [12, 13].

Warum dennoch einige wenige dieser Introns und mit ihnen ein komplexes zweites Spleiß-System erhalten blieben und wie sich die beiden Systeme in einer Zelle entwickeln konnten und koexistieren, ist unklar. Um die Rolle des „Minor“-Spleiß-Systems im Organismus zu erforschen, haben wir eine Methode entwickelt um die beiden Spleißosomen in Zellen selektiv zu hemmen [14]. Dabei blockieren wir die unterschiedlichen snRNAs der beiden Systeme selektiv mit klei-

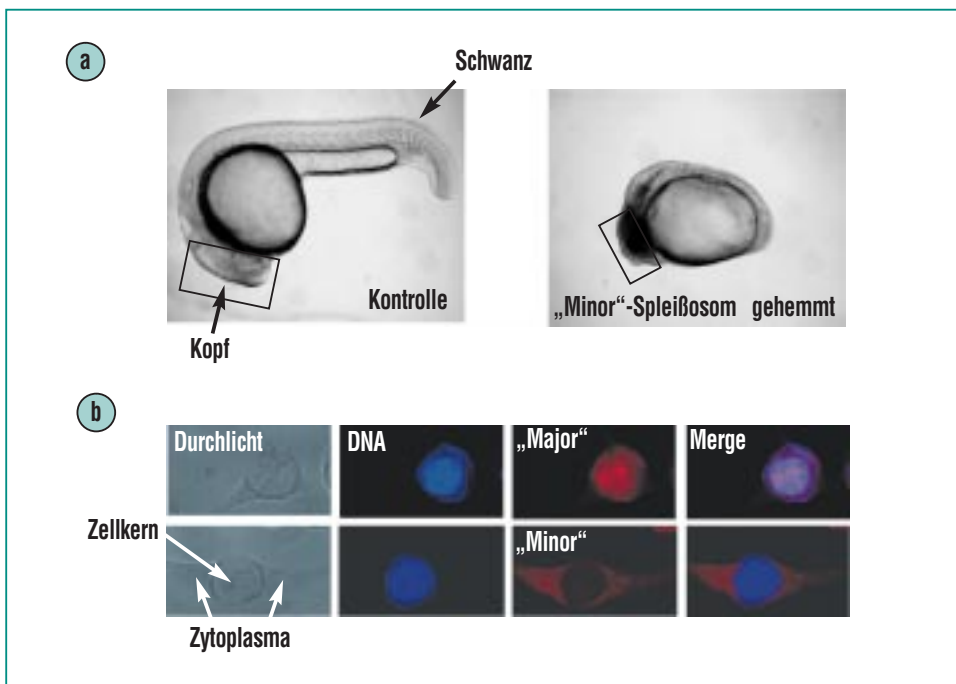


Abb. 3: Das parallele „Minor“-Spleiß-System reguliert die Zellteilung und befindet sich außerhalb des Zellkerns. Die Entdeckung einer zweiten Spleißmaschinerie („Minor“-Spleißosom) hat grundlegende Fragen bezüglich der Funktion und Evolution von zwei parallelen Spleiß-Systemen und bezüglich der Evolution von Zellen aufgeworfen. (a) Durch die Entwicklung einer Methode zur selektiven Hemmung der beiden Systeme konnten wir eine spezifische Rolle für das zweite Spleiß-System bei der Zellteilung zeigen. Die Blockierung der Zellteilung nach Hemmung des „Minor“-Spleißosoms führt zu massiven Veränderungen in Bereichen von Zebrafisch-Embryonen mit schneller Zellteilung (mit Rechtecken markierte Bereiche im Kopf) und hemmt das Wachstum von menschlichen Tumorzellen. (b) Bei unseren Untersuchungen machten wir eine weitere, sehr überraschende Entdeckung. Im Gegensatz zum klassischen „Major“-Spleiß-System (obere Reihe) fanden wir die snRNA-Komponenten (rote Fluoreszenzfärbung) des „Minor“-Spleißosoms (untere Reihe) und seine Aktivität nicht wie erwartet im Zellkern (blaue DNA-Fluoreszenzfärbung), sondern außerhalb im sog. Zytoplasma von Zellen (hier Mausfibroblasten); vgl. mit der Durchlichtaufnahme und der Überlagerung der blauen und roten Fluoreszenzfärbungen (Merge). Die beiden Spleiß-Systeme sind also räumlich voneinander getrennt.

nen synthetischen DNA-ähnlichen Molekülen. Zusammen mit Ferenc Müllers Gruppe am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) gelang es uns, diese Strategie in Zebrafisch-Embryonen anzuwenden und so die Rolle des „Minor“-Spleiß-Systems in der Wirbeltierentwicklung zu untersuchen [15]. Die Hemmung dieses Systems führte zu erstaunlich spezifischen Veränderungen in Bereichen der Embryonen mit schneller Zellteilung (Abb. 3a). Analysen des Zellteilungszyklus in Zebrafisch-Embryonen und in menschlichen Krebszellen deuten auf eine essenzielle und in der Evolution konservierte Rolle für dieses zweite Spleiß-System in der Zellteilung von Wirbeltieren hin.

Könnte diese wichtige Funktion der Grund für seine Konservierung in der Evolution sein? Und beruht diese wichtige Funktion auf spezifischen Eigenschaften dieses parallelen Spleiß-Systems? Bei unseren Untersuchungen machten wir eine weitere, sehr überraschende Entdeckung. Überraschend deshalb, weil sie mit Dogmen kollidiert, welche die Revolution von gestückelten Genen und Spleißen für unser Bild von der Genexpression mit sich brachte: Spleißen erfolgt allgemein im Zellkern, gekoppelt an das fortschreitende Ablesen (Transkription) von Genen; nur gespleißte reife Boten-RNA kann den Zellkern verlassen; Spleißen und Proteinsynthese sind räumlich getrennt. Im Gegensatz zum klassischen „Major“-Spleiß-System fanden wir die snRNA-Komponenten des „Minor“-Spleißosoms und seine Aktivität nicht wie erwartet im Zellkern, sondern außerhalb im sogenannten Zytoplasma der Zelle (Abb. 3b) [15].

Die räumliche Trennung der beiden Spleiß-Systeme (siehe Abb. 4) bietet eine attraktive Erklärung für ihre Evolution ausgehend von einem gemeinsamen „Ahnsystem“ (nahe gelegt durch die vielen gemeinsamen Komponenten) in einer ursprünglichen Zell-Linie. Sie könnte auch erklären wie die beiden Systeme parallel funktionieren können, trotz vieler gemeinsamer Komponenten aber stark unterschied-

lichen Konzentrationen. Die Regulation und Sicherstellung einer korrekten Proteinherstellung über das Entfernen entsprechender Introns durch ein Spleiß-System außerhalb des Zellkerns könnte notwendig sein, wenn der Zellkern reorganisiert wird und Kernprozesse (wie Transkription und das klassische „Major“-Spleißen) blockiert sind. Eine solche Blockade von Kernprozessen erfolgt inter-

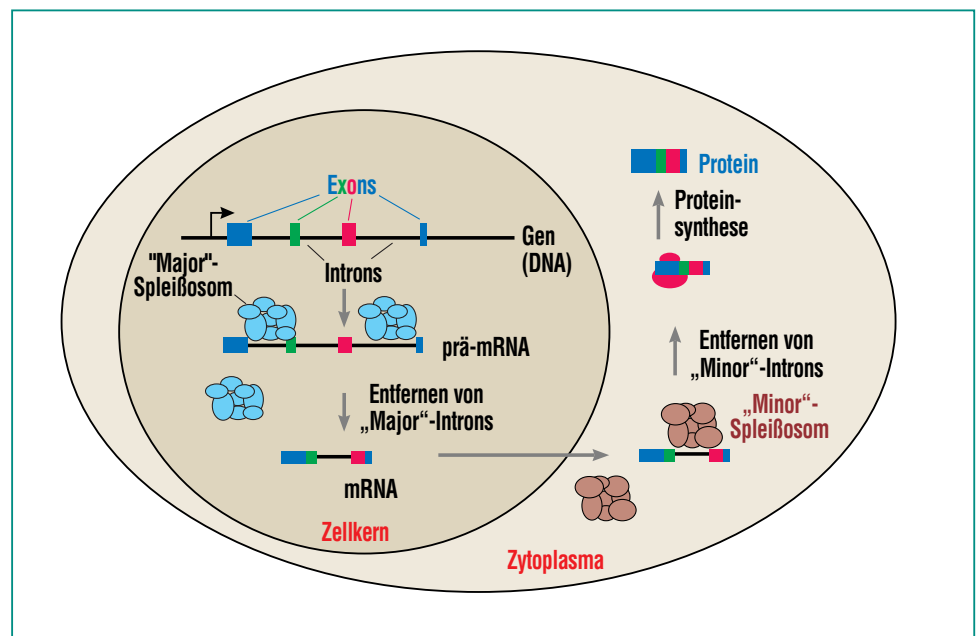


Abb. 4: Getrennte Spleißwelten. Unsere Untersuchungen zeigten überraschenderweise, dass das „Minor“-Spleißosom außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist und somit räumlich getrennt vom nukleären „Major“-Spleiß-System. Dies fordert die Modifikation von Dogmen, welche die Revolution von gestückelten Genen und Spleißen für unser Bild von der Genexpression mit sich brachte. So galt bisher, dass Spleißen allgemein auf den Zellkern beschränkt und an die fortschreitende Transkription von Genen gekoppelt ist; dass nur gespleißte reife Boten-RNA den Zellkern verlassen kann; und dass Spleißen und Proteinsynthese räumlich getrennt sein müssen. Die von uns gefundene räumliche Trennung der beiden Spleißmaschinerien bietet eine attraktive Erklärung für die Evolution der beiden Systeme ausgehend von einem gemeinsamen „Ahnsystem“ in einer ursprünglichen Zell-Linie. Die Regulation und Sicherstellung einer korrekten Proteinherstellung über das Entfernen entsprechender Introns durch ein extra-nukleäres Spleiß-System könnte notwendig sein, wenn Kernprozesse (wie Transkription und das klassische „Major“-Spleißen) blockiert sind. Eine solche Blockade von Kernprozessen erfolgt interessanterweise während der Zellteilung.

essanterweise während der Zellteilung. Ob das „Minor“-Spleiß-System tatsächlich auf diese Weise dort eine Rolle spielt und ob es diese besondere Eigenschaft des Systems ist, die es für Zellen so unabdingbar macht, wollen wir in unserer zukünftigen Arbeit untersuchen.

Zusammenfassung

Die gestückelte Struktur von Genen in höheren Organismen macht die Entfernung von nicht-kodierenden Sequenzen durch das Spleißen von Boten-RNA-Molekülen notwendig. Spleißen wird durch zwei komplexe molekulare Systeme bewerkstelligt, einem „Major“- und ei-

nem „Minor“-Spleißosom. Kommt es zur Fehlregulation von Spleißen entstehen verschiedene Krankheiten, einschließlich Krebs. Durch unsere Arbeiten versuchen wir zu verstehen, wie das Spleißen von Boten-RNAs durch zelluläre Signale in normalen und in Tumorzellen reguliert wird und warum höhere Organismen zwei parallele Spleiß-Systeme benötigen. Wir entdeckten die Verbindung eines wichtigen zellulären Signalwegs mit einem Regulatorprotein für ein Spleißereignis, das bei der Entwicklung bestimmter Tumoren eine Rolle spielt. Bei der Untersuchung der beiden Spleißosomen konnten wir eine essentielle Rolle des „Minor“-Spleißosoms bei der Kontrolle der

Zellteilung nachweisen. Überraschenderweise fanden wir dieses zweite Spleiß-System außerhalb des Zellkerns und somit räumlich getrennt von der nukleären „Major“-Spleißmaschinerie. Die Trennung der beiden Systeme bietet eine attraktive Erklärung dafür, wie sich zwei parallele Spleiß-Systeme in Zellen entwickeln konnten. Sie könnte es Zellen ermöglichen, die Herstellung von Proteinen auch dann zu regulieren und sicherzustellen, wenn Prozesse im Zellkern gehemmt sind, wie bei der Zellteilung.

Literatur

- [1] P.A. Sharp, *Cell* 77, 805 (Jun 17, 1994)
- [2] M.S. Jurica, M.J. Moore, *Mol Cell* 12, 5 (Jul, 2003)
- [3] T. Maniatis, B. Tasic, *Nature* 418, 236 (Jul 11, 2002)
- [4] B. Modrek, C. Lee, *Nat Genet* 30, 13 (Jan, 2002)
- [5] H. Kim, R. Klein, J. Majewski, J. Ott, *Nat Genet* 36, 915 (Sep, 2004)
- [6] N.A. Faustino, T.A. Cooper, *Genes Dev* 17, 419 (Feb 15, 2003)
- [7] H. Ponta, L. Sherman, P.A. Herrlich, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 33 (Jan, 2003)
- [8] S. Weg-Remers, H. Ponta, P. Herrlich, H. König, *Embo J* 20, 4194 (Aug 1, 2001)
- [9] L. Chang, M. Karin, *Nature* 410, 37 (Mar 1, 2001)
- [10] N. Matter, P. Herrlich, H. König, *Nature* 420, 691 (Dec 12, 2002)
- [11] A.A. Patel, J.A. Steitz, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 960 (Dec, 2003)
- [12] C.B. Burge, R.A. Padgett, P.A. Sharp, *Mol Cell* 2, 773 (Dec, 1998)
- [13] A. Levine, R. Durbin, *Nucleic Acids Res* 29, 4006 (Oct 1, 2001)
- [14] N. Matter, H. König, *Nucleic Acids Res* 33, e41 (2005)
- [15] H. König, N. Matter, R. Bader, F. Müller, *Manuscript submitted*

Die Rolle von Chemokinen in der Etablierung der immunologischen Synapse

J. Adam, M. Cramer, J. Fuchs, S. Weg-Remers, ITG

Steuerung zellulären Verhaltens durch Zell-Zell-Kommunikation

In allen vielzelligen Organismen ist die Steuerung zellulären Verhaltens von entscheidender Bedeutung. Zellen müssen sich durch extrazelluläre Botenstoffe oder durch direkten Informationsaustausch mit einer benachbarten Zelle darüber verständigen, welches Verhalten gerade notwendig ist. Wichtige Aspekte des Verhaltens von Zellen sind dabei Zellwanderung (Migration), Zellvermehrung (Proliferation) und die Übernahme von neuen Funktionen durch Zellen (Differenzierung). Diese Verhaltensweisen werden durch genetische Programme gesteuert, die in den Zellen an- oder ausgeschaltet werden. Darunter verstehen wir die vielfältigen molekularen Mechanismen, die dazu führen, dass eine Zelle die in ihrer Erbinformation festgelegte Information in Proteine umsetzt, die dazu dienen, bestimmte Funktionen auszuüben. Für das Ein- oder Ausschalten genetischer Programme sind – unter Vermittlung von Signalkaskaden – extrazelluläre Botenstoffe verantwortlich, die an Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren binden. Damit die Zelle mit dem richtigen Programm auf den gleichzeitigen Einfluss verschiedener extrazellulärer Stimuli reagiert, muss sie synergistische und antagonistische Signale auf Ebene der Signalkaskaden integrieren. Die Mechanismen der intrazellulären Signalverarbeitung werden noch nicht vollständig verstanden. Um bei einer Fehlfunktion korrigierend in die zellulären Programme eingreifen

zu können, ist es jedoch wichtig, zu verstehen, wie sich einzelne Signale gegenseitig beeinflussen.

Die immunologische Synapse zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen – ein Modell zur Untersuchung des Informationsaustauschs zwischen Zellen

T-Lymphozyten haben eine Schlüsselrolle im Immunsystem, das es uns als komplexes Abwehrsystem ermöglicht, in einer Umgebung zu überleben, in der wir Erregern wie Bakterien, Pilzen oder Viren ausgesetzt sind, die zum Teil lebensgefährliche Infektionen hervorrufen können. Es verfügt über sich ergänzende Abwehrmechanismen. Durch die angeborene (naive) Immunität erfolgt eine unspezifische Erkennung und Bekämpfung eines Erregers, des sogenannten Antigens, innerhalb weniger Minuten. Diese „Sofortmaßnahmen“ werden hauptsächlich durch phagozytierende Zellen vermittelt und bieten keinen andauernden Schutz. Die Zellen der naiven Immunität regulieren jedoch auch die Zellen der erworbenen (adaptiven) Immunantwort, beispielsweise durch Sekretion von Zytokinen.

Die adaptive Immunität erlaubt unserem Körper das gezielte Erkennen und Bekämpfen eines spezifischen Antigens. Dabei können langlebige Gedächtniszellen gebildet werden, die bereits bekannte Antigene wieder erkennen und eine schnelle Reaktion ermöglichen. Die adaptive Immunantwort wird hauptsächlich von Lymphozyten vermittelt, die aus pluripo-

ten hämatopoetischen Stammzellen entstehen und nach dem Ort ihrer Reifung in zwei Klassen, B-Lymphozyten (Reifung im Knochenmark, engl. *bone marrow*) und T-Lymphozyten (Reifung im Thymus), unterteilt werden. B-Zellen vermitteln eine humorale (in Blut und Lymphe ablaufende) Immunantwort; nach Aktivierung reifen sie zu Plasmazellen und sezernieren spezifische Immunglobuline, die Pathogene beseitigen bzw. Toxine neutralisieren. Der erste Schritt einer Immunreaktion ist jedoch die Aktivierung von T-Zellen, die die zelluläre Immunantwort vermitteln. Ihre Aufgabe ist es, Antigene zu erkennen und zu bekämpfen, sowie andere Zellen des Immunsystems, wie B-Zellen, zu regulieren. Ihre zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort macht sie zu einem besonders interessanten Modell für die Untersuchung der Mechanismen, die bei der Steuerung des Zellverhaltens wichtig sind.

Um die adaptive Immunität gegenüber einem bestimmten Antigen aufzubauen, muss die T-Zelle zunächst aktiviert werden. Hierfür ist immer eine Partner-Zelle erforderlich, die sogenannte Antigen-präsentierende Zelle. „Professionelle“ Antigen-präsentierende Zellen kommen in fast allen Geweben des Körpers vor. Sie sammeln dort kontinuierlich Antigene auf, verarbeiten sie und präsentieren sie im Komplex mit körpereigenen Proteinen aus dem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) auf der Zelloberfläche. Zu Beginn einer entzündlichen Reaktion erfolgt die Reifung der Antigen-präsentierenden Zellen, die sich daraufhin auf

den Weg in die regionalen Lymphknoten machen. Hier begegnen sie den im Körper zirkulierenden T-Zellen. Trifft eine T-Zelle in den lymphatischen Geweben nicht auf ihr spezifisches Antigen, so zirkuliert sie weiter durch den Körper. Interagiert jedoch ein Proteinkomplex auf ihrer Oberfläche, der sogenannte T-Zell-Rezeptor, mit seinem spezifischen Antigen, gebunden an den MHC-Komplex auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle, so beenden beide Partner die Migration und bilden einen stabilen, lang anhaltenden Kontakt aus. Dieser Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle wird in Analogie zu neuronalen Synapsen auch als „immunologische Synapse“ bezeichnet. Die Verbindung muss über mehrere Stunden aufrechterhalten werden, um eine volle Aktivierung der T-Zelle zu ermöglichen.

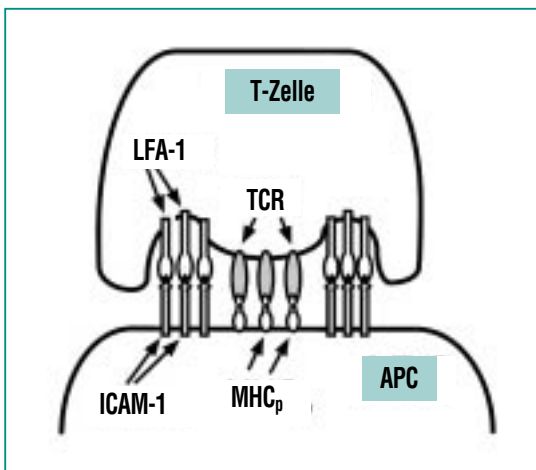


Abb. 1: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse: Querschnitt durch T-Zelle und Antigen-präsentierende Zelle (APC) mit Darstellung der Verteilung der Rezeptoren und Liganden. Im Zentrum befinden sich MHC-Antigen-Komplexe, die mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex interagieren, in einem äußeren Ring finden sich LFA-1-Proteine, die an ICAM-1 binden.

