Projektbeschreibungen der von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP) 2005 geförderten Promotionsstipendien

Zusammengestellt von
A. Gillissen
(Geschäftsführer der DGP)

M. D./Phd. Scholarships Funded by the German Society of Pneumology in 2005

Einleitung

Auf Beschluss des Vorstandes der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie (DGP) vom 20.09.2004 wird sich die DGP zukünftig intensiver im Bereich der Nachwuchsförderung der pneumologischen Wissenschaft engagieren. In diesem Rahmen wurde ein mit 40 000.-€ dotiertes Promotionsstipendium ausgeschrieben, mit dem eine anspruchsvolle medizinische oder naturwissenschaftliche Doktorarbeit auf dem Gebiet der Pneumologie unterstützt werden soll. Die eingereichten Arbeiten wurden durch ein unabhängiges, dreiköpfiges Gutachtergremium evaluiert. Die Beurteilung erfolgte nach modifizierten DFG-Kriterien (Deutsche Forschungsgemeinschaft) zur Beurteilung von Graduiertenkollegs bzw. eines Forschungsantrags. Dabei erfolgte allerdings keine Bewertung des Antragstellers/der Antragstellerin, da insbesondere Studierende der Medizin noch keine nennenswerten wissenschaftlichen Arbeiten vorweisen können. Die Modifikation der DFG-Kriterien ergab sich auch deswegen, da die DFG keine direkten Promotionsstipendien vergibt. Auf dem Boden dieser Bewertung erfolgte die Auswahl der zu fördernden Forschungsvorhaben. Ursprünglich sollten maximal 4 Arbeiten prämiert werden. Aufgrund einer Pattsituation der an 4. und 5. Stelle beide als gleich gut bewerteten Vorhaben entschloss sich der DGP-Vorstand zur Förderung von insgesamt 5 Promotionen (Beschluss vom 22.04.2005).

Folgende Promoventen in folgenden Arbeitsgruppen werden jetzt mit dem DGP-Promotionsstipendium 2005 gefördert: (Tab. **1**).

Tab. **1**

Nr.	*Antragsteller*	*Arbeitsgruppe*	*Institution*	*Thema*
1	Marc Hübner	Prof. Dr. Hartwig Schulz-Key	Universitätsklinikum Tübingen, Inst. für Tropenmedizin	Einfluss von Helminthen-Infektionen auf Allergien: Evaluierung des therapeutischen Potenzials von Wurminfektionen in einem Mausmodell für Atemwegs-Hyperreaktivität und allergisches Asthma
2	Janine Zahlten	Priv.-Doz. Dr. Stefan Hippenstiel	Charité, Med. Klinik m. S. Infektiologie, Berlin	molekulare Interaktion zwischen St. pneumoniae und humanem Lungenepithel
3	Tibor Veres	Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich	Fraunhofer Inst. Toxikologie und Experimentelle Medizin, Hannover	Interaktion pulmonaler dendritischer Zellen mit Nerven bei der allergischen Entzündung: Wirkung von Neuropeptid-Rezeptor-Antagonisten im murinen Asthmamodell
4	Maike Klein	Prof. Dr. Wolfgang Kummer	Justus-Liebig-Universität, Inst. für Anatomie und Zellbiologie, Gießen	Zelldifferenzierung und mukoziliärer Transport im Trachealepithel der Maus bei Gendefizienz der muskarinischen Rezeptoren m1, m2 u. m3
5	Cornelia Krüger	Prof. Dr. Andrea Tannapfel, Prof. Dr. Adrian Gillissen, Prof. Dr. Wataru Yasui	Universitätsklinikum Leipzig/Inst. für Pathologie; Robert Koch-Klinik, Klinikum „St. Georg"/Leipzig; Hiroshima University/Institute of Pathology/Japan	Epigenetic inactivation of cell-cycle regulators in lung cancer

Institutsangaben
Robert Koch Klinikum, Klinikum „St. Georg", Leipzig

Korrespondenzadresse
Prof. Dr. Adrian Gillissen · Robert Koch Klinikum · Klinikum „St. Georg" ·
Nikolai-Rumjanzew-Str. 100 · 04207 Leipzig · E-mail: adrian.gillissen@sanktgeorg.de

Bibliografie
Pneumologie 2005; 59: 736–742 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
DOI 10.1055/s-2005-915550
ISSN 0934-8387

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

An dieses Promotionsstipendium sind folgende Bedingungen geknüpft:

- Vorstellung des Projektes in der Zeitschrift Pneumologie, wie hiermit geschehen.
- Bis spätestens zum 31.5.2008 Erstellung eines Abschlussberichtes (Promotionsschrift), der beim Geschäftsführer der DGP als Beleg für die durchgeführten Arbeiten einzureichen ist. Alternativ reicht der Nachweis von mindestens einer Originalpublikation.
- Die Institution oder der Doktorvater des genannten Promoventen muss sich verpflichten, dass das von der DGP zur Verfügung gestellte Stipendium ausschließlich für das beantragte Projekt verwendet wird.
- In der Verwendung der Mittel bestehen ansonsten keinerlei Einschränkungen.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Finanzlage der DGP plant der DGP-Vorstand, diese Art der Nachwuchsförderung in gleicher oder ähnlicher Weise auch 2006 fortzusetzen. Damit leistet die DGP gerade im Vergleich zu anderen wissenschaftlichen Fachgesellschaften einen beispielhaften Beitrag zur Wissenschaftsförderung.

