

# NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Im Auftrage des Präsidiums herausgegeben von

Harald zur Hausen, Vizepräsident der Akademie

Neue Folge, Supplementum 18

## Ergebnisse des Leopoldina- Förderprogramms III

Meeting und Berichte der Stipendiaten

am 8. und 9. November 2002

Halle/Saale

Herausgegeben von:

Gunter S. FISCHER (Halle/Saale)

Vizepräsident der Akademie

Benno PARTHIER (Halle/Saale)

Altpräsident der Akademie

Roland RIEDEL (Halle/Saale)

Beauftragter für das Förderprogramm







# NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Im Auftrage des Präsidiums herausgegeben von

HARALD ZUR HAUSEN  
Vizepräsident der Akademie

---

NEUE FOLGE

SUPPLEMENTUM

NUMMER 18

---

## Ergebnisse des Leopoldina- Förderprogramms III

Meeting und Berichte der Stipendiaten

am 8. und 9. November 2002  
Halle (Saale)

Herausgegeben von:

Gunter S. FISCHER (Halle/Saale)  
Vizepräsident der Akademie

Benno PARTHIER (Halle/Saale)  
Altpräsident der Akademie

Roland RIEDEL (Halle/Saale)  
Beauftragter für das Förderprogramm

Mit 118 Abbildungen and 12 Tabellen



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle (Saale) 2004**  
**In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart**

Redaktion: Dr. Michael KAASCH und Dr. Joachim KAASCH

**Die Schriftenreihe Nova Acta Leopoldina erscheint bei der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Birkenwaldstraße 44, 70191 Stuttgart, Bundesrepublik Deutschland.  
Jedes Heft ist einzeln käuflich!**

Die Schriftenreihe wird gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie das Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt.

**Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdruckes, der fotomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und dgl. in diesem Heft berechtigt nicht zu der Annahme, daß solche Namen ohne weiteres von jedermann benutzt werden dürfen. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht eigens als solche gekennzeichnet sind.

© 2004 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V.  
06019 Halle (Saale), Postfach 11 05 43, Tel. (03 45) 4 72 39 34  
Hausadresse: 06108 Halle (Saale), Emil-Abderhalden-Straße 37  
Herausgeber: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Harald ZUR HAUSEN, Vizepräsident der Akademie  
Printed in Germany 2004  
Gesamtherstellung: Druck-Zuck GmbH  
ISBN 3-8047-2176-1  
ISSN 0369-4771  
Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

# Inhalt

PARTHIER, Benno: Begrüßung und Einführung .....	7
<b>Physik</b>	
ENDERS, Peter, und SUIJSKY, Dieter: Über das Auswahlproblem in der klassischen Mechanik und in der Quantenmechanik.....	13
FRISCHKORN, Christian: Ultraschnelle Dynamik der Elektronen-Solvatisierung in endlichen Systemen.....	19
VOGEL, Nadeshda: Laserplasmen – Analogien zur Astrophysik.....	41
<b>Chemie</b>	
HAHN, Christine: Substitution <i>versus</i> Addition – Dikationische Palladium(II)- und Platin(II)-Olefinkomplexe und ihre Reaktionen mit protischen Nucleophilen.....	49
SCHALLEY, Christoph Andreas: Molekulares Tennis: Massenspektrometrische Untersuchung von selbst-organisierten molekularen Kapseln .....	65
<b>Geowissenschaften</b>	
NOFFKE, Nora: Geobiologie: eine neuentdeckte alte Wissenschaft .....	87
<b>Genetik/Molekularbiologie und Zellbiologie</b>	
MAIER, Olaf, und HOEKSTRA, Dick: Charakterisierung des vesikulären Transports von Sphingolipiden in polarisierten HepG2-Zellen .....	101
<b>Biochemie und Biophysik</b>	
JUNGNICKEL, Berit: Die Rolle der Keimzentrumsreaktion in der Entstehung humaner B-Zell-Lymphome.....	121
MÄDLER, Burkhard, und MACKAY, Alex: Entwicklung kernmagnetischer Resonanz- methoden zur diagnostischen Anwendung bei degenerativen Erkrankungen der weißen Gehirnsubstanz beim Menschen .....	131

OSTARECK-LEDERER, Antje, und OSTARECK, Dirk H.: Zelluläre Signale zur post-transkriptionalen Regulation der Retikulozyten 15-Lipoxygenase-(r15-LOX)-Expression während der Reifung erythroider Zellen .....	163
<b>Physiologie und Pharmakologie/Toxikologie</b>	
BÜRGER, Antje, JAY, Patrick Y., SHERWOOD, Megan C., LAWITTS, Joel A., und IZUMO, Seigo: Untersuchungen zur Funktion des Homöobox-Gens Csx/Nkx2.5 und zur Expression der Cre-Rekombinase im Herzen der Maus .....	181
<b>Toxikologie</b>	
DISTLER, Oliver, DISTLER, Jörg, HIRTH, Astrid, GAY, Renate E., und GAY, Steffen: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in der Pathogenese der systemischen Sklerose .....	189
<b>Chirurgie, Orthopädie und Anästhesiologie</b>	
HARTWIG, Werner: Pankreasproteasen – ihre Rolle in der Pathogenese der lokalen und systemischen Organschädigung bei akuter Pankreatitis.....	197
<b>Gynäkologie und Pädiatrie</b>	
SCHWAB, Matthias: Geräusche und Streßhormone im Mutterleib – Was nimmt der Fetus wahr und was prägt ihn für den Rest des Lebens? .....	219
<b>Neurowissenschaften</b>	
MÜLLER, Karsten: Zur Anwendung multivariater Spektralanalyse in der funktionellen Magnetresonanztomographie .....	253
<b>Ophthalmologie, Oto-Rhino-Laryngologie und Stomatologie</b>	
JOHN, Mike, und MICHEELIS, Wolfgang: Mundgesundheitsbezogene Lebensqualität in der Allgemeinbevölkerung und klinischen Patienten.....	271
Teilnehmer .....	283

## Begrüßung und Einführung

Benno PARTHIER (Halle/Saale)

Altpräsident der Akademie

Zur Eröffnung dieses dritten Meetings begrüße ich im Namen des Präsidiums und im Rahmen des Leopoldina-Förderprogramms herzlich alle Teilnehmer, darunter besonders Herrn SCHMIDT-KÜNTZEL als Vertreter des Bundesministeriums für Bildung und Forschung, die Leopoldina-Mitglieder, die Vortragenden, Gäste, darunter Teilnehmer vom ersten Förderprogramm. Die Redner sind fast ausschließlich, wie erwartet und gewünscht, jene über die Leopoldina geförderten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, die nach Beendigung oder im fortgeschrittenen Stadium ihrer Förderprojekte von uns gebeten wurden, über ihre Ergebnisse vorzutragen. Darüber hinaus ist das Meeting die beste Gelegenheit, daß die Stipendiaten sich gegenseitig kennenlernen. Mindestens genau so wichtig ist es für die Mitglieder des Vergabeausschusses, durchweg Leopoldina-Mitglieder, Sie persönlich kennenzulernen, damit sie sich ein unmittelbares Bild machen können über die jungen Damen und Herren, die zu fördern wir für würdig befunden haben.

Wie bereits bei den vergangenen Meetings (1995, 1998) werden heute und morgen Vormittag wieder unterschiedliche naturwissenschaftliche und medizinische Beiträge zu hören und zu sehen und hoffentlich auch lebhaft zu diskutieren sein. Alle sind dazu aufgefordert. Dankbar sind wir Frau LANDFESTER, die als Mitglied der Jungen Akademie Informationen zu den Juniorprofessuren geben wird, und unserem Mitglied Herrn BÜCHEL, der als ehemaliger Forschungsleiter der Bayer-AG, wie kaum ein anderer, in seinem Abschlußvortrag die Industrieforschung gestern und heute beleuchten wird – eventuell auch darüber berichten wird, wie kritisch oder wie optimistisch diese Variante eines Forschungseinstiegs für die im Leopoldina-Programm Geförderten sein kann. Schließlich wollen wir als letzten Teil, moderiert von Herrn Vizepräsidenten FISCHER, über das Förderprogramm selbst diskutieren, wobei besonders die Teilnehmer ihre eigenen, persönlichen Erfahrungen, Vorschläge und Wünsche einbringen sollen. Darüber hinaus sind wir und das BMBF an Berichten von den Geförderten über ihr wissenschaftliches Leben an den Gastinstituten interessiert.

Einige Sätze zur Geschichte des Förderprogramms. Es ist üblich geworden, auch ein zehnjähriges Bestehen jedweder Einrichtung mit Grußworten und Stehempfangen zu begehen. (Ich weiß nicht, was der Finanzminister dazu sagt.) Das Angebot des damaligen Bundesministeriums für Forschung und Technik an die Leopoldina kam 1991 direkt vom Minister Heinz RIESENHUBER. Er fragte uns, ob der Bund eine spezielle Förderung jener Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler in den neuen Bundesländern, die unter den Reise- und Ausbildungsrestriktionen in der DDR gelitten hatten, durch die Leopoldina verwirklichen könne. Diese gesamtdeutsch wirkende Institution, die das DDR-Regime politisch unabhängig überstanden habe, wäre in ihrer fachlichen Ausrichtung und ihrer personellen Kompetenz ein Garant für

eine objektive und fachkundige Durchführung eines solchen Förderprogramms, das zunächst für fünf Jahre angedacht sei.

Selbstverständlich hat das Präsidium diese Form einer staatlichen Auszeichnung sehr gern angenommen, lag es doch in unserem Wunsche und Sinne, den durch DDR-spezifische Unmündigkeit und Reisebeschränkungen benachteiligten akademischen Nachwuchs endlich mit einer finanziell erheblichen Summe (3 Mio. DM per Jahr) die notwendige Förderung angedeihen zu lassen. Das Programm sah vor, möglichst, aber nicht ausschließlich, jüngere Wissenschaftler aus den naturwissenschaftlichen und medizinischen, also Leopoldina-spezifischen Fachbereichen mit einem jeweils sechsmonatigen Stipendium zum Zwecke einer methodischen Qualifizierung zu fördern, damit sie auf internationalem Niveau ihre Forschungsarbeiten durchführen könnten. Die Finanzierung enthielt eine erhebliche Summe zur Anschaffung von wissenschaftlich-technischen Geräten für die weiteren Arbeiten in der jeweiligen Heimat-Institution.

Die erste Phase des Leopoldina-Förderprogramms, die von 1992–1996 dauerte, konnte im Arbeitsprogramm der Leopoldina nach der Wende zur Zufriedenheit auch des Zuwendungsgebers erfolgreich abgeschlossen werden. Nicht nur der Abschlußbericht, sondern auch die beiden eingangs erwähnten Meetings mit den Leopoldina-Förderpreisträgern legen Zeugnis davon ab. Im Zusammenhang mit diesem Programm wurden 24 Promotions-, 10 Habilitations- und 7 Berufungsverfahren durchgeführt bzw. abgeschlossen.

Als Nachfolgeprogramm, quasi die Phase 2 des Leopoldina-Förderprogramms, bot uns das nun in BMBF umbenannte Ministerium an, eine postgraduale Förderung exzellenter, nicht über 35 Jahre alter Nachwuchswissenschaftler aus den Stammländern der Leopoldina durchzuführen. Auch hier standen die naturwissenschaftlichen und medizinischen Fachgebiete im Mittelpunkt, und vorgesehen waren ein- bis dreijährige Forschungsaufenthalte in Spitzeninstituten der ganzen Welt, um dort eigene Forschungsprojekte unter optimalen Bedingungen durchführen zu können. Die Güte, Idee und Realisierbarkeit der jeweiligen Forschungsprojekte sind die Grundlage für eine Vergabe des Stipendiums, und sie werden dementsprechend durch wenigstens vier, zum Teil externe Gutachter und durch den Vergabeausschuß aus Leopoldina-Mitgliedern verschiedener Fachkompetenz beurteilend geprüft und schließlich positiv oder negativ beschieden.

Auch diese 2. Phase des Förderprogramms war für zunächst fünf Jahre vorgesehen (von 1997 bis 2001). Im Ergebnis wurde es formal mit einem Abschlußbericht erfüllt. Es wird derzeit jedoch weitergeführt, da das Programm in seiner Essenz, vielleicht nicht in allen Belangen, zumindest jedoch in den seinen Bedürfnissen und individuellen Ergebnissen erfolgreich ist. Das heutige Meeting gehört also zur Abschlußleistung dieses Jahrfünfts hinzu. Statistisch betrachtet wurden in den ersten fünf Jahren dieses *Post-doc*-Programms die Anträge von etwa 200 Bewerbern den Förderbedingungen entsprechend geprüft und der guten Hälfte der Antragssteller die Förderung, in der Regel für zwei Jahre, zuerkannt. Einiges darüber werden wir in den Vorträgen hören und sehen. Nur am Rande sei erwähnt, daß über 90 % der erfolgreichen Antragssteller führende Forschungsinstitute in den USA gewählt haben.