Dabei tastet die T-Zelle die Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle ab, integriert die vielfältigen Signale von T-Zell-Rezeptor und ko-stimulatorischen Molekülen und organisiert die Signalübertragung. Die Aktivierung der T-Zelle durch die synaptische Verbindung mit der Antigen-präsentierenden Zelle führt zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle, wodurch sie Funktionseigenschaften erhält, die für das Bekämpfen eingedrungener Erreger erforderlich sind (sogenannte Effektor-T-Zellen) oder für den Aufbau einer bleibenden Immunität (Gedächtnis-T-Zellen).

Die Mechanismen des in der immunologischen Synapse stattfindenden Signalaustauschs werden bislang nur ansatzweise verstanden. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Etablierung bestimmter räumlicher Muster in der Anordnung der beteiligten Zellmembranrezeptoren, die in den vergangenen Jahren in einer Reihe bahnbrechender Studien unter Zuhilfenahme artifizierender Membranen aufgeklärt wurde [1]. Der Prototyp einer immunologischen Synapse besteht aus einem Muster konzentrischer Ringe von einigen Mikrometern im Durchmesser, bei dem im Zentrum die Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Antigen-Komplex lokalisiert sind und in einem peripheren Ring die Interaktionen zwischen den Adhäsionsproteinen LFA-1 und ICAM-1 (siehe Abb. 1).

Durch Veränderung der räumlichen Anordnung der Membranproteine mittels nanotechnologischer Methoden konnte man zeigen, dass die Form der Anordnung wesentlich für die Steuerung der Signalübertragung ins Zellinnere ist und

damit für die korrekte Initiation der T-Zell-Proliferation und Differenzierung [2, 3].

Die Rolle von Chemokinen bei der Etablierung der immunologischen Synapse

Neben dem direkten Kontakt zwischen Zellmembranproteinen auf der Oberfläche des T-Lymphozyten und der Antigen-präsentierenden Zelle spielen auch kleine, diffusionsfähige Botenstoffe eine Rolle wie etwa Chemokine. Das sind kleine Proteine, die von vielen Zelltypen gebildet und sezerniert werden und deren primäre Funktion es ist, Zellen an bestimmte Orte des Körpers zu dirigieren. Für die stabile Induktion der oben beschriebenen Signalereignisse ist der andauernde Kontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle notwendig. Es ist noch nicht genau bekannt, welche Faktoren diesen andauernden Kontakt regulieren, jedoch deuten aktuelle Studien auf eine Beteiligung von Chemokinen hin [4]. Diese binden spezifische Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche, die alle zur Familie der heptahelikalen Membranrezeptoren zählen (siehe Abb. 2). Die Rezeptoren haben eine dreidimensionale Struktur, bei der Domänen des Proteins insgesamt siebenmal die Zellmembran passieren.

Über die Bindung von Signalproteinen an die drei intrazellulären Schleifen des Rezeptors, aber auch an den intrazytoplasmatischen Teil werden nach Bindung des Chemokins eine Reihe von Signalkaskaden induziert, deren Aktivität bewirkt, dass die Zelle in Richtung ei-

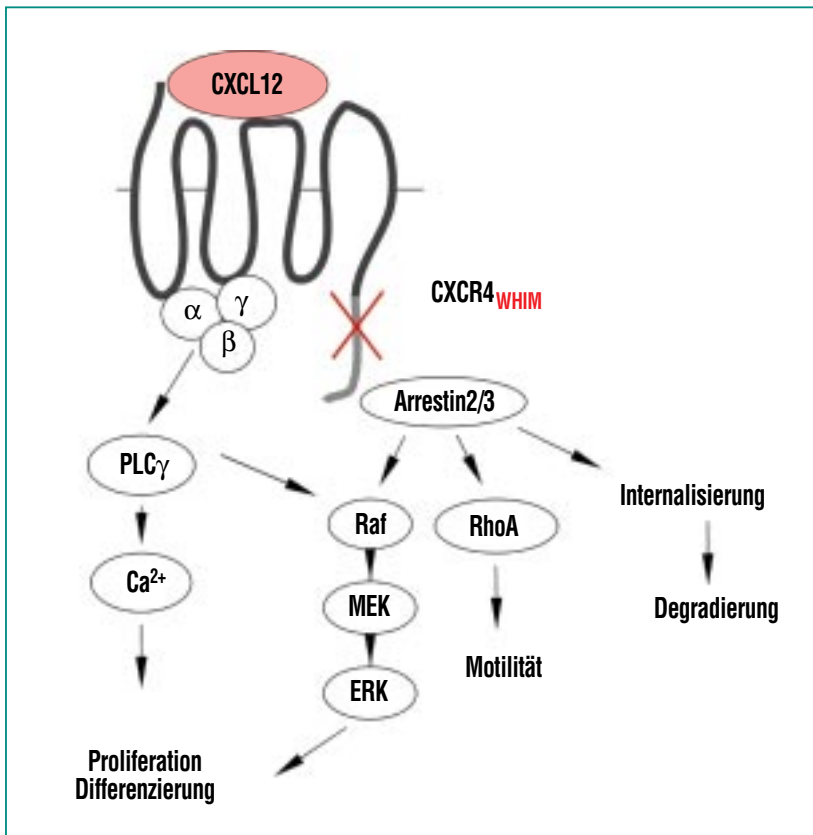


Abb. 2: Schematische Darstellung des heptahelikalen Rezeptors CXCR4 und der von ihm angesteuerten Signalwege: Über heterotrimere G-Proteine (α , β , γ) wird der PLC γ -Signalweg angeschaltet, der gemeinsam mit dem Ras-Erk-Signalweg Proliferation und Differenzierung reguliert. Arrestine vermitteln die Aktivierung des Ras-Erk- und des RhoA-Signalwegs, der für die Motilität von Zellen mit verantwortlich ist. Darüber hinaus vermitteln sie die Begrenzung der Signalweiterleitung von CXCR4 durch Internalisierung, die zu der Degradierung des Rezeptors führt.

nes Chemokin-Gradienten wandert. Auf diese Weise dirigieren beispielsweise die Chemokine CCL19 und CCL21 über den Chemokin-Rezeptor CCR7 die Migration der T-Zellen zu den Antigen-präsentierenden Zellen in die Lymphknoten. Darüber hinaus wurden die Chemokine CXCL12 und CCL5 in den letzten Jahren als wichtige Regulatoren in der Feinabstimmung der Immunantwort identifiziert. So wurde gezeigt, dass

die korrespondierenden Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 auf der T-Zelle zur immunologischen Synapse rekrutiert werden (siehe Abb. 3), dort mit dem T-Zell-Rezeptor assoziieren und nach Bindung der von der Antigen-präsentierenden Zelle sezernierten Chemokine CXCL12 und CCL5 auch aktiv am Signalaustausch teilnehmen [5, 6].

Infolgedessen wird über zwei Mechanismen die synaptische Ver-

bindung zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle verstärkt. Zum einen kommt es durch die Chemokin-Wirkung zu einer Verstärkung der Adhäsionskräfte des Integrin-Rezeptors LFA-1 auf der T-Zelloberfläche, der mit ICAM-1 auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle interagiert. Zum anderen vermindert die Rekrutierung von CXCR4 und CCR5 an die Synapse die Sensitivität der nicht-synaptischen Anteile der T-Zell-Membran, so dass die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass die T-Zelle durch Chemokin-Signale aus der Umgebung „abgelenkt“ wird und die Synapse verlässt. All dies verstärkt die Proliferation und erhöht die Produktion einer weiteren Familie von Botenstoffen, den Zytokinen, durch die T-Zelle, die ihrerseits zur Proliferation und weiteren Differenzierung der T-Zelle, sowie zur Aktivierung umgebender Immunzellen beitragen.

Das WHIM-Syndrom – ein Krankheitsmodell, das zum besseren Verständnis der Zell-Zell-Kommunikation an der immunologischen Synapse beiträgt

Das WHIM-Syndrom ist eine erbliche Krankheit des Menschen, die auf einer Mutation des Chemokinrezeptors CXCR4 beruht, die zu einem Verlust des regulatorischen intrazellulären Teils des Rezeptors führt [7]. Patienten leiden an einem relativ gut symptomatisch therapierbaren Immunschwäche-Syndrom, das durch wiederkehrende Infektionen der Atemwege, multiple Warzen der Haut nach Infekti-

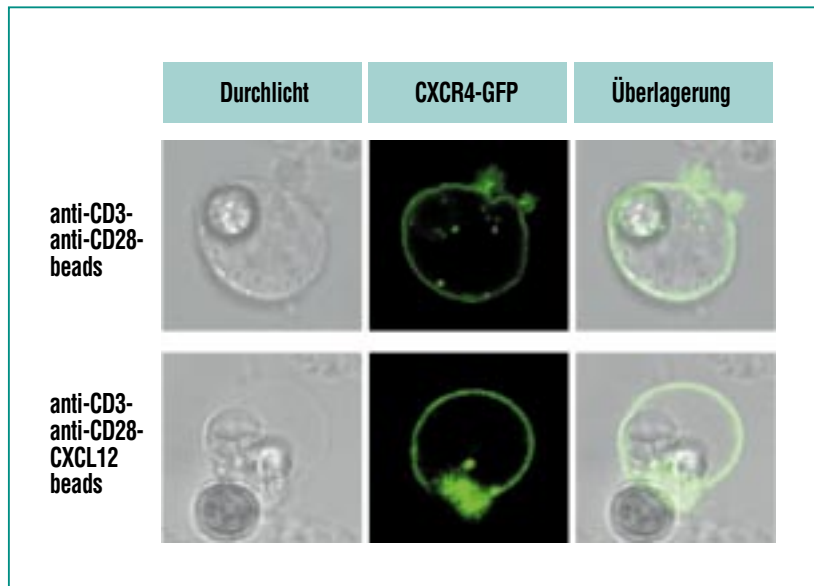


Abb. 3: Translokation des Rezeptors CXCR4 in den Bereich der immunologischen Synapse: Confokale Fluoreszenzbilder von T-Zellen, die ein Green-fluorescent-protein(GFP)-gekoppeltes CXCR4 tragen (obere Reihe). Wenn diese Zellen mit Latex-Kügelchen („beads“, 6 µm Durchmesser) inkubiert werden, an die neben stimulierenden Antikörpern (anti-CD3, anti-CD28) auch der Ligand von CXCR4, CXCL12, gebunden ist, so kommt es zur Simulation der Verhältnisse einer immunologischen Synapse, bei der GFP-CXCR4 in den Bereich der Kontaktfläche transloziert (untere Reihe).

on mit humanen Papillomaviren und erniedrigte Blut-Immunglobulin-Spiegel, sowie verminderte Zahlen weißer Blutkörperchen im Blut charakterisiert ist. Um diese Erkrankung besser zu verstehen, ist es daher von großem Interesse, die Funktionen des intrazellulären Teils des Rezeptors näher zu untersuchen (siehe zum folgenden Abb. 2).

Nach Bindung des Chemokins CXCL12 wird der regulatorische intrazytoplasmatische Teil des Rezeptors CXCR4 durch Phosphorylierung biochemisch modifiziert und bindet daraufhin Arrestine, eine Familie intrazellulärer Proteine [8]. Arrestine vermitteln die Internalisierung des Rezeptors, d. h.

die Aufnahme in das Zellinnere, wodurch eine Reihe von Signalkaskaden, die durch CXCL12 angeschaltet wurden, wieder in den Ruhezustand versetzt werden. Darüber hinaus wirken Arrestine als so genannte „Scaffold-Proteine“, d. h. sie rekrutieren andere Signalmoleküle an die Zellmembran und vermitteln auf diese Weise indirekt deren Aktivierung. Durch den Wegfall (WHIM-Mutation) des zytoplasmatischen Teils von CXCR4 und das Fehlen der Arrestin-Bindung ist daher für einige der von CXCL12/CXCR4 angeschalteten Signalwege durch Ausbleiben der Arrestin-abhängigen Internalisierung von CXCR4 eine verlängerte und ggf. verstärkte Aktivierung zu erwarten. Für die Arrestin-abhän-

gigen Signalwege ist jedoch mit einer fehlenden Aktivierung zu rechnen.

Beobachtungen, die wir in einem in unserem Labor etablierten Zellkulturmodell gemacht haben, bestätigen diese Hypothesen. Tatsächlich zeigen CXCR4^{WHIM}-exprimierende T-Lymphozyten eine defekte Internalisierung des Rezeptors nach Stimulation mit CXCL12. Infolgedessen ist die Signaltransduktion im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor dereguliert, was zu einer verstärkten und verlängerten Calciumantwort nach Behandlung mit CXCL12 führt. Auf der anderen Seite ist die Aktivierung Arrestin-abhängiger Signalmoleküle wie der kleinen GTPase RhoA oder der MAP-Kinase Erk in CXCR4^{WHIM}-exprimierenden T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

Funktionelle Analysen ergaben, dass CXCR4^{WHIM}-exprimierende T-Zellen eine Reihe von Merkmalen zeigen, die auf eine Funktionsstörung während der Immunantwort hinweisen: Sie reagierten nicht auf das Stoppsignal durch T-Zell-Rezeptor- und Corezeptor-Stimulation, das entscheidend für die stabile Ausbildung der immunologischen Synapse ist. Durch die gestörte Informationsübertragung in einer nicht voll funktionsfähigen immunologischen Synapse, aber möglicherweise auch durch davon unabhängige Mechanismen werden nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation mehrere wichtige Signalwege nicht oder nur schwach aktiviert. Dies hat eine verminderte Produktion des Zytokins Interleukin-2 zur Folge, des Schlüsselproteins, das Proliferation und Differenzierung in den aktivierten T-Zellen weiter vorantreibt. Die de-

taillierte Analyse der gestörten Signalübertragung in CXCR4^{WHIM}-T-Zellen in vitro und in vivo ist Gegenstand unserer aktuellen Arbeiten. Es kann jedoch bereits zum gegenwärtigen Zeitpunkt angenommen werden, dass die Störung der Kommunikation zwischen T-Zelle

und Antigen-präsentierender Zelle in WHIM-Syndrom-Patienten der entscheidende Auslöser für die Immunschwäche ist, die in den Patienten beobachtet wird. Eine Analyse der Mechanismen wird nicht nur unser Wissen über die Biologie der Zell-Zell-Kommunikation er-

weitern, sondern auch möglicherweise zur Behandlung von Patienten mit WHIM-Syndrom oder anderen Formen der Immunschwäche beitragen.

Literatur

- [1] J.T. Groves, 2006, *Spatial mutation of the T cell immunological synapse*, *Curr Opin Chem Biol* 10:544–550
- [2] J. Doh, D.J. Irvine, 2006, *Immunological synapse arrays: Patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells*, *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5700–5705
- [3] K.D. Mossman, G. Campi, J.T. Groves, M.L. Dustin, 2005, *Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses*, *Science* 310
- [4] A. Viola, R.L. Contento, B. Molon, 2006, *T cells and their partners: the chemokine dating agency*, *Trends Immunol* 27:421–427
- [5] A. Kumar, T.D. Humphreys, K.N. Kremer, P.S. Bramati, L. Bradfield, C.E. Edgar, K.E. Hedin, 2006, *CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells*. *Immunity* 25: 213–224
- [6] B. Molon, G. Gri, M. Bettella, C. Gomez-Mouton, A. Lanzavecchia, A.C. Martinez, S. Manes, A. Viola, 2005, *T cell costimulation by chemokine receptors*, *Nat Immunol* 6:465–471
- [7] G.A. Diaz, 2005, *CXCR4 mutations in WHIM syndrome: a misguided immune system?* *Immunol Rev* 203:235–243
- [8] E.V. Gurevich, V.V. Gurevich, 2006, *Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways*, *Genome Biol* 7:236.

Mechanismen der Erkrankung der Skelettmuskulatur

I. V. Röder, J. Roll, Y. Petersen, J. Martin, R. Rudolf, ITG

Neuromuskuläre Erkrankungen und ihre Wirkebenen

Jede Art willkürlicher Bewegung, vom Atmen über das Sprechen, Essen, Gehen bis zum Schreiben dieser Zeilen, wird durch Skelettmuskulatur vermittelt. Dementsprechend schwerwiegend sind krankhafte Veränderungen in diesem System. Das Interesse ist groß, diesen Veränderungen auf die Spur zu kommen und sie wo möglich zu beseitigen. Der Weg dahin ist aufgrund der Komplexität der Zusammenarbeit verschiedener Gewebetypen sehr langwierig. Unsere Willkürmotorik basiert nämlich auf einer Interaktion zwischen zentralem und peripherem Nervensystem und der Skelettmuskulatur selbst. Während in Gehirn und Rückenmark eingehende – sensorische – und ausgehende – motorische – Reize miteinander abgeglichen werden, setzen die sogenannten Motoneurone, welche Rückenmark und Muskeln miteinander verbinden, diese zentralnervösen Signale in muskelstimulierende Erregungsmuster um. Letztere bewirken die Kontraktion der Skelettmuskulatur auf so erstaunlich feine Weise, dass es uns möglich ist, komplizierteste Bewegungsvorgänge durchzuführen. Auf jeder der genannten regulatorischen Ebenen kann es zu Erkrankungen kommen, deren Schweregrad alleine durch exemplarische Nennungen deutlich wird – z. B. Parkinsonsche Krankheit für das Zentralnervensystem, Multiple Sklerose für die Motoneurone und Duchenne Muskeldystrophie für die Skelettmuskulatur.

Muskeldystrophien – Ursachen und Wirkungen

Wir beschäftigen uns mit Mechanismen, die für die Ausbildung der muskelbasierten Erkrankungen wichtig sind. Unter diesen sind besonders die Muskeldystrophien bekannt, eine Gruppe von Syndromen, die alle durch progressiven Muskelschwund und damit einhergehende Einschränkungen der Bewegungsfähigkeit gekennzeichnet sind. In besonders schweren Fällen, wie zum Beispiel der Duchenne Muskeldystrophie, führt die Muskelschwäche bereits im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt zum Tod durch Herzversagen oder Atemstillstand.

Ein Meilenstein in der Dystrophieforschung war die Erkenntnis, dass alle Patienten, die unter der Duchenne-Form leiden, Mutationen im Dystrophin-Gen aufweisen [1]. Dieses Gen ist verantwortlich für die Herstellung von Dystrophin, welches eines der größten menschlichen Proteine darstellt. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass Dystrophin Teil eines umfangreichen Proteinkomplexes ist, der die Muskelzelle mit ihrer Umgebung verzahnt und ihr so zusätzliche Stabilität gegen die hohen Scherkräfte verleiht, die während der Muskelkontraktion auftreten [2]. Man geht deshalb davon aus, dass Fasern, bei denen dieser Proteinkomplex nicht intakt ist, schon bei normaler Beanspruchung Mikrorisse aufweisen, und nachfolgend das zelluläre Gleichgewicht so stark gestört ist, dass die Fasern nach und nach absterben. Als besonders problematisch wird bei diesem Geschehen der Einstrom von Calciumionen angesehen [3]. Während die-

se Ionen einerseits für die ganz normale Regulation der Muskelkontraktion unentbehrlich sind, können sie bei übermäßigem Auftreten auch den Zelltod bewirken, und im Falle der Entstehung der Muskeldystrophien scheint dies ein entscheidender Faktor zu sein. Auf morphologischer Ebene fallen im dystrophischen Muskel neben deutlichen Anzeichen von Entzündung und Verdrängung des Muskelgewebes durch Fett- und Bindegewebe hauptsächlich Veränderungen im Zellskelett und der neuromuskulären Synapse, der Verbindung zwischen Nerv und Muskel, auf.

Die Maus als Modell für die Erforschung der Muskeldystrophien

Aufgrund der genannten Hypothesen zur Krankheitsentstehung und der beobachteten Symptome gehen wir besonders zwei Fragen nach: 1. Inwieweit und an welcher Stelle ist das zelluläre Gleichgewicht gestört, und welche Folgen hat dies für den Muskel? 2. Welche Ursachen liegen der veränderten Morphologie der Synapse zugrunde, und welche Rolle spielt dies für das Überleben der Faser? Diese Vorgänge können in Zellkultursystemen nicht oder nur sehr unbefriedigend bearbeitet werden, da dort die Scherkräfte und Signalmechanismen, die im lebenden Muskel wirksam und entscheidend sind, nicht nachgestellt werden können. Es wurde deshalb nötig, nach geeigneten Systemen zu suchen, die einerseits die molekularen Mechanismen, die den Muskeldystrophien zugrunde liegen, widerspiegeln und die andererseits hinreichend klein wären, um für die notwendige mikroskopi-

sche Analyse verfügbar zu sein. Beide Bedingungen erfüllt die Maus. Bei dieser Spezies existiert eine Reihe von Formen, bei denen dieselben genetischen Defekte auftreten, die auch beim Menschen zur Ausbildung der Muskeldystrophien führen. Ausserdem sind eine Anzahl an oberflächlichen Skelettmuskeln besonders gut experimentell zugänglich und überdies genetisch manipulierbar. Wir machten uns deshalb vor wenigen Jahren daran, Modelle zu entwickeln, die uns einen direkten Einblick die das Zellgleichgewicht im lebenden gesunden und kranken Skelettmuskel gewähren würden.

