



Forscherguppe 1103

Neurodegeneration und -regeneration bei ZNS-Erkrankungen des Hundes

Wolfgang Baumgärtner, Wolfgang Löscher und Konstantin Wewetzer

Die DFG hat im Mai 2009 rund 2,5 Millionen Euro für ein neues Forschungsprogramm zur Untersuchung neurologischer Erkrankungen des Hundes bewilligt. Ziel der interdisziplinär zusammengesetzten Forschergruppe 1103 mit sieben Teilprojekten (Abbildung 1) ist es, durch die gemeinsame Untersuchung der Pathogenese degenerativer und regenerativer Prozesse des zentralen Nervensystems bei drei ausgewählten Erkrankungen des Hundes (Epilepsie, Staupe-Virusinfektion, Rückenmarksverletzungen) die Grundlage für die Entwicklung innovativer Therapieansätze zu schaffen. Diese Ergebnisse besitzen zweifache Bedeutung. Zum einen tragen speziell für den Hund entwickelte Therapeutika der gestiegenen Bedeutung dieser Spezies als „companion animal“ für den Menschen Rechnung (Kling 2007), und zum anderen besitzt der Hund aufgrund seiner im Vergleich zum Labornager engeren Verwandtschaft mit dem Menschen (Techangamsuwan et al. 2008) hervorragende Bedeutung als ein translationales

Modellsystem (Jeffery et al. 2006; Radtke et al. 2004; Radtke und Wewetzer 2009). Diese doppelte Bedeutung spiegelt sich in der Zusammensetzung der Forschergruppe wieder. Neben den veterinärmedizinischen Instituten für Pathologie, Pharmakologie und Toxikologie, Physiologie und der Klinik für Kleintiere (alle Tierärztliche Hochschule Hannover) sowie dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München ist die Medizinische Hochschule Hannover mit der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie und dem Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie vertreten und als Kooperationspartner das Department of Neurology der Yale University (J. Kocsis) assoziiert. Die Einbettung der Forschergruppe in den seit einigen Jahren erfolgreich durchgeführten postgradualen Promotions (Ph.D.)-Studiengang des hannoverschen Zentrums für Systemische Neurowissenschaften (ZSN) wird die Arbeit des Forschungsverbunds weiter fördern.

Forschungsziele und wissenschaftliches Konzept der Forschergruppe 1103

Die rapiden Fortschritte in der Biomedizin der letzten Jahre und der hohe Stellenwert des Patienten Hund in der Tiermedizin bilden die Grundlagen für das beantragte Vorhaben. Der Hund besitzt hierbei nicht nur besondere Bedeutung, weil er die mit neurologischen Problemen in der Tierklinik am häufigsten vorgestellte Spezies darstellt, sondern, weil er zahlenmäßig kaum vernachlässigbar ist. In Deutschland leben ca. 5,3 Millionen Hunde in 13,4% der Haushalte.

Forschungsschwerpunkte bilden drei beim Hund häufig anzutreffende Erkrankungen. Die **Staupevirus-Infektion** ist die häufigste infektiöse Erkrankung des ZNS beim Hund (Beineke et al. 2009). Die mit einer Entmarkung einhergehende Leukoenzephalomyelitis entwickelt sich dabei im chronischen Verlauf vermutlich auf der Basis autoimmuner Prozesse. **Traumatische Rückenmarkserkrankungen**, die sich zumeist in der Folge von Bandscheibenvorfällen oder von Unfällen im Straßenverkehr ereignen, sind die am häufigsten, primär degenerativen Veränderungen im kaninen ZNS (Bull et al. 2008), ihre Pathogenese, insbesondere die des sich sekundär entwickelnden Schadens sind nur ansatzweise bekannt, und neue therapeutische Ansätze liegen lediglich als Einzelfallbeschreibungen vor. Die **Epilepsie** schließlich stellt die häufigste chronische Erkrankung des kaninen ZNS dar und ist derzeit nur begrenzt therapierbar, da die momentan verfügbaren Antiepileptika aus der humanen Forschung hervorgingen und beim Hund überwiegend zu rasch abgebaut werden (Rogawski und Löscher 2004; Löscher et al. 2007).

Das interdisziplinäre Forschungsvorhaben mit Teilnehmern aus den Bereichen Anatomie, Biologie, Molekularbiologie, Klinik, Pathologie, Pharmakologie, Neuroanatomie und Neurotransplantation ermöglicht eine synergistische, pathogenetische Analyse ausgewählter Erkrankungen des ZNS des Hundes. Ausgehend von den geplanten Studien sind sowohl neue Erkenntnisse und Ansätze zur Entwicklung von therapeutischen Strategien als auch eine weitergehende Einschätzung des regenerativen Potenzials des kaninen ZNS zu erwarten. Es ist daher das Ziel der Forschergruppe, durch eine interdisziplinäre, zielgerichtete Zusammenarbeit neue fächerübergreifende Ansätze zur Erforschung von ZNS-Erkrankungen beim Hund zu entwickeln und innovative Therapieansätze voranzutreiben.