Erwähnenswert ist ferner, daß zum Förderprogramm nicht nur die mit den Auswahlprozessen verbundene Betreuung der jungen Kollegen gehört, sondern auch eine Nachbetreuung. Wir werden gewiß in der allgemeinen Diskussion und am Schluß der Veranstaltung einige spezifische Punkte diskutieren, auch einige, die uns suboptimal oder bedenkenswert erscheinen.

Als Fazit der vergangenen zehn Jahre resümiere ich, daß das bisherige Leopoldina-Förderprogramm erfolgreich gelaufen ist, wofür wir dem Bundesministerium für Bildung und Forschung außerordentlich dankbar sind. Wir danken besonders auch den Nachwuchswissenschaftlern, die hoffentlich nach der erfolgreichen Förderung auch weiterhin an deutlich

sichtbarer Stelle in der deutschen Wissenschaftslandschaft ihre Lichter leuchten lassen wollen und sollen. Somit ist die Leopoldina nur der Vermittler, wenngleich ein auswählender, differenzierender, entscheidender Vermittler. Genaugenommen fungiert sie als eine angesehene Hülle, aber sie will, trotz ihrer in diesem Jahr gefeierten 350 Jahre nicht als »alte Schachtel« bezeichnet werden. Wir wissen, in jeder Schachtel kommt es auf den Inhalt an, hier auf die Qualität der förderungswürdigen und förderungsbereiten jungen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler.

Schließlich geht mein herzlicher Dank an den Vergabeausschuß, an jene bereitwilligen zwei Dutzend Leopoldina-Mitglieder, die viel Zeit eingesetzt haben, um dem Förderprogramm zu dienen, oft über acht Jahre oder länger hinweg. Mein Dank gilt auch allen Gutachtern, die uns sehr geholfen haben bei der Findung der qualitativ besten Bewerber. Einen ganz besonderen Dank aber möchte ich Herrn Dr. Roland RIEDEL aussprechen, der in wenig spektakulärer, aber dafür in stiller gediegener Mitarbeit das Leopoldina-Förderprogramm über mehr als zehn Jahre betreut hat und uns nun zum Ende dieses Jahres altersmäßig bedingt verlassen wird. Die Vorbereitung dieses Symposiums hat er zusammen mit der Generalsekretärin Frau Professor SCHNITZER-UNGEFUG übernommen; beteiligt war natürlich auch der sogenannte engere Vorvergabeausschuß; insbesondere Herrn Vizepräsident Gunter FISCHER, danke ich sehr herzlich. Für die Nachfolge für Herrn Dr. RIEDEL haben wir uns bereits per Ausschreibung umgesehen, und für meine Nachfolge im Präsidentenamt (das nicht ausgeschrieben wird) darf Herr Professor TER MEULEN dann meinen Part, das heißt den Vorsitz im Vergabeausschuß, übernehmen. So sind also alle Weichen gestellt, damit das Förderprogramm auch in Zukunft seinen guten Weg weitergehen kann.

Ich wünsche Ihnen und uns eine anregende, bereichernde und überzeugende wissenschaftliche Veranstaltung.

Prof. Dr. Dr. h. c. Benno PARTHIER  
Deutsche Akademie der Naturforscher  
Leopoldina  
Postfach 110543  
06019 Halle (Saale)



**Physik**

---

Dr. sc. nat. Peter ENDERS

Studium der Physik an der Humboldt-Universität zu Berlin, Aspirantur an der Staatlichen Lomonossow-Universität Moskau. Promotion zum Dr. rer. nat. über chemische Bindung und Phasenübergänge in IV-VI-Verbindungen; Promotion zum Dr. sc. nat. über Transportvorgänge und nichtlineare optische Effekte in Halbleiterlasern (zusammen mit der *Facultas docendi* als der Habilitation gleichwertige Leitung anerkannt). Auszeichnung mit dem Humboldt-Preis 1978 und dem Leopoldina-Förderpreis 1995. Forschung und Lehre zur Theoretischen Festkörperphysik, Optoelektronik und zu Transportprozessen an der Humboldt-Universität zu Berlin, am Zentralinstitut für Optik und Spektroskopie, am Max-Born-Institut für Nichtlineare Optik und Kurzzeit-Spektroskopie, an der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus. Forschungsaufenthalte in Moskau, Norwich (UK) und Urbana-Champaign (USA). Derzeit bei der Siemens AG, Bereich Information und Kommunikation.

Dr. phil. Dr. rer. nat. Dieter SUIJSKY

Studium der Physik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Aspirantur an der Humboldt-Universität zu Berlin. Promotion zum Dr. phil. über das Raum-Zeit-Problem in der Geschichte der neueren Philosophie; Promotion zum Dr. rer. nat. über Optische Eigenschaften von Halbleitern unter dem Einfluß von äußeren Feldern. Forschungsaufenthalte in Moskau und Sao Paulo. Forschung und Lehre an der Humboldt-Universität zu Berlin zur Theoretischen Halbleiterphysik und zur Wissenschaftstheorie.

## Über das Auswahlproblem in der klassischen Mechanik und in der Quantenmechanik

Peter ENDERS und Dieter SUISKY (Berlin)

### Zusammenfassung

Die Schrödinger-Gleichung läßt sich innerhalb eines axiomatischen Zuganges ableiten, wenn man das Quantisierungsproblem als Auswahlproblem stationärer Zustände formuliert und anstelle der Newtonschen die Eulersche Axiomatik der klassischen Mechanik zugrunde legt. EULER reduzierte die Newtonschen Axiome auf diejenigen, welche die Zustandserhaltung beschreiben, so daß weder die Kraft, noch die Bewegungsgleichung axiomatisch festgelegt sind und alternative Bewegungsgesetze formuliert werden können.

Die stationäre und die nichtstationäre Schrödinger-Gleichung können abgeleitet werden, ohne die üblichen Annahmen über die Natur quantenmechanischer Systeme, wie den Welle-Teilchen-Dualismus oder das Plancksche Wirkungsquantum, zu machen; letzteres ergibt sich aus der Ableitung selbst. Außer der Eulerschen Axiomatik werden vorausgesetzt/benutzt: (a.) die universelle Gültigkeit des Energiesatzes für stationäre Zustände wechselwirkungsfreier Systeme; (b.) HELMHOLTZ' Begründung des Energiesatzes; (c.) WHITTAKERS Integraldarstellungen für die Lösungen gewisser Differentialgleichungen und die daraus resultierenden Rekursionsformeln.

Unsere Ableitung stützt sich auf Ergebnisse von EINSTEIN und SCHRÖDINGER, die die neue Theorie umfassender analysiert haben, als in den späteren Interpretationen deutlich wird. EINSTEINS Annahme (1907), daß der Hauptunterschied zwischen klassischen und Quantensystemen in einer geringeren Anzahl von stationären Zuständen letzterer liegt, wird durch WHITTAKERS Lösungsmethode mathematisch adäquat formuliert. Sie bestätigt den grundlegenden Ansatz SCHRÖDINGERS (1933) über die logischen Beziehungen zwischen klassischer und Quantenmechanik. Dieser kann konsequent fortgesetzt werden, wenn man die Eulersche und die Helmholtzsche Mechanik zugrundelegt und die Bahnen durch die Konfigurationen ersetzt. Das Verhältnis von klassischer und nichtklassischer Theorie wird durch die Voraussetzungen der Ableitung weitgehend festgelegt, deshalb ist die Benutzung von Analogien nicht erforderlich.

### Abstract

The reformulation of »quantization as eigenvalue problem« in terms of »quantization as selection problem« allows to derive SCHRÖDINGER'S stationary equation by a *straightforward* procedure from CM and, subsequently, to acquire the non-stationary equation within the same frame. In contrast to the eigenvalue problem, the selection problem can be formulated and solved without any reference to additional *a priori* assumptions on the nature of the QM system, such as the wave corpuscle duality or an underlying wave equation or the existence of PLANCK'S finite action parameter. The existence of such an additional parameter – as the *only* additional one – is inherent in the procedure.

The key for succeeding this way is given by the following prerequisites. (i) EULER'S representation of CM being essentially different from NEWTON'S axiomatics and allowing for well-defined relations between classical and non-classical theories; (ii) a generalized version of EULER'S method of maxima and minima; (iii) HELMHOLTZ'S treatment of the energy conservation law; (iv), EINSTEIN'S criterion for the difference of energetic spectra of classical systems and atomic aggregates; (v) the reformulation of that criterion in terms of WHITTAKER'S method for representing the solutions to certain types of partial differential equations. The quantization results from the application of two selection criteria. The first one is of purely mathematical origin and allows to select discrete sets from the continuum. The 2<sup>nd</sup> criterion is of purely physical origin and allows to select the only set from the remaining set of solutions.

The relationship between classical and non-classical theories is largely predetermined by the prepositions of derivation; therefore, analogies are not needed. SCHRÖDINGER'S (1933) analysis of the relationship between CM and QM in terms of paths is reinterpreted in terms of configurations.

## 1. Einleitung

Gewöhnlich werden die klassische Mechanik (KM) und die Quantenmechanik (QM) als korreliert betrachtet: »Die Formulierung der Grundsätze der Quantentheorie ist prinzipiell unmöglich, ohne die klassische Mechanik heranzuziehen« (LANDAU und LIFSCHITZ 1966, S. 2). In diesem Satz wird die bekannte Tatsache hervorgehoben, daß die KM eine *notwendige* Voraussetzung der QM ist. Die weiterreichende Frage, ob die KM nicht auch eine *hinreichende* Voraussetzung für die QM sein könnte, wird gewöhnlich weder gestellt, noch ausdrücklich als unzulässig ausgeschlossen. Mit dieser Frage eröffnet sich jedoch ein neues Feld für die Analyse der Beziehungen zwischen der KM und der QM (SUISKY und ENDERS 2001, 2003, ENDERS und SUISKY 2003). Allerdings, und hier zeigt sich die Dimension des Problems, ist es erforderlich, mit einer Kritik der üblichen Darstellung der KM zu beginnen und zu diesem Zwecke auf das Werk von EULER, MAUPERTUIS und D'ALEMBERT zurückzugreifen.

## 2. Newtonsche und Eulersche Axiomatik. Klassische und nicht-klassische Mechanik

EULER, MAUPERTUIS und D'ALEMBERT setzten nicht nur das Newtonsche Werk fort, sondern, und diese Komponente wurde später übersehen, unterzogen die Newtonsche Mechanik ebenso einer radikalen Kritik. Insbesondere ersetzte EULER das Newtonsche durch ein *reduziertes* Axiomensystem, indem er als axiomatische Grundlage der Mechanik ausschließlich die Aussagen des 1. Newtonschen Gesetzes zuließ, dem 2. und dem 3. Gesetz NEWTONS hingegen den axiomatischen Status absprach (EULER 1750). Dieser Schritt vollzog sich vollständig innerhalb der Theorie, ohne auf andere experimentelle Befunde als NEWTON zu rekurrieren. Später analysierten GAUSS, BOLYAI, LOBATSCHESKI und RIEMANN die axiomatischen Grundlagen der Euklidischen Geometrie nach den gleichen Gesichtspunkten und erhielten nicht-Euklidische Geometrien. Mit dem axiomatischen Status des Newtonschen Bewegungsgesetzes entfällt natürlich auch seine absolute Verbindlichkeit, und *alternative Bewegungsgesetze* werden möglich (SUISKY und ENDERS 2001, 2003, ENDERS und SUISKY 2003). Der Übergang von der KM zu einer nicht-KM führt nicht nur zu einer Erweiterung der Theorie, sondern definiert auch ein Auswahlproblem (AWP) zwischen diesen Alternativen.

## 3. Klassische Mechanik versus Spezielle Relativitätstheorie als Auswahlproblem

Das Newton-Eulersche Bewegungsgesetz folgt aus der Annahme (A1), »Die Zustandsänderung ist *unabhängig* vom Zustand«, repräsentiert durch die von EULER angegebene Beziehung  $dv = (K/m)dt$  zwischen der Änderung  $dv$  der Zustandsgröße Geschwindigkeit, der Kraft  $K$ , der Masse  $m$  und dem Zeitelement  $dt$ . Ein alternatives Bewegungsgesetz folgt aus der Annahme (A2), »Die Zustandsänderung ist *nicht unabhängig* vom Zustand«:  $d(vf(v)) = (K/m)dt$ , die zunächst unbekannte Funktion  $f(v)$  repräsentiert diese Abhängigkeit. Sie läßt sich vermittels der üblichen Voraussetzungen über die Homogenität und Isotropie des Raumes bestimmen. Im Ergebnis gelangt man zur Lorentz-Transformation, wobei ebenso wie in MITTELSTAEDT (1995) *nicht* auf die Elektrodynamik zurückgegriffen wird. Unterstellt man in beiden Fällen die Geschwindigkeit als Zustandsgröße, so lautet das hier zugrunde liegende AWP »ENTWEDER (A1), ODER (A2)«.