Technologische Fortschritte ermöglichen neue Einsichten in der biomedizinischen Forschung

Auf dem Weg dahin halfen uns besonders technologische Entwicklungen auf zwei Gebieten, nämlich der Mikroskoptechnologie und der Entwicklung fluoreszierender Proteine als molekulare Sonden. Im Bereich der Mikroskopie wurde seit Anfang der neunziger Jahre durch Winfried Denk (Heidelberg) und Kollegen die sogenannte Zweiphotonenmikroskopie in die biologische Forschung eingeführt. Diese Technologie ermöglicht die nicht-invasive Visualisierung fluoreszierender Objekte tief im Gewebe und hat bereits eine Reihe wichtiger Erkenntnisse über physiologische Vorgänge, z. B. im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems, geliefert. Besonders profitiert hat diese Methode durch die quasi parallele Entdeckung und Entwicklung des sogenannten Grün Fluoreszierenden Protein

(GFP) als genetischer Marker. GFP ist ein Protein aus Quallen, das auch nach Bildung in Fremdorganismen selbsttätig zu einer fluoreszenten Form heranreift. Zunächst wurde GFP in erster Linie als Marker für Proteinbildung und -verteilung eingesetzt. Inzwischen kennt man eine ganze Serie von verschiedenen Formen und Farbvarianten von GFP und anderen fluoreszierenden Proteinen, die zusammen ein wichtiges Werkzeugarsenal für biologische und biochemische Labors darstellen. Gemeinsam ist all diesen Werkzeugen, dass sie mit Hilfe gewöhnlicher genetischer Verfahren in das Untersuchungsobjekt eingeführt werden und dort für die jeweiligen Zwecke eingesetzt werden können.

Basierend auf diesen beiden technologischen Entwicklungen konnten wir schließlich ein experimentelles System entwickeln, das erstmals direkte Einsichten in das zelluläre Gleichgewicht mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung gestattete (siehe Abb. 1). Dazu wurden zunächst die fluoreszenten Proteinsonden in den Muskel übertragen und dann, nach einer Reifungszeit der Sonden mithilfe der Zweiphotonenmikroskopie am betäubten Tier die zu bestimmenden Parameter vermessen. Bevor wir uns aber an die Untersuchung unbekannter physiologischer Phänomene machten, mussten wir sicherstellen, dass unsere Präparate intakt sind, das heißt, dass sie auf Reize mit bekannter Antwort entsprechend reagieren würden. Zunächst untersuchten wir also, ob die Muskeln bei Stimulierung mit zunehmender Stimulationsfrequenz zunehmend kontrahierten

und ob dieser Effekt positiv mit der Konzentration an Calcium-Ionen in den Fasern korrelierte. Für die Messung der Calcium-Ionendynamik benutzten wir eine spezifische Fluoreszenzsonde, die ihr Leuchtverhalten in Abhängigkeit der vorhandenen Calcium-Ionenkonzentration ändert. Erfreulicherweise entsprachen unsere Messergebnisse den Erwartungen und wir konnten eine direkte Beziehung zwischen Stimulationsfrequenz, Muskelkontraktion und Calcium-Ionenspiegel in den Muskelfasern zeigen.

Beschreibung physiologischer Calcium-Puffersysteme

Als Nächstes wendeten wir uns der Fragestellung zu, welche zellulären Kompartimente an der Regulierung des Calcium-Spiegels beteiligt wären. Dies ist von Bedeutung für die Ursachenerforschung der Muskeldystrophien, weil man zwar einerseits davon ausgeht, dass ein verstärktes Auftreten von Calcium-Ionen in der Muskelfaser entscheidend für die Krankheitsauslösung sein könnte, andererseits aber unklar ist, über welchen Mechanismus letztlich die Faserintegrität angegriffen wird. Wie bereits erwähnt, benötigt die Muskelzelle Calcium-Ionen für die Kontraktion, reagiert aber auf einen dauerhaft erhöhten Calcium-Spiegel mit dem Absterben der Faser. Es ist also absolut essenziell, dass die Konzentration dieses Ions in jeder Situation genau eingestellt ist. Dazu bedient sich die Muskelzelle einer Reihe verschiedener Mechanismen, die im wesentlichen auf einer kontrollierten Separierung von Calcium basieren, das

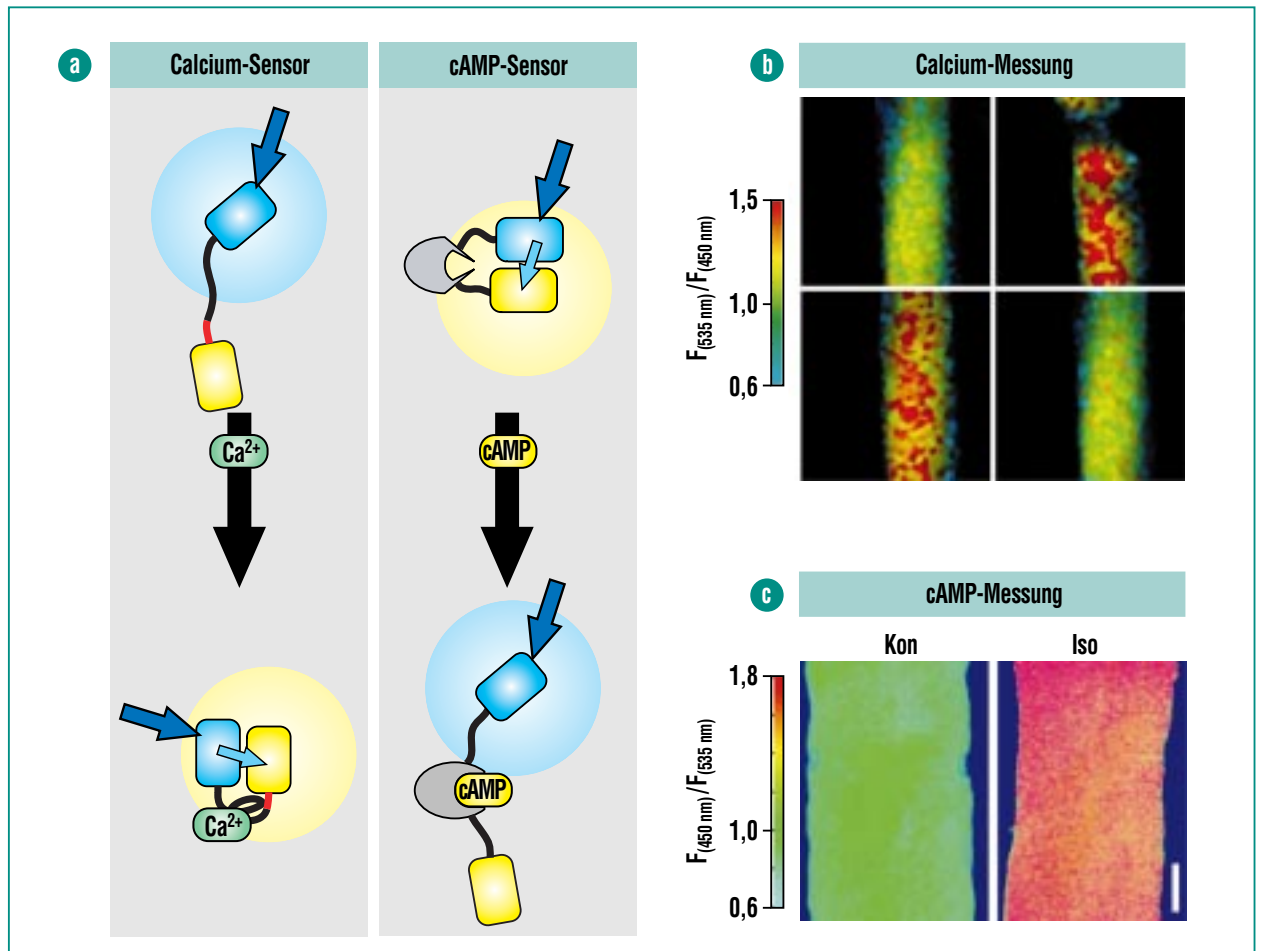


Abb. 1: Molekulare Nanosensoren und deren Anwendung in der Muskelforschung. a): Wirkungsweise von Ca^{2+} - und cAMP-Sensoren. Die Bindung von Calcium-Ionen (links) oder cAMP (rechts) führt durch Molekülumlagerungen zu einer messbaren Veränderung der Fluoreszenzfarbe. Dunkelblaue Pfeile, Anregungslicht; hellblaue/gelbe Kreise, Fluoreszenzfarbe. b) und c): Messung physiologischer Parameter im Muskel mittels Nanosensoren und Zweiphotonenmikroskopie. Erhöhte Calcium- (b) und cAMP-Spiegel (c) aufgrund physiologischer Stimuli sind durch Falschfarbenwechsel von grün nach rot angezeigt.

heißt sie lagert diese Ionen während der Ruhephasen in bestimmten Depots und entlässt es nur zum Zwecke der Kontraktion und in portionierten Mengen aus diesen Depots in das Zellinnere. Zum Beenden der Kontraktion muss das Calcium freilich wieder zurück in die Depots gepumpt werden. Die Muskelzelle bringt das Kunststück fertig, all diese Vorgänge in Millisekunden und hochpräzise ablaufen

zu lassen. Aber wohin pumpt sie das freigesetzte Calcium? Bislang war ein röhrenartiges Membrannetzwerk, das sogenannte Sarcoplasmatische Reticulum, als Hauptspeicher bekannt. Es enthält Ionenkanäle, die Calcium auf die Aktivierung der Muskelzelle hin aus dem Netzwerk entlassen, und es enthält Ionenpumpen, die anschließend das Calcium wieder in das Netzwerk zurückbefördern.

Die Frage war, ob ein zweites, wichtiges Netzwerk bestehend aus sogenannten Mitochondrien ebenfalls an der Aufnahme von Calcium nach der Kontraktion beteiligt ist. Da dieses Netzwerk, das normalerweise für die Bereitstellung der Energieträgermoleküle ATP bekannt ist, keine aktiven Pumpen, sondern nur relativ unsensible, passive Calcium-Ionenkanäle enthält, wurde lange eine Rolle dieses Netz-

werkes am Calciumzyklus von Muskelzellen bezweifelt. Allerdings war auch bekannt, dass es so etwas wie ein Mess- und Regelglied für die Zellphysiologie darstellt: In ihm befinden sich nämlich eine Reihe von Faktoren, die bei Freisetzung zum programmierten Zelltod führen; und diese Freisetzung findet bekanntermaßen in einer Reihe von Zelltypen (für Muskelzellen war das noch nicht bekannt) bei unphysiologisch erhöhtem Calcium-Spiegel statt. Also war zu prüfen, ob das Mitochondriennetzwerk in Muskelzellen im intakten Gewebe Calcium aufnehmen und damit Veränderungen im zellulären Calciumspiegel messen könnte. Wir sind dieser Frage anhand unseres experimentellen Tiermodells und unter Ausnutzung einer Sonde, die Calcium nur in Mitochondrien misst, nachgegangen. Wir konnten auf diese Weise erstmals im lebenden Gewebe nachweisen, dass diese Calcium-Aufnahme tatsächlich unter verschiedenen Bedingungen stattfindet, dass sie aber durch Inaktivierung des Netzwerkes unterbunden werden kann [4]. Im Nachhinein wurden wesentliche Bestandteile dieser Befunde auch durch Untersuchungen anderer Gruppen bestätigt und erlauben im Hinblick auf die Muskeldystrophien eine theoretische Einbeziehung des Mitochondriennetzwerkes in den Mechanismus der Krankheitsentstehung.

Ausblick

Durch Kombination unseres Tiermodells mit der Vielzahl vorhandener und neu zu entwickelnder Sonden und deren Visualisierung mittels moderner bildgebender Me-

thoden haben wir eine neue Plattform für die direkte Beobachtung hochkomplexer und nur im biologischen Gefüge beantwortbarer Fragestellungen entwickeln können [4–6]. Mit dieser Technik konnte bereits erstmals zweifelsfrei die Beteiligung eines neuen Calcium-Depots (der Mitochondrien) im Skelettmuskel beschrieben werden [4]

und Untersuchungen über die Beteiligung dieses Depots an der Entstehung der Muskeldystrophie sind derzeit im Gange. Eine zweite Stoßrichtung unseres Labors befasst sich mit Störungen des Transports von Proteinen zur Verbindungsstelle zwischen Nerv und Muskel im dystrophen Muskel (Abb. 2). Mithilfe des Tiermodells

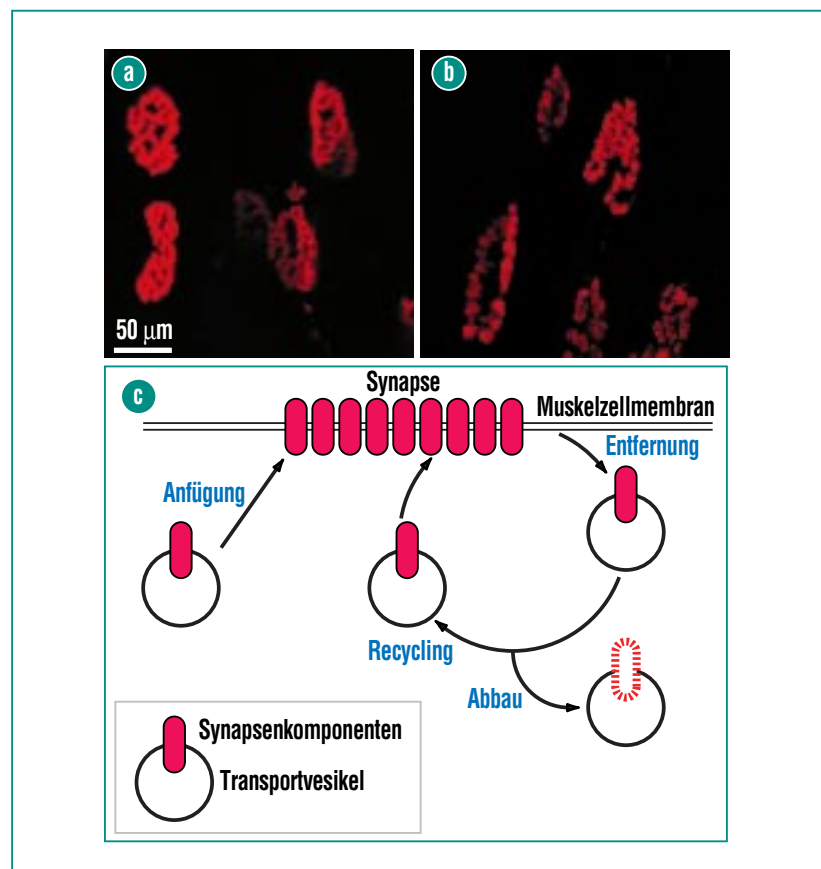


Abb. 2: Schäden an der neuromuskulären Synapse in kranken Muskeln. Struktur, Form und Größe der Muskelsynapse im gesunden (a) und im kranken, dystrophen Säugermuskel (b). Form, Größe und Aufbau der Synapsen sind im dystrophen Muskel krankhaft verändert. c): Schema der Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Muskelsynapse dienen. Komponenten der Synapse werden über Transportvesikel bei Bedarf herangeführt und nach Überalterung oder bei Inaktivität entfernt. Je nach physiologischem Zustand des Muskels können entfernte Komponenten rezykliert oder definitiv abgebaut werden. Wie diese Transportschritte stattfinden und in welchem Maß sie in kranken Muskeln gestört sind, ist Gegenstand unserer Forschung.

konnten wir dort erste Hinweise auf die Beteiligung und Fehlsteuerung bestimmter Motorproteine finden und gehen nun der weiteren Charakterisierung dieser Effekte und deren Rolle für das dystrophe

Krankheitsbild nach. Wir hoffen, auf lange Sicht der molekularbiologischen und genetischen Forschung ein wertvolles und physiologisch aussagekräftiges Modell zur Seite stellen und weiterent-

wickeln zu können, um das Ursache-Wirkung-Gefüge von Muskel-erkrankungen aufzudecken.

Literatur

- [1] E.P. Hoffman, R.H. Brown Jr., L.M. Kunkel, (1987) *Cell* 51, 919-928
- [2] M.W. Berchtold, H. Brinkmeier, M. Muntener, (2000) *Physiol Rev* 80, 1215-1265
- [3] P.R. Turner, T. Westwood, C.M. Regen, R.A. Steinhardt, (1988) *Nature* 335, 735-738
- [4] R. Rudolf, M. Mongillo, P.J. Magalhaes, T. Pozzan, (2004) *J Cell Biol* 166, 527-536
- [5] R. Rudolf, P.J. Magalhaes, T. Pozzan, (2006) *J Cell Biol* 173, 187-193
- [6] J. Tothova, B. Blaauw, G. Pallafacchina, R. Rudolf, C. Argentini, C. Reggiani, S.Schiaffino, (2006) *J Cell Sci* 119, 1604-1611

Von der Grundlagenforschung zur Entwicklung metastasenspezifischer Peptide

H. Ponta, V. Orian-Rousseau, ITG

Als wir uns vor mehr als 20 Jahren entschlossen, nach Genen zu suchen, die spezifisch in metastasierenden Tumorzellen aktiv sind, hatten wir zwei Hoffnungen: Erstens könnten solche „Markergene“, speziell natürlich die von ihnen hergestellten Proteine, diagnostische und eventuell auch therapeutische Bedeutung im Kampf gegen Metastasen bekommen. Zweitens könnten uns die von solchen Genen abgeleiteten Proteine Aufschluss über die molekularen Wirkmechanismen geben, die zur Metastasierung von Tumorzellen führen. Mit der Identifizierung von CD44 v6 als einem der ersten metastasenspezifischen Proteine hatten wir sehr bald die Möglichkeit, beide Linien zu verfolgen.

Der erste Aspekt, der der medizinischen Relevanz, war vielversprechend nachdem wir gezeigt hatten, dass ein homologes CD44-Gen auch beim Menschen vorkommt (wir hatten es ursprünglich in der Ratte identifiziert, da wir ja in einem geeigneten Modellorganismus seine metastasenspezifischen Eigenschaften testen wollten) und in einer Reihe von menschlichen Tumoren ein Indiz für bösartiges Wachstum – also Metastasierung – ist. Über ein Patent gelang es uns, eine große pharmazeutische Firma ins Boot zu bekommen, die uns tatkräftig unterstützte. Mit deren Hilfe haben wir eine ganze Palette von Antikörpern hergestellt, also Proteine, die spezifische Strukturen auf anderen Proteinen, in unserem Fall CD44 v6, erkennen und binden können. Diese Antikörper wurden dann zum Nachweis von CD44 v6 und zur Inhibition seiner Funktion eingesetzt. Nachdem alle Versuche erfolgver-

sprechend verliefen, hat diese pharmazeutische Firma das Projekt gestartet, CD44 v6 als therapeutisches Zielmolekül zur Bekämpfung von Metastasen zu verwenden. Dies ist ein langwieriger und extrem kostenaufwändiger Weg. Es wurden so genannte „humanisierte“ Antikörper hergestellt, die humanes CD44 v6 erkennen und von menschlichen Immunzellen toleriert werden. Diese Antikörper müssen in großen Mengen und unter besonderen Sicherheitsvorkehrungen synthetisiert werden (sie dürfen z. B. nicht mit Viren kontaminiert sein), und wurden dann in ersten klinischen Tests auf pharmakologische Eignung in Tumorpatienten eingesetzt. Nachdem auch diese Tests zufriedenstellend verlaufen waren, wurden die Antikörper durch Fusion mit einem Toxin so verändert, dass ihre Bindung an Zellen (bevorzugt natürlich Tumorzellen), die Tötung der Zellen bewirkt. Sieben unheilbar an Krebs erkrankte Patienten wurden mit diesen Toxinantikörpern behandelt. Leider zeigten diese Patienten neben der Hemmung des Tumorwachstums Krankheits-symptome auf der Haut, die eines der normalen Organe ist, die ebenfalls CD44 v6 tragen. Einer der Patienten verstarb an diesen Symptomen und daher wurde die gesamte Testreihe abgebrochen [1]. Damit war eine Entwicklung, die mehr als 10 Jahre gedauert hatte, in den Sand gesetzt. Gleichzeitig war es zunächst das Aus für CD44 v6 als therapeutisches Metastasenzielgen, weil man erwarten musste, dass die Behandlung von Patienten mit zu vielen und zu schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden ist.