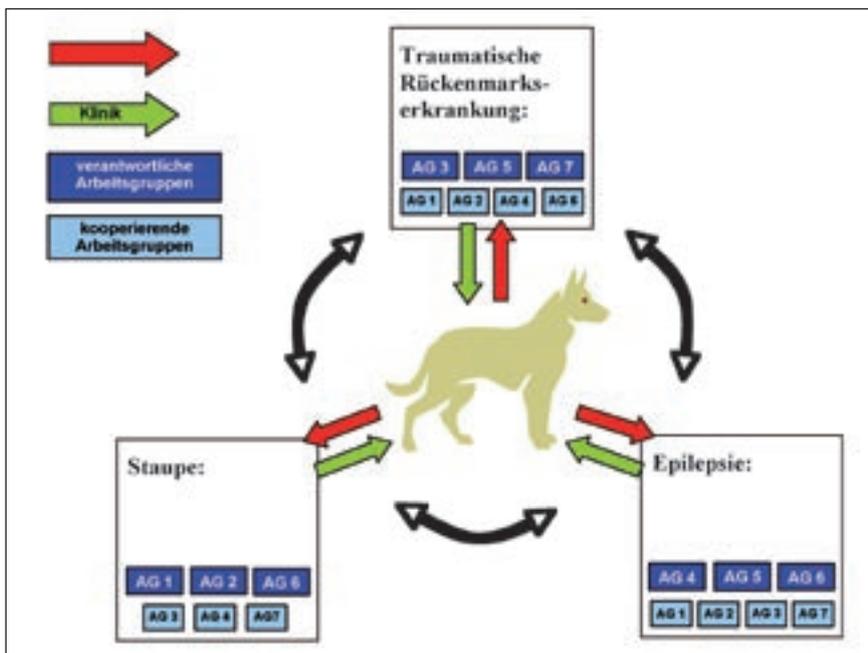


Abb.1: Ziele und Struktur der Forschergruppe 1103 und Interaktion der beteiligten Arbeitsgruppen (siehe auch Tab.1)

Tab. 1: Teilprojekte der FOR 1003 (Teilprojekt 5: * Kooperation mit Jeffery Kocsis, Yale, USA)

	Teilprojekte 1-7	Arbeitsgruppen Teilnehmer
1	Untersuchungen von immunpathologischen Prozessen bei der Staupevirus-induzierten Entmarkungsenzephalitis des Hundes und in einem murinen Virusmodell	Andreas Beineke Wolfgang Baumgärtner
2	Die Rolle der Mikroglia bei infektiösen und degenerativen Erkrankungen des kaninen Zentralen Nervensystems (ZNS)	Andrea Tipold Veronika Stein
3	Traumatische Rückenmarksläsionen und regenerationsfördernde Gliazellen beim Hund	Wolfgang Baumgärtner Konstantin Wewetzer Andreas Beineke
4	Neuroprotektion, Entzündungshemmung und Neuromodulation als Strategien zur Epilepsieprävention	Wolfgang Löscher Claudia Brandt
5	Zelltransplantation bei traumatischen Rückenmarkserkrankungen und Epilepsien	Christine Radtke Manuela Gernert Wolfgang Löscher*
6	Neuroregeneratives Potenzial im Hundehirn und dessen Modulation durch mimetische Peptide	Heidrun Potschka Anton Pekcec
7	Stickstoffmonoxid (NO)-vermittelte Signaltransduktion in einem Regenerationsmodell aus kokultivierten Gliazellen und Neuronen	Gerd Bicker

Kurzübersicht über die Teilprojekte

Teilprojekt 1: Die demyelinisierende Leukoencephalitis der Hundestaupe umfasst virusinduzierte und immunpathologische Prozesse. Ziel ist es, anhand der experimentellen Theiler-Virusinfektion der Maus und der vergleichenden Analyse entzündungsfördernder und -hemmender Prozesse zu klären, inwiefern die Dysfunktion regulatorischer T-Zellen und die Apoptoseresistenz von Leukozyten bei chronischen Virusinfektionen zu persistierenden Entzündungen und Entmarkung beitragen. Hierzu wird die Verteilung von Treg und assoziierten Immunzell-Infiltrationen sowie deren Zytokin- und Toll-like-receptor-Expression und Apoptose-Induktion bei der experimentellen TME und der spontan aufgetretenen Hundestaupe vergleichend analysiert. Weiterhin wird der Einfluss von Gliazellen auf die Immunmodulation und Apoptose von Leukozyten in *in vitro*-Experimenten näher charakterisiert. Damit ist die geplante Studie ein innovativer Ansatz zur Pathogeneseforschung der Staupe-Enzephalitis.