Im Folgenden werden die prämierten Promotionsarbeiten vorgestellt, wie sie dem DGP-Vorstand von den jeweiligen Antragstellern eingereicht wurden.

Einfluss von Helminthen-Infektionen auf Allergien: Evaluierung des therapeutischen Potenzials von Wurmfaktoren in einem Mausmodell für Atemwegs-Hyperreaktivität und allergisches Asthma

Projektleiter und Institution

Prof. Dr. Hartwig Schulz-Key, Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen

Stipendiat
Diplombiologe Marc Hübner

Mehrere epidemiologische und immunepidemiologische Studien in Industrie- und Entwicklungsländern zeigen eine inverse Korrelation zwischen dem Befall mit parasitischen Würmern (Helminthen) und dem Vorkommen von bestimmten allergischen Erkrankungen. Diese Feststellung steht im Zusammenhang mit der sog. „Erweiterten Hygiene-Hypothese“ [1–3]. Auch in zahlreichen, tierexperimentellen Arbeiten konnte eine Verringerung der Immunreaktivität gegen bestimmte Modellallergene festgestellt werden, wenn die Versuchstiere zuvor mit Helminthen infiziert wurden [4,5]. In filarieninfizierten Mäusen war die Produktion von Ovalbumin-spezifischem IgG1 und IgE um das 4–20fache reduziert und die Eosinophilenzahl in Lunge und Bronchoalveolar-Lavageflüssigkeit war so niedrig wie bei den nicht sensibilisierten Kontrollen. Die Atemwegs-Hyperreaktivität war ebenfalls deutlich verringert. Milzzellen von filarieninfizierten Tieren enthielten mehr regulatorische T-Zellen als nicht infizierte Kontrollen. Unklar blieb die Rolle von IL 10 (eigene Beobachtungen).

Ziele des Projektes sind die Identifizierung und Charakterisierung von genetischen und immunologischen Faktoren, die bei der filarieninduzierten Suppression des allergischen Phänotyps eine Rolle spielen sowie die Evaluierung des therapeutischen Potenzials von Wurmfaktoren. Die Nagerfilarie Litomosoides sigmodontis ist gut für diese Fragestellung geeignet, da sich diese Nematoden leicht und in großer Zahl aus infizierten Versuchstieren gewinnen und etliche Wochen unter genau definierten Bedingungen in vitro kultivieren lassen [6]. Die von ihnen freigesetzten, immunmodulatorischen Substanzen (im Folgenden „Wurmfaktoren“ genannt) können aus Kulturüberständen gewonnen, angereichert und ihre immunmodulatorische Wirkung in vitro und in vivo getestet werden. Folgende Arbeiten sind vorgesehen:

- Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c werden mit Filarien infiziert bzw. erhalten Applikationen von Wurmfaktoren. Zunächst werden – aus hoch infizierten Spendertieren gewonnene – immature, weibliche Adultwürmer, d. h. solche, die gerade ihre letzte Häutung hinter sich haben, aber noch keine Larvenstadien freisetzen, intraperitoneal implantiert [7]. Für die allergene Sensibilisierung wird den Versuchstieren intraperitoneal Ovalbumin (OVA) injiziert. Zusätzlich erfolgt eine intranasale Sensibilisierung. Die Atemwegsreaktivität wird mittels Ganzkörper-Plethysmographen quantifiziert [8]. Das Ausmaß der immunologischen Entzündung wird im Blut und verschiedenen Geweben mittels ELISA, Durchfluss-Zytometrie, immunhistochemischen und zytologischen Methoden verfolgt.
- Ferner werden dendritische Zellen aus der Milz von filarieninfizierten und allergen-sensibilisierten Mäusen isoliert und in naive Mäuse injiziert, die dann ebenfalls mit OVA sensibilisiert werden. Klassische Marker wie CD4/CD25 sowie membranständiger Transforming Growth Factor β und die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 dienen zum Nachweis von regulatorischen T-Zellen. Zudem wird aus diversen Organzellen, die in vivo oder in vitro Filarienantigen oder Wurmfaktoren exponiert waren, die RNA isoliert und mittels DNA-Chip-Technologie die Gesamt-Genexpression untersucht.
- Des Weiteren werden Wurmfaktoren bzw. fraktionierte Kulturüberstände in definierter Konzentration in osmotische Minipumpen injiziert, diese dann intraperitoneal implantiert. Dadurch können Kandidatenfraktionen mit immunmodulatorischer Aktivität systemisch über einen Zeitraum von zwei Wochen appliziert werden. Weitere Untersuchungen beziehen sich auf den potenziellen therapeutischen Einsatz von Helminthen und die Charakterisierung immunmodulatorischer Komponenten und der biochemischen Natur von Wurmkulturüberständen.