#### 4. Klassische Mechanik versus Quantenmechanik als Auswahlproblem

Das AWP zwischen KM und QM läßt sich nach den gleichen Prinzipien definieren, wenn man anstelle der Newton-Eulerschen Zustandsgröße Impuls bzw. Geschwindigkeit die *Gesamtenergie* eines konservativen Systems mit HELMHOLTZ (1911) axiomatisch einführt und anstelle der Beziehung zwischen den Bahnen und den Kräften diejenige zwischen der *Energie* und den *Konfigurationen* des Systems analysiert. Hierbei gibt es sechs Fälle: Für *alle zulässigen* Werte der (Impuls-)Konfigurationen gilt

- (I) »ENTWEDER  $E-T(p) \geq 0$ , ODER  $E-T(p) < 0$ « – Helmholtz-Fall zur Definition klassischer Größen;
- (II) » $E-T(p) \geq 0$  UND  $E-T(p) < 0$ « – Helmholtz-Fall zur Definition *nichtklassischer* Größen;
- (III) »WEDER  $E-T(p) \geq 0$ , NOCH  $E-T(p) < 0$ « – keine Mechanik;
- (IV) »ENTWEDER  $E-V(x) \geq 0$ , ODER  $E-V(x) < 0$ « – Umkehrung des Helmholtz-Falles zur Definition klassischer Größen;
- (V) » $E-V(x) \geq 0$  UND  $E-V(x) < 0$ « – Umkehrung des Helmholtz-Falles zur Definition *nichtklassischer* Größen;
- (VI) »WEDER  $E-V(x) \geq 0$ , NOCH  $E-V(x) < 0$ « – keine Mechanik.

Dem entspricht folgende Hierarchie von AWP. Beide Fälle schließen sich jeweils aus – und bedingen einander.

- (1) »ENTWEDER Newtonsche KM, ODER nicht-Newtonsche KM« [(I), (IV)];
- (2) »ENTWEDER KM [(I),(IV)], ODER nicht-KM [(II),(V)];
- (3) »ENTWEDER Mechanik [(I),(II),(IV),(V)], ODER nicht-Mechanik [(III),(VI)]«.

Wenn (I) und (IV) gelten, läßt sich die Energie als Summe bzw. Differenz von kinetischer und potentieller Energie schreiben, Bahnen und Kräfte sind möglich. In der Newtonschen KM wird die Ausdehnung des Systems im Orts- und im Impulsraum durch die Energie begrenzt, z. B.  $E = V(x_{\max}) = T(p_{\max})$  beim Oszillator. Wenn (II) und (V) gelten (nicht-KM), ist eine solche Darstellung der Energie nicht mehr möglich, Bahnen und Kräfte können nicht eingeführt werden, die Energie begrenzt nicht die Ausdehnung. In Verallgemeinerung der Eulerschen Methode der Maxima und Minima definieren wir deshalb  $V_{\text{nkl}}(x) = F(x) \cdot V(x)$ ,  $T_{\text{nkl}}(p) = G(p) \cdot T(p)$ . Die *Begrenzungsfunktionen*  $F(x) = F_E(x)$  und  $G(p) = G_E(p)$  stellen die Beziehung zwischen Ausdehnung und Energie her, gemäß dem Helmholtzschen Prinzip, daß ein System bei Energie-Abgabe bzw. -Aufnahme seine Ausdehnung verändert. Wegen  $F_E(x), G_E(p) \geq 0$  setzen wir  $F_E(x) = |f_E(x)|^2$ ,  $G_E(p) = |g_E(p)|^2$ . Des weiteren gibt es ohne Bahnen keine Anfangswerte als ausgezeichnete (Impuls-)Konfigurationen, mithin sind *alle* (Impuls-)Konfigurationen *gleichberechtigt*. Die nicht-klassische Darstellung des Energiesatzes ergibt sich daher durch Integration der Größen  $V_{\text{nkl}}(x)$  und  $T_{\text{nkl}}(p)$  über den gesamten Orts- bzw. Impulsraum. Durch Elimination der Funktion  $g_E(p)$  bzw.  $f_E(x)$  gelangen wir zur Orts- und zur Impuls-Darstellung der stationären Schrödinger-Gleichung. Die Energie sowie  $g_E(p)$  und  $f_E(x)$  sind durch diese als *interne* Systemgrößen bestimmt.

## 5. Quantisierung als Auswahlproblem

Nach SCHRÖDINGER (1926) ist die *Quantisierung als Eigenwertproblem* nicht allein durch die Schrödinger-Gleichung selbst gegeben, sondern auch durch ihre Lösung in Analogie zum klassischen Eigenwertproblem. *Quantisierung als Auswahlproblem* meint dagegen, daß bestimmte Werte des Energieparameters aus der gesamten Lösungsmannigfaltigkeit *ohne* Kenntnis, d. h. ohne vorherige Berechnung der Wellenfunktion auszuwählen sind. Dazu benutzen wir für das Modellsystem linearer harmonischer Oszillator die aus ihrer Integral-Darstellung (WHITTAKER und WATSON 1927, 16.5) resultierenden Rekursionsbeziehungen zwischen den Wellenfunktionen, aus denen sich zunächst ein *mathematisches* AWP ergibt. Dieses besteht jedoch nicht – wie in HELMHOLTZ (1911) und MITTELSTAEDT (1995) – hinsichtlich des Vorzeichens, sondern hinsichtlich *der Auswahl einer diskreten Menge von abzählbar unendlich vielen Elementen* aus einem Kontinuum von Parameterwerten, in Übereinstimmung mit EINSTEINS (1907) Kriterium über die Differenz zwischen klassischen Systemen und atomaren Aggregaten. Die von WHITTAKER 1903 gefundene Darstellung gilt für *alle* Lösungen, nicht nur für die Schrödingerschen Eigenlösungen: Die quantenmechanische Diskretheit ist *unabhängig von den Randbedingungen*. Für die Auswahl der physikalischen aus den mathematisch äquivalenten Lösungsmengen ist erneut ein *physikalisches* Kriterium erforderlich, in diesem Fall die Unmöglichkeit eines *perpetuum mobile*.

## 6. Diskussion

Die hier vorgeschlagene Analyse und Ableitung nebst Lösung der stationären Schrödinger-Gleichung geht nicht von der Analogie von Wellen- und Strahlenoptik aus, auf der nicht nur die Grundlegung der Wellenmechanik (SCHRÖDINGER 1926), sondern auch die spätere Schrödingersche Analyse des Verhältnisses von KM und QM (SCHRÖDINGER 1933) beruht. Sie ist damit auch unabhängig von der Hamiltonschen Mechanik oder der Annahme einer Wellengleichung (die Hamiltonschen Gleichungen lassen sich aus der Eulerschen Axiomatik ableiten). Die stationäre Schrödinger-Gleichung läßt sich aus der KM allein mit Hilfe der Eulerschen Axiomatik und der Helmholtzschen Begründung des Energiesatzes ableiten. Ein Parameter von der Dimension einer Wirkung – als *einzig* zusätzliche Größe – ergibt sich aus der Ableitung selbst. Die nicht-stationäre Schrödinger-Gleichung läßt sich auf methodisch ähnliche Weise ableiten. Dieses Vorgehen ermöglicht es nicht zuletzt, drei bereits von SCHRÖDINGER (1926) genannte Probleme zu entscheiden, die der schnelle und durchschlagende Erfolg der Wellenmechanik in Vergessenheit geraten ließ:

- Die stationäre Schrödinger-Gleichung sollte »die Quantenbedingungen in sich selbst tragen« (unabhängig von den Randbedingungen);
- Es sollte eine spezielle Lösungsmethode für diese Art von Differentialgleichungen geben, die der nichtklassischen Natur der Quantisierung Rechnung trägt (also verschieden von den üblichen Methoden für Eigenwertprobleme ist);
- Es sollte eindeutig feststehen, daß die Energie- und nicht die Frequenzwerte diskretisiert sind.

Das Verhältnis von klassischer und nichtklassischer Theorie wird durch die Voraussetzungen der Ableitung weitgehend festgelegt, deshalb ist die Benutzung von Analogien nicht mehr erforderlich.

### *Dank*

P. E. dankt der Leopoldina für die Verleihung des Leopoldina-Förderpreises, der u. a. einen Arbeitsaufenthalt in Urbana-Champaign (USA) ermöglichte. Wir danken Herrn Dr. HECHT, der unsere Aufmerksamkeit auf die Mechanik des 18. Jahrhunderts gelenkt hat, Frau Prof. FALKENBURG für den Hinweis auf die Analysen von MITTELSTAEDT und Herrn Prof. NOLTING für sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

### *Literatur*

- EINSTEIN, A.: Die Plancksche Theorie der Strahlung und die Theorie der spezifischen Wärme. *Ann. Phys.* 22, 180–190 (1907)
- ENDERS, P., und SUIISKY, D.: Einführung in die Quantenfeldtheorie des Festkörpers. (2003, in Vorbereitung)
- EULER, L.: *Opera Omnia*, ser. II, vol. 3 und 4. Zürich und Basel: 1911–1986
- HELMHOLTZ, H. VON: Vorlesungen über die Dynamik discreter Massenpunkte. 2. Aufl. Leipzig: Barth 1911
- LANDAU, L. D., und LIFSCHITZ, E. M.: *Lehrbuch der Theoretischen Physik*. Bd. III. Berlin: Akademie-Verlag 1966
- MITTELSTAEDT, P.: *Klassische Mechanik*. Mannheim: Bibliographisches Institut 1995
- SCHRÖDINGER, E.: Quantisierung als Eigenwertproblem. *Ann. Phys.* 79, 361–376 (Erste), 79, 489–527 (Zweite), 80, 437–490 (Dritte), 81, 109–139 (Vierte Mitt.) (1926)
- SCHRÖDINGER, E.: The fundamental idea of wave mechanics. Nobel Award Lecture (1933)
- SUIISKY, D., and ENDERS, P.: Leibniz' foundation of mechanics and the development of 18<sup>th</sup> century mechanics initiated by Euler. In: POSER, H. (Ed.): *Nihil sine ratione*. Proc. VII Intern. Leibniz Congress, Berlin (2001)
- SUIISKY, D., and ENDERS, P.: On the derivation of the Schrödinger equation. Quantization as selection problem. 5<sup>th</sup> Int. Conf. *Fundamentals of Frontiers in Physics*, Hyderabad (2003) (wird publiziert).
- WHITTAKER, E. T., and WATSON, G. N.: *A Course of Modern Analysis*. 4. Aufl. Cambridge: Cambridge Univ. Press (1927)

Dr. Peter ENDERS  
Fischerinsel 2 / 0107  
10179 Berlin  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 30 38624941  
Fax: +49 30 20450217  
E-Mail: peter.enders@bln1.siemens.de

---

Dr. rer. nat. Christian FRISCHKORN

Geboren 1966 in Frankfurt am Main. 1986 bis 1993 Physikstudium an der Technischen Hochschule Darmstadt. 1993 bis 1994 Gastaufenthalt am *Joint Laboratory for Quantum Optics* der *East China Normal University* und des *Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics* der *Academia Sinica* in Shanghai, China. 1994 bis 1997 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Strömungsforschung, Abteilung Atom- und Molekülphysik, in Göttingen. 1997 Promotion zum Dr. rer. nat. über Photodissoziation von Wasserstoffhalogeniden und deren Clustern. 1998 bis 2000 Forschungen als Post-Doktorand am *Chemistry Department* der *University of California*, Berkeley. Seit Ende 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Experimentalphysik der Freien Universität Berlin.

## Ultraschnelle Dynamik der Elektronen-Solvatisierung in endlichen Systemen

Christian FRISCHKORN (Berlin)

Mit 13 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

Die Solvatisierungsdynamik von Elektronen in endlichen Systemen, wie in Clustern oder in dünnen Adsorbatschichten auf Metalloberflächen, wurde mit zeitaufgelöster Pump-Probe-Photoelektronenspektroskopie untersucht. Auf der Femtosekunden-Zeitskala konnte dabei ein mikroskopisches Verständnis über die Prozesse gewonnen werden, die zur Stabilisierung eines Überschusselektrons beitragen.

In Clusterexperimenten mit negativ geladenen Iodionen, eingebettet in verschiedene Lösungsmittelumgebungen (Wasser, Ammoniak, Methanol und Xenon), konnten die Zeitkonstanten für die Solvatisierung untersucht und auch die Frage nach einer eventuellen Mindestgröße beantwortet werden, die ausreicht, um ein Elektron mit begrenztem Solvatnetzwerk zu solvatisieren.  $\Gamma(\text{H}_2\text{O})_n$  stellt hier ein Modellsystem dar, da ein klarer Schwellenwert für die Solvatisierung gefunden wurde. Bis zum Tetramer ( $n = 4$ ) kann das angeregte Elektron zwar aufgrund des Dipolmoments des Solvatnetzwerks gehalten, aber nicht durch Umstrukturierung solvatisiert werden. Für  $n \geq 5$  hingegen führt die durch Rotationsbewegungen eingeleitete Isomerisierung der Clusterkonfiguration zur Solvatisierung des Elektrons. Die Variation der Polarität und der Art der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Lösungsmittelteilchen zeigt deutlichen Einfluß auf die Solvatisierungsdynamik.