Die zweite Möglichkeit, die uns die Identifizierung von CD44 v6 eröffnete, nämlich Wirkmechanismen zu entdecken, die relevant für Metastasierung sind, war zwar ebenso langwierig wie der erste Ansatz, dafür aber weit weniger risikobehaftet und wissenschaftlich sehr erfolgreich. Über die Identifizierung der Wirkmechanismen stießen wir aber auch auf neue Möglichkeiten der Intervention mit ihrer Wirkung und damit auf neue therapeutische Ziele. Im Folgenden soll ein solcher Ansatz beschrieben werden.

Das CD44-v6-Protein ist ein Transmembranprotein auf der Oberfläche von Zellen mit einem extrazellulären Abschnitt, einem transmembranen Teil und einem intrazellulären Abschnitt (Abb. 1). In den letzten fünf Jahren ist es uns gelungen, diejenige Funktion von CD44 v6 zu identifizieren, die für die Bildung von Metastasen von Tumorzellen verantwortlich ist. Es ist nämlich ein Korezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren, spezifisch des Met-Rezeptors, der für Zellwanderung und Zellvermehrung und invasives Wachstum verantwortlich sein kann – Eigenschaften, die auch eine metastasierende Tumorzelle benötigt. Wachstumsfaktorrezeptoren sind generell Oberflächenproteine, die durch die Bindung eines Liganden (eines Wachstumsfaktors) aktiviert werden (siehe auch die Abb. 1). Diese Aktivierung führt zu einer Kettenreaktion im Zellinnern (man spricht von „Signaltransduktion“) wobei mehrere Proteine nacheinander aktiviert werden. Am Ende der Kette befindet sich ein Protein, das, wenn aktiviert, im Zellkern Gene aktivieren oder reprimieren kann und auf diese Weise zelluläres Wachs-

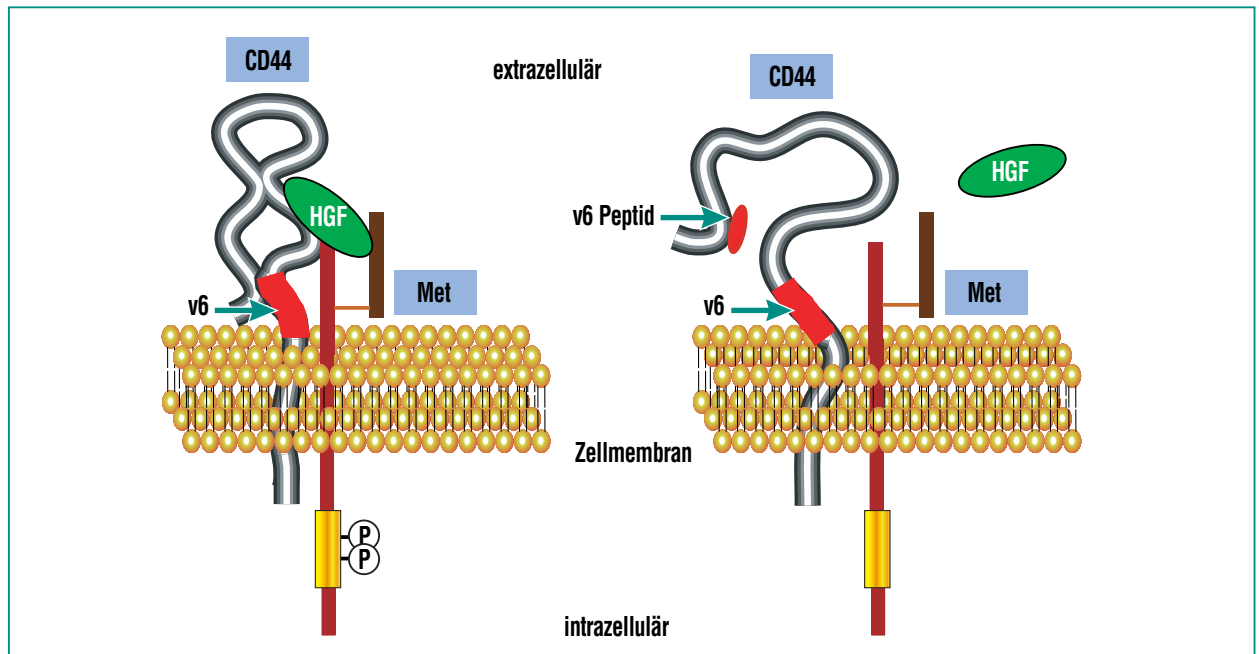


Abb. 1: Für die Aktivierung des Transmembranrezeptors Met, dargestellt als Phosphorylierung (P) im Zellinneren, ist die Bindung seines Liganden, des Wachstumsfaktors HGF (hepatocyte growth factor), im Komplex mit CD44 v6 notwendig (linker Teil der Abbildung). Ein CD44-v6-spezifisches Peptid interferiert mit der korrekten Faltung von CD44 v6 (rechter Teil der Abbildung) und verhindert damit die Bindung des Liganden und die Aktivierung des Rezeptors.

tum oder Bewegung steuert. Nachdem man lange Zeit dachte, dass solche Wachstumsfaktorrezeptoren nur über die Bindung ihres Liganden reguliert werden, zeigt sich nun, dass es darüber hinaus noch eine Feinregulation über Korezeptoren gibt – und ein solcher Korezeptor ist CD44 v6. Über die physiologische Bedeutung dieser Feinregulation haben wir in den Nachrichten 1/2002 berichtet [2]. Sie kontrollieren, ob in einer gegebenen physiologischen Situation die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden überhaupt passieren soll. In diesem Artikel soll nun erhellt werden, wie CD44 v6 als Korezeptor funktioniert.

Antikörperproteine, die spezifisch an den extrazellulären Teil von CD44 v6 binden, waren ursprüng-

lich als Hemmer der Metastasierung von Tumorzellen im Tierrmodell Ratte identifiziert worden [3]. Die gleichen Antikörper hemmen auch die Aktivierung des Met-Rezeptors durch seinen Liganden. Das bedeutet, dass die extrazelluläre Domäne von CD44 v6 an der Aktivierung von Met beteiligt ist. Entweder benötigt der Met-Rezeptor die Bindung an CD44 v6, damit er von seinem Liganden erkannt werden kann, oder CD44 v6 muss den Liganden primär binden und ihn dann seinem Rezeptor „präsentieren“. Dass letzteres der Fall ist, hat Alexandra Matzke, ein Postdoc in unserem Labor, in einer Reihe von eleganten Experimenten gezeigt. Sie hat die Bindung des Liganden in Zellen untersucht, die entweder sowohl CD44 v6 als auch den Met-Rezeptor (als positive

Kontrolle) oder nur den Met-Rezeptor oder nur CD44 v6 auf ihrer Oberfläche tragen. Der Met-Rezeptor alleine reichte nicht zur Bindung seines Liganden aus, wohl aber CD44 v6 alleine. Damit ist eine Funktion von CD44 v6 geklärt. Welches sind aber die Aminosäuren im CD44-v6-Protein (Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut, die linear miteinander verknüpft sind), die für die Bindung der Liganden und damit der Aktivierung des Met-Rezeptors verantwortlich sind? Auch dieser Frage hat sich Alexandra Matzke angenommen. Sie hat kritische Aminosäuren in CD44 v6 durch Mutation verändert und solche Mutantenproteine auf ihre Fähigkeit, als Korezeptor zu funktionieren, getestet. Auf diese Art und Weise gelang es ihr, eine Sequenz von drei aufeinander

folgende Aminosäuren in CD44 v6 dingfest zu machen. Nur wenn diese drei Aminosäuren in der extrazellulären Domäne verändert waren, war CD44 v6 als Korezeptor inaktiv.

Dieser Befund hat neben seiner wissenschaftlichen Bedeutung (wie beeinflussen diese drei Aminosäuren die Struktur des Proteins?) eine eminente praktische Bedeutung. Denn dieses Ergebnis impliziert, dass möglicherweise kleine Peptide, deren Aminosäuresequenz die drei kritischen Aminosäuren beinhalten, die Aktivität des Korezeptors blockieren könnten und damit die Aktivität des Met-Rezeptors inhibieren könnten. Um diese Möglichkeit zu testen, haben wir solche Peptide synthetisieren lassen. Und tatsächlich fanden wir, dass Peptide, die nur aus fünf Aminosäuren aufgebaut sind, aber die drei kritischen enthalten, erstens die Bindung des Met-Liganden HGF an CD44 v6 und damit zweitens die Aktivierung des Met-Rezeptors hemmen (siehe Abb. 1).

Wenn die Korezeptorfunktion von CD44 v6 für den Met-Rezeptor tatsächlich der kritische Schritt für die Metastasierung der Tumorzelle ist, sollten diese spezifischen Peptide auch die Metastasierung in vivo, in der Ratte, unterdrücken. Wir haben die Tumorzellen unter die Haut von Ratten appliziert. Nachdem sich Primärtumore gebildet hatten, haben wir Peptide dreimal wöchentlich injiziert (bisher nur in die Nähe des Tumorgewebes; in weiteren Experimenten ist vorgesehen, die Peptide intravenös zu verabreichen) und die Tiere vor Erreichen des moribunden Stadiums von „Kontrolltieren“ (ohne Injektionen

on der spezifischen Peptide) auf Metastasen in der Lunge und Lymphknoten untersucht. Alle Tiere, die Tumorzellen und ein Kontrollpeptid, das die drei kritischen Aminosäuren nicht enthielt, injiziert bekamen, entwickelten massive Metastasen in Lymphknoten und Lunge. Im Gegensatz dazu zeigten alle Tiere, denen das spezifische Peptid injiziert worden war, weder Lymphknoten- noch Lungenmetastasen (Tab. 1). Interessanterweise war das Wachstum des Primärtumors von dem Peptid nicht beeinflusst. Dieses Peptid stellt damit ein selektives Mittel dar, Metastasenbildung zu unterdrücken und ist somit eine neue Möglichkeit, ein Therapeutikum zu entwickeln. Generell sind solche Peptide leicht und preiswert zu synthetisieren und über Modifika-

tionen kann man deren Stabilität und damit deren Verweildauer im Organismus beeinflussen. Durch solche Veränderungen lassen sich möglicherweise auch Nebenwirkungen minimieren oder gar ausschalten. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass im Tierexperiment in Ratten keinerlei Nebenwirkungen bei der Behandlung mit dem Peptid zu beobachten waren.

Für die meisten Experimente, die wir zur Identifizierung des Wirkmechanismus von CD44 v6 als Korezeptor für den Met-Rezeptor durchgeführt haben, verwendeten wir Zelllinien. Solche Zelllinien sind in den meisten Fällen transformierte Zellen, die aus Tumoren stammen oder in vitro zu Tumorzellen verändert wurden. Solche Zellen sind viel leichter zu hand-

	Tumorvolumen [mm ³]	Relative LN-Zunahme	Zahl der Lungenmetastasen
weiblich 1	1071	1,76	43
weiblich 2	3588	1,97	15
männlich 1	6400	2,50	29
männlich 2	34020	2,04	> 50
weiblich 3	3800	1	1
weiblich 4	3348	1	0
männlich 3	32938	1	0
männlich 4	1368	1	0

Tab. 1: Metastasierungstest. Tumorzellen aus Rattenpankreas mit hohem Metastasierungspotenzial wurden in syngene Ratten unter die Haut appliziert. Nach Anwachsen des Tumors wurden in den Tumor entweder Kontrollpeptide (Tiere 1 und 2) oder CD44-v6-spezifische Peptide (Tiere 3 und 4) drei Mal wöchentlich gespritzt. Bei Erreichen des moribunden Stadiums der Tiere 1 und 2 wurden alle Tiere getötet und die relative Zunahme des Gewichtes des dem Tumor benachbarten Lymphknoten (LN) und die Zahl der Lungenmetastasen ermittelt.

haben als primäre Zellen und haben eine unbegrenzte Lebensdauer. Es erhebt sich aber sofort die Frage, ob die Ergebnisse, die wir mit solchen Zellen erzielen, auch relevant für normale Zellen oder gar für Zellen im lebenden Organismus sind. Diese Frage stellt sich nicht, wenn man nach Mechanismen in Tumorzellen oder gar, wie oben dargestellt, in metastasierenden Tumorzellen sucht. Umgekehrt sind in vielen Fällen solche Mechanismen nicht nur tumorspezifisch sondern sind oft wichtig in spezifischen Entwicklungsstadien z. B. während der Embryogenese in vivo, im Tier. Dies trifft speziell auf den Met-Rezeptor zu, der während der Embryonalentwicklung und im adulten Tier (und Mensch) in vielen Geweben vorkommt und vielfältige Funktionen erfüllt. Braucht der Met-Rezeptor auch in vivo CD44 v6 als Korezeptor? Wie weiter oben beschrieben, braucht der Met-Rezeptor auf Tumorzellen als eine Funktion von CD44 v6 die „Präsentation“ seines Liganden (es gibt noch weitere Funktionen von CD44 v6 in der Met-Aktivierung, nämlich intrazellulär für die Signalweiterleitung, auf die aber hier nicht weiter eingegangen wird. Der interessierte Leser sei auf die Publikationen [4] und [5] verwiesen). Es ist unwahrscheinlich, dass der Met-Rezeptor in vivo ganz neue Wege seiner Aktivierung beschreitet. Aber wie kann man das nachweisen? Eine Möglichkeit besteht darin, das Gen in vivo zu inaktivieren. Über eine sehr aufwändige Technik wird an Stelle des normalen Gens ein Gen mit inaktivierenden Sequenzen in das Genom des Tieres (meistens einer Maus) eingesetzt, die die Übersetzung des Gens in ein Protein

unterdrückt. Mäuse haben, wie auch wir Menschen, in allen somatischen Zellen zwei Kopien eines Gens, man muss also beide Gene inaktivieren und erhält dann eine null-Maus für das entsprechende Gen. In einer solchen null-Maus untersucht man dann, ob Entwicklungs- oder Funktionsstörungen auftreten.

Wie erwartet traten in einer Met-null-Maus (und ebenso in einer Met-Liganden-null-Maus) massive Störungen in verschiedenen Geweben während der Embryogenese auf, die schließlich zum Tod der Tiere zwischen Tag 12 und 16 der Embryonalentwicklung führen. Die Embryogenese in der Maus dauert 19 Tage, die Met-null-Mutation ist also embryonal letal. Wenn für die Aktivierung des Met-Rezeptors in vivo ebenfalls CD44 v6 notwendig ist, sollte man erwarten, dass eine CD44-null-Maus ähnliche Entwicklungsstörungen wie die Met-null-Maus hat. Zu unserer großen Überraschung ist dies nicht der Fall. Solche CD44-null-Mäuse sind nicht in der Embryonalentwicklung beeinträchtigt und haben während ihres Lebens nur einige nicht lebenswichtige Defekte, hauptsächlich im Immunsystem. Bedeutet dieser Befund nun, dass in vivo keine Kooperation von Met mit CD44 v6 notwendig ist? Es gibt eine Reihe von Evidenzen, die diese Interpretation unwahrscheinlich machen, auf die hier der Einfachheit halber aber nicht eingegangen werden kann. Nur ein Hauptargument sei erläutert: Man kann Mäuse herstellen, in denen die Inaktivierung eines Gens nur in bestimmten Geweben, z. B. in der Haut stattfindet. Solche Mäuse gibt es auch für CD44. Im Unter-

schied zu der „totalen“ null-Maus hat eine solche Maus ausgeprägte Veränderungen in der Haut. Wie kann man erklären, dass eine totale null-Maus, in der ja auch kein CD44 in der Haut vorkommt, eine normale Haut entwickelt im Unterschied zu der hautspezifischen null-Maus? Eine mögliche Erklärung, die auch durch weitere Evidenzen erhärtet wird, ist folgende: Wenn CD44 vom Beginn der Embryonalentwicklung an fehlt, können seine Funktionen von anderen Proteinen übernommen werden. Wenn allerdings die Embryonalentwicklung weiter fortgeschritten ist und erst zu diesem späteren Zeitpunkt das Gen von CD44 inaktiviert wird, kann keine Substitution der Funktion mehr stattfinden. Dies ist der Fall bei der Inaktivierung in der Haut. Diese Inaktivierung erfolgt erst in der Mitte der Embryonalentwicklung, am Tag 10 nach Befruchtung und daher prägt sich der Verlust von CD44 in diesen Mäusen in der Haut aus.

Wir gehen mehrere Wege um diese Hypothese, die weitreichende Konsequenzen für das Verständnis der Plastizität unseres Genoms hat, zu beweisen. Ein Weg ist die Identifizierung einer Substituten für die Korezeptorfunktion von CD44 v6 für Met in der CD44-totalen null-Maus. Obwohl es kein direkt verwandtes Gen zu CD44 im menschlichen oder murinen Genom gibt, kennen wir eine Reihe von Proteinen, die zum Teil überlappende Funktionen zu CD44 ausüben könnten. Während ihrer Doktorarbeit hat Frau Vivienne Olaku einen Kandidaten für diese Substitution gefunden, der nun in den CD44-null-Mäusen als Substituent geprüft wird. Ein anderer Weg,

den Herr Thor Kastilan während seiner Doktorarbeit beschriften hat, ist die Herstellung einer so genannten „gefloxten“ Maus. Eine solche Maus trägt an Stelle des normalen Gens ein Gen, bei dem essentielle Abschnitte von zwei „loxP“-Sequenzen (daher „gefloxte“) flankiert sind. loxP sind kurze DNS-Sequenzen, die von einem Enzym erkannt werden können, das dann

das Ausschneiden der dazwischen liegenden DNA-Abschnitte bewirkt. Dadurch wird das Gen inaktiviert. Durch Aktivierung dieses Enzyms zu verschiedenen Zeiten während der Embryonalentwicklung oder spezifisch in verschiedenen Geweben, kann damit vom Experimentator beliebig die Geninaktivierung gesteuert werden. Herrn Kastilan sind die ersten entschei-

denden Schritte zur Herstellung einer solchen CD44-gefloxten Maus gelungen, und wir hoffen, in naher Zukunft unsere Hypothese der Substitution von CD44-Funktionen während der frühen Embryonalentwicklung und die Korezeptorfunktion von CD44 v6 für den Met-Rezeptor in vivo beweisen zu können.

Literatur

- [1] B.M. Tjink, J. Buter, R. de Bree, G. Giaccone, M.S. Lang, A. Staab, C.R. Leemans, G.A. van Dongen, (2006) *A phase I dose escalation study with anti-CD44 v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus*, *Clin Cancer Res* 12, 6064–6072
- [2] H. Ponta, V. Orian-Rousseau, L. Chen, H. Morrison, P. Herrlich, (2002) *Stop or Go – CD44 als Regulator essentieller zellulärer Entscheidungen*, *Nachrichten Forschungszentrum Karlsruhe* 34, 36–40
- [3] U. Günthert, M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zöller, I. Haußmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, P. Herrlich, (1991) *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells*, *Cell* 65, 13–24
- [4] V. Orian-Rousseau, L. Chen, J.P. Sleeman, P. Herrlich, H. Ponta, (2002) *CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling*, *Genes Dev* 16, 3074–3086
- [5] V. Orian-Rousseau, H. Morrison, A. Matzke, T. Kastilan, G. Pace, P. Herrlich, H. Ponta, (2007) *Hepatocyte Growth Factor-induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to Both CD44 v6 and F-Actin*, *Mol Biol Cell* 18, 76–83

Psychologie der Nahrungsaufnahme in Fliegen und Menschen

R. Bader, C. Melcher, S. Buch, M. Bülow, M. Peters, M. Glöck, M. Bauer, B. Pankratz, A. Schröck, S. Kurzhals, S. Walther, O. Simakov, M. Pankratz, ITG

Einleitung

Die Nahrungsaufnahme ist eine der grundlegendsten Aktivitäten im Tierreich. Wann, wieviel und wie oft gegessen wird, Jagdstrategien und Nahrungspräferenzen haben sich zwischen den Spezies zwar unterschiedlich entwickelt, aber eine Gemeinsamkeit bleibt: Nahrung muss die Anforderungen an Wachstum, Überleben und Reproduktion erfüllen. Das hat unter anderem dazu geführt, dass sich innerhalb des Tierreiches verschiedene, hoch spezialisierte Verhaltensmuster der Nahrungsaufnahme entwickelt haben. Diese sind sowohl vom Nahrungsangebot der Umwelt, als auch vom Ernährungszustand des Körpers abhängig. Viele Verhaltensweisen, wie zum Beispiel die Nahrungssuche bei Hunger, sind offensichtlich. Andere wiederum beinhalten raffiniertere oder schwierigere Entscheidungen, wie beispielsweise die Entscheidung zwischen ähnlichen Nahrungsquellen oder zwischen fressen, oder von einem möglichen Jäger gefressen zu werden. Von besonderem biologischem Interesse ist daher die Frage, wie unser zentrales Nervensystem (ZNS) relevante Informationen verarbeitet, um geeignete Entscheidungen zu treffen.