Dieses Projekt wird in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. E. Hamelmann, Pädiatrische Pneumologie und Immunologie, Charité Berlin durchgeführt.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Literatur

[1] Sheikh A, Strachan DP. The hygiene theory: fact or fiction? Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 12: 232 – 236
[2] Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in ethiopia: a nested case-control study. Lancet 2001; 358: 1493 – 1499
[3] Biggelaar AH van den, Ree R van, Rodrigues LC et al. Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10. Lancet 2000; 356: 1723 – 1727
[4] Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N et al. Helminth parasites – masters of regulation. Immunological Reviews 2004; 201: 89 – 116
[5] Wickelgren I. Can worms tame the immune system? Wielding worms on asthma and autoimmunity. Science 2004; 305: 170 – 171
[6] Hoffmann WH, Petit G, Schulz-Key H et al. Litomosoides sigmodontis in mice: reappraisal of an old model for filarial research. Parasitol Today 2000; 16: 387 – 389
[7] Hoffmann WH, Pfaff AW, Schulz-Key H et al. Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in Litomosoides sigmodontis filariasis. Parasitology 2001; 122: 641 – 649
[8] Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K et al. Non-invasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 766 – 775

Regulation der Genexpression in S. pneumoniae-infiziertem Lungenepithel

Projektleiter und Institution

Priv. Doz. Dr. Stefan Hippenstiel, Med. Klinik m. S. Infektiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin

Stipendiatin
Janine Zahlten

Die Infektion mit Streptococcus pneumoniae ist die häufigste Ursache für eine ambulant erworbene Pneumonie, welche die verbreitetste Infektionskrankheit in den Industrienationen darstellt. Obwohl pulmonale Epithelzellen primäre Zielzellen invadierender Pathogene (einschließlich Pneumokokken) sind, liegen kaum Informationen über die Pneumokokken-Wirtszellinteraktion vor. Epithelzellen detektieren extra- [1] und intrazelluläre [2] Pneumokokken durch Rezeptoren. Infolgedessen kommt es zu einer starken pro-inflammatorischen Aktivierung des Epithels [3]. Die subsequente Freisetzung von Chemo- und Zytokinen durch die Wirtszellen orchestriert den charakteristischen, massiven Einstrom neutrophiler Granulozyten bei der Pneumokokkenpneumonie. Obwohl die Entzündungsreaktion zur Elimination der Pathogene notwendig ist, bergen eine überschießende pulmonale Entzündungsreaktion und direkte Schädigung der pulmonalen Epithelzellen durch Pneumokokken [4] ständig das Risiko eines pulmonalen Organversagens.

Daher sollen im Rahmen dieser Förderung Mechanismen der Genexpression in S. pneumoniae-infiziertem humanen Lungenepithel im Detail untersucht werden. Mittelfristig kann das Verständnis dieser Signalprozesse die Grundlagen zur Entwicklung neuer, rationaler Therapiestrategien der Pneumonie legen.

Die Zytokinbildung unterliegt einer engen Regulation durch epigenetische Mechanismen, Kinasenkaskaden und Transkriptionsfaktoren (z. B. NF-κB) [5]. Aktuelle Untersuchungen ergaben, dass diese Signalwege teils in parallelen, teils in sequenziellen Signalwegen interagieren und erst im komplexen Zusammenspiel zur Bildung von Zytokinen führen.

Der Transkriptionsfaktor NF-κB wurde z. B. in verschiedenen Systemen als ein Zielmolekül der p38 mitogen-aktivierten Kinase (MAPK), ihrer Effektorkinasen (u. a. MSK1/2, MK2/3) sowie von Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) beschrieben [6, 7]. Besondere Bedeutung kommt hierbei offenbar einer Konvergenz dieser Signalkaskaden auf Ebene der Promotorregulation zu. Nach Aktivierung, nukleärer Translokation und Bindung von NF-κB an Genpromotoren entscheiden z. B. Phosphorylierungen von NF-κB darüber, ob Transkription stattfindet. So können beispielsweise Phosphorylierungen von NF-κB aktivierend (z. B. Serin 276, 536) als auch inhibierend (Serin 468) [8] an spezifischen Genpromotoren wirken [6]. Die Bedeutung solcher spezifischer, posttranslationeller Modifikationen des Transkriptionsfaktors NF-κB für pulmonale Infektionen ist unbekannt. Anhand von Pneumokokken infizierten humanen pulmonalen Epithelzellen werden wir diese molekularen Regulationsmechanismen im Detail untersuchen.