In Experimenten an Adsorbat-Metall-Grenzschichten wurde die Auswirkung der Dimensionsbegrenzung auf die ultraschnelle Dynamik des Elektronentransfers und der Solvatisierung untersucht. Dabei werden Elektronen aus einem Kupfersubstrat in eine darauf adsorbierte Wasserschicht (Eis) injiziert. Die beobachtete Dynamik weist Ähnlichkeiten zur Solvatisierung in Clustern auf, eröffnet aber durch kontrollierte Substrat- und Adsorbatveränderungen (Substratmaterial, Oberflächenbeschaffenheit, Adsorbatschichtdicke) die Möglichkeit, die Elektronen-Solvatisierung in niedrigdimensionalen Systemen gezielt zu beeinflussen.

### *Abstract*

The solvation dynamics in finite systems, e. g. in clusters or thin adsorbate layers on metal surfaces, have been studied by time-resolved photoelectron spectroscopy. On a femtosecond timescale, a microscopic-level understanding of the processes involved in the stabilization of excess electrons was developed.

In cluster experiments with the iodine anion embedded in different solvents (water, ammonia, methanol, xenon), the time constants of the solvation dynamics were addressed as well as the question of a minimum solvent cluster size needed to solvate an electron.  $\Gamma(\text{H}_2\text{O})_n$  serves as model system, since a clear solvation threshold in the cluster size was found. Up to the tetramer ( $n = 4$ ), the initially excited electron is bound due to the collective dipole moment, but not stabilized, i.e. solvated by solvent rearrangement. Contrary for  $n \geq 5$ , the excess electron is solvated by an isomerization process induced by the librational-rotational motion of the solvent molecules. The variation of the solvent polarity and the intermolecular interaction within the solvent influences the observed solvation dynamics.

Experiments on adsorbate-metal interfaces show the influence of a reduced dimensionality on the ultrafast dynamics of electron localization and solvation. Here, electrons are injected from a copper substrate into an adsorbed water (ice) layer. The observed dynamics exhibit similarities to the solvation in clusters. However, a systematic variation of substrate and adsorbate (substrate material, surface properties, thickness of the adsorbate layer) offers the possibility to manipulate electron solvation in low dimensional systems to a certain extent.

## 1. Einleitung

Die Wechselwirkung zwischen Überschusselektronen und umgebenden Lösungsmittelteilchen ist von fundamentalem Interesse in Physik, Chemie und Biologie. Ursprünglich freie Elektronen können durch Reorganisation polarer Solvatmoleküle eingefangen und stabilisiert (solvatisiert) werden. Das breite Spektrum der Bereiche, in denen solvatisierten Elektronen eine besondere Bedeutung zukommt, reicht von Ladungstransferprozessen und ladungsinduzierter Reaktivität über Strahlungschemie und Umweltwissenschaften bis hin zur Astrophysik. Die Geschichte und Entwicklung der Untersuchungen an und mit solvatisierten Elektronen weist ihre eigene Besonderheit auf: Noch vor der eigentlichen Entdeckung des Elektrons wurden Phänomene, die auf solvatisierte Elektronen zurückzuführen sind, bei Lösungsexperimenten von Metallen in flüssigem Ammoniak schon Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben (WEYL 1864). Anfang des 20. Jahrhunderts ordnete KRAUS jene Beobachtungen »ammonisierten«, d. h. in Ammoniak gelösten Elektronen zu (KRAUS 1908). Stimuliert wurde das Interesse an solvatisierten Elektronen durch die Entdeckung hydratisierter, d. h. im biologisch weitaus wichtigeren Lösungsmittel Wasser gelöster Elektronen (HART und BOAG 1962). Dementsprechend findet man eine reichhaltige Literatur zu experimentellen und theoretischen Arbeiten zum Phänomen der Elektronen-Solvatisierung in der kondensierten Phase. Zu einem mikroskopischen Verständnis der bei der Solvatisierung relevanten Prozesse haben in den letzten Jahren zeitaufgelöste Arbeiten mit ultraschnellen Pump-Probe-Laserspektroskopiemethoden beigetragen. Dabei kann die Dynamik der Umordnung von Lösungsmittelmolekülen auf Femto- und Pikosekunden-Skala ( $10^{-15}$  s bzw.  $10^{-12}$  s) zeitaufgelöst werden. Jedoch konzentrierten sich die meisten Studien auf die kondensierte Phase, ein in allen drei Dimensionen unendliches System. In diesem Beitrag werden Untersuchungen an endlichen Systemen vorgestellt, die zeigen daß die Begrenzung des Solvatverbundes durch eine endliche Anzahl zur Verfügung stehender Lösungsmittelteilchen (d. h. in Clustern) oder durch Dimensionsbegrenzung auf zwei Raumrichtungen (d. h. in dünnen Adsorbatschichten auf Metalloberflächen) Besonderheiten der Elektronen-Solvatisierung hervorruft. In den folgenden Abschnitten sollen die Untersuchungen an Clustern und an Adsorbatschichten getrennt behandelt werden. Zunächst wird jedoch die bei den dargestellten Clusterexperimenten verwendete experimentelle Methode näher beschrieben.

## 2. Experiment

In der Femtosekunden-Photoelektronenspektroskopie (FPES) wird mit einem ultrakurzen Pump-Laserpuls das Ausgangssystem (Cluster bzw. Moleküle) in einen nicht-stationären Zustand gebracht. Ein zeitlich verzögerter Femtosekunden-(fs)-Probepuls löst daraufhin Photoelektronen (PE) aus, deren kinetische Energie mit Hilfe eines Flugzeitspektrometers bestimmt wird. Die Dynamik des anfänglich präparierten Zustands kann somit als Funktion der eingestellten Verzögerungszeit zwischen Pump- und Probepuls nachverfolgt werden, wobei die zeitaufgelösten PE-Spektren energetische »Schnappschüsse« des untersuchten Systems darstellen (Abb. 1). Der Vorteil der Photoelektronenspektroskopie als Abfrage-Methode in einem zeitaufgelösten Experiment liegt darin, daß der Probepuls nicht wie in resonanten Methoden (z. B. laserinduzierter Fluoreszenz) durchgestimmt werden muß.

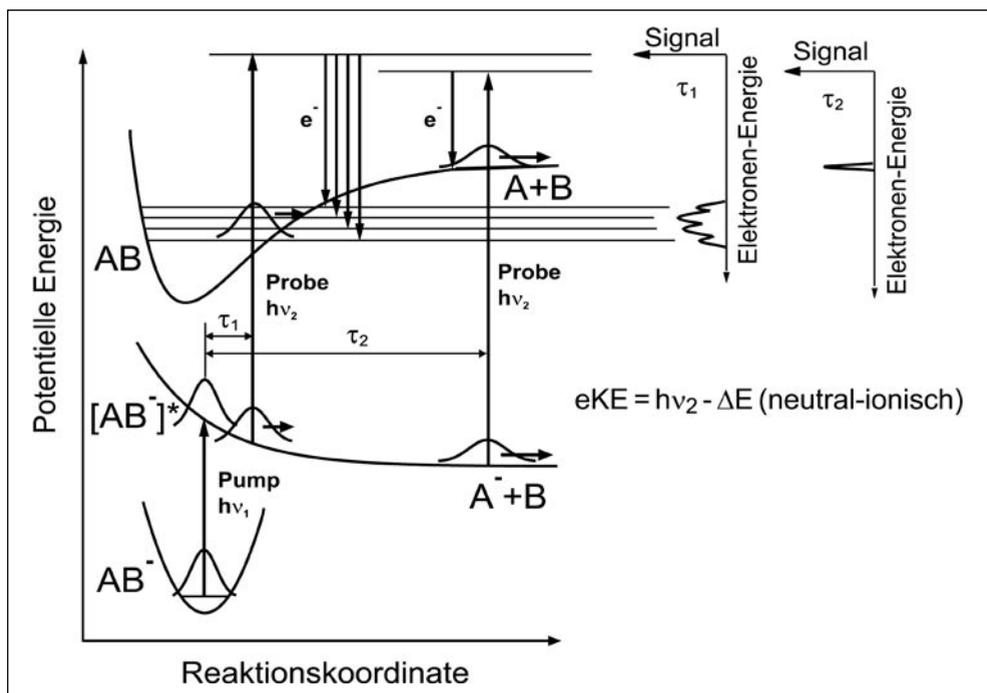


Abb. 1 Methode der zeitaufgelösten Femtosekunden-Photoelektronenspektroskopie. Mit dem Pumpuls der Energie  $h\nu_1$  wird aus dem anionischen Anfangszustand  $AB^-$  ein Wellenpaket auf der Potentialfläche des angeregten Zustands  $AB^-*$  erzeugt, das dann eine Zeitspanne  $\tau_1$  propagiert bis der Probestuls  $h\nu_2$  das Elektron ablöst. Entsprechend dem neutralen Endzustand spiegelt sich die im System deponierte Überschussenergie in der kinetischen Energie der Photoelektronen  $eKE$  wider.

In den Clusterexperimenten dient das Iod-Anion  $I^-$  als Elektron-Träger. Die energetische Zugänglichkeit durch den abgedeckten Wellenlängenbereich des Titan-Saphir-Lasersystems und die Vergleichsmöglichkeit mit entsprechenden Messungen in der kondensierten Phase bestimmt dabei die Auswahl des Anions. Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau der Clusterstrahlapparatur (ZANNI 1999), in der die entsprechenden Cluster erzeugt, massensepariert und schließlich mit den fs-Laserpulsen (Pump und Probe) zur Wechselwirkung gebracht werden. Zur Erzeugung der Cluster wird ein Trägergas (Ar oder  $N_2$ ) im Falle der flüssigen Lösungsmittel (Wasser, Methanol) zuerst über ein Reservoir desselben und anschließend über einen Vorratsbehälter mit Methyljodid ( $CH_3I$ ) geleitet. Bei den gasförmigen Substanzen (Ammoniak, Xenon) wird eine entsprechende Vormischung mit dem Trägergas verwendet. Die in einer Überschallexpansion durch Abkühlung entstandenen Cluster werden mittels Elektronenbeschuss ionisiert und mit gepulsten Abzugs- und Beschleunigungsspannungen in einem Flugzeit-Massenspektrometer nach ihrer Clustergröße separiert. Im Fokus des Photoelektronenspektrometers kommt es zum zeitlichen und räumlichen Überlapp mit den fs-Laserpulsen. Die optische Seite des Experiments basiert auf einem Titan-Saphir-Oszillator mit regenerativem Verstärker (Abb. 3). Der Oszillator seinerseits wird von einem diodengepumptem Festkörperlaser gepumpt und liefert in Pulszügen von 76 MHz Lichtpulse mit 5 nJ Pulsenergie und 65 fs Pulslänge. In einer typischen Verstärkeranordnung durch *Chirped Pulse Amplification* (CPA) werden mittels

zeitlicher Pulsstreckung, Verstärkung und Rekompresseion Ausgangspulsenergien im Bereich von 1 mJ bei einer Repetitionsrate von 500 Hz erreicht. Verschiedene Frequenzkonversionseinheiten erlauben die nötige Durchstimmbarekeit vom ultravioletten (UV) bis hin zum nahen infraroten (IR) Spektralbereich. Zur Anregung der anionischen Ausgangscluster dient die 3. Harmonische (HG) des Lasersystems (Pumpimpuls bei 260–273 nm), die Ablösung des Photoelektrons (*detachment*) erfolgt mit der Fundamentalen (Probepuls bei 780–820 nm). Bei den entsprechenden Messungen an  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$ - und  $\Gamma(\text{Xe})_n$ -Clustern kommt ein optischer parametrischer Verstärker (OPA, 4HG des Signals: 320–370 nm) zum Einsatz. Die Intensität der durch die fs-Laserpulse ausgelösten Photoelektronen wird in einem Spektrometer mit magnetischer Flasche detektiert (CHESHNOVSKY et al. 1987), wobei durch die spezielle Anordnung von inhomogenen und homogenen Magnetfeldern eine hohe Kollektionseffizienz der Elektronen von  $> 50\%$  erreicht wird. Bei Variation der Verzögerungszeit  $\tau$  zwischen den beiden Laserpulsen mittels computergesteuerten Verschiebetisch (3  $\mu\text{m}$  zusätzliche Wegstrecke entsprechen 10 fs Zeitunterschied) zeigen die gemessenen Flugzeitverteilungen der Photoelektronen die zeitliche Entwicklung des durch den Pumpimpuls bevölkerten elektronischen Zustands des Clusters. Typische Flugzeitverteilungen und die daraus bestimmten Energiespektren, d. h. die kinetische Energie der Elektronen, sind als FPE-Spektren in Abbildung 4 beispielhaft für verschiedene Werte von  $\tau$  dargestellt. Um neben einer Energieverschiebung eine verlässliche Aussage über zeitliche Intensitätsveränderungen zu erhalten, müssen die gemessenen Flugzeitverteilungen auf ein Referenzsignal normiert werden. Ein Lichtzerhacker (*chopper*) wird zu den Pulszügen so synchronisiert, daß abwechselnd die rote Fundamentale (800 nm) und die blaue zweite Harmonische (SHG – *second harmonic generation*) als Probepuls durchgelassen und auf

