

Abschlussbericht
zur Fördermaßnahme BioProfile

des Bundesministeriums für Bildung und Forschung
für ein Entwicklungsvorhaben innerhalb des BioProfile-Programms
für die Region Stuttgart/Neckar-Alb

mit dem Thema

Axonale Regeneration im zentralen Nervensystem
in einer bioaktiven Nano-Matrix

Teilprojekt Universität Tübingen

Universität Tübingen
Projektpartner A:
Klinik für Neurochirurgie
Hoppe-Seyler-Str. 3
Und
Projektpartner B:
Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Elfriede-Aulhornstraße 5
72076 Tübingen

vorgelegt von

Prof. Dr. med. Marcos Tatagiba (Projektleiter und Projektpartner A)

PD Dr. Hubert Löwenheim (Projektpartner B)

Förderkennzeichen: 0313837B
Laufzeit des Vorhabens: 01.11.2006 bis 30.04.2008

kostenneutral verlängert bis 31.10.2008
Berichtszeitraum: 01.11.2006 bis 31.10.2008
Tübingen, den 10.05.2010

Zusammenfassung

Verletzungen des Nervensystems führen zur Degeneration des lokalen Gewebes und des peripheren Anteils der durchtrennten Nervenfasern, begleitet von Gliaproliferation, der Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix, einer Makrophageninvasion und der Entfernung der Zelldebris. Im Gegensatz zum Peripheren Nervensystem erfolgt im Zentralen Nervensystem nach einer Verletzung reifer Axone kein Wachstum, sondern es kommt zur Myelinschädigung und Narbenbildung.

Der *Nervus acusticus*, der im Projekt als Modell für die axonale Regeneration des ZNS untersucht wurde, besteht aus Axonen bipolarer Neurone des Spiralganglions, deren Verletzung eine neurale Degeneration sowohl an ihrem peripheren als auch an ihrem zentralen Ende induzieren kann.

Als besondere Innovation hatte das vorliegende Projekt ein für die funktionelle Restitution des Hörvermögens erforderliches langstreckiges Nervenfaserverwachstum auf einer künstlich erzeugten bioaktiven Matrix zum Ziel. Auf der Basis autoaggregierender, amphiphiler Peptid-Oberflächen wurde die Stimulation des axonalen Wachstums *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Hierzu wurden in einem ersten Schritt beim Projektpartner C (EMC microcollections GmbH) geeignete Verbindungskollektionen mit potentiell regenerationsbiologischen Eigenschaften hergestellt, die zunächst *in vitro* ihre morphologische und gelbildende Funktion und auf ihre Wirksamkeit in Hinblick auf axonales Wachstum geprüft wurden. Nach der Screening- und Optimierungsphase in Bezug auf regenerationsbiologische und autoaggregierende Eigenschaften, wurden schließlich die aussichtsreichsten bioaktiven Epitope als Regenerations-Matrizes für die *in vivo*-Experimente ausgewählt.

Im Rahmen des Projektes wurde, erstmals für den Hörnerv, eine Leitstruktur mit wachstumsfördernden spezifischen Oberflächen-Epitopen entwickelt. Entsprechende regenerationsbiologisch relevante Peptide für diese Matrix konnten identifiziert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Kurze Darstellung des Projektes	4
1.1	Aufgabenstellung	4
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	5
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	9
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	12
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	14
2	Eingehende Darstellung der wissenschaftlichen Ergebnisse	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.1	Etablierung in vitro assay	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2	In vitro Screening-Assay	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.3	In vivo Screening-Assay	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.4	Verwertbarkeit der Ergebnisse	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.5	Fortschritte bei anderen Stellen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.6	Veröffentlichungen (erfolgte und geplante)	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Kurze Darstellung des Projektes

1.1 Aufgabenstellung

Das Ziel von regenerationsbiologischen Untersuchungen zur axonalen Regeneration ist es, neue Wege zu finden, eine funktionelle Wiederherstellung im Zentralen Nervensystem (ZNS) zu ermöglichen. Im Rahmen des Projektes sollte für diese Situation die Induktion der Regeneration von Nervenfasern durch regenerationsbiologisch wirksame Peptid-Epitope auf einer Nanofaser-Matrix amphiphiler Peptide untersucht werden.