Neben der Phosphorylierung des Promotor-gebundenen NF-κB modifizieren Histon-Acetyltransferasen (z. B. p300, CBP, Gcn5) und –Deacetylasen (z. B. HDAC1 – 3) die Gentranskription [9]. Diese Enzyme werden z. T. durch ihre Lokalisation als auch durch eine Modifikation ihrer Transkription reguliert. Ob eine und welche Funktion diesen Enzymsysteme in der Pneumokokkeninfektion zukommt ist unbekannt. In einem zweiten Schwerpunkt analysieren wir daher die Rolle dieser Moleküle für die pro-inflammatorische Aktivierung Pneumokokken exponierter pulmonaler Epithelzellen.

Insgesamt hat die Infektion pulmonaler Epithelzellen mit Pneumokokken die Stimulation einer Vielzahl verschachtelter, bislang unzureichend charakterisierter Signalwege zur Folge, welche die Expression pro-inflammatorischer Gene regulieren. Diese Untersuchungen sollen einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Pathophysiologie der Pneumokokkenpneumonie leisten und zur Entwicklung rationaler Therapiestrategien beitragen.

Literatur

[1] Schröder NW, Morath S, Alexander C et al. Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. J Biol Chem 2003; 278: 15587 – 15594
[2] Opitz B, Püschel A, Schmeck B et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae. J Biol Chem 2004; 279: 36426 – 36432
[3] Schmeck B, Zahlten J, Moog L et al. Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promotor. J Biol Chem 2004; 279: 53241 – 53247
[4] Schmeck B, Gross R, N'Guessan PD et al. Streptococcus pneumoniae-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. Infect Immun 2004; 72: 4940 – 4947
[5] Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H et al. Multiple control of interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol 2002; 72: 847 – 855

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

[6] Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5: 392 – 401
[7] Schmitz ML, Mattioli I, Buss H et al. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. Chembiochem 2004; 5: 1348 – 1358
[8] Buss H, Dorrie A, Schmitz ML et al. Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. J Biol Chem 2004; 279: 49 571 – 49 574
[9] Muegge K. Preparing the target for the bullet. Nat Immunol 2002; 3: 16 – 17

Interaktion zwischen pulmonalen dendritischen Zellen und Nerven bei der allergischen Entzündung des Asthma bronchiale

Projektleiter und Institution

Prof. Dr. Dr. Uwe Heinrich, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin, Hannover

Stipendiat
Tibor Veres

Die Integrität der Atemwegsschleimhaut bei Kontakt mit potenziell schädlichen Substanzen (wie z. B. Allergenen, Umweltverschmutzungen) und Mikroorganismen, die sich in der eingeatmeten Luft befinden, wird durch diverse physiologische Mechanismen aufrechterhalten. Die erste Abwehrlinie wird durch die sehr effektive mechanische Barriere von Zilienepithelzellen und Atemwegssekret gebildet. Schädliche Substanzen, die diese Barriere überwinden, müssen vom Organismus detektiert werden, um angepasst aktive Eliminierungsmechanismen zu induzieren. Diese Aufgabe wird im Wesentlichen von zwei verschiedenen sensorischen Netzwerken der Atemwegsschleimhaut erfüllt.

Das erste Netzwerk bilden die sensorischen Nerven, deren Endigungen bis ins Epithel reichen. Sie werden von verschiedenen unspezifischen Reizen, wie z. B. kalter oder verschmutzter Luft, aktiviert. Neben den resultierenden zentralen Reflexen, die z. B. zu Husten führen, werden durch den so genannten Axonreflex auch lokale Effekte hervorgerufen. Hierbei werden lokal wirksame Neuropeptide wie Substanz-P (SP) und Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP) aus benachbarten Nervenendigungen freigesetzt. Das Ergebnis ist eine Permeabilitätssteigerung der Blutgefäße, erhöhte Schleimproduktion, Bronchokonstriktion und eine verstärkte Entzündung. Dieses Phänomen wird auch als „neurogene Entzündung“ bezeichnet. Der Atemwegshyperreaktivität beim Asthma bronchiale liegt unter anderem eine dauerhafte Hyperaktivität sensorischer und motorischer Nervenfasern zugrunde [1].

Das zweite Netzwerk, das eine sensorische Funktion in der Atemwegsschleimhaut erfüllt, wird von den pulmonalen dendritischen Zellen gebildet. Auch diese Zellen nehmen Umweltinformationen (-antigene) auf, die nach ihrer Prozessierung in den drainierenden Lymphknoten T-Lymphozyten präsentiert werden [2]. Damit fungieren sie als „sensorische Zellen“ des Immunsystems. Dendritische Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale [3], da sie nicht nur für die allergische Sensibilisierung verantwortlich sind, sondern auch zur Aufrechterhaltung der allergischen Entzündung beitragen.