Dieser Sachverhalt ist nicht nur für die biologische Grundlagenforschung von Interesse, sondern hat auch großen Einfluss auf Medizin und Landwirtschaft. Das vielfältige Nahrungsangebot in modernen Industriestaaten zusammen mit einem bequemen Lebensstil haben dazu beigetragen, dass immer mehr Menschen von Krankheiten wie Diabetes und Fettleibigkeit be-

troffen sind. Das zentrale Nervensystem, das sich im Laufe der Evolution unter den Bedingungen von Nahrungsknappheit entwickelt hat, muss nun mit dem Überangebot an Nahrung zurechtkommen.

In diesem Bericht geht es um die Untersuchung eines nahrungsabhängigen neuronalen Schaltkreises in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Die kurze Generationszeit, die Entschlüsselung des Genoms und das leicht zugängliche ZNS, sowie geeignete molekularbiologische und genetische Methoden, haben *Drosophila* zu einem aussagekräftigen Modellorganismus für die Untersuchung neuronaler Schaltkreise gemacht. Durch die Untersuchung von Mutanten mit verändertem Fressverhalten und genomweiten Expressionsanalysen (Bauer et al., 2002) konnte das Neuropeptid kodierende Gen *Hugin* identifiziert werden. Die Zellen, in denen das Genprodukt hergestellt wird, sind am Fressverhalten von *Drosophila* beteiligt. Außerdem ist es nicht spezifisch für Fliegen sondern besitzt mit Neuropeptid *U* ein homologes Neuropeptid in Säugetieren (Melcher et al., 2006). Die Fruchtfliege ist daher ein optimaler Modellorganismus für die Erforschung der biologischen Grundlagen der Nahrungsaufnahme.

Lage und Projektion der Hugin-Neurone

Das Gen *Hugin* kodiert für ein Vorläuferpeptid, das in mindestens zwei aktive Peptide gespalten wird. *Hugin_γ*, eines der Peptide, weist Ähnlichkeit zu einem Protein auf, das für die Häutung der *Drosophila*-Larve verantwortlich ist. Das

zweite Peptid, *PK-2* (*Drosophila melanogaster* Pyrokinin) scheint ein Protein mit muskelstimulatorischer Wirkung zu sein (Meng et al., 2002). Die Produkte des *Hugin*-Gens werden in bestimmten Neuronen im Unterschlundganglion (engl. suboesophageal ganglion (SOG)) produziert. Das SOG gilt als primäres Zentrum für die Verarbeitung von Informationen, welche die Nahrungsaufnahme betreffen. Es hat eine analoge Funktion zum Hypothalamus der Säugetiere. Vom SOG aus senden die *Hugin*-Neurone Nervenfasern, so genannte Neuriten oder Axone, in vier verschiedene Zielgebiete. Zum einen in die Ringdrüse, welche in der Larve das wichtigste Organ zur Freisetzung von im Gehirn produzierten Substanzen ist; zum anderen in das Protocerebrum, welches als höheres Gehirnzentrum für komplexe Verhaltensweisen, sowie Erinnerung und Lernen verantwortlich ist. Die *Hugin*-Neurone senden des Weiteren Nervenfasern in die Mundhakenmuskulatur, welche für die physische Nahrungsaufnahme verantwortlich ist, sowie in das ventrale Nervensystem, welches hauptsächlich die Körpermuskulatur kontrolliert. Die rezeptiven Strukturen der *Hugin*-Zellen erhalten Informationen von Nervenfasern, die direkt von den Geschmackssinnesorganen ausgehen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Zelle immer nur in eine bestimmte der vier möglichen Zielregionen projiziert. Daraus ergibt sich die Einteilung der *Hugin*-Neurone in vier Gruppen. Zusätzliche Zielregionen konnten identifiziert werden. Außerdem gibt es eine Überschneidung der Projektio-

nen verschiedener Hugin-Zellen in einer bestimmten Region des ZNS seitlich des ösophagealen Foramens. Das ösophageale Foramen ist der Durchgang, durch welchen

die Speiseröhre das Gehirn passiert. Dieser Bereich könnte eine bisher unbekannte Region für die Freisetzung von Neuropeptiden sein, welche für das Fressverhalten verant-

wortlich sind. In Abb. 1 sind die vier verschiedenen Gruppen von Hugin-Neuronen dargestellt, sowie schematisch aufgearbeitet. Pro Gehirnhemisphäre projizieren zwei

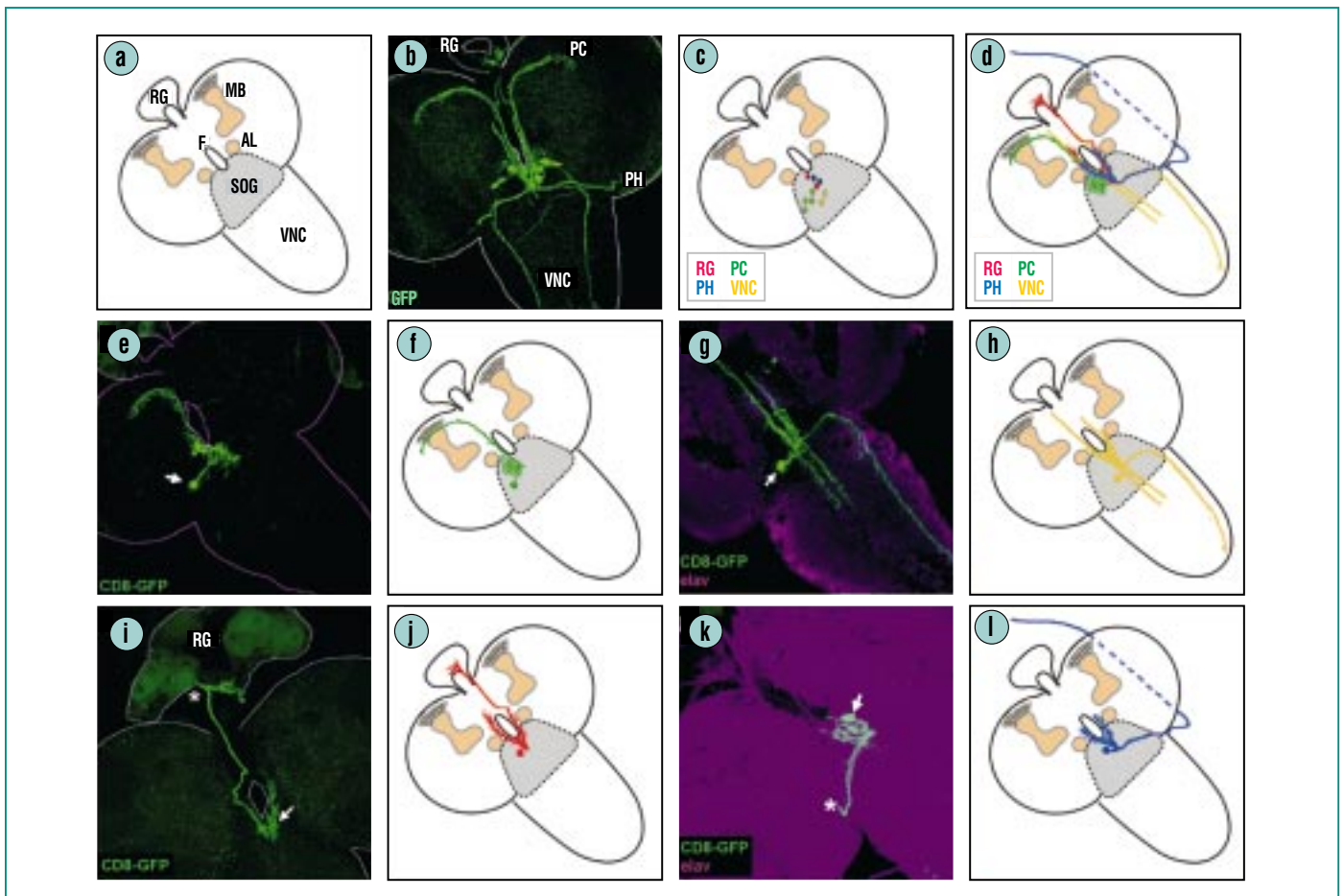


Abb. 1: Lage und Projektion einzelner Hugin-Zellen. (a) zeigt eine schematische Darstellung des zentralen Nervensystems (ZNS) einer Drosophila-Larve mit den wichtigen Regionen: Ringdrüse (RG); Pilzkörper/Protocerebrum (MB); Foramen (F); Antennal-Loben (AL); Subösophageales Ganglion (SOG); ventrales Nervensystem (VNC). In (b) ist ein gefärbtes Gehirn einer Larve zu sehen, in der das Fluoreszenz Protein GFP in den Hugin-Zellen hergestellt wird. Die Projektionen zu den vier verschiedenen Hauptzielen sind gut sichtbar. (c) zeigt die ungefähre Lage der Zellkörper der Hugin-Zellen. In (d) sind die Nervenfasern der vier verschiedenen Gruppen von Hugin-Zellen, farblich voneinander getrennt, sichtbar. In (e) ist eine Hugin-Zelle zu sehen, die in das Protocerebrum projiziert, der Pfeil markiert den Zellkörper, (f) ist die schematische Aufarbeitung. (g) zeigt eine Hugin-Zelle, die in das VNC projiziert, der Pfeil verdeutlicht den Zellkörper, (h) zeigt eine schematisierte Darstellung der Zelle. (i) zeigt eine Hugin-Zelle aus der Klasse der Zellen, die in die Ringdrüse projizieren, der Pfeil markiert den Zellkörper, der Stern verdeutlicht die Verästelungen des Projektionsendes beim Eintritt in die Ringdrüse, (j) ist eine schematische Verdeutlichung dieser Gruppe von Zellen. (k) zeigt eine Zelle, die in den Pharynx projiziert. Die Nervenfasern wurde bei der Präparation des ZNS durchtrennt. Deshalb wird der Austritt der Nervenfasern aus dem ZNS durch einen Stern verdeutlicht. Der Pfeil deutet auf den Zellkörper. (l) ist eine schematische Darstellung einer Zelle aus dieser Gruppe.

Zellen zu der Ringdrüse, zwei zur Mundhakenmuskulatur, zwei in das ventrale Nervensystem und vier in das Protocerebrum. Die vier Zellen, die in das Protocerebrum projizieren, haben seitlich des Foramens feine Verzweigungen, die als rezeptive Strukturen fungieren könnten. Nervenzellen aus den Geschmackssinnesorganen senden Nervenfasern in diese Region. Drei der vier zuvor genannten Gruppen projizieren in eine Region lateral des Foramens, in die Nähe der Antennal-Loben, welche als primäres Zentrum für die Verarbeitung von Geruchsreizen fungieren (Melcher und Pankratz, 2005; Bader et al., 2007). Diese Ergebnisse sind in Abb. 1 zusammengefasst.

Auswirkungen der Hugin-Neurone auf das Fressverhalten

Die Funktion der Hugin-Neurone wurde in erwachsenen Fliegen erforscht. Wenn man durch genetische Manipulation die Produktion des Nervengifts Tetanus-Toxin in den Hugin-Neuronen anregt, unterbindet dieses die neuronale Aktivität der Hugin-Zellen. Das erste auffallende Ergebnis war, dass die Fliegen, bei denen die neuronale Aktivität der Hugin-Neurone unterbunden ist, viel früher mit der Nahrungsaufnahme beginnen, wenn man sie auf eine neue Futterquelle setzt. Im Gegensatz dazu scheinen die nicht manipulierten Kontrollfliegen die

neue Futterquelle zunächst einmal zu evaluieren, bevor sie mit der Nahrungsaufnahme beginnen. Dieser Prozess wird bei den experimentellen Fliegen unterdrückt. Dieses Verhaltensmuster kann sonst nur bei Fliegen beobachtet werden, die sich in einem Hungerzustand befinden. Die Hugin-Zellen fungieren also möglicherweise als Relais, welches die Geschmacksinformation aus den externen und internen Geschmackssinnesorganen aufnimmt. Diese wird in den Hugin-Zellen verschaltet und zu den Zielregionen weitergeleitet. Die Konnektivität und die Auswirkungen von Hugin-Zellen auf das Verhalten sind in Abb. 2 schematisch dargestellt.

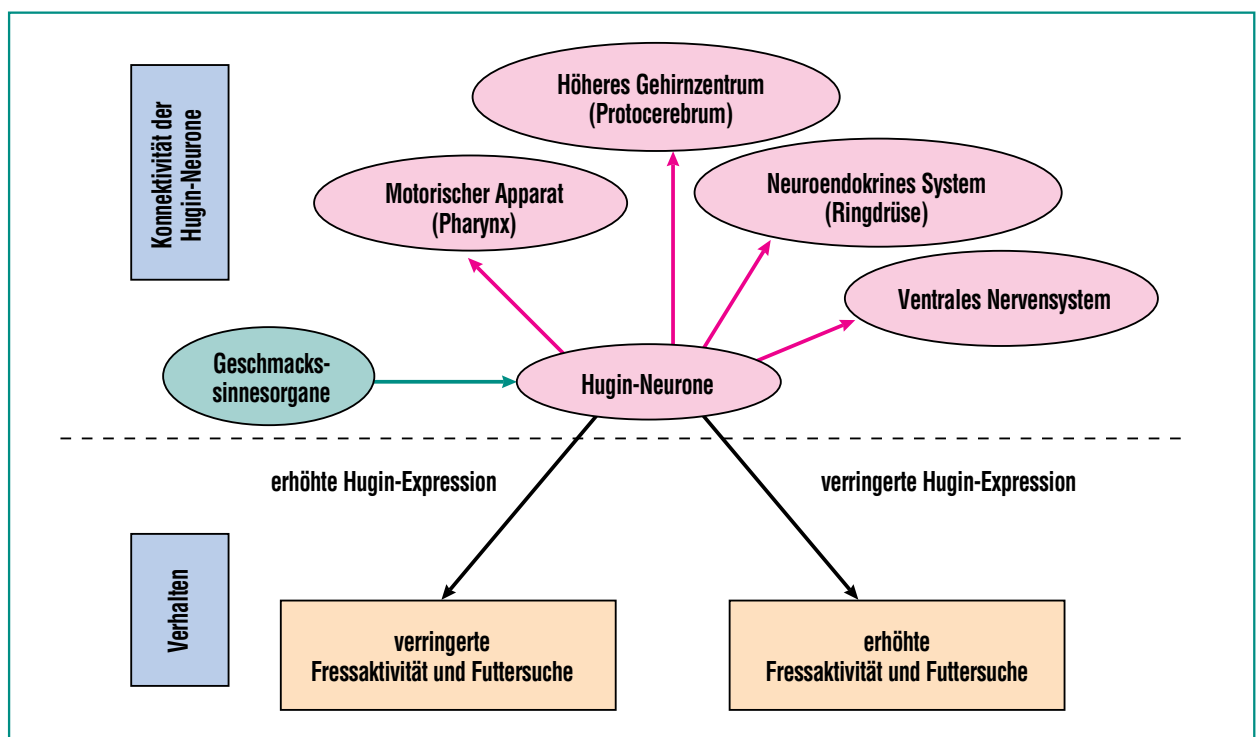


Abb. 2: Modell der Hugin-Neurone als Modulator für Fressverhalten. Die Hugin-Neurone, welche die Geschmackssinnesorgane über das SOG mit der Fressmuskulatur, der Ringdrüse und dem Protocerebrum verbinden, modulieren chemosensorisch abhängiges Verhalten. Erhöhte Hugin-Aktivität verursacht eine verringerte Fressaktivität und Futtersuche, während verringerte Hugin-Aktivität zu einer erhöhten Fressaktivität und zu erhöhter Futtersuche führt.

Homologie zum Menschen

Hugin kodiert also für ein Prä-Pro-peptid welches eine Rolle bei nahrungsabhängigem Verhalten spielt. Doch wie sieht es bei uns Menschen aus? Gibt es in Säugetieren ein Neuropeptid mit ähnlichen Eigenschaften? Erst kürzlich konnten wir ein homologes Neuropeptid beschreiben (Melcher et al., 2006). Dabei handelt es sich um das in Menschen und Säugetieren vorkommende Neuromedin U (NmU). Die Annahme, dass dies das homologe Molekül ist, basiert zum einen auf einer Sequenzhomologie von NmU8 und PK-2, vor allem in dem für die Bindung an den Rezeptor wichtigen Teil, sowie der gleichen Anzahl an Aminosäuren (Abb. 3). Außerdem weisen die Rezeptoren für beide Peptide eine hohe Sequenzhomologie auf. Ein

weiterer Punkt ist die Organisation der Vorläuferpeptide von PK-2 und NmU8. Beide haben mögliche Schnittstellen, an denen bestimmte Enzyme binden und das Vorläuferpeptid durch verschiedene Modifikationen aktivieren können. Außerdem weisen NmU8 und PK-2 funktionelle Homologien auf. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ratten, denen NmU8 verabreicht wurde, zu reduzierter Nahrungsaufnahme neigen, während Mäuse, denen das NmU-Gen fehlt, eine deutliche Fresssucht aufweisen.

Ausblick

Drosophila zeigt eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu Menschen, wenn es um das Fressverhalten geht. Scheinbar gibt es Reizschwellen für Aufnahme von neuem oder schlecht schmeckendem

Futter. Werden die Tiere gehungert, wird diese Reizschwelle gesenkt. Sobald man den gehungerten Tieren jedoch eine schlecht schmeckende Nahrungsquelle anbietet wird diese Reizschwelle wieder etwas angehoben. Die Länge des Fastens und die Nahrungsqualität sind offensichtlich die Faktoren für diese Reizschwelle. Solange ausreichend Nahrung vorhanden ist, kann man sehr wählerisch sein. Befindet man sich jedoch in einem Hungerzustand, wird gegessen was man bekommt, wenn auch mit weniger Genuss.

Was bisher noch nicht diskutiert wurde ist die Tatsache, dass adulte Fliegen klare geschlechtsspezifische Nahrungspräferenzen zeigen. Weibchen bevorzugen wegen der ständigen Eiproduktion proteinreiche Nahrung, während Männchen Zucker präferieren. Zu-

Säugetiere	Mensch NmU-25	FRVDEEFQSPFASQSRG	YFLFRPRN	25
	Mensch NmU-8		YFLFRPRN	8
	Maus NmU-23	FKA EYQSPSVGQSKG	YFLFRPRN	23
	Mensch NmS	ILQRGSGTAAVDFTKKDHTATWGRPF	FLLFRPRN	33
	Maus NmS	LPRLRLR L DSRMATVDFPKKDPTTSLGRPF	FLLFRPRN	36
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drm-PK-2 (von hugin)		SVPFKPRL	8
	Drm-Capa-3 (von capa)	TGPSASSGLWFG	PRL	15
andere Insekten	<i>P. americana</i> (Pk-2)		LVPFRPRL	8
	<i>H. zea</i> PBAN	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRTKYF	SPRL	33
	<i>H. zea</i> PGN-8		TMNFS PRL	8
	<i>Bombyx</i> DH	TDMKDES DRGAHSERGA	LWFGPRL	26

Abb. 3: Homologie von PK-2 zu NmU8. Darstellung der Reihenfolge der Aminosäuren einiger homologer Neuropeptide aus Säugetieren und Insekten. Ähnlicher Aufbau lässt den Schluss auf eine ähnliche Funktion zu. Vor allem der Teil, der bei der Bindung an den Rezeptor eine wichtige Rolle spielt, ist konserviert. Er weist die gemeinsame Sequenz FxPRx auf, wobei F, P und R für die Aminosäuren Phenylalanin, Prolin und Arginin stehen. X steht für eine beliebige Aminosäure. Da dieses Motiv in allen dargestellten Neuropeptiden vorkommt, geht man von einer ähnlichen Funktion aus. Die konservierten Aminosäuren sind rot unterlegt.

dem müssen sie neben Hungergefühl und Nahrungsangebot auch die Entscheidung zwischen Nahrungsaufnahme und Reproduktion treffen. Ebenfalls erwähnenswert ist die Tatsache, dass sich entwickelnde *Drosophila*-Larven ein weitaus robusteres Fressverhalten zeigen, als erwachsene Individuen. Dies lässt darauf schließen, dass das Nahrungsbedürfnis einen so hohen Stellenwert hat, dass andere Bedürfnisse in den Hintergrund rücken und die Nahrungsaufnahme konstant aufrechterhalten wird.