Teilprojekt 2: Mikrogliazellen werden durch verschiedene pathologische Stimuli aktiviert und spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen. In diesem Projekt wird untersucht, inwiefern Mikroglia regenerative und/oder degenerative Prozesse bei der Staupevirusinfektion und Rückenmarkstraumata beeinflusst. Die Erkenntnisse betreffen damit die übergreifende Fragestellung nach der Stereotypie und Spezifität der Mikroglia-Reaktion als Antwort auf Stimuli unterschiedlicher Genese. Bei der

Staupevirusinfektion soll die Produktion von Stickstoffmonoxid und Sauerstoffradikalen untersucht und mit bereits *ex vivo* erhobenen Daten verglichen werden, um so den mikroglialen Anteil an der Demyelinisierung zu definieren. Bei den Rückenmarkstraumata werden immunphänotypische und funktionelle *ex vivo* Untersuchungen durchgeführt, um zu klären, ob die Mikroglia den regenerativen Prozess unterstützt oder hemmt. Die Resultate dieser Untersuchungen könnten die Grundlage für die Entwicklung innovativer Therapiestrategien liefern.

Teilprojekt 3: *In vivo*-Studien am Nagermodell zeigen, dass Schwann-Zellen und olfaktorische Hüllzellen (olfactory ensheathing cells, OECs) axonales Wachstum und Remyelinisierung *in vivo* fördern. In diesem Projekt wird zunächst die Degeneration des adulten kaninen Rückenmarks nach Verletzung detailliert morphologisch und molekular charakterisiert. Parallel dazu werden Slice-Kulturen des adulten Rückenmarks angelegt, und die degenerative Prozesse *in vitro* untersucht. OECs des Bulbus olfactorius und der Riechschleimhaut sowie Schwann-Zellen des N. fibularis werden kultiviert und erstmalig vergleichend die Eigenschaften von OECs und Schwann-Zellen bezüglich Proliferation, Antigenexpression und neuritenwachstumsfördernder Aktivität *in vitro* und *in vivo* nach Transplantation in das verletzte Rückenmark der Ratte (Kooperation mit AG 5) bestimmt. Damit werden nicht nur bislang am Nagermodell erhobene Daten auf den Hund übertragen, sondern innovativ die Grundlage für autologe Transplantationen beim Hund gelegt.

Teilprojekt 4: Hirninsulte durch Schädel-Hirn-Traumata, Infektionen, Hirntumoren oder zerebrale Blutungen können nach einer Latenzzeit zu sekundären (symptomatischen) Epilepsien führen. Die zeitliche Verzögerung eröffnet die Möglichkeit pharmakologisch in die Prozesse der Epileptogenese einzugreifen, um die Entwicklung spontaner epileptischer Anfälle, neurodegenerativer Veränderungen und psychopathologischer sowie kognitiver Defekte zu verhindern oder zu reduzieren. Im vorliegenden Projekt werden drei Strategien der antiepileptogenen Intervention verglichen: Neuroprotektion, Entzündungshemmung und Neuromodulation. In der ersten Phase werden hierfür etablierte Nagermodelle der Temporallappenepilepsie verwendet, bei denen sich Epilepsie nach einem chemisch oder elektrisch induzierten Status epilepticus entwickelt. Später wird die wirksamste antiepileptogene Behandlungsstrategie an Hunden mit schweren Hirnverletzungen klinisch überprüft.

Teilprojekt 5: Verletzungen des zentralen Nervensystems führen aufgrund der begrenzten Regenerationsfähigkeit zu bleibenden neurologischen Defiziten. Die Transplantation regenerationsfördernder Gliazellen ist ein viel versprechender neuer Therapieansatz. In diesem Projekt werden zwei mögliche Anwendungen der Zelltransplantation exemplarisch untersucht: die Transplantation kaniner olfaktorischer Hüllzellen bzw. Schwann-Zellen bei traumatischen Rückenmarkserkrankungen und die Transplantation immortalsierter GABA-produzierender Neuronen bei Epilepsien. Beide Zellpopulationen werden



Forschergruppe 1103: Vordere Reihe (von links): A. Pekcec, M. Gernert, C. Radtke, A. Tipold. Mittlere Reihe (von links): H. Potschka, C. Brandt, K. Wewetzer, A. Beineke Hintere Reihe (von links): W. Löscher, W. Baumgärtner, G. Bicker

zunächst im Rattenmodell auf ihr regeneratives Potenzial getestet, um so die Grundlage für die klinische Anwendung beim Hund zu schaffen. Dabei sollen sowohl die funktionelle Effizienz der Transplantation, das Verhalten der transplantierten Zellen im Wirtsorganismus (Überleben und Integration in bestehende Netzwerke), sowie der Einfluss auf das Wirtsgewebe und dessen Regeneration untersucht werden.