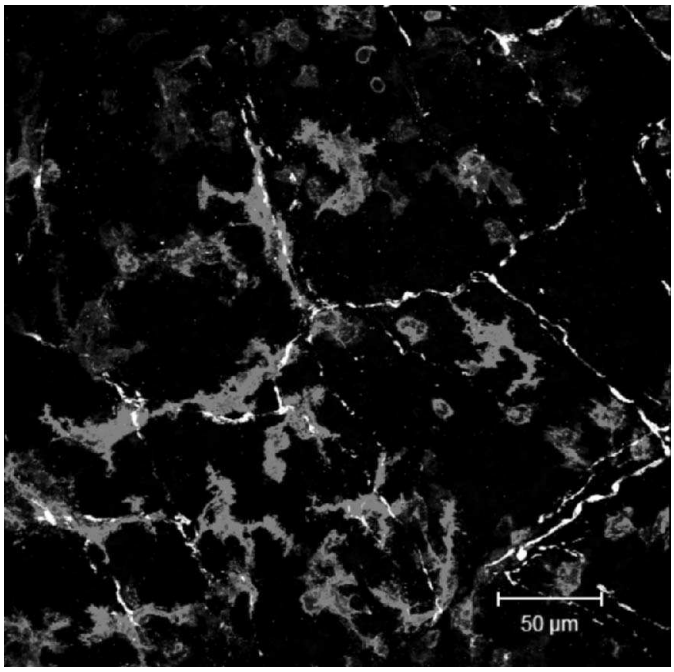

Abb. **1** Pulmonale dendritische Zellen befinden sich im engen Kontakt mit Nervenfasern. Die dendritischen Zellen (grau) sind gegen das Antigenpräsentationsmolekül MHC II und die Nerven (weiß) gegen den Pan-Neuronalmarker PGP 9.5 gefärbt. Dargestellt ist eine Projektion von laserscanmikoskopischen Z-Serienaufnahmen.

Da sich Nerven und dendritische Zellen im selben anatomischen Kompartiment der Atemwegsmukosa befinden und teilweise ähnliche Funktionen erfüllen, lässt sich vermuten, dass es zwischen den beiden sensorischen Netzwerken eine direkte Interaktion gibt. Forschungen der letzten Jahre zeigen tatsächlich, dass dendritische Zellen in vitro dem Einfluss neuronaler Signale unterliegen, und gleichzeitig selber mit Neuronen kommunizieren können. Neuropeptide wie CGRP wirken auf unreife dendritische Zellen chemotaktisch und können ihre Ausreifung fördern [4]. Umgekehrt können von dendritischen Zellen freigesetzte Botenstoffe, z. B. Neurotrophine wie Nerve Growth Factor (NGF), auf Neurone wirken und ihre Aktivität modulieren. Unklar ist aber, ob und wie diese Interaktion in situ im Lungengewebe funktioniert.

Ziel des Forschungsvorhabens ist es, erstmals die Interaktion von dendritischen Zellen mit Neuronen in der allergisch entzündeten Lunge zu beleuchten. Hierzu sollen zunächst sowohl morphologische als auch funktionelle Untersuchungen im murinen Tiermodell des allergischen Asthma bronchiale durchgeführt werden. Die anatomische Charakterisierung der räumlichen Interaktion zwischen Nerven und dendritischen Zellen erfolgt durch immunhistologische Färbungen von so genannten Whole-Mount Präparaten (Abb. **1**). Diese Technik ermöglicht die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur des Lungengewebes durch eine Mikropräparation der intrapulmonalen Atemwege. Die mit entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markierten Präparate werden mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert, wobei Multikanal-Z-Serien von aufeinanderliegenden optischen

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Schnitten aufgenommen werden. Die Z-Serienaufnahmen von dendritischen Zellen und Nerven werden mit der Software IMARIS (Bitplane) mittels Oberflächen- und Volumenrendering dreidimensional rekonstruiert. Anschließend werden verschiedene quantitative Analysen, wie z. B. die Messung der Länge der Nervenfasern und die Bestimmung der Größe kolokalisierter Areale, in einem definierten Volumen durchgeführt. Die Methode ermöglicht darüber hinaus die in situ Charakterisierung dendritischer Zellen bezüglich der Expression von Neuropeptidrezeptoren und Neurotrophinen.