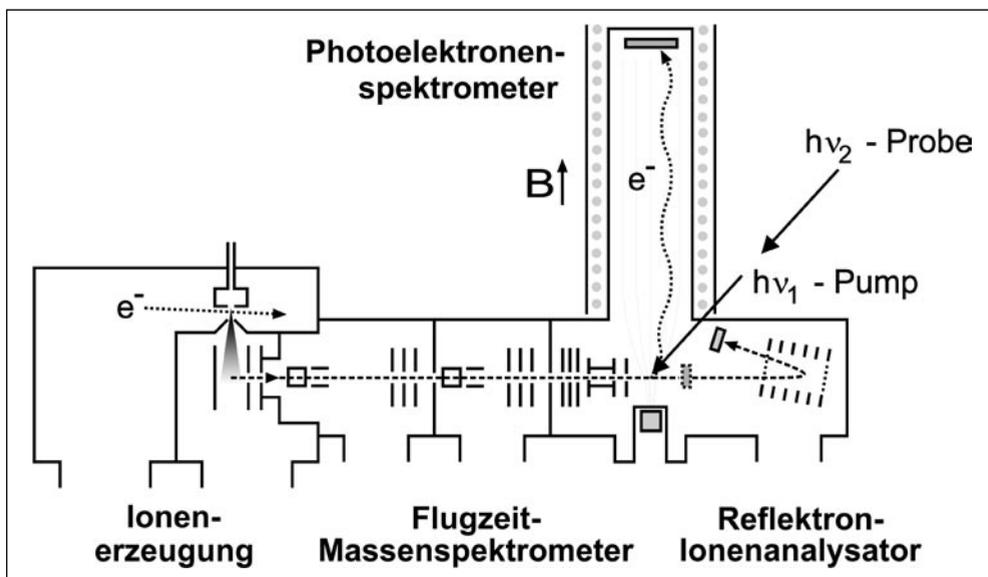


Abb. 2 Schematische Seitenansicht der Clusterstrahlapparatur mit Ionenerzeugung, Flugzeit-Massenspektrometer, das die Größenseparation ermöglicht, und Photoelektronenspektrometer, das die Flugzeitverteilung der durch den Probepuls abgelösten Elektronen aufzeichnet. Mit dem hinter der Wechselwirkungszone liegenden Reflektron-Ionenanalysator kann eine eventuell auftretende laserinduzierte Fragmentation der Ausgangscluster festgestellt werden.

die Clusterpakete im Wechselwirkungsvolumen des Spektrometers fokussiert werden. Das über etliche Tausend Laserschüsse gemittelte FPE-Spektrum weist demzufolge neben dem eigentlichen,  $\tau$ -abhängigen Meßspektrum ein zusätzliches Signal auf, das vom UV-Pumpuls und bei festem, aber mit positiver Verzögerungszeit eingestelltem SHG-Probepuls stammt. Experimentelle Schwankungen (z. B. der Laserschußintensität), die sich als Fluktuationen im integrierten Referenzsignal bemerkbar machen, können somit rechnerisch weitgehend eliminiert werden (FRISCHKORN et al. 2000).

### 3. Elektronen-Solvatisierung in Clustern

Experimente an gröÑenselektierten Clustern ermöglichen die Beobachtung, wie sich im Übergang vom einzelnen Atom bzw. Molekül zur kondensierten Phase die physikalischen und chemischen Eigenschaften als Funktion der Teilchenzahl ändern. Cluster stellen mit ihrer begrenzten Anzahl von Solvateilchen (finites System) sogenannte »Mikrolösungen« dar. Ziel unserer Experimente war es, die Dynamik des Ladungstransfers bei der Solvatisierung in Abhängigkeit von Clustergröße und -art zeitaufgelöst zu verfolgen: Gibt es eine Mindestanzahl von Solvateilchen, d. h. eine Mindestclustergröße, die notwendig ist, um ein Elektron

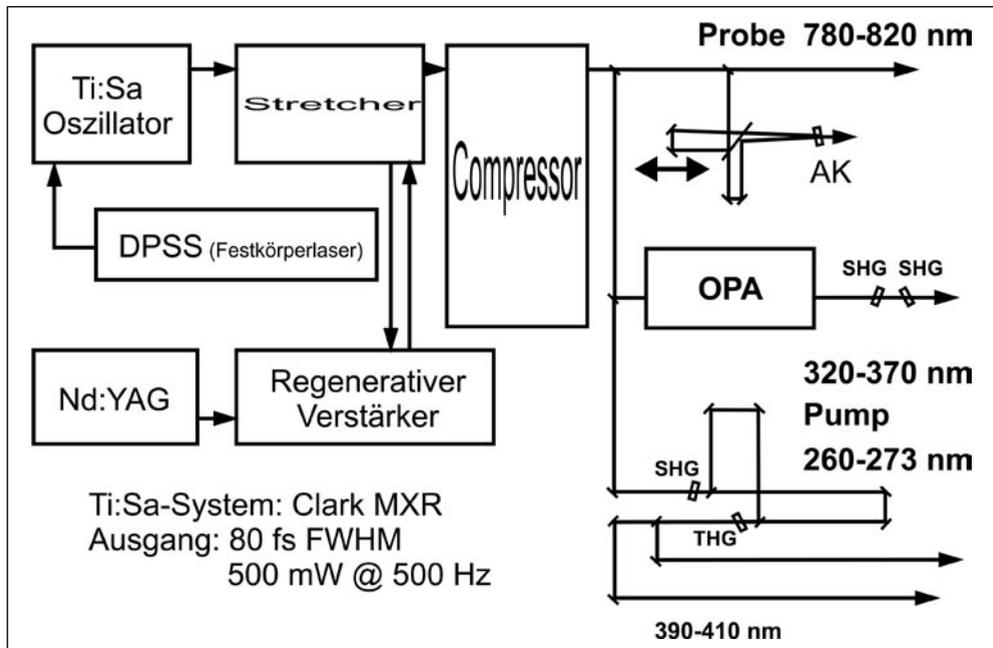


Abb. 3 Femtosekunden-Lasersystem: Ein diodengepumpter Festkörperlaser (DPSS – diode pumped solid state) pumpt den Titan-Saphir (Ti:Sa)-Oszillator, dessen fs-Pulse zeitlich gestreckt (*Stretcher*), regenerativ verstärkt und wieder komprimiert (*Compressor*) werden. Alternativ dienen entweder die 3. Harmonische der Fundamentalen oder der frequenzvervierfachte Ausgang eines optisch-parametrischen Oszillators zur Anregung der Cluster. Als Probepuls wird die Fundamentale verwendet, die im Rahmen des Ti:Sa-Oszillators durchstimmbar ist und deren zeitliche Länge mittels Intensitätsautokorrelation (AK) bestimmt werden kann.

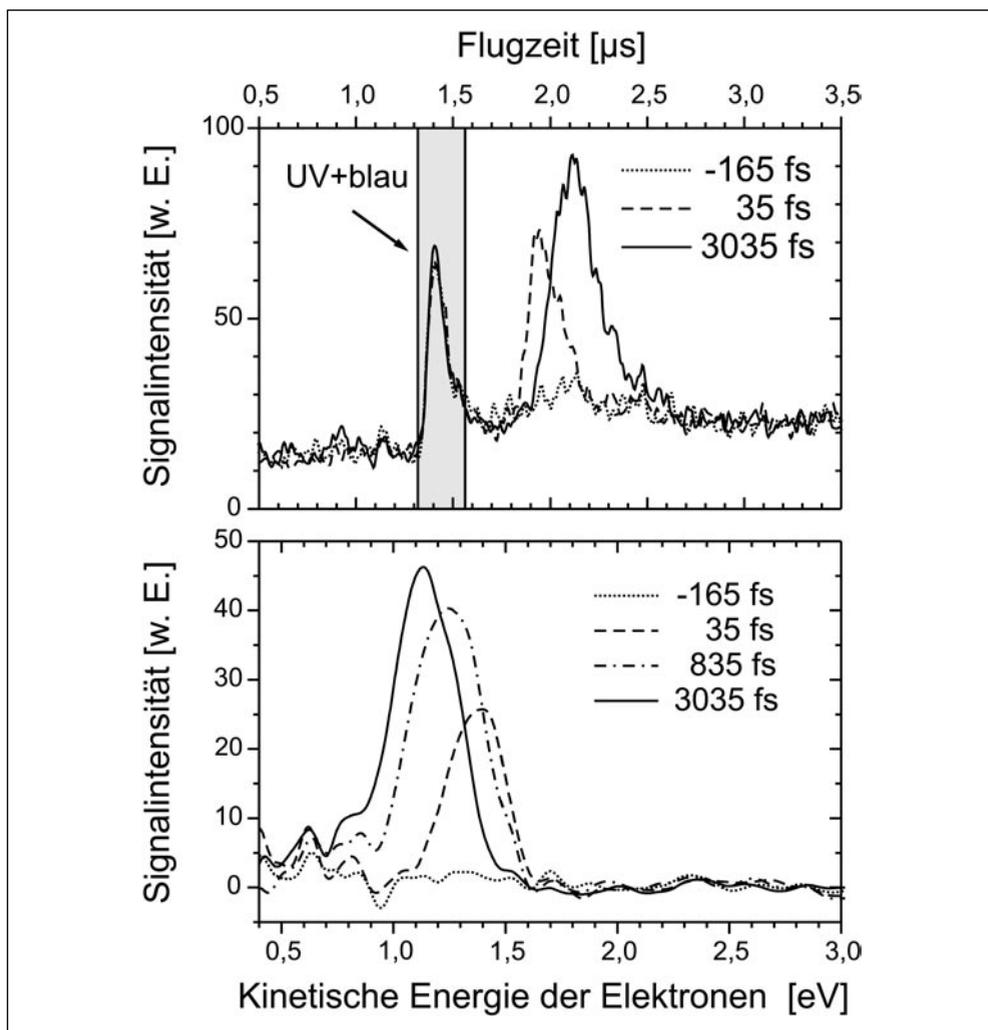


Abb. 4 Exemplarische Flugzeitverteilungen und die daraus resultierenden Energiespektren bei verschiedenen Pump-Probe-Verzögerungszeiten. Negative Werte bedeuten, daß der Abfragepuls zeitlich vor dem Anregungspuls liegt. Zur Intensitätsnormierung werden alternierend zwei unterschiedlich farbige Probepulse eingestrahlt. Zum Vergleich der eigentlichen Meßspektren wird der markierte Referenzbereich integriert und bei der Skalierung der absoluten Signalintensität berücksichtigt. (Veränderter Nachdruck aus FRISCHKORN et al. 2000, mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.)

zu solvatisieren? Informationen über typische Reorganisationszeiten im Cluster und über die Art von Molekülbewegungen, die involviert sind, geben im Vergleich mit entsprechenden Messungen an der kondensierten, flüssigen Phase (*bulk*) ein komplementäres Verständnis von den mikroskopischen Vorgängen in den Anfangsstadien der Elektronen-Solvatisierung. Eine elegante Möglichkeit, solche solvatisierten Elektronen zu erzeugen, besteht in der Anregung sogenannter *Charge-transfer-to-solvent*(CTTS)-Bänder, bei denen das Überschußelektron

vom Ladungsträger in den Solvatverbund übertragen wird. Solche elektronischen Bänder, die durch eine konzertierte Aktion von mehreren Lösungsmitteltelchen entstehen, sind in der kondensierten Phase seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt (FRANCK und SCHEIBE 1928) und seit wenigen Jahren auch in finiten Systemen beobachtet und in der Frequenzdomäne untersucht worden (Forschungsgruppen von M. JOHNSON, Yale, z. B. SERXNER et al. 1996, bzw. von O. CHESHNOVSKY, Tel Aviv, z. B. MARKOVICH und CHESHNOVSKY 1994).

### 3.1 Wassercluster $\Gamma(H_2O)_n$ und $\Gamma(D_2O)_n$

Die Solvatisierung des Überschusselektrons in Wasserclustern stellt ein Modellsystem dar und soll aufgrund eines deutlich ausgeprägten Schwelleneffekts im Solvatisierungsvermögen und der konsistenten Interpretation am ausführlichsten beschrieben werden. Abbildung 5 zeigt FPE-Spektren von verschiedenen Clustergrößen mit regulärem und deuteriertem Wasser als zweidimensionale Konturgrafiken (LEHR et al. 1999). Dabei wird die Signalintensität farbkodiert als Funktion der kinetischen Energie der Elektronen (eKE – *elektron kinetic energy*) und der Pump-Probe-Verzögerungszeit aufgetragen. Es ist eine deutliche Veränderung der PE-Spektren zwischen den Clustergrößen  $n = 4$  und  $n \geq 5$  erkennbar. Für  $n = 4$  bleiben Form und Zentrum des Spektrums zeitlich weitgehend konstant, die integrierte Intensität steigt mit zunehmender Verzögerungszeit  $\tau$  steil an, erreicht bei  $\tau = 200$  fs ihr Maximum und klingt schließlich mit einer Zeitkonstante von wenigen Pikosekunden (ps) ab. Wir erklären dieses Verhalten damit, daß das Überschusselektron vom Iod-Anion in einen dipolgebundenen, hoch delokalisierten Zustand angeregt wird und dieser Zustand dann über einen Schwingungs-Selbstablöseprozeß (*vibrational autodetachment*) zu  $I(^2P_{3/2}) \cdot (D_2O)_4 + e^-$  zerfällt. Die nach der Anregung durch das Pumpphoton vorliegende, überschüssige Vibrationsenergie wird in kinetische Energie des Photoelektrons transferiert. Im Gegensatz dazu findet bei den größeren Clustern mit  $n \geq 5$  nach den ersten 300–400 fs, in denen das PE-Spektrum in Intensität zwar zunimmt, aber in Lage und Form konstant bleibt, eine deutliche Verschiebung des Spektrums zu kleineren kinetischen Energien hin statt. Weiterhin beobachten wir bei diesen Clustergrößen ein nicht-monotones Intensitätsverhalten. Das erste Intensitätsmaximum wird nach Einsetzen der Energieverschiebung von einem zweiten weitaus übertroffen. Nach Anregung der Cluster in einen anfänglich dipolgebundenen CTTS-Zustand findet eine Neuorientierung (Isomerisierung) der Solvatmoleküle statt, um so das vom Iod-Rumpf abgelöste, »diffuse« Elektron wieder zu lokalisieren, d. h. lösen zu können.