Aufgrund aktueller Befunde erscheinen die Eigenschaften einer auto-aggregierenden Nervenfasermatrix nach Kopplung bioaktiver Epitope geeignet, eine axonale Regeneration zu induzieren. Durch die geplanten Untersuchungen zur biologischen Wirkung von verschiedenen, mit maßgeschneiderten Eigenschaften ausgestatteten Peptiden, sollten exemplarisch für den Hörnerv regenerationsbiologisch relevante Substanzen identifiziert werden, die in der Lage sind, eine entsprechende axonale Regeneration im ZNS zu induzieren.

Hierzu sollten strukturell modifizierte amphiphile Nanofaser-Matrizes mit unterschiedlichen bioaktiven Epitopen beim Projektpartner C (EMC microcollections GmbH) hergestellt und analysiert werden. Die Prüfung der biologischen Wirkung erfolgte zunächst in *in vitro*-Tests. Hierbei sollte für die Nanofasermatrizes und unterschiedliche Epitope die Fähigkeiten zur Induktion von axonalem Wachstum untersucht werden. Auf der Basis der Ergebnisse dieser zellbiologischen Untersuchungen sollten beim Projektpartner EMC Modifikationen der aussichtsreichsten Peptidsequenzen vorgenommen werden, die zu einer verbesserten regenerationsbiologischen Wirkung führen sollten. Diese optimierten Strukturanaloga wurden *in vitro* und *in vivo* in weitergehenden Prüfungen untersucht.

Nach der Screening- und Optimierungsphase in Bezug auf die zellbiologischen und auto-aggregierenden Eigenschaften sollten die aussichtsreichsten bioaktiven Epitope als Regenerations-Matrizes für die *in vivo*-Experimente ausgewählt werden. Zudem sollte ihre morphologische und gelbildende Funktion optimiert werden, um die besonderen Anforderungen für eine Applikation *in vivo* zu gewährleisten.

Bei entsprechenden regenerationsbiologischen Wirkungen zur Ausbildung von Faserstrukturen und zur zielgerichteten Reparatur durchtrennter Nerven auch in weiterführenden *in vivo*-Experimenten, haben die neuen Verbindungen eine direkte therapeutische Implikation.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Verletzungen des Nervensystems rufen eine abgestufte Reaktion hervor, deren grundlegende Phasen bereits seit langem bekannt sind. Auf die Degeneration des lokalen Gewebes und des peripheren Anteils der durchtrennten Nervenfasern folgen eine Gliaproliferation, die Ablagerung von Komponenten der extrazellulären Matrix, eine Makrophageninvasion und die Entfernung der Zelldebris. Oft wird im Anschluss daran eine Aussprossung der geschädigten Axone beobachtet.

Im Peripheren Nervensystem (PNS) kann dieser Aussprossung eine Elongation der Nervenfasern über lange Distanzen folgen. Dieser Vorgang führt häufig zu einer funktionellen Rekonnektion mit der Zielregion. Im Gegensatz dazu erfolgt im Zentralen Nervensystem (ZNS) nach einer Verletzung reifer Axone kein Wachstum über eine Strecke von 1 mm hinaus. Die Nervenfasern des Zentralen Nervensystems erwachsener Säugetiere sind nach einer Verletzung nicht in der Lage, langstreckig auszuwachsen, um so wieder funktionsfähige Verbindungen mit ihrer Zielregion aufzunehmen. Stattdessen kommt es nach einer Axotomie der Faserbahnen zu einem Untergang von Neuronen und Gliazellen, zu einer Myelinschädigung und zur Narbenbildung.

Durch diese vorgegebenen zellbiologischen Abläufe und das mangelnde Wiederauwachsens der Nervenbahnen führen Läsionen von Gehirn, Rückenmark und zentralen Hirnnerven von Säugern zu bleibenden funktionellen Defiziten bzw. klinisch neurologischen Ausfällen. Aus diesem Grund besteht für den Menschen nach traumatischen, degenerativen oder onkologischen Schädigungen der Hör- oder Sehnerven sowie des Rückenmarks keine Hoffnung auf eine spontane Erholung der verlorenen Funktionen.

Jährlich treten so irreversible Querschnittslähmungen, Seh- oder Hörverluste in großer Zahl auf. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge beträgt allein in den USA