Für die funktionellen Untersuchungen der Interaktion zwischen pulmonalen dendritischen Zellen und Nerven werden lebende Lungenschnitte (Precision Cut Lung Slices, PCLS) verwendet. Die Schnitte werden aus den Lungen von CD11c-EYFP transgenen Mäusen angefertigt [5], in denen die dendritischen Zellen das Fluoreszenzprotein EYFP exprimieren. Nach Beladung der Schnitte mit einem fluoreszierenden Calcium-Indikator werden die sensorischen Nerven stimuliert und die Aktivation der dendritischen Zellen durch die Messung der intrazellulären Ca-Konzentration in den CD11c-EYFP$^+$ dendritischen Zellen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht.

Unsere Strategie ist es, während des Projektes Methoden zu etablieren, die eine Charakterisierung der Interaktion zwischen pulmonalen dendritischen Zellen und Nerven morphologisch und funktionell in situ ermöglichen. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse könnten entscheidend zur Entwicklung eines genaueren pathophysiologischen Konzeptes des Asthma bronchiale beitragen.

Literatur

[1] Undem BJ, Kajekar R, Hunter DD et al. Neural integration and allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2000; 106: 213 – 220

[2] Havenith CE, Miert PP van, Breedijk AJ et al. Migration of dendritic cells into the draining lymph nodes of the lung after intratracheal instillation. Am J Respir Cell Mol Biol 1993; 9: 484 – 488

[3] Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol 2003; 3: 994 – 1003

[4] Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C et al. Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells. J Immunol 2001; 166: 2167 – 2172

[5] Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D et al. Visualizing dendritic cell networks in vivo. Nat Immunol 2004; 5: 1243 – 1250

Zelldifferenzierung und mukoziliärer Transport im Trachealepithel der Maus bei Gendefizienz der muskarinischen Rezeptoren m1, m2 und m3

Projektleiter und Institution

Prof. Dr. Wolfgang Kummer, Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Anatomie und Zellbiologie

Stipendiatin
Maike Klein

Azetylcholin (ACh) ist ein weit verbreitetes, funktionell hoch relevantes Signalmolekül. ACh-Rezeptoren werden nach ihrer Affinität für zwei Modellagonisten in nikotinische und muskarinische Rezeptoren eingeteilt. In der Lunge und den Atemwegen sind insbesondere die muskarinischen Rezeptoren von besonderer klinischer Relevanz. Diese werden in die Subtypen m1 bis m5 eingeteilt, die jeweils auf einem eigenen intronlosen Gen kodiert sind. In der Peripherie wird ACh nicht nur als wichtigster Neurotransmitter von parasympathischen Nervenendigungen, sondern auch von verschiedensten non-neuronalen Zellen, darunter die Atemwegsepithelien, synthetisiert und freigesetzt [1 – 2]. Dieses non-neuronale ACh wirkt auto- und parakrin.

Die akuten Wirkungen des neuronal freigesetzten ACh in den Atemwegen – Bronchokonstriktion, Stimulation von Drüsenzellen – sind weitgehend bekannt, weniger hingegen die langsam eintretenden auto- und parakrinen. Aus epithelialen Systemen sind eine cholinerge Steuerung der Proliferation, Differenzierung, Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, Organisation des Zytoskeletts, Stimulation der Zilienschlagfrequenz und Regulation der Zytokinproduktion bekannt [2 – 6]. Detaillierte Kenntnisse zur Beteiligung der einzelnen Rezeptorsubtyen sind einerseits zum Verständnis der Pathogenese von Umbauvorgängen im Verlauf chronischer Erkrankungen, z. B. COPD, andererseits auch zur gezielten therapeutischen Nutzung erforderlich.

Im respiratorischen Epithel sind vor allem die muskarinischen Rezeptorsubtypen m1, m2 und m3 vorhanden. Im vorliegenden Projekt wird ihre derzeit nur unzulänglich bekannte spezifische Rolle in der epithelialen Differenzierung, Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten und Regulation des mukoziliären Transports in den Atemwegen untersucht werden. Hierzu wird die Trachea von gendefizienten Mäusestämmen, die jeweils einen dieser Rezeptorsubtypen nicht ausbilden, im Vergleich zu ihrem korrespondierenden Wildtyp untersucht. Messparameter sind relative Häufigkeit und subzellulärer Phänotyp der individuellen Epithelzelltypen (Immunhistochemie, Ultrastruktur), Ausmaß und Struktur der Zell-Zell-Kontakte (Immunhistochemie, Ultrastruktur) sowie Geschwindigkeit und Koordination des mukoziliären Transportes (Videomikroskopische Analyse des Partikeltransports).

Von den Ergebnissen werden Erkenntnisse über die Funktion und Bedeutung der individuellen muskarinischen Rezeptorsubtypen m1 – m3 im non-neuronalen cholinergen System der Atemwege erwartet, die Möglichkeiten ihrer selektiven therapeutischen Nutzung in chronischen Erkrankungen, die mit Umbauvorgängen der Atemwegswand einhergehen, eröffnen sollen.