Diese Interpretationen sind konsistent mit Strukturberechnungen von Halogen-Ionen in Wasserclustern z. B. der Jortner-Gruppe in Tel Aviv (COMBARIZA et al. 1994), die Oberflächenplätze des Halogen-Ions mit einem ausgerichteten Wassernetzwerk und großen Dipolmoment ergeben. Ein qualitatives Schema der beschriebenen Prozesse wird in Abbildung 6 gegeben. Auf der linken Bildseite sind exemplarische Potentialflächen für die anionischen und neutralen Cluster dargestellt. Für Pentamer und Hexamer findet nach der anfänglichen Anregung in einen dipolgebundenen Zustand eine Isomerisierung zu einer Clusterstruktur mit niedrigerem Potentialminimum statt. Das Elektron ist damit stärker gebunden, was sich in der gemessenen, kleineren eKE widerspiegelt. Darüber hinaus findet sich eine sehr gute Übereinstimmung mit Wirkungsquerschnittsmessungen von zwei existierenden, unterschiedlichen  $(H_2O)_6^-$ -Konfigurationen (BAILEY und JOHNSON 1997), mit deren Hilfe das Intensitätsverhalten unserer PE-Spektren verständlich wird. Auf der rechten Seite von Abbildung 6 ist dieser elektronenstabilisierende Umordnungsprozeß der Wassermoleküle für  $n = 6$  anschaulich gemacht. Der Pumpimpuls läßt

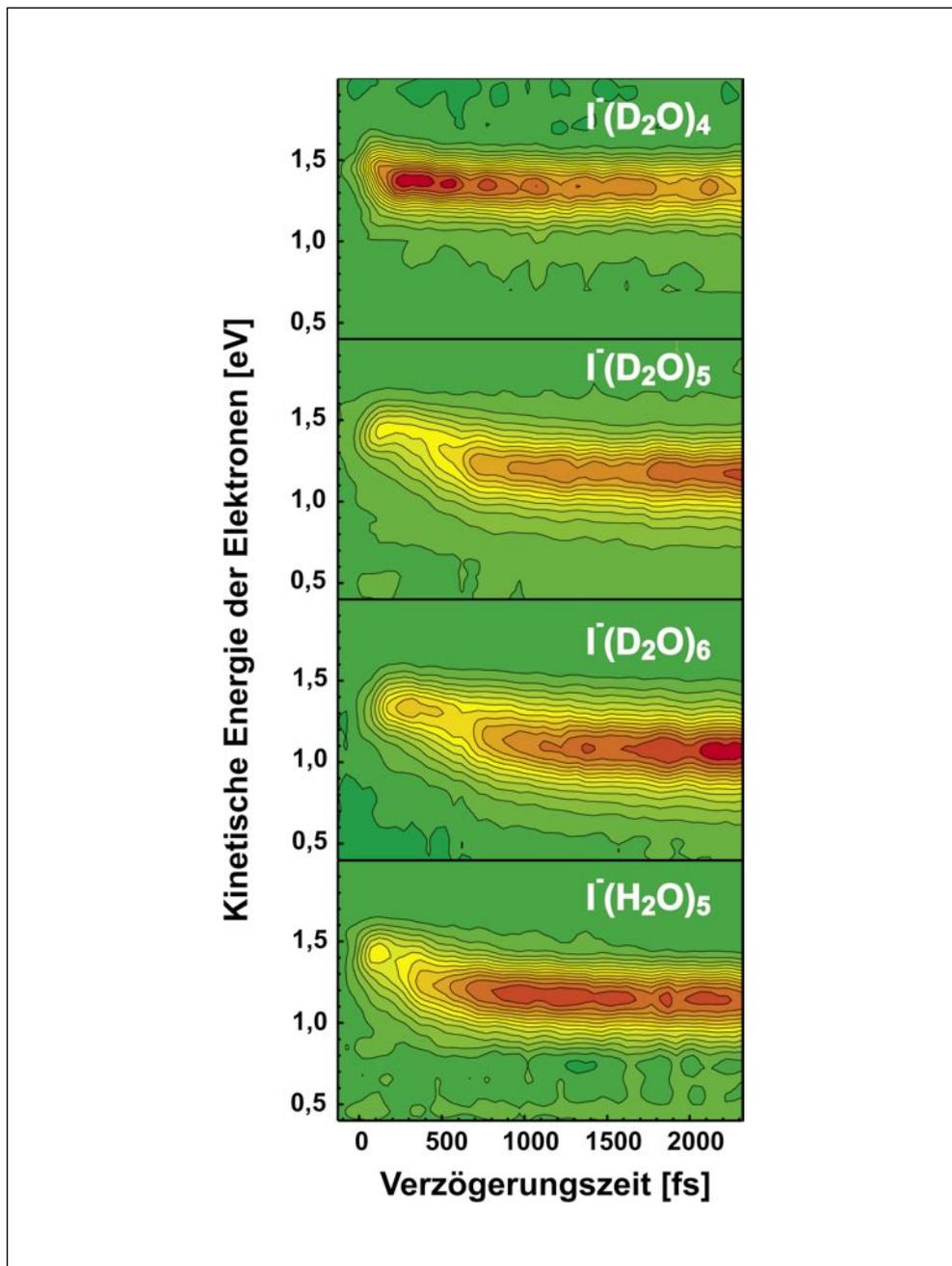


Abb. 5 FPE-Spektren von  $I^-(D_2O)_{n=4,5,6}$  und  $I^-(H_2O)_5$  als zweidimensionale Konturdarstellung. Die Signalintensität ist farbkodiert als Funktion der kinetischen Energie der Photoelektronen und der Pump-Probe-Verzögerungszeit aufgetragen. Rot bedeutet hohe, grün niedrige Intensität. Schnitte längs der Energieachse ergeben die ursprünglichen Energiespektren, analog zu der Darstellung in Abb. 4. (Veränderter Nachdruck aus LEHR et al. 1999, mit freundlicher Genehmigung der American Association for the Advancement of Science)

das Solvatnetzwerk unbeeinflusst und delokalisiert das Elektron. Die Wasserdipole reagieren auf die veränderte Ladungsverteilung und ordnen sich so um, daß das Elektron wieder mehr lokalisiert, d. h. solvatisiert wird. Aus Isotopenaustausch-Experimenten werden Informationen über die Art der involvierten Solvatbewegungen gewonnen. Ein Vergleich der Ergebnisse für  $\Gamma(\text{H}_2\text{O})_{5,6}$  mit denen für  $\Gamma(\text{D}_2\text{O})_{5,6}$  zeigt, daß die Energieverschiebung zu niedrigerer eKE bei den  $\text{H}_2\text{O}$ -Clustern ca. 100 fs früher einsetzt als bei den deuterierten Clustern. Dies läßt sich damit erklären, daß bei der Reorganisation Librationsbewegungen (frustrierte oder gehinderte Rotation) der Wassermoleküle stattfinden. Zusammenfassend folgern wir, daß bei Wasserclustern  $n = 5$  die Mindestgröße darstellt, die analog zur kondensierten Phase im Cluster zumindest teilweise elektron-gelöste Zustände unterstützt.

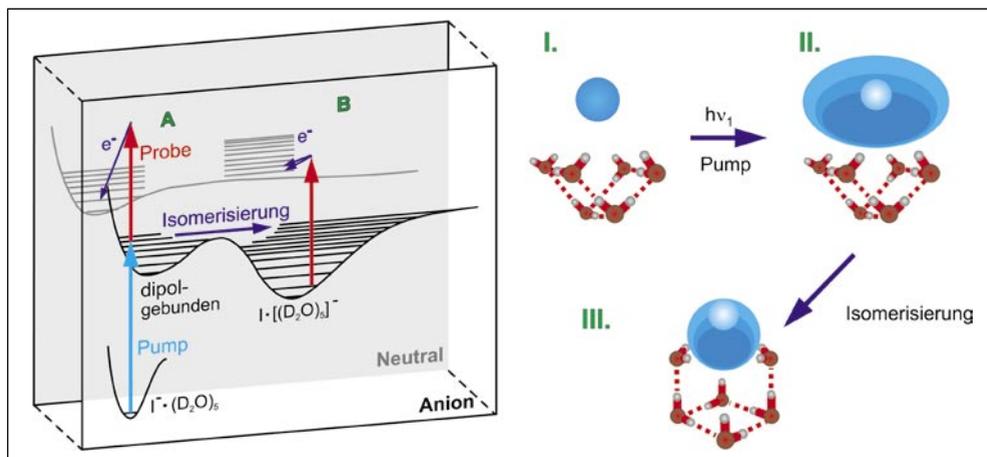


Abb. 6 Links: Anregungsschema der resonanten UV-IR-zwei-Photonen-Photoablösung (*photodetachment*) über einen dipolgebundenen Zustand. In der vorderen Ebene liegen die anionischen Potentiale, der rückwärtige, graumarkierte Bereich steht für die Zustände des neutralen Clusters. Im Fall (A) erfolgt die Ablösung direkt aus dem dipolgebundenen Zustand, während in (B) vor dem Einstrahlen des Probepulses eine Isomerisierung in eine energetisch niedrigere Struktur stattfindet. Als Resultat wird ein rotverschobenes PE-Spektrum gemessen. Rechts: Vorgeschlagene Clusterstruktur für  $\Gamma(\text{D}_2\text{O})_6$  I. bzw. II. mit hohem Dipolmoment basiert auf anionischen Grundzustandsrechnungen für einen Halogenid-Wasserhexamercluster, ursprünglich mit  $\text{Cl}^-$  (COMBARIZA et al. 1994). Struktur III. wird als energetisch günstigste Anordnung für  $(\text{H}_2\text{O})_6^-$  bestimmt (LEE et al. 1997). (Veränderter Nachdruck aus LEHR et al. 1999, mit freundlicher Genehmigung der *American Association for the Advancement of Science*.)

### 3.2 Ammoniakcluster $\Gamma(\text{NH}_3)_n$

Die Variation der Clusterumgebung von Wasser auf Ammoniak zeigt, wie stark der Lösungsprozeß des Überschusselektrons vom Solvatnetzwerk bestimmt wird (FRISCHKORN et al. 2000). Zum einen bildet der  $(\text{NH}_3)_n$ -Verbund drei Wasserstoffbrücken-Bindungen aus, zum anderen hat das einzelne Ammoniak-Molekül ein kleineres elektrisches Dipolmoment ( $\mu = 1,47$  D) als das Wasser-Molekül ( $\mu = 1,85$  D). Als Grenzwert für den Aufbau von dipolgebundenen Zuständen wird ein Wert von  $\mu_c > 2-2,5$  D angegeben (CRAWFORD 1971, DESFRANCOIS et al. 1996). Im Vergleich zu den Wasser-Messungen zeigen die PE-Spektren der  $(\text{NH}_3)_n$ -Cluster in der Tat folgende Unterschiede:

Es findet sich kein Schwellenwert  $n_c$  für die Clustergröße, ab der eine deutliche Verschiebung der kinetischen Energie der Photoelektronen als Funktion der Verzögerungszeit zu beobachten ist. Mit steigendem  $n$  nimmt der Betrag der Energieverschiebung, die ohne anfängliche Verzögerung einsetzt, kontinuierlich und ohne markante Sprünge zu ( $\Delta E = 70$  meV für  $n = 4$  bis hin zu 240 meV für  $n = 15$ ). Da die kinetische Energie der Photoelektronen von der Photonenergie des Probepulses  $h\nu_2$  abhängig ist, muß für einen Vergleich der absoluten Energien aus den PE-Spektren für die Ammoniak- und Wassercluster die vertikale Ablöseenergie VDE (*vertical detachment energy*)<sup>1</sup> gemäß folgender Beziehung bestimmt werden:

$$\text{VDE} = h\nu_2 - e\text{KE}. \quad [1]$$

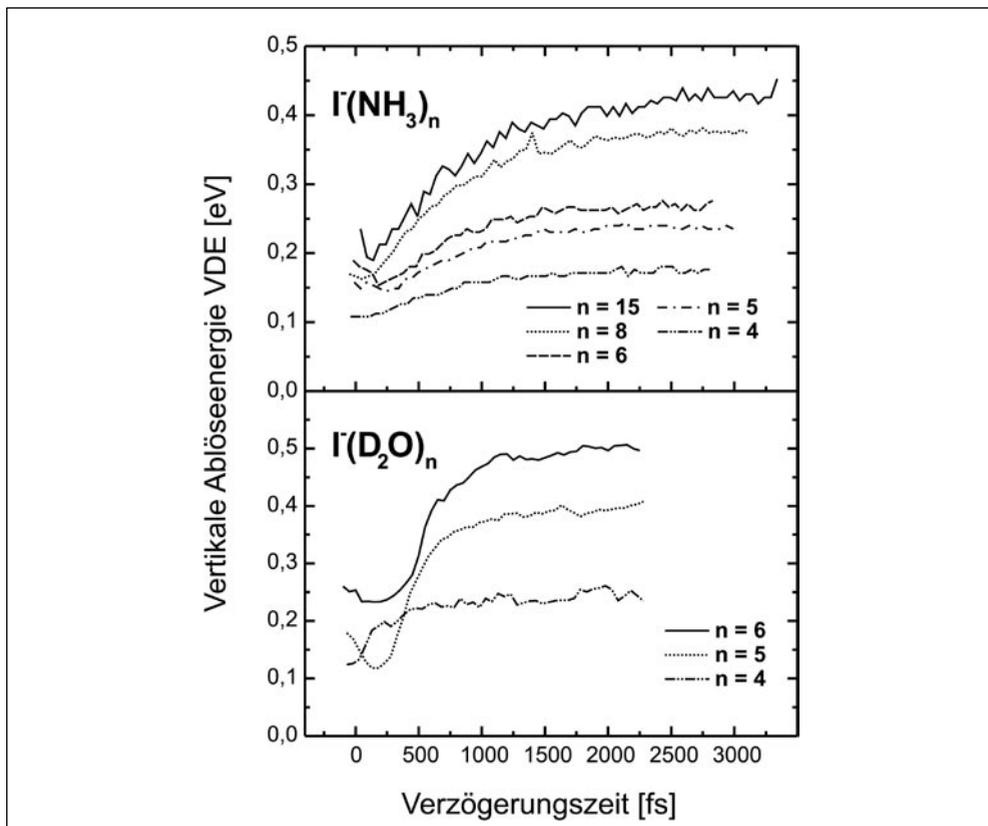


Abb. 7 Zeitliche Entwicklung der vertikalen Ablöseenergie VDE für  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$ -Cluster mit  $n = 4-6, 8$  und  $15$ ; zum Vergleich die entsprechenden Ergebnisse für  $\Gamma(\text{D}_2\text{O})_n$  mit  $n = 4-6$ . (Veränderter Nachdruck aus FRISCHKORN et al. 2000, mit freundlicher Genehmigung der *Royal Society of Chemistry*)

<sup>1</sup> Die VDE ist diejenige Energie, die aufgebracht werden muß, um in einem vertikalen Übergang ein Elektron abzulösen und ist größer oder gleich der notwendigen Minimalenergie ADE – *adiabatic detachment energy*. Man beachte, daß eine auf die Verschiebung, d.h. auf Unterschiede in der kinetischen Energie basierende Argumentation – wie bisher erfolgt – unbeeinflusst bleibt, da  $\Delta e\text{KE} = \Delta \text{VDE}$ .

Abbildung 7 zeigt die zeitliche Entwicklung der vertikalen Ablöseenergie für  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$  mit  $n = 4-6, 8, 15$  und  $\Gamma(\text{D}_2\text{O})_n$  mit  $n = 4-6$  und stellt damit klar das unterschiedliche Solvatisierungsverhalten zwischen den beiden Lösungsmittelarten heraus. Wir folgern für die Ammoniakcluster, daß die anfängliche Anregung nicht in einen dipolgebundenen Zustand, sondern direkt in einen elektron-solvatisierten Zustand erfolgt (Abb. 8), wobei mit zunehmender Clustergröße eine immer stärkere Umorganisation der Solvatmoleküle nötig wird. Unterstützt wird unsere Interpretation, daß das  $\text{NH}_3$ -Netzwerk keinen dipolgebundenen Zustand ausgebildet, durch vergleichende Argumentation mit einem  $\text{H}_2\text{O}$ -Solvatverbund. Relativ niedrige Potentialbarrieren in  $(\text{NH}_3)_n$ -Clustern zwischen benachbarten Minima führen besonders bei endlichen Temperaturen zu relativ großen Bewegungsamplituden und einer sehr »weichen« Struktur. So beträgt z. B. das Dipolmoment für das Ammoniak-Dimer nur  $\mu = 0,74$  D (FRASER

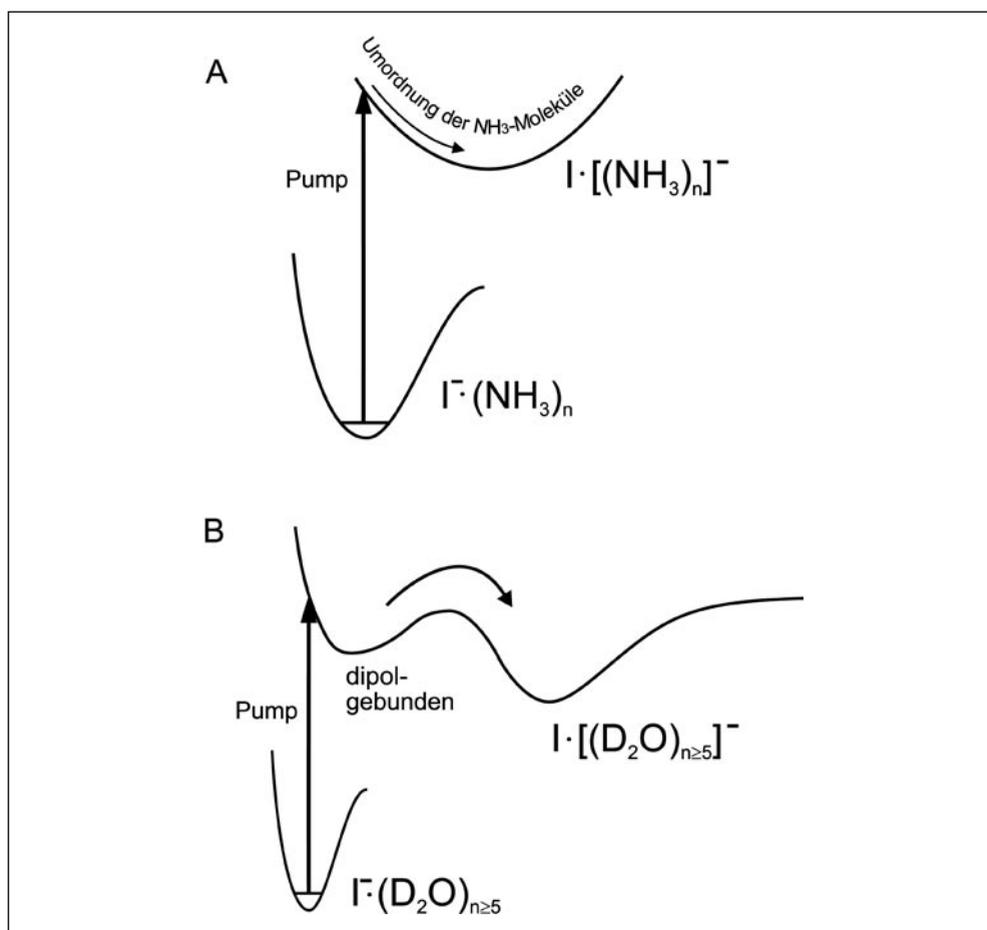


Abb. 8 Schematische Darstellung der Solvatisierungsdynamik nach Anregung der CTTS-Zustände in (A)  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$  und (B)  $\Gamma(\text{D}_2\text{O})_n$ -Clustern. Es wird deutlich, daß in den Ammoniakclustern anfänglich kein dipolgebundener Zustand besetzt wird. (Veränderter Nachdruck aus FRISCHKORN et al. 2000, mit freundlicher Genehmigung der *Royal Society of Chemistry*)

et al. 1985), ein geringerer Wert als eine starre Struktur erwarten läßt. Konsequenterweise konnte  $(\text{NH}_3)_2^-$  nie nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu besitzt  $(\text{H}_2\text{O})_2$  ein deutlich größeres Dipolmoment von 2,65 D (FELLERS et al. 1999), was die Beobachtbarkeit eines negativ geladenen Dimers für Wasser verständlich macht (HENDRICKS et al. 1996). Diese Überlegungen lassen erwarten, daß dipolgebundene Zustände bei der Solvatisierungsdynamik in  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$  keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die insgesamt relativ flache Potentiallandschaft der  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$  wird auch für die beobachteten über eine Größenordnung kleineren Lebensdauern der elektron-solvatisierten Endzustände in den Ammoniakssystemen im Vergleich zu den Wasserclustern verantwortlich gemacht. Im Größenbereich von  $n = 4-8$  werden für den Zerfall der solvatisierten Zustände in den  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$ -Clustern Zeitkonstanten von 12 bis 28 ps gefunden, wohingegen die entsprechenden Wassercluster Werte von 37 bis 440 ps aufweisen (FRISCHKORN et al. 2000). Demzufolge scheinen sich die  $\text{NH}_3$ -Moleküle besonders bei endlichen Temperaturen im Clusterverbund leichter auch in solche Anordnungen zu bewegen, in denen das Überschußelektron nicht mehr gehalten werden kann und es zur Elektronenablösung kommt. Im Gegensatz zur kondensierten Phase, in der die endliche Lebensdauer des solvatisierten Elektrons durch Rekombination mit dem neutralen Iod-Atom bestimmt wird, kann dieser Prozeß bei den Clusterexperimenten ausgeschlossen werden. Die bei der Rekombination freiwerdende Bindungsenergie des Elektrons EA (Elektronenaffinität) würde eine Fragmentation des angeregten Ausgangsclusters verursachen, die aber mit dem Reflektron-Ionenanalysator in allen unseren Experimenten an den unterschiedlichen Clusterumgebungen nicht nachgewiesen wurde.

### 3.3 Methanolcluster $\Gamma(\text{CH}_3\text{OH})_n$

Das dritte System, die Methanolcluster, zur Untersuchung der Dynamik des Ladungstransfers in polaren Lösungsmittel zeigt seinerseits ein neues, charakteristisches Verhalten (DAVIS et al. 2000). Ähnlich zu den  $(\text{NH}_3)_n$ -Clustern kann auch für  $\Gamma(\text{CH}_3\text{OH})_n$  keine kritische Größengrenze  $n_c$  für den Start der Elektron-Solvatisierung angegeben werden. Im Größenbereich  $n = 5-8$  nimmt die Energieverschiebung der PE-Spektren zu kleineren eKE kontinuierlich zu. Die Methanol-Messungen haben ihre Besonderheit in der zusätzlich auftretenden reversen Energieverschiebung bei langen Verzögerungszeiten bis 50 ps. Dabei verschiebt sich das Zentrum der Spektren zurück zu der ursprünglichen Elektronenenergie am Zeitnullpunkt. Mögliche Erklärungsmodelle für dieses unerwartete Verhalten reichen vom Abdampfen eines der Clusterkonstituenten (I oder  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), was aufgrund der einhergehenden geringer werdenden Stabilisierung des Überschußelektrons in eine Erhöhung der eKE resultieren würde, bis hin zu zwei unterschiedlichen Clusterkonfigurationen, bei denen unterschiedliche Lebensdauern zum beschriebenen Verhalten führen könnten. Diese Interpretationen unserer FPES-Daten erfordern Clusterstrukturberechnungen für das  $\Gamma(\text{CH}_3\text{OH})_n$ -System und zusätzlich andere experimentelle Untersuchungsmethoden (z. B. IR-Spektroskopie).