Teilprojekt 6: Epilepsien und Staupenzephalitiden sind gekennzeichnet durch neuroinflammatorische und neurodegenerative Prozesse. Zur zielgerichteten therapeutischen Modulation dieser ist es notwendig, zunächst den Einfluss dieser Prozesse auf das neuroregenerative Potenzial und auf die Induktion neuroinflammatorischer Prozesse im Hippocampus des Hundes zu analysieren. In vergleichenden Untersuchungen am Nagermodell wird der Einfluss einer viralen Enzephalitis auf die hippokampale Zellproliferation und -differenzierung sowie der Einfluss wiederholter epileptischer Anfallsaktivität auf die Langzeitbilanz der hippokampalen Neurogenese evaluiert. In einer ersten Phase wird das anti-inflammatorische, neuroprotektive und neuroregenerative Potenzial vom Erythropoetin und dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül abgeleiteten Peptidmimetika in einem Status-Epilepticus-Modell untersucht. Das

Projekt schafft damit die Grundlage für die Entwicklung innovativer prophylaktischer und therapeutischer Strategien zur Behandlung von Hunden mit Epilepsie oder Staupenzephalitis.

Teilprojekt 7: Die verzögerten degenerativen Prozesse nach ZNS-Trauma eröffnen ein therapeutisches Zeitfenster, um die sekundären Schädigungen pharmakologisch zu reduzieren. In diesem Projekt dienen Kulturen von Modellneuronen (NT-2) und kaninen Gliazellen zur Simulation von Degenerations- und Regenerationsprozessen. Mechanische Schädigungen des Neuron/Glia-Zellrasens werden in einem scratch wound Assay untersucht. Ein Schlüsselergebnis der posttraumatischen Neurodegeneration sind oxidative Schädigungen, die durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) und die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) induziert werden. NO kann zudem im physiologischen Konzentrationsbereich die zelluläre Beweglichkeit stimulieren. In diesem Projekt soll daher die Untersuchung von NO vermittelter Zellmotilität nach traumatischen Schädigung in einem *in vitro*-Modell, neue Erkenntnisse zur spinalen Regeneration liefern. Im Kokulturmodell werden die regenerationsfördernden Eigenschaften von pharmakologischen Manipulationen der NO-Signaltransduktionskaskade analysiert.

Literatur

- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F. und Baumgärtner, W. (2009): Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 127: 1-18.
- Bull, C., Fehr, M. und Tipold, A. (2008): Bandscheibenvorfälle beim Hund: Retrospektive Studie über den klinischen Verlauf von 238 Hunden (2003-2004). *Berl. Münch. Tierärztl Wochenschr* 121: 159-170.
- Jefferey, N.D., Smith, P.M., Lakatos, A., Ibanez, C., Ito, D. und Franklin, R.J. (2006): Clinical canine spinal cord injury provides an opportunity to examine the issues in translating laboratory techniques into practical therapy. *Spinal Cord* 44: 584-593.
- Kling, J. (2007): Biotech for your companion? *Nature Biotechnol* 25: 1343-1345.
- Löscher, W., Gernert, M. und Heinemann, U. (2008): Cell and gene therapies in epilepsy – promising avenues or blind alleys? *Trends Neurosci* 31: 62-73.
- Radtke, C., Akiyama, Y., Brokaw, J., Lankford, K.L., Wewetzer, K., Fodor, W.L. und Kocsis, J.D. (2004): Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *FASEB J* 18: 335-337.
- Radtke, C. und Wewetzer, K. (2009): Translating basic research into clinical practice: what else do we have to learn about olfactory ensheathing cells? *Neurosci Lett* 456: 133-136.
- Rogawski, M.A. und Löscher, W. (2004): The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Rev Neurosci* 5: 553-564.
- Techangamsuwan, S., Imbschweiler, I., Kreutzer, R., Kreutzer, M., Baumgärtner, W. und Wewetzer, K. (2008): Similar behaviour and primate-like properties of adult canine Schwann cells and olfactory ensheathing cells in long-term culture. *Brain Res* 1240: 31-38.

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner, Ph.D.
(Sprecher FOR 1003)
Institut für Pathologie
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 17, 30559 Hannover
Tel.: +49 511 953 8620
Fax: +49 511 953 8675
E-Mail: wolfgang.baumgaertner@tiho-hannover.de

Prof. Dr. Wolfgang Löscher
(Stellvertretender Sprecher FOR 1103)
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 17, 30559 Hannover
Tel.: +49 511 953 8720
Fax: +49 511 953 8581
E-Mail: wolfgang.loescher@tiho-hannover.de