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Literatur

[1] Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J et al. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthezised by surface cells of rat and man. Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol 1997; 335: 515 – 523
[2] Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F et al. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. Jpn J Pharmacol 2001; 85: 2 – 10
[3] Shafer SH, Puhl HL, Phelps SH et al. Activation of transfected M1 or M3 muscarinic acetylcholine receptors induces cell-cell adhesion of chinese hamster ovary cells expressing endogenous cadherins. Exp Cell Res 1999; 248: 148 – 159
[4] Metzen J, Bittinger F, Kirkpatrick CJ et al. Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype. Life Sci 2003; 72: 2075 – 2080
[5] Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J et al. Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Exp Cell Res 2004; 294: 534 – 549
[6] Struckmann N, Schwering S, Wiegand S et al. Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: Studies on receptor-deficient mice. Mol Pharmacol 2003; 64: 1444 – 1451

Epigenetic Inactivation of Cell-Cycle Regulators in Lung Cancer

Projektleiter und Institution

Prof. Dr. Andrea Tannapfel, Universitätsklinik Leipzig, Institut für Pathologie

Prof. Dr. Adrian Gillissen, Robert-Koch-Klinik, Klinikum „St. Georg", Leipzig

Prof. Dr. Dr. Wataru Yasui, Hiroshima University, Department of Molecular Pathology

Stipendiatin
Cornelia Köhler

DNA methylation is a crucial component of the epigenetic control of gene activity through the regulation of chromatin state. It has been found that DNA methylation is required for protecting chromosomes and it is involved in recognition of parental DNA strands during mismatch repair [1]. DNA methylation also plays a very important role in regulating the spatial distribution of gene expression [2]. A number of factors involved in this process, such as methyl-binding proteins and histone-deacetylases have been identified [3]. Similar to other somatic genome alterations present in cancer cells, including gene deletions and gene mutations, DNA methylation changes often affect gene function; methylation of CpG dinucleotides clustered into CpG islands encompassing the transcriptional regulatory region of genes has been associated with transcriptional "silencing" of many critical genes in cancer cells. Unlike other somatic genome alterations in cancer cells, however, DNA methylation changes typically do not disrupt DNA sequence. For this reason, somatic changes in DNA methylation in cancer cells are thought to be potentially reversible "epigenetic" genome lesions, rather than irreversible "genetic" genome alterations [4].

If suitable CpG markers are identified that are selectively hypermethylated in lung cancer (LC) but not in normal epithelium. They could be potential markers useful in classifying LC and defining subgroups of patients, as well as lend themselves to diagnosis of occult disease or recurrence. The detection of methylation of particular sets of genes could help select patients that respond well to certain drugs. Importantly, these studies will interact with preclinical and early clinical studies underway for compounds that reverse methylation-induced transcriptional silencing and thus have tremendous potential for translation to the clinic [5].

To additionally define epigenetic modifications and order of epigenomic events at CpG islands on a global scale, a microarray system that combines gene expression, DNA methylation, and DNA-protein interaction analyses comparing results from lung cancer tissue with specimens from healthy bronchi/lung tissue will be employed in the network as platform technique [6].

Our study represents a genomic approach that is capable of dissecting the complex hierarchy of transcriptional controls orchestrated by the epigenomic machinery. This integrated microarray system allows for both the identification of individual genes and a systematic analysis of the relationship among the epigenetic machinery, promoter targets, and downstream responses regulated by the epigenome.

We plan to generate array data in the lab of Professor Yasui, Hiroshima, Japan, which is an internationally accepted and well-known experts in the field of methylation/acetylation.

He is willing to generate the biological as well as bioinformatory data of our project. Within the network, the applicant is collecting tumour specimen of patients with LC. The analysis will take place in the Hiroshima lab.

Data validation and candidate methylation screening will be the second part of the project and take place in Leipzig (Institute of Pathology and St. George Medical Center, Robert-Koch-Hospital).

The objectives will be at follows:
- Identification of epigenitically altered genes for targeted therapy of lung cancer.
- Screening for possible methylation targets in Hiroshima/Japan using microarrays and sequencing. Implementing these methods in Leipzig and subsequent biological assessment in lung cancer specimens.
- Identification of methylated genes in lung cancer responsible for tumorgenesis with the intent of therapeutic intervention by reversing methylation, thereby reactivating the silenced gene.
- Comparing these data with healthy bronchopulmonary tissue.

The program has three integral parts which take place in Japan and Leipzig. The applicant has to learn the microarray technique in the Yasui lab, using tumour specimen from Germany (tumour bank Robert-Koch-Hospital).