Bei uns Menschen gibt es so etwas wie Essen aus Genuss, auch bekannt als „hedonic-feeding“. Dies zeigt sich vor allem darin, dass wir manchmal fortfahren wohlschmeckende Speisen zu essen, obwohl wir bereits satt sind (also alle Nahrungsanforderungen bereits erfüllt wurden). Wahrscheinlich haben unsere Vorfahren, nachdem sie ein Tier erlegt haben, so viel wie möglich in einer relativ kurzen Zeit gegessen. Nicht nur weil es schwierig war das Fleisch haltbar zu machen, sondern auch wegen des

fraglichen Erfolges der nächsten Jagd. Abschließend lässt sich sagen, dass uns die Erforschung, wie Fliegen nahrungsabhängige Entscheidungen treffen, durchaus helfen kann, etwas über dieses sehr menschliche Verhalten zu lernen.

Literatur

- [1] R. Bader, J. Colomb, B. Pankratz, A. Schröck, R.F. Stocker, M.J. Pankratz, *Genetic dissection of a neural circuit underlying feeding behavior in Drosophila: distinct classes of hugin expressing neurons*, *Journal of Comparative Neurology*, 502 (2007) S. 848–56
- [2] M. Bauer, J. Katzenberger, I. Zinke, C. Melcher, C. Schütz, A. Gähler, M. Ritter, M. Pankratz, *Mutanten, Moleküle und Mikroarrays, Dem Appetit auf der Spur*, *Nachrichten - Forschungszentrum Karlsruhe*, 34 (2002) S.49–54
- [3] C. Melcher, R. Bader, S. Walther, O. Simakov, M.J. Pankratz, *Neuromedin U and its putative Drosophila homolog hugin*, *PLoS Biology*, 4 (2006) S. 316
- [4] C. Melcher, M.J. Pankratz, *Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the Drosophila brain*, *PLoS Biology*, 3 (2005) S. 1618–29
- [5] X. Meng, G. Wahlstrom, T. Immonen, M. Kolmer, M. Tirronen, R. Predel, N. Kalkkinen, T.I. Heino, H. Sariola, C. Roos, *The Drosophila hugin gene codes for myostimulatory and ecdysis-modifying neuropeptides*, *Mechanisms of Development*, 117 (2002) 117 S. 5–13

Regulation der Genexpression

U. Strähle, M. März, S. Rathnam, S. Rastegar, ITG

Einleitung

Leben beruht auf der geordneten Realisation genetischer Information, die im Genom im Zellkern niedergelegt ist. Das Genom des Menschen und des Zebrafischarb, einem Süßwasserfisch, haben beide ungefähr 25000 Gene [1] (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/). Die Zahl der Gene unterscheidet sich daher in höheren und niederen Wirbeltieren kaum und selbst der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* hat immer noch eine respektable Zahl von 19.500 Genen [1].

Gene sind Informationseinheiten, die meistens für ein Protein kodieren. Die Geninformation wird in mehreren Schritten in Proteine übersetzt (Abb. 1). Dazu bedarf es einer Lesemaschinerie, die die genetische Information, die in der Buchstabenabfolge aus A, G, C, und T auf der Desoxyribonukleinsäure (DNS) kodiert wird, entschlüsselt. Das menschliche Genom hat insgesamt 3 Milliarden solcher Buchstaben. Jedes Gen besteht aus einer spezifischen Abfolge dieser vier Buchstaben des genetischen Alphabets. Die Lesemaschine – auch RNA-Polymerase genannt – beginnt an einer definierten Region und Richtung mit dem Ablesen der genetischen Information und schreibt diese in eine Botenribonukleinsäure (Abb. 1, mRNA) um. Diese Ribonukleinsäure wird nach Prozessierung (auch Spleißen genannt) weitergeleitet an Ribosomen – universale Proteinfabriken, die in allen Lebewesen vorkommen (Abb. 1). Diese Ribosomen schreiben dann die Botenribonukleinsäuren in eine Aminosäurekette um, die durch

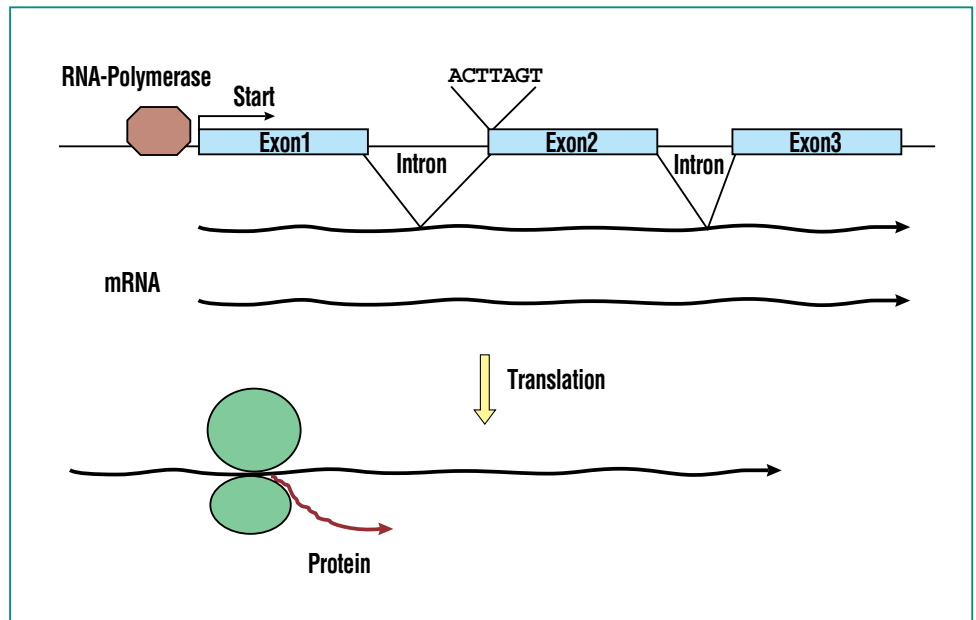


Abb. 1: Vom Gen zum Protein. Gene sind durch eine Startstelle definiert – den sogenannten Promotor – an dem die RNA-Polymerase bindet und die Transkription beginnt. Gene sind in der Regel aus Exonen und dazwischen liegenden Intronen zusammengesetzt. Die RNA-Polymerase schreibt nun das Gen mit allen Exonen und Intronen in eine Boten-RNA um. In einem parallel ablaufendem Vorgang werden die Introne entfernt, so dass ein kohärenter Strang von Exonen entsteht, die mit ihrem Triplet-Code für Proteine kodieren. Dieser Triplet-Code, aus den vier Nukleotiden A, G, C und T zusammengesetzt, wird dann mit Hilfe der Ribosomen (grün) in Protein umgeschrieben.

die spezifische Abfolge der 20 natürlichen Aminosäuren die Struktur und Funktion der verschiedenen Proteintypen unserer Zellen bestimmt.

Es werden nicht immer alle Gene in allen Zelltypen und unter allen physiologischen Bedingungen abgelesen. Vielmehr ist die Arbeit der RNA-Polymerase, in dem so genannten Prozess der Gen-Transkription, in höchstem Maße reguliert. Sowohl Entwicklungsvorgänge, die während der Entstehung unseres Körpers ablaufen, aber auch Anpassung und Steuerung der Zellfunktion im erwachsenen Organismus führen häufig zu unterschiedlicher Transkription und

damit differenzieller Realisation der genetischen Information. Man bezeichnet diesen Prozess auch als Genexpression.

Steuerung der Genexpression

Während der Entwicklung spielt die unterschiedliche Genexpression eine essenzielle Rolle. Als Antwort auf Signale von Nachbarzellen werden Zellen dazu gebracht, sich in höchst spezialisierte Zellformen wie Muskelzellen, Nervenzellen oder Hautzellen, um nur drei Beispiele der mehr als 200 Zelltypen unseres Körpers zu nennen, umzuwandeln. Diese Zellspezialisierung führt dazu, dass unter-

schiedliche Sätze von Genen in diesen speziellen Zelltypen abgelesen bzw. exprimiert werden. Eine Nervenzelle unterscheidet sich daher primär von einer Muskelzelle durch die Gene, die in ihr abgelesen werden.

Gene sind nicht nur dadurch charakterisiert, dass sie Startstellen für die Lesemaschine haben und für den Bau von Proteinen kodieren. Gene haben auch Schalter, die die Transkription – also das Ablesen der genetischen Information – steuern. Diese Schalter können die Expression bestimmter Gene in Zelltypen wie Nervenzellen oder Muskelzellen steuern. Diese Schalter können aber auch dazu dienen,

Genexpression flexibel herauf- oder herunterzuregulieren, um auf physiologische Einflüsse zu reagieren. Einflüsse können sein: die Verfügbarkeit von Nährstoffen oder aber auch die Anwesenheit von Schadstoffen. Umweltgifte zum Beispiel können bestimmte Gene in bestimmten Zellen ansteuern, die dann zum Teil als Schutzmechanismus gegen diese Einflüsse dienen (L.Yang und U.S., in Vorbereitung).

Diese Schalter haben die Eigenschaft, dass sie in allen Orientierungen vor, in und nach kodierenden Regionen lokalisiert sein können, auch weit von der kodierenden Region entfernt [2] (Abb. 2, 3).

Diese Schalter bestehen ebenfalls aus den vier Buchstaben des genetischen Alphabets. Sie können bis zu 200–300 Buchstaben (auch Basenpaare genannt) umfassen und dienen als Bindestellen, an die Transkriptionsfaktoren binden können (Abb. 2). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die auf die Lesemaschine, die Polymerase, Einfluss nehmen können. Diese Transkriptionsfaktoren können Aktivatoren der Polymerase sein. Es gibt aber auch Repressoren, die die Aktivität der Lesemaschine unterbinden.

Das menschliche Genom kodiert für 1962 Transkriptionsfaktoren [1], d. h. acht Prozent des gesamten menschlichen Genoms werden benötigt, um die Gentranskription zu steuern. Dies unterstreicht die Bedeutung der differentiellen Transkription für die Entstehung und Funktion unseres Körpers.

Das Auffinden von Genschaltern gleicht der Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen

Genschalter wurden in den letzten 20 Jahren intensiv untersucht. Im Gegensatz jedoch zu den Regionen, die für den Bauplan von Proteinen kodieren, sind diese Genschalter in ihrer Struktur nur sehr schwer zu erkennen. Das hat zur Folge, dass wir, obwohl wir die Basensequenzen ganzer Genome zur Verfügung haben, in den wenigsten Fällen vorhersagen können, wo die Schalter in den Genen präzise sitzen. Das liegt, wie schon erwähnt, an der variablen Position dieser Schalter in den Genen. Weiterhin sind die DNS-Bindestellen von Transkriptionsfaktoren häufig nur

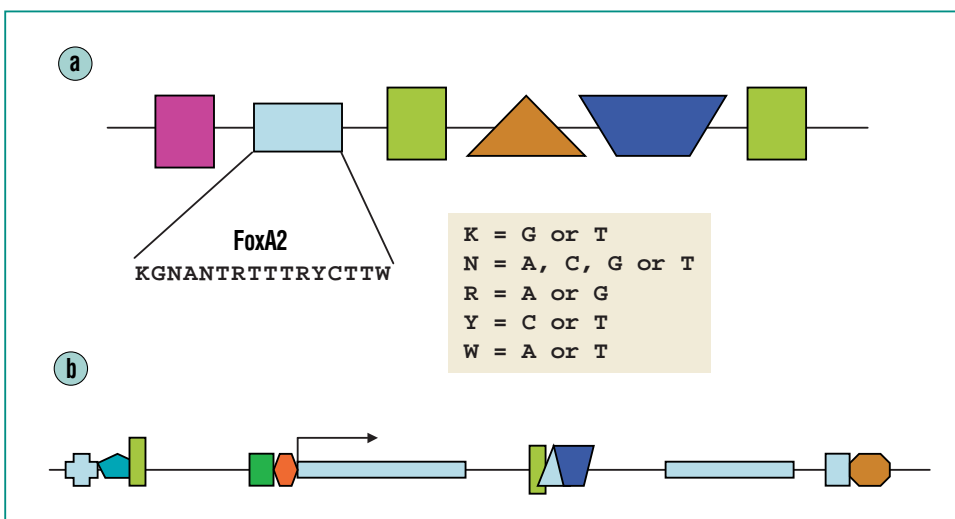


Abb. 2: a) Struktur einer regulatorischen Region (Genschalter), die die Transkription von Genen steuert. Farbige Boxen stellen Transkriptionsfaktoren dar, wie z. B. das Protein FoxA2, das durch die Konsensus-Erkennungssequenz KGNANTRTTRYCTTW ausgezeichnet ist (K = G oder T, N = A, C, G oder T, R = A oder G, Y = C oder T, W = A oder T). Diese Konsensus-Erkennungssequenz wird durch das Aneinanderlegen vieler verschiedener Bindestellen eines bestimmten Transkriptionsfaktors erstellt. Man sieht daran, dass die Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren recht variabel sein können. b) Genschalter können vor, in und hinter den kodierenden Abschnitten liegen. Jede dieser Regionen ist in der Regel durch eine Anhäufung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen charakterisiert. Häufig gibt es mehrere Genschalter in einem Gen, die entweder redundant wirken oder bestimmte Funktionen haben können.

sehr schwer zu erkennen, da sie an so genannten degenerierten Bindestellen angreifen (Abb. 2), die eine gewisse Flexibilität in der Abfolge der Basenpaare erlauben. Suchprogramme haben daher nach wie vor Schwierigkeiten, solche Sequenzen im Genom zu entdecken [3]. Weiterhin sind häufig nur solche Bindestellen aktiv, die mit anderen Faktoren assoziiert sind, d. h. die Kombinatorik verschiedener Transkriptionsfaktoren in Nachbarschaft ist ein wichtiges Charakteristikum für solche Genschalter [4].

Ein Riesenschritt in unserer Fähigkeit zur Identifizierung von Genschaltern in dem Genom von Wirbeltieren war die Entdeckung, dass die Sequenzen von solchen Schaltern konserviert, d. h. in der Evolution erhalten geblieben sind zwischen niedrigen Wirbeltieren wie den Fischen und höheren Wirbeltieren – den Säugern, wie Maus und Mensch [5]. Man kann daher durch Aneinanderlegen der DNA-Sequenzen verschiedener Wirbeltierarten konservierte Bereiche identifizieren, die nicht für Proteine kodieren, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit Genschalter darstellen (Abb. 3, 4). Wir haben solche konservierten regulatorischen Sequenzen sowohl im Neurogenin1 als auch dem Sonic-hedgehog-(shh)-Gen des Zebrafährblings identifiziert und charakterisiert [6–8]. Diese Genschalter sind im Bereich von 60–70 % identisch in ihrer Sequenz mit Abschnitten in den verwandten Genen im menschlichen Genom (Abb. 2, 3).

Leider gilt das nicht für alle Gene. Diese hochkonservierten regulatorischen Sequenzen scheinen vor allem in speziellen Klassen von

Genen vorhanden zu sein. Diese umfassen Regulatorgene und auch Transkriptionsfaktorgene, die in der Entwicklung eine Rolle spielen [9–11]. In anderen Genen, so genannten Haushaltsgenen, die für den normalen Haushalt der Zelle verantwortlich sind, findet man solche hochkonservierten Schalter in der Regel nicht. Dort – nimmt man an – wurde die Struktur der regulatorischen Sequenzen so durcheinander gemischt, dass sie mit den heute zur Verfügung stehenden Suchalgorithmen nicht aufzufinden sind [3, 12]. Es ist nach wie vor ein Rätsel, warum regulatorische Gene so besonders hoch konservierte Genschalter haben müssen. Es gibt Spekulationen, dass dies damit zu tun haben könnte, dass diese Gene in embryonalen Stammzellen nicht abgelesen werden dür-

fen, um die vorzeitige Umwandlung dieser Stammzellen in die spezialisierten Zellen des ausgewachsenen Körpers zu verhindern [13]. Die Analyse der Funktion solcher regulatorischen Elemente ist nach wie vor eine große Herausforderung für die moderne Biologie. Man nimmt an, dass nicht nur einzelne Gene durch bestimmte Transkriptionsfaktoren gesteuert werden, sondern dass ganze Gen-Netzwerke von solchen Faktoren kontrolliert werden. Weiterhin gibt es Evidenz, dass regulatorische Mechanismen sich während der Entwicklung sehr schnell verändern können, so dass nicht die gleichen Prinzipien bzw. Mechanismen die Expression eines gegebenen Gens in der Entwicklung und im erwachsenen Organismus steuern.

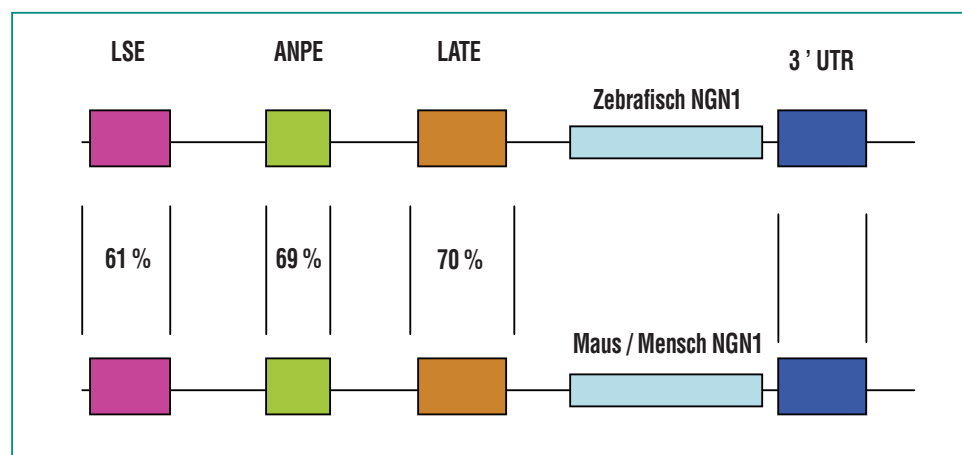


Abb. 3: Die regulatorische Architektur des Neurogenin1-Gens (NGN1). Die farbigen Boxen sind mehrere 100 Basenpaare lang und binden daher eine Vielzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren. Das regulatorische Element LSE treibt die Expression in der lateralen Neuralplatte. Das Element ANPE vermittelt Expression in der vorderen Neuralplatte und das Element LATE ist für die Expression im Dienzephalon und in sensorischen Neuronen verantwortlich. Diese Elemente im Zebrafährbling-Gen sind zu 61, 69 und 70 % in ihrer Buchstabenabfolge konserviert mit dem Maus und dem menschlichen NGN1-Gen. Eine weitere hoch konservierte Region findet sich in der 3' nicht translatierten Region (UTR), die sich hinter dem Gen befindet. Eine spezielle Funktion wurde dieser Region bisher nicht zugeordnet.

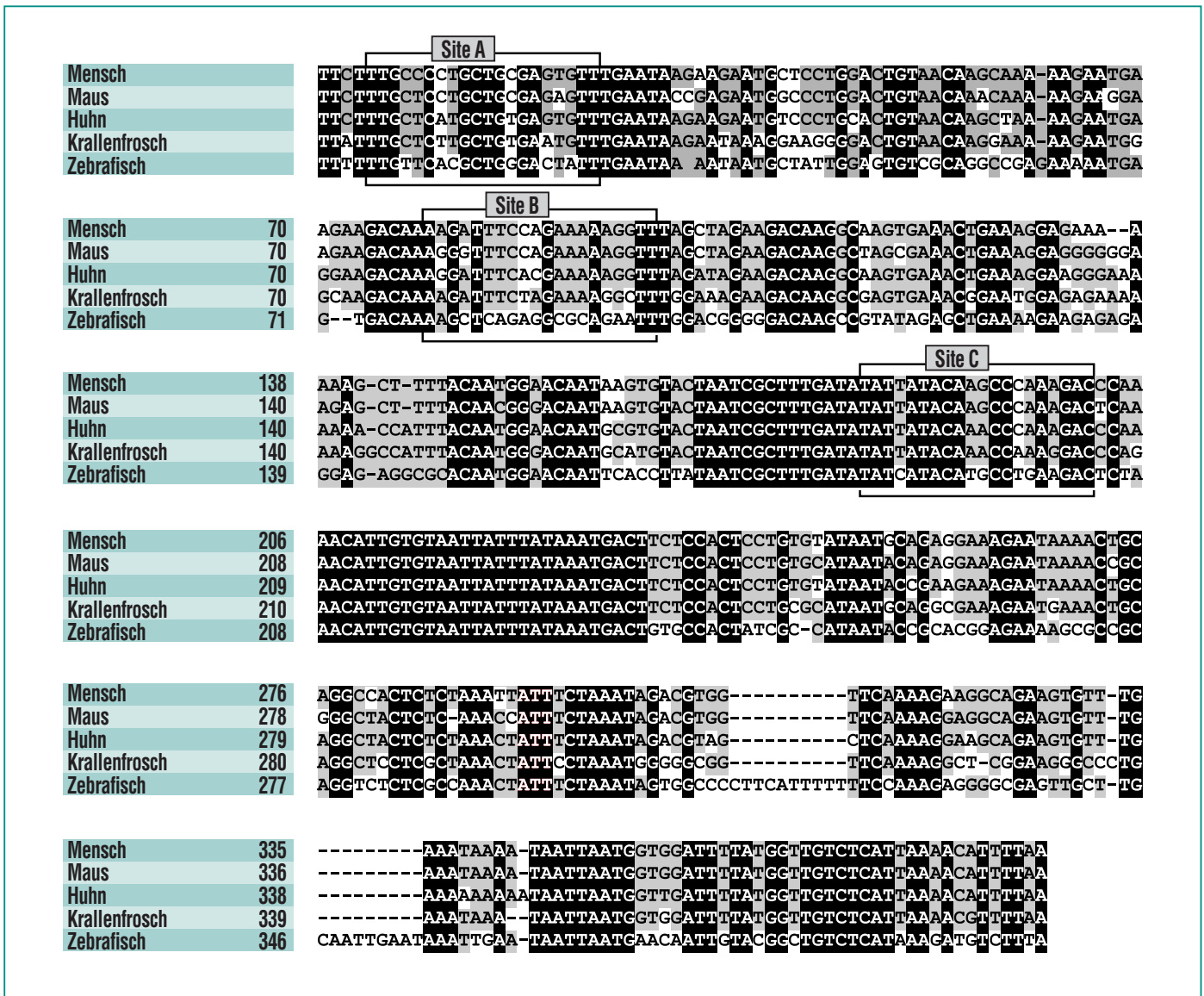


Abb. 4: Sequenzvergleich der LATE-Region des Neurogenin1-Gens. Es wurden hier die Sequenzen der LATE-Region des NGN1-Gens des Menschen, der Maus, des Huhns, des Krallenfrosches *Xenopus tropicalis* und des Zebrafischarters untereinander gereiht. Man sieht, dass die Sequenz der LATE-Region mit ihren fast 400 Basenpaaren über 450 Millionen Jahre der unabhängigen Evolution höchst konserviert geblieben ist.