All patients with bronchial carcinoma (NSCLC and SCLC) will be included as far as tumour tissue can be obtained and written con-

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

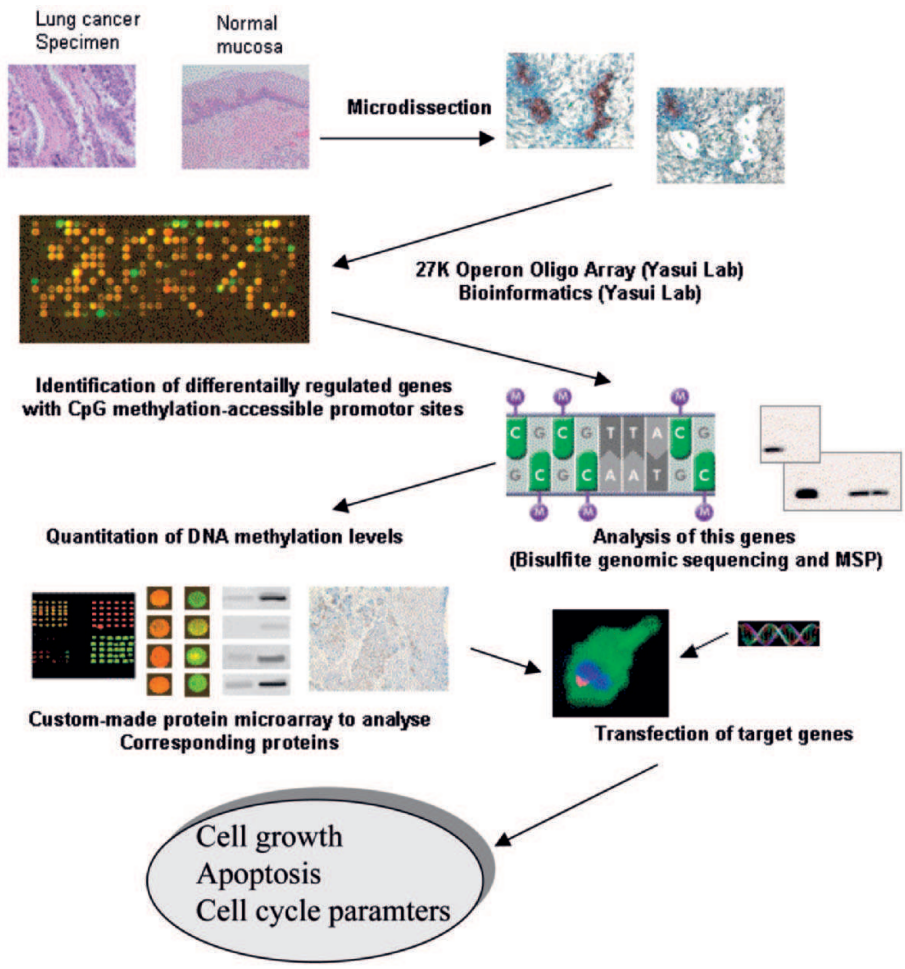

Abb. **1** Project description (see text for details) in which the scholarship will be embedded.

sent of voluntary participation is obtained. We expect about 70% NSCLC and 30% SCLC. Using the tumour bank of the Robert-Koch-Hospital 500 patients may be included over time once specimen collection and documentation of these patients are already in place. Once the NSCLC is expected to be the majority the patients will be statistically divided in three groups: a) NSCLC (Stadium I-IIIA), b) NSCLC (Stadium IIIB-IV), c) SCLC.

The identified candidate genes will be assessed in a large series of tumour. The biological relevance (is the identified gene a tumour suppressor?) will be analysed in the Institute of Pathology. The identified gene will be transfected into a cell culture system to be able analyse possible effects on cell cycle and marker expression.

The project was designed as a collaboration project to obtain data from Leipzig's patients using the Japanese chip technology and biostatistics (Abb. **1**). The project as described above does already exist for gastrointestinal tumors. Thus, lung tumor specimen will be newly included in an already existing international scientific network collaboration effort. Therefore, the network will be expanded by a new organ tumour (lung cancer), using an already existing methodological platform. The advances of these complex techniques will be transferred to both German partners. The pre-existing network will be further expanded covering pulmonary oncology as well.

Literatur

[1] Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. Curr Opin Oncol 2005 Jan; 17 (1): 55 – 60

[2] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. J Clin Oncol 2004 Nov 15; 22 (22): 4632 – 4642

[3] Khan AU, Krishnamurthy S. Histone modifications as key regulators of transcription. Front Biosci 2005 Jan 1; 10: 866 – 872 Print 2005 Jan 1

[4] Mockler TC, Ecker JR. Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. Genomics 2005 Jan; 85 (1): 1 – 15

[5] Steensel B van, Henikoff S. Epigenomic profiling using microarrays. Biotechniques 2003 Aug; 35 (2): 346 – 350,: 352 – 354: 356 – 357

[6] Shi H, Maier S, Nimmrich I et al. Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: principles and applications. J Cell Biochem 2003 Jan 1; 88 (1): 138 – 143

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.