Sonic hedgehog als Paradigma für einen Entwicklungsregulator mit konservierten regulatorischen Sequenzen

shh Protein, das vom shh-Gen kodiert wird, ist ein sezerniertes Pro-

tein, d. h. es wird von Zellen produziert und in die Umgebung abgegeben [14, 15]. Shh wirkt auf Nachbarzellen, indem es an Rezeptoren auf der Oberfläche bindet und dann über eine Signalkaskade Transkriptionsfaktoren aktiviert, die in der Zielzelle zur Expression bestimmter Gene führen [14, 15].

shh hat weiterhin die Eigenschaft, dass es je nach Menge in den Zielzellen unterschiedliche Antworten auslösen kann. Man nennt ein solches Molekül auch Morphogen, weil es in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedliche Zellumwandlungen steuern kann. So werden z. B. in der Entwicklung des

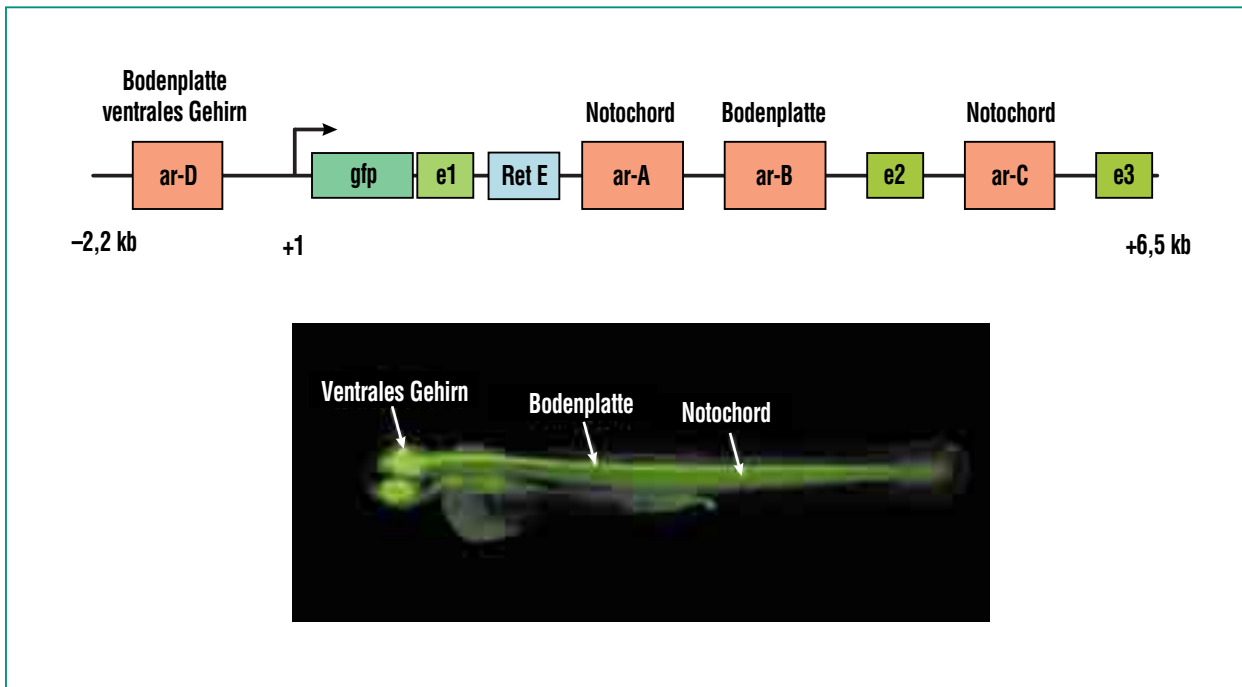


Abb. 5: Struktur des Sonic-hedgehog-Gens. Im Sonic-hedgehog-Gen sind, wie im NGN1-Gen, mehrere Genswitcher für die Expression verantwortlich. Die Switcher ar-D und ar-B steuern Expression in der Bodenplatte und ventralem Gehirn. Die Genswitcher ar-A und ar-C treiben z. B. Expression im Notochord. RetE ist ein kürzlich entdeckter Genswitcher, der die Expression in der Retina treibt.

Neuralrohr, das unser Rückenmark bildet, unterschiedliche Nervenzellen auf der ventralen Seite induziert. Je nachdem wie viel shh-Protein von einer Zelle empfangen wird [14, 15] entwickeln sich embryonale Stammzellen in Motoneurone oder spezielle Typen von Interneuronen. Die Steuerung der Sonic-hedgehog-Expression ist somit von absoluter Wichtigkeit für die normale Entwicklung eines Wirbeltierembryos. Fehlregulierung von shh führt zu Missbildung und kann auch Tumore hervorrufen [14, 15].

In systematischen Analysen des shh-Gens des Zebrafisches konnten wir mehrere Regionen identifizieren, die für die Expression dieses Gens wichtig sind [16–19]. Wir haben in Deletions- und Mu-

tationsansätzen mehrere Genswitcher kartiert, die Aspekte der shh-Expression steuern. Diese Genswitcher befinden sich sowohl vor der Transkriptionsstartstelle (Abb. 4, 5), als auch in Bereichen der Introne 1 und 2 und sind zum Teil im shh-Gen des Menschen und der Maus konserviert. Diese Genswitcher regulieren bestimmte Teilaspekte des Expressionsmusters im Embryo. So finden wir Genswitcher wie z. B. ar-D und ar-B, die die Expression in der Bodenplatte, einer Struktur im ventralen Neuralrohr treiben [20]. Andere Genswitcher kontrollieren die Expression von shh im Gehirn oder dem Notochord, einer embryonalen Stützstruktur. Dieses Beispiel des shh-Gens zeigt anschaulich wie komplex die regulatorische Struktur von Genen sein kann.

Genswitcher als Integrationseinheiten für Signale der Zellkommunikation

shh kontrolliert eine Vielzahl von Prozessen im sich entwickelnden Wirbeltierembryo und im Erwachsenen. Diese umfassen so diverse Prozesse wie die neuronale Differenzierung im Zentralnervensystem, Pankreasentwicklung bis zu Haut, Zahn und Haarbildung, um nur einige Beispiele zu nennen [14, 15]. shh scheint eine grundlegende Funktion auch im Erhalt von Stammzellen zu haben [21]. Dies wirft natürlich die Frage auf, wie ein einziges Signalmolekül eine solche Vielzahl von unterschiedlichen Wirkungen in Zielzellen haben kann. Eine Erklärung, wie oben bereits angesprochen, ist die kon-

zentrationenabhängige Wirkung von shh in Zielzellen. Zusätzlich spielt auch die Kombinatorik verschiedener Signale eine Rolle. Diese Signale steuern parallel geschaltete Signalwege an. Durch Integration dieser Signale können unterschiedliche Genprogramme in den Zielzellen aktiviert werden. Die Integration dieser Signale kann während der Signalübertragung auf dem Weg in den Zellkern durch Protein-Proteinwechselwirkung vollzogen werden. Eine wesentliche Rolle spielen aber sicherlich auch die Genschalter im Genom, die durch ihre freie Kombinierbarkeit zur Integration verschiedener Signaleinflüsse entscheidend beitragen können [4]. Dabei spielt auch die zeitliche Abfolge von Signalereignissen eine Rolle.

Ein Beispiel für dieses Zusammenspiel von verschiedenen Zellkommunikationssignalen liefert die Expression des shh-Genes selbst (Abb. 6). shh wird in der Netzhaut des Auges des Zebrafisches exprimiert und spielt dort eine entscheidende Rolle in der Neurogenese [22, 23]. Im Zebrafisch breitet sich die shh-Expression von einem Initiationspunkt in der Nähe der Nase am Augenstiel, wo später der Sehnerv gebildet wird, wellenförmig über die ganze Netzhaut aus. In diesem Prozess ist das shh-Kommunikationssystem selbst involviert [22, 23]. Es spielen aber auch Signale aus der Fibroblastenwachstumsfaktor-Familie (oder FGF-Familie, von Fibroblast Growth Factors im Englischen) eine wichtige Rolle [24 und S. Rathnam in Vorbereitung]. Das

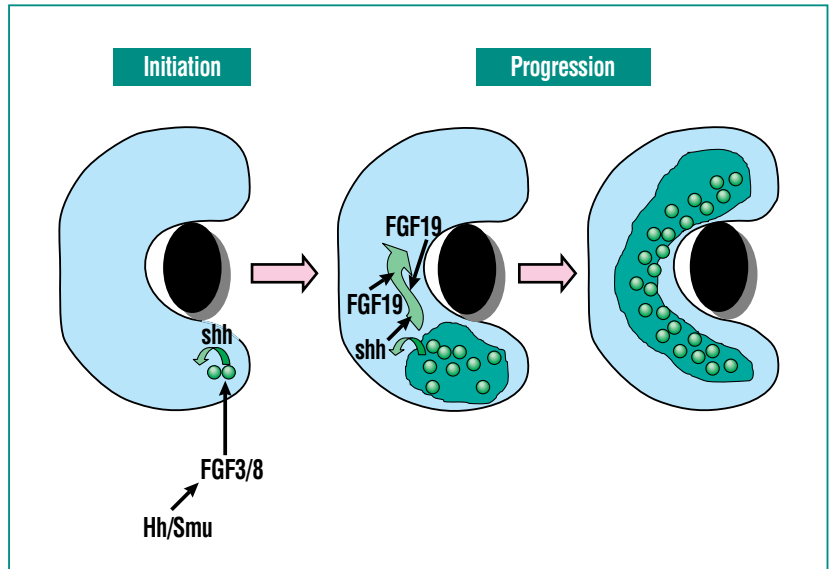


Abb. 6: Modell der Zellkommunikationsprozesse, die zur Etablierung der shh-Expression in der Retina führen. Der Hedgehog-Signalweg (Hhs/Smu) induziert die Bildung des Augenstiels, der dann die Zellkommunikationssignale FGF3 und FGF8 produziert. Diese Signalproteine wirken dann auf die Vorläuferzellen der Retina im Augengebecher und bringen die Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Augenstiel dazu shh zu exprimieren. Im nächsten Schritt bewirkt dann shh im Zusammenspiel mit FGF19 die Ausbreitung der shh-Expression in der ganzen Retina.

shh-Signalsystem ist in der Etablierung der Expression zweier FGF-Faktoren, FGF3 und FGF8, im Augenstiel beteiligt [25]. FGF3 und FGF8 schalten dann die shh-Expression in der Netzhaut in der Nähe des Augenstiels an. Zur Ausbreitung bedarf es dann allerdings der Aktion eines weiteren Mitgliedes der FGF-Familie: FGF19. FGF19 steuert zusammen mit Shh in einer selbst-regulatorischen Rückkopplung, die Ausbreitung der shh-Expression in der Retina (S. Rathnam, in Vorbereitung). Dieser Prozess wird im shh-Gen durch einen Genschalter, dem RetE, gesteuert (Abb. 5). Dieser Genschal-

ter integriert somit Einflüsse des FGF- und shh-Signalweges. Dieses Beispiel der shh-Expression in der Retina beschreibt anschaulich wie bestimmte Genexpressionsprozesse in der Entwicklung gesteuert werden. Dabei hat die Integration verschiedener Signale eine große Bedeutung, da damit spezifische Genprogramme in den Zielzellen gesteuert werden können.

Literatur

- [1] D.N. Messina, J. Glasscock, W. Gish, M. Lovett, *An ORFeome-based analysis of human transcription factor genes and the construction of a microarray to interrogate their expression*, *Genome Res* 2004, 14(10B), 2041–2047
- [2] H.E. Davidson, *The regulatory genome – gene regulatory networks in development and evolution*, London, Academic Press, 2006
- [3] G. Elgar, *Different words, same meaning: understanding the languages of the genome*, *Trends Genet* 2006, 22(12), 639–641
- [4] R.S. Mann, S.B. Carroll, *Molecular mechanisms of selector gene function and evolution*, *Curr Opin Genet Dev* 2002, 12(5), 592–600
- [5] F. Muller, P. Blader, U. Strähle, *Search for enhancers: teleost models in comparative genomic and transgenic analysis of cis regulatory elements*, *Bioessays* 2002, 24(6), 564–572
- [6] P. Blader, C.S. Lam, S. Rastegar, R. Scardigli, J.C. Nicod, N. Simplicio, C. Plessy, N. Fischer, C. Schuurmans, F. Guillemot, et al., *Conserved and acquired features of neurogenin1 regulation*, *Development* 2004, 131(22), 5627–5637
- [7] P. Blader, C. Plessy, U. Strähle, *Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo*, *Mech Dev* 2003, 120(2), 211–218
- [8] F. Müller, B. Chang, S. Albert, N. Fischer, L. Tora, U. Strähle, *Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord*, *Development* 1999, 126(10), 2103–2116
- [9] C. Plessy, T. Dickmeis, F. Chalmel, U. Strähle, *Enhancer sequence conservation between vertebrates is favoured in developmental regulator genes*, *Trends Genet* 2005, 21(4), 207–210
- [10] T. Dickmeis, C. Plessy, S. Rastegar, P. Aanstad, R. Herwig, F. Chalmel, N. Fischer, U. Strähle, *Expression profiling and comparative genomics identify a conserved regulatory region controlling midline expression in the zebrafish embryo*, *Genome Res* 2004, 14(2), 228–238
- [11] A. Sandelin, P. Bailey, S. Bruce, P.G. Engstrom, J.M. Klos, W.W. Wasserman, J. Ericson, B. Lenhard, *Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes*, *BMC Genomics* 2004, 5(1), 99
- [12] S. Rastegar, S. Albert, I. Le Roux, N. Fischer, P. Blader, F. Muller, U. Strähle, *A floor plate enhancer of the zebrafish netrin1 gene requires Cyclops (Nodal) signalling and the winged helix transcription factor FoxA2*, *Dev Biol* 2002, 252(1), 1–14
- [13] B.E. Bernstein, T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*, *Cell* 2006, 125(2), 315–326
- [14] P.W. Ingham, A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*, *Genes Dev* 2001, 15(23), 3059–3087
- [15] A.P. McMahon, P.W. Ingham, C.J. Tabin, *Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling*, *Curr Top Dev Biol* 2003, 53, 1–114
- [16] F. Müller, S. Albert, P. Blader, N. Fischer, M. Hallonet, U. Strähle, *Direct action of the Nodal-related signal Cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS*, *Development* 2000, 127(18), 3889–3897
- [17] F. Müller, S. Albert, N. Fischer, D. Biellmann, C.J. Neumann, P. Blader, U. Strähle, *Two mechanisms of floor plate specification in the zebrafish embryo*, *Development* 2002, in revision
- [18] F. Muller, B. Chang, S. Albert, N. Fischer, L. Tora, U. Strähle, *Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord*, *Development* 1999, 126(10), 2103–2116
- [19] R. Ertzer, F. Muller, Y. Hadzhiev, S. Rathnam, N. Fischer, S. Rastegar, U. Strähle, *Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression*, *Dev Biol* 2007, 301(2), 578–589
- [20] U. Strähle, C.S. Lam, R. Ertzer, S. Rastegar, *Vertebrate floor-plate specification: variations on common themes*, *Trends Genet* 2004, 20(3), 155–162
- [21] Nicolis SK: *Cancer stem cells and „stemness“ genes in neuro-oncology*, *Neurobiol Dis* 2007, 25(2):217–229.
- [22] C.J. Neumann, C. Nüsslein-Volhard, *Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity*, *Science* 2000, 289(5487), 2137–2139.
- [23] A. Shkumatava, S. Fischer, F. Muller, U. Strähle, C.J. Neumann, *Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina*, *Development* 2004, 131(16), 3849–3858
- [24] J.R. Martinez-Morales, F. Del Bene, G. Nica, M. Hammerschmidt, P. Bovolenta, J. Wittbrodt, *Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center*, *Dev Cell* 2005, 8(4), 565–574
- [25] Z.M. Varga, A. Amores, K.E. Lewis, Y.L. Yan, J.H. Postlethwait, J.S. Eisen, M. Westerfield, *Zebrafish smoothed functions in ventral neural tube specification and axon tract formation*, *Development* 2001, 128(18), 3497–3509

Mechanismen der biologischen und toxischen Wirkungen von Nanopartikeln

S. Diabaté, C. Weiss, ITG

Einleitung

Nanopartikel sind feste Stoffe unterschiedlicher chemischer Verbindungen oder Elemente, wie z. B. Metalloxide oder reiner Kohlenstoff mit nanoskaligen Abmessungen (< 100 nm in mindestens einer Dimension), die in der Regel schwer wasserlöslich sind (siehe auch [1]). Wenn sie als Nebenprodukte von Verbrennungen, wie z. B. bei Dieselmotoren oder beim Holzkohlegrill in die Umwelt gelangen, bezeichnet man sie als ultrafeine Partikel (UFP). Zusammen mit den größeren Agglomeraten bis 10 µm (PM₁₀) sind sie als „Feinstaub“ in die Schlagzeilen geraten, weil die Inhalation von erhöhten Konzentrationen in der Atemluft zu Gesundheitsproblemen führen kann [2]. Aufgrund epidemiologischer und toxikologischer Studien zu den Wirkmechanismen von UFPs wurden Grenzwerte für die Exposition abgeleitet, die beispielsweise durch Reduktion der Feinstaubgenerierung mittels Fahrverbote in belasteten Regionen sowie durch Einführung von Filtertechniken erreicht werden sollen. Neben der ungewollten Erzeugung und Freisetzung von Nanopartikeln nimmt in Zukunft im Zuge der Nanotechnologie die Produktion von neu entwickelten Nanopartikeln mit den unterschiedlichsten chemischen Zusammensetzungen und Formen zu und in deren Folge steigt auch die Exposition des Menschen sowie der belebten Umwelt gegenüber diesen neuen Materialien. Um mögliche Risiken für am Arbeitsplatz exponierte Personen und Verbraucher als auch für die Umwelt abzuschätzen und letztendlich zu vermeiden, sind

Kenntnisse der Mechanismen der biologischen Wirkung sowie der Partikeleigenschaften, die diese Wirkung verursachen, erforderlich.

Nanopartikel: Vorkommen, Aufnahme- wege und Verteilung im Organismus

Nanopartikel kommen auch in natürlicher Form in der belebten und unbelebten Umwelt vor. So liegen Mineralien in der Erdoberfläche wie beispielsweise Silikate bis zu 50 % als Nanopartikel (sogenannte Nanomineralien) in agglomerierter Form vor [3]. Ebenso führen natürliche Verbrennungsprozesse wie Waldbrände zum Entstehen von Nanopartikeln. Seit Beginn der biologischen Entwicklung sind Zellen Ziele von Viren, deren Abmessungen im Nanometerbereich liegen und somit als biologische Nanopartikel betrachtet werden können. In Folge dieser schon immer vorhandenen Konfrontation haben Lebewesen Strategien zum Umgang mit Nanopartikeln entwickelt, um mögliche schädliche Wirkungen zu verhindern. Erst nach Überwinden oder Überfordern dieser Verteidigungs- bzw. Entgiftungsmechanismen kommt es zu Schädigungen des Zielorganismus. Ob die vom Menschen neu erzeugten Nanopartikel vergleichbare biologische Reaktionen hervorrufen wie die in der Natur vorkommenden Nanopartikel oder aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften völlig unbekannte Wirkungen besitzen, ist bisher unbekannt und Gegenstand unserer Untersuchungen.

Die Grenzflächen des menschlichen Körpers mit der Umwelt sind gleichzeitig die Hauptaufnahmewege von Fremdstoffen. Diese werden somit im Wesentlichen über die Atemwege, die Haut und den Ernährungstrakt (Speiseröhre, Magen und Darm) aufgenommen. Zusätzlich nehmen wir Medikamente und Diagnosemittel auch unter Umgehung der natürlichen Barrieren z. B. durch Injektion in die Blutbahn oder andere Zielgewebe auf. Prinzipiell sind sämtliche genannten Aufnahmewege für Nanopartikel relevant, da deren Vorkommen nicht nur auf die Umweltluft beschränkt ist, sondern sie auch im Zuge von verunreinigten oder gewollt veränderten Lebensmitteln sowie in der medizinischen Anwendung vom Menschen aufgenommen werden.

Neben der Aufnahmeart von Fremdstoffen bestimmt deren Verteilung in der Zelle und im Organismus deren Wirkungen. Im Gegensatz zu Arzneimitteln, die häufig durch passive Diffusion unspezifisch ins Gewebe eindringen, werden größere Partikel nur kontrolliert von spezialisierten „Fresszellen“ (Makrophagen, Granulozyten) aufgenommen, um sie nach außen zu transportieren. Da Partikel im Unterschied zu löslichen Fremdstoffen in vom Körper ausscheidbare Substanzen umgewandelt werden können, sind der genannte zelluläre Abtransport sowie der direkte Transport durch Flimmerepithelien (kleine Härchen an der Oberfläche von Organgrenzflächen) die einzige Möglichkeit zur Entgiftung. Eine wesentlich neue Eigenschaft von nanoskaligen im Vergleich zu größeren Partikeln könnte deren

Verteilung in der Zelle bzw. Organismus sein, da diese ähnlich den löslichen Fremdstoffen auch durch passive und somit unkontrollierte Diffusion aufgenommen werden. Deshalb könnten Nanopartikel an jedem Ort in der Zelle oder des Organismus ihre möglicherweise toxischen Wirkungen entfalten [4, 5].

Biologische und toxische Wirkmechanismen von Nanopartikeln

Umweltmedizinische und tierexperimentelle Studien belegen toxische Wirkungen von Partikeln (z. B. Feinstaub) vor allem in der Lunge, die ausgehend von Entzündungsreaktionen zu Atemwegs-, Herz-Kreislaufkrankungen sowie einem erhöhten Lungenkrebsrisiko beitragen [6]. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die kleineren Partikel (UFP) deutlich stärkere Effekte auslösten als die größeren.

Synthetische Nanopartikel sind ebenso in der Lage, Entzündungsreaktionen auszulösen und somit ist es wahrscheinlich, dass bei entsprechender Exposition ähnliche gesundheitsschädliche Konsequenzen wie für größere Partikel beschrieben zu erwarten sind.

Ob Nanopartikel zusätzliche toxische Eigenschaften besitzen, ist Gegenstand aktueller Studien. Hierzu muss sowohl die Partikelgröße als auch die chemische Zusammensetzung betrachtet werden. Das vergrößerte Oberflächen-Volumen-Verhältnis sowie bei gleicher Masse die erhöhte Zahl und somit Oberfläche von Nanopar-

tikeln im Vergleich zu Mikropartikeln könnte dazu beitragen, dass chemische Reaktionen an Partikeloberflächen toxische Intermediate wie reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Dies wäre eine mögliche Erklärung, dass die relativ größere Oberfläche von Nanopartikeln eine erhöhte Toxizität bewirken kann.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt scheint die Verteilung in der Zelle und im Organismus zu sein, da Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe leichter in Zellen eindringen, andere Zellkompartimente erreichen (Abb. 1 a) und über die Lunge ins Blutsystem gelangen und somit prinzipiell im ganzen Körper wirken könnten [4].

Nanotoxikologie – nur eine Radikal-Theorie?

Hauptaufnahmeweg von luftgetragenen Nanopartikeln ist die Inhalation. Nanopartikel dringen im Gegensatz zu größeren Partikeln tiefer in die Lunge ein und werden in den Lungenbläschen (Alveolarbereich) mit hoher Effizienz deponiert [7]. Die Wände der Lungenbläschen sind mit einer oberflächenaktiven Flüssigkeitsschicht (Surfactant) ausgekleidet, d. h. der erste Kontakt von Partikeln findet mit dieser Flüssigkeit statt. Wenn eine feste Oberfläche in eine wässrige Umgebung eingebracht wird, bilden sich dabei an der Ober-

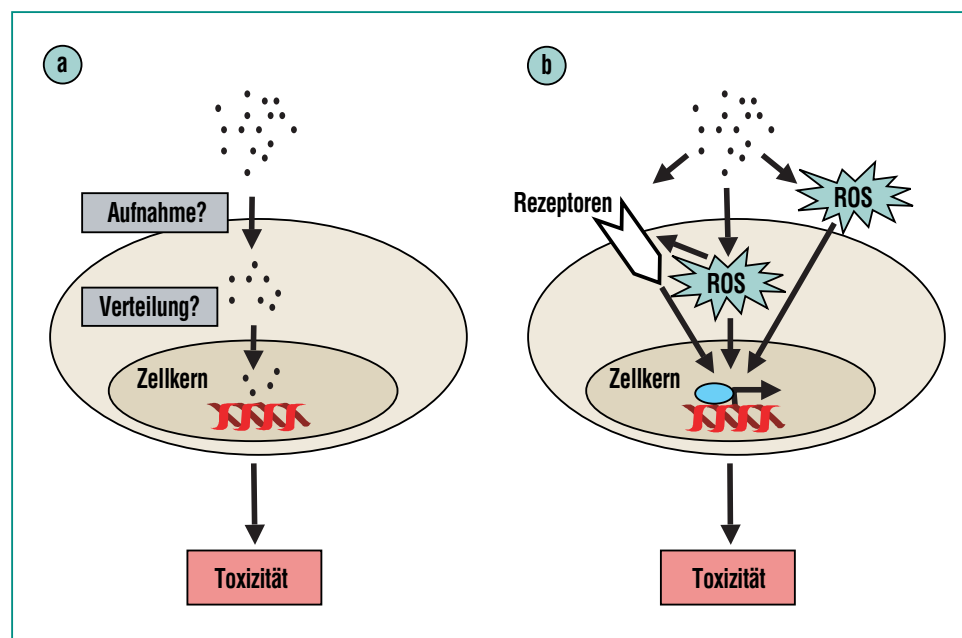


Abb. 1: Zelluläre Partikelwirkungen. (A) Aufnahme und Verteilung von Partikeln. Nanopartikel können im Vergleich zu größeren Partikeln andere Zellkompartimente (Mitochondrien, Zellkern) erreichen, wodurch grundsätzlich andere biologische und möglicherweise toxische Wirkungen auftreten können. (B) Partikel können außerhalb von Zellen ROS generieren und/oder mit zellulären Rezeptoren interagieren. In Zellen aufgenommene Partikel können ebenfalls ROS generieren. Nach Überschreiten einer kritischen Dosis sind die antioxidativen Entgiftungsmechanismen überfordert und es können toxische Wirkungen beobachtet werden.

fläche von metallischen Oxiden oder Mineralien Hydroxylgruppen, z. B. Si-OH und Ti-OH-Gruppen an der Oberfläche von SiO₂- und TiO₂-Partikeln. Selbst an der Oberfläche von Partikeln aus reinem Kohlenstoff können sich sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen (CO, CHO oder COOH) bilden. Das bedeutet, alle Oberflächen von Partikeln tragen in wässriger Suspension einige sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen [8]. Je kleiner die Partikel, umso größer ist ihre Oberfläche und damit die Zahl der funktionellen Gruppen. Bei einigen Partikelsorten kann diese Eigenschaft bereits in zellfreien Systemen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bzw. -radikalen (ROS, reactive oxygen species) wie z. B. Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder das reaktive Hydroxylradikal (\cdot OH) führen (Abb. 2).

Trotz der großen Vielfalt der chemischen Zusammensetzung von Partikeln scheint sich ein gemeinsamer biologischer Mechanismus abzuzeichnen, der für die biologischen und toxischen Wirkungen verantwortlich ist – die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Bisher ist unklar, wie ROS durch Nanopartikel im Organismus induziert werden. Mögliche Quellen sind Reaktionen direkt an der Partikeloberfläche sowie enzymatische Vorgänge innerhalb von Zellen, die durch Partikel stimuliert werden und somit indirekt mehr ROS erzeugen. Ebenso unbekannt ist, an welchem Zielort, d. h. innerhalb oder außerhalb der Zelle, Nanopartikel ROS erzeugen, um Wirkungen zu entfalten (Abb. 1 b). Genaue Kenntnisse zur ROS-Entstehung bieten einen Ansatz, um Partikeleigenschaften oder zelluläre Faktoren zu beeinflussen, wodurch schädliche Effekte reduziert bzw. verhindert werden könnten. Erst durch Klärung von toxischen Wirkmechanismen kann eine erfolgreiche Therapie gegen Vergiftungserscheinungen entwickelt werden. Ein bekanntes Beispiel ist die mitunter tödlich verlaufende Vergiftung, hervorgerufen durch überdosiertes Paracetamol, ein häufig verwendetes Fieber- und Schmerzmedikament. Hierbei wird durch frühzeitige Gabe von N-Acetylcystein (ACC) (auch als Schleimlöser aus der Apotheke bekannt) die Anreicherung toxischer Abbauprodukte des Paracetamols verhindert, wodurch die weitere Vergiftung verhindert und therapiert wird. Bis zu einem gewissen Grad kann die Zelle durch eigene antioxidative Mechanismen, z. B. dem Glutathion-

luläre Faktoren zu beeinflussen, wodurch schädliche Effekte reduziert bzw. verhindert werden könnten. Erst durch Klärung von toxischen Wirkmechanismen kann eine erfolgreiche Therapie gegen Vergiftungserscheinungen entwickelt werden. Ein bekanntes Beispiel ist die mitunter tödlich verlaufende Vergiftung, hervorgerufen durch überdosiertes Paracetamol, ein häufig verwendetes Fieber- und Schmerzmedikament. Hierbei wird durch frühzeitige Gabe von N-Acetylcystein (ACC) (auch als Schleimlöser aus der Apotheke bekannt) die Anreicherung toxischer Abbauprodukte des Paracetamols verhindert, wodurch die weitere Vergiftung verhindert und therapiert wird. Bis zu einem gewissen Grad kann die Zelle durch eigene antioxidative Mechanismen, z. B. dem Glutathion-

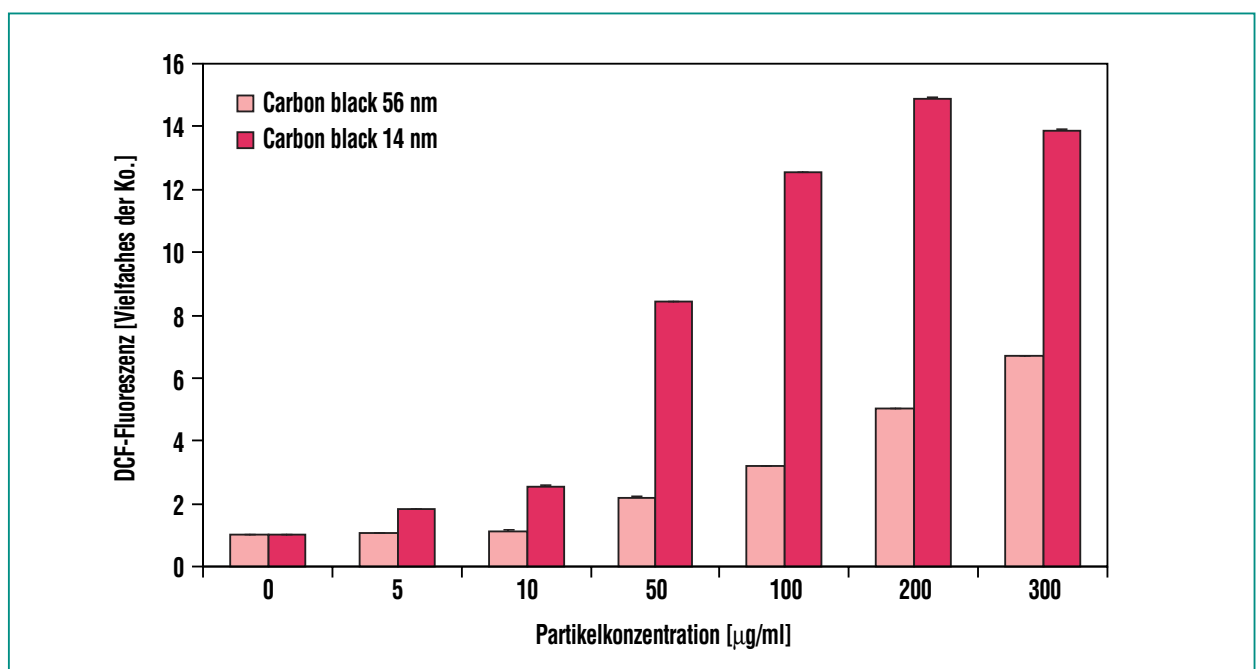


Abb. 2: Bildung von ROS durch Carbon Black Nanopartikel im zellfreien System. In Anwesenheit von kleineren Partikeln (Primärpartikel 14 nm) wird nicht-fluoreszierendes Dichlor-Dihydro-Fluoreszein (H₂DCF) stärker zu der fluoreszierenden Substanz Dichlor-Fluoreszein (DCF) oxidiert als mit größeren Partikeln (Primärpartikel 56 nm).

system, oxidativem Stress gegensteuern. Wenn die oxidativen Prozesse jedoch überwiegen, reagiert die Zelle mit der Aktivierung intrazellulärer Signalwege mit dem Ziel, die antioxidative Kapazität zu erhöhen. Hierbei spielen redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 oder Nrf2, eine entscheidende Rolle. Nach Aktivierung wandern diese in den Zellkern und erhöhen die Expression von Genen, die für antioxidative Proteine kodieren. Die genannten Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 sind möglicherweise ebenso an den durch Nanopartikel erzeugten Entzündungsreaktionen beteiligt. Als Folge von zu starkem oxidativem Stress können biologische Moleküle wie Proteine und Lipide modifiziert werden, was ihre Funktion beeinflusst und zum Zelltod führen kann. Längerfristige Konsequenzen ergeben sich aus oxidativer Schädigung der DNS (Genotoxizität), welche zur Zellentartung und Tumorentstehung beitragen. In welchem Umfang Nanopartikel genotoxisch sind, ist eine der momentan vorrangig diskutierten Fragen.

Obwohl die Hypothese, dass Nanopartikel ihre Effekte durch die anfängliche ROS-Produktion bewirken, durch einige Befunde gestützt wird [9], sind andere Wirkmechanismen denkbar. So werden an der Zellmembran befindliche Rezeptoren, die externe Signale ins Zellinnere weiterleiten, durch Nanopartikel aktiviert [10]. Die zugrunde liegenden Aktivierungsmechanismen sind bisher nicht verstanden und könnten auf der einen Seite wiederum durch ROS-Wirkungen erklärbar sein oder aber durch andere Prinzipien

wie beispielsweise einer direkten durch Partikelbindung induzierten Konformationsänderung des Rezeptorproteins verursacht werden (Abb. 1 b). Nanopartikel sind, im Gegensatz zu Mikropartikeln, in der Größenordnung von Viren, für welche die Zelle verschiedene Signalwege besitzt, um sich zu verteidigen. Diese so genannten „Gefahr-Rezeptoren“ könnten ebenso auf Nanopartikel reagieren und zu deren biologischen Wirkungen beitragen. In wieweit ROS-unabhängige Effekte zur Nanopartikeltoxikologie beitragen, kann durch Verhinderung der ROS-Produktion und anschließender Analyse der verbleibenden Reaktionen überprüft werden. Zusätzliche Ansätze, die beispielsweise alle Veränderungen in der Genexpression einer Zelle oder einem Modellorganismus detektieren, erlauben eine unvoreingenommene Untersuchung und führen hoffentlich zu einem umfassenderen Verständnis der Nanopartikelwirkungen. Außer mechanistischen Studien sind in der Toxikologie Dosis-Wirkungsbeziehungen grundlegend, um möglicherweise Grenzwerte am Arbeitsplatz und in der Umwelt festzulegen („Was ist das giftigste, alle Ding sind giftig, und nichts ohne giftig. Allein die Dosis macht, das ein Ding kein giftig ist.“ Paracelsus, 16. Jh.). Dafür werden sensitive Messverfahren zur Quantifizierung von Nanopartikeln in Aerosolen benötigt. Weiterhin ist die Etablierung von Sensoren zur Messung der Nanopartikeldeposition notwendig, um Expositionen und mögliche toxische Wirkungen direkt vor Ort besser abschätzen zu können. Grundlegende Vorarbeiten zur Erreichung dieses Ziels wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tech-

nische Chemie, Bereich Thermische Abfallbehandlung (ITC-TAB) durch definierte Exposition von humanen Lungenepithelzellen mit Modellstäuben und Analyse von Entzündungsparametern geleistet [11].

Zusammenfassung und Ausblick

Um mögliche schädliche Wirkungen von Nanopartikeln für den Menschen und die Umwelt rechtzeitig zu erkennen, abzuschätzen und zu verhindern, ist das Verständnis ihrer biologischen und toxischen Wirkungen Voraussetzung. Ausgehend von Untersuchungen an größeren Partikeln fokussiert sich die toxikologische Forschung momentan auf die Entstehung von reaktiven Zwischenstufen wie beispielsweise reaktiven Sauerstoffspezies als Hauptursache der Nanopartikelwirkungen. Außer der Erzeugung von Radikalen sind andere bisher wenig verstandene neue Wirkungen von Nanopartikeln denkbar, die sich aus ihrer im Vergleich zu größeren Partikeln anderen Verteilung in der Zelle und Organismus sowie anderer physikalisch-chemischen Eigenschaften ergeben könnten. Die Identifizierung kritischer Partikeleigenschaften, die für toxische aber nicht für die gewünschten Wirkungen verantwortlich sind, ermöglicht es eventuell Nanopartikel ohne oder mit stark reduzierten Nebenwirkungen zu erzeugen. Ähnlich wie für größere Partikel sollte die Aufklärung der Wirkmechanismen sowie der Dosis-Wirkungsbeziehungen von Nanopartikeln die Grundlage für die Etablierung von Grenzwerten zur Exposition am Arbeitsplatz und in der Umwelt ermöglichen.

Literatur

- [1] J.M. Wörle-Knirsch, H.F. Krug, K. Kern, S. Diabaté, *Forschungszentrum Karlsruhe – Nachrichten* 37 (2005) 83–88
- [2] A. Kappos, P. Bruckmann, T. Eikmann, N. Englert, U. Heinrich, P. Höpfe, E. Koch, N. Metz, K. Rauchfuss, P. Rombout, J. Schabronath, V. Schulz-Klemp, M.F. Spallek, H.E. Wichmann, W. Kreyling, G.H.M. Krause, *Umweltmed. Forsch. Prax.* 8 (2003) 257–278
- [3] P.G. Weidler, R. Nüesch, *Forschungszentrum Karlsruhe – Nachrichten* 37 (2005) 74–78
- [4] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 823–839
- [5] M. Geiser, B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp, S. Schurch, W. Kreyling, H. Schulz, M. Semmler, H. Im, V.J. Heyder, P. Gehr, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 1555–1560
- [6] H. Schulz, V. Harder, A. Ibaldo-Mulli, A. Khandoga, W. Koenig, F. Krombach, R. Radykewicz, A. Stampfl, B. Thorand, A. Peters, *J. Aerosol Med.* 18 (2005) 1–22
- [7] W.G. Kreyling, M. Semmler, W. Möller, *J. Aerosol Med.* 17 (2004) 140–152
- [8] A.J. Ghio, M.D. Cohen, *Inhal. Toxicol.* 17 (2005) 709–716
- [9] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, *Science* 311 (2006) 622–627
- [10] U. Sydlik, K. Bierhals, M. Soufi, J. Abel, R.P. Schins, K. Unfried, *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 291 (2006) L72–L733
- [11] S. Mülhopt, H.R. Paur, S. Diabaté, H.F. Krug, *Advanced Environmental Monitoring in press* (2007)