### 3.4 Xenoncluster $\Gamma(\text{Xe})_n$

CTTS-Anregungen sind auch in nicht-polaren Umgebungen wie Xenon aufgrund der Polarisierbarkeit der Solvateilchen möglich (BECKER et al. 1997). Dabei wird, wie in den vorherigen Abschnitten bei polaren Lösungsmittelteilchen im Cluster beschrieben, das Überschußelektron vom Iod-Rumpf abgelöst und als Komplex der Form  $[\text{I}(\text{P}_{1/2,3/2})\text{Xe}_n]^-$  stabilisiert. Ein einzel-

nes Xe-Atom bindet kein überzähliges Elektron. Experimente zeigen, daß mindestens 6 Xe nötig sind, um stabile Cluster  $\text{Xe}_n^-$  zu erzeugen, deren geometrische Größe eine ausreichende Polarisierbarkeit gewährleistet (HABERLAND et al. 1989). Man erwartet jedoch markante Unterschiede in der Solvatisierungsdynamik zwischen nicht-polaren und polaren Clustern. Wir haben mit der zeitaufgelösten FPES-Methode Experimente an  $\Gamma(\text{Xe})_n$ -Clustern ( $n = 6-38$ ) durchgeführt (ZANNI et al. 2000), bei denen mit resonant abgestimmten Pumpwellenlängen die CTTS-Bänder beider Spin-Bahn-Zustände ( $^2P_{1/2}$  bzw.  $^2P_{3/2}$ ) des Iod-Anions angeregt wurden. Diese Bänder unterschieden sich drastisch in ihrem Zeitverhalten. Während der obere  $^2P_{1/2}$ -Zustand über den Kanal  $[\text{I}(^2P_{1/2})\cdot(\text{Xe})_n]^- \rightarrow \text{I}(^2P_{3/2})\cdot(\text{Xe})_n + e^-$  durch Spin-Bahn-induzierte Selbstablösung (*autodetachment by spin flip*) zerfallen kann, steht diese Möglichkeit dem  $^2P_{3/2}$ -Zustand energetisch nicht zur Verfügung. Konsistent dazu zeigen unsere PE-Spektren, daß der obere Spin-Bahn-Zustand auf einer Zeitskala von 500–1500 fs zerfällt (Abb. 9). Die mit größeren Clustern zunehmende Lebensdauer der CTTS-Anregungen läßt sich mit einer einhergehenden geringeren Wechselwirkung des im Clusterzentrum sitzenden Iod-Atoms mit dem sehr diffusen, angeregten Elektron erklären. Theoretische Arbeiten bestimmen z. B. für  $\text{Xe}_{13}^-$  einen Ladungswolken-Radius des Überschubelektrons von bis zu 36 Å außerhalb des eigentlichen Clusters (MARTYNA und BERNE 1988). Im Gegensatz dazu wird für den energetisch niedrigeren Spin-Bahn-Zustand ( $^2P_{3/2}$ ) keine Intensitätsabnahme bis zu einigen 100 ps gemessen (Abb. 10). Energietransfer von elektronischen Freiheitsgraden zur Vibrationsenergie, die zu einer Temperaturerhöhung der anionischen Ausgangscluster führt, läßt die CTTS-Anregung

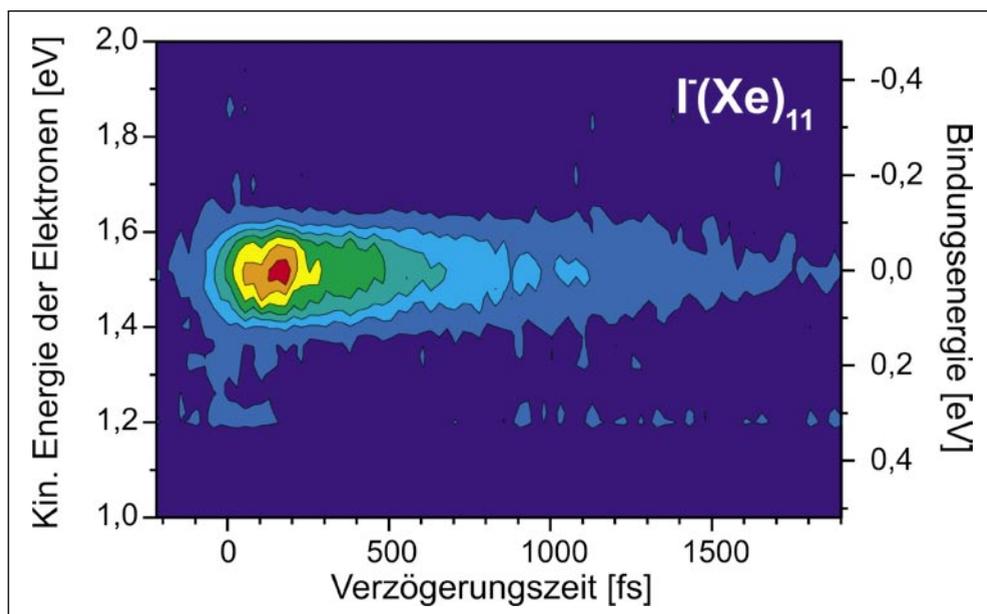


Abb. 9 Konturdarstellung der FPE-Spektren von  $\Gamma(\text{Xe})_{11}$  nach Anregung des CTTS-Zustands des oberen Spin-Bahn-Niveaus ( $^2P_{1/2}$ ). Die Photoelektronenintensität ist farbkodiert (rot – hohe Intensität, blau – niedrige Intensität) als Funktion der kinetischen Energie bzw. Bindungsenergie des Überschubelektrons und der Pump-Probe-Verzögerungszeit aufgetragen. (Veränderter Nachdruck aus ZANNI et al. 2000, mit freundlicher Genehmigung der *American Chemical Society*.)

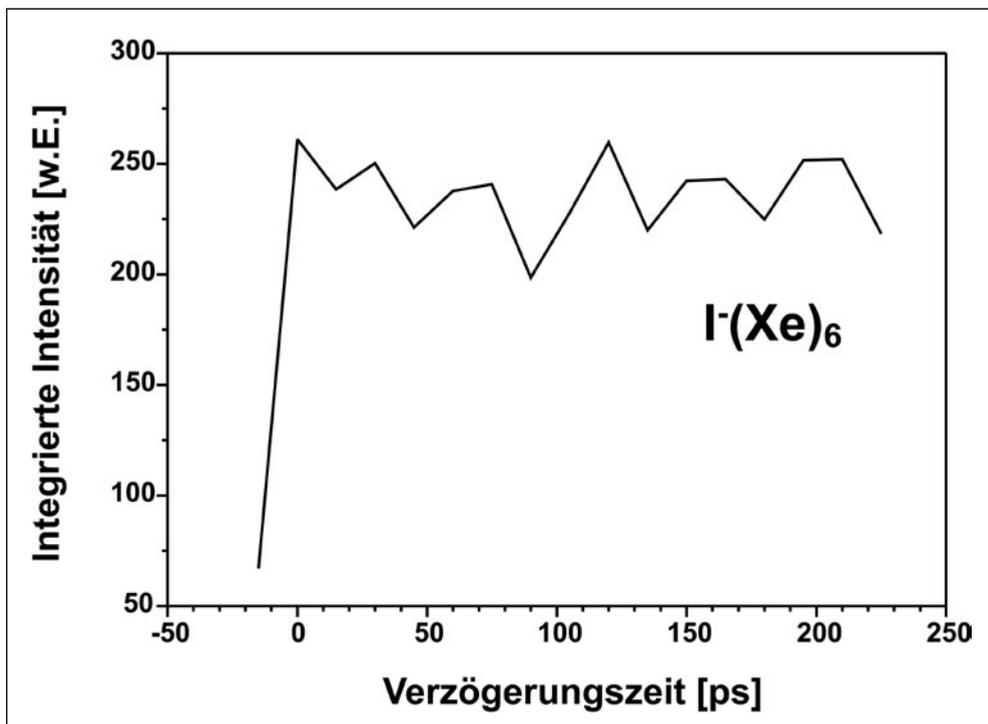


Abb. 10 Integrierte Intensität der FPE-Spektren von  $\Gamma(\text{Xe})_6$  nach Anregung des CTTS-Zustands des unteren Spin-Bahn-Niveaus ( $^2P_{3/2}$ ). Selbst bei diesem kleinsten der untersuchten Cluster ist über mehrere 100 ps keine merkliche Intensitätsabnahme festzustellen. (Veränderter Nachdruck aus ZANNI et al. 2000, mit freundlicher Genehmigung der *American Chemical Society*.)

zerfallen. Jedoch sollten die Cluster beider Spin-Bahn-Zustände in gleicher Weise davon betroffen sein, was aber für die  $[\text{I}(^2P_{3/2}) \cdot (\text{Xe})_n]^-$ -Komplexe im Zeitfenster unseres Experiments nicht beobachtet wird. Zumindest ist der Spin-Bahn-induzierte Zerfallskanal für den ( $^2P_{3/2}$ )-Zustand deutlich schneller als andere Relaxierungsmechanismen.

Eine Reorganisation des Xe-Solvatverbundes, die sich analog zu den Experimenten an Clustern mit polaren Solvatteilchen in einer Energieverschiebung der Photoelektronen bemerkbar machen würde, kann bei allen  $\Gamma(\text{Xe})_n$ -Clustern nicht festgestellt werden. Die Anregung erfolgt sehr wahrscheinlich direkt in den Ursprung des CTTS-Zustands, so daß bei einem im Zentrum sitzenden Iod-Atom durch die ähnliche Clusterstruktur für Grund- und angeregten Zustand eine deutliche Reorganisation der Xe-Atome nicht erforderlich wird (ZANNI et al. 2000). Unter diesen Bedingungen muß das Überschusselektron nicht unbedingt in einen solvatisierten Zustand übergehen, der durch Umstrukturierung des gesamten Cluster aufgebaut wird. Hochauflösende Experimente und theoretische Berechnungen müssen hier zur vollständigen Klärung beitragen.

#### 4. Elektronen-Solvatisierung in Adsorbatschichten auf Oberflächen

Im letzten Abschnitt dieses Beitrags sollen Ergebnisse zum Elektronentransfer und zur Lokalisierungs- und Solvatisierungsdynamik an Adsorbat-Metall-Grenzschichten vorgestellt werden. Die Dimensionsbegrenzung und die damit verbundenen erschwerten Solvatbewegungen im Vergleich zu isotropen Medien der kondensierten Phase lassen besondere Eigenarten der Solvatisierungsdynamik erwarten. Nur wenige Arbeiten wurden hierzu durchgeführt (GE et al. 1998, GAHL et al. 2002, MILLER et al. 2002). Unsere Experimente zur Lokalisierungs- und Solvatisierungsdynamik in ultradünnen D<sub>2</sub>O-Schichten auf Kupfer stellen eine der ersten Arbeiten zur Elektronensolvatisierung in unterkühltem Wasser bzw. Eis dar (GAHL et al. 2002). Bedeutung im mikroskopischen Verständnis der ablaufenden Prozesse haben diese Arbeiten an Eis als Lösungsmittel insofern, als daß z. B. Elektronen in Vorstufen zur vollständigen Solvatisierung die Dissoziationsrate von Fluorchlorkohlenwasserstoffen auf Eis deutlich erhöhen. Das dadurch freiwerdende Dissoziationsfragment Chlor trägt seinerseits in Wolken der Stratosphäre zum Ozonabbau bei (LU und SANCHE 2001).

Die Methode der Wahl, Elektronendynamik in und auf Metalloberflächen zeitaufgelöst zu studieren, ist die Femtosekunden-Zwei-Photonen-Photoemissions-(2PPE)-Spektroskopie (PETEK und OGAWA 1998). Konzeptionell sind die 2PPE-Technik und die bereits vorgestellte FPES-Methode identisch: Mit dem ersten fs-Puls (Pumpimpuls) wird eine transiente Population in einem Zwischenzustand aufgebaut, der dann über den zeitverzögerten zweiten Puls (Probe) abgefragt wird. In der Summe müssen die eingestrahelten Photonenergien über der Bindungsenergie der Elektronen liegen, um Photoelektronen von der Oberfläche auszulösen. Anstelle der adiabatischen Ablöseenergie ADE bei den anionischen Molekülen oder Clustern im ersten Teil dieses Beitrags ist die Austrittsarbeit  $\Phi$  (*work function*) entscheidend bei der Photoelektronenspektroskopie an Festkörpern bzw. deren Oberflächen. Die Besonderheit der 2PPE-Spektroskopie an Oberflächen besteht in der Möglichkeit, durch winkelaufgelöste Messungen Informationen über Impuls  $k_{\parallel}$  der Elektronen parallel zur Oberfläche zu erhalten. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der 2PPE-Technik, mit deren Hilfe Energie und Impuls der Photoelektronen zeitaufgelöst werden können. Mit dem Pumpimpuls  $h\nu_1$  werden Elektronen unter dem Fermi-Niveau in einen Zwischenzustand angeregt. Der zeitverzögerte Abfragepuls  $h\nu_2$  transferiert einen Teil der transienten Population des Zwischenzustands über das Vakuumniveau ins Kontinuum. Die dabei ausgelösten Photoelektronen werden im Spektrometer energetisch analysiert. Variiert man die Detektionsachse in bezug auf die Oberflächennormale, kann die funktionale Abhängigkeit des Parallelimpulses von der kinetischen Energie der Elektronen gewonnen werden. Über die Dispersionsbeziehung

$$k_{\parallel} = \sqrt{2m_e E_{\text{kin}}/\hbar^2} \sin(\alpha) \quad [2]$$

erhält man Informationen über den Lokalisierungsgrad des abgefragten Elektronenzustands. Die Dispersion eines delokalisierten Zustandes ist wie die eines freien Teilchens parabolisch, während sich ein lokalisierter Zustand in einer flachen  $E_{\text{kin}}-k_{\parallel}$ -Abhängigkeit äußert.

##### *Wasser auf Kupfer D<sub>2</sub>O/Cu(111)*

Gefrorene Wasserschichten (Eis) auf einer Einkristall-Metalloberfläche werden im Ultrahochvakuum mittels Bedampfen durch ein Nadellochdosierer bei niedrigen Temperaturen (z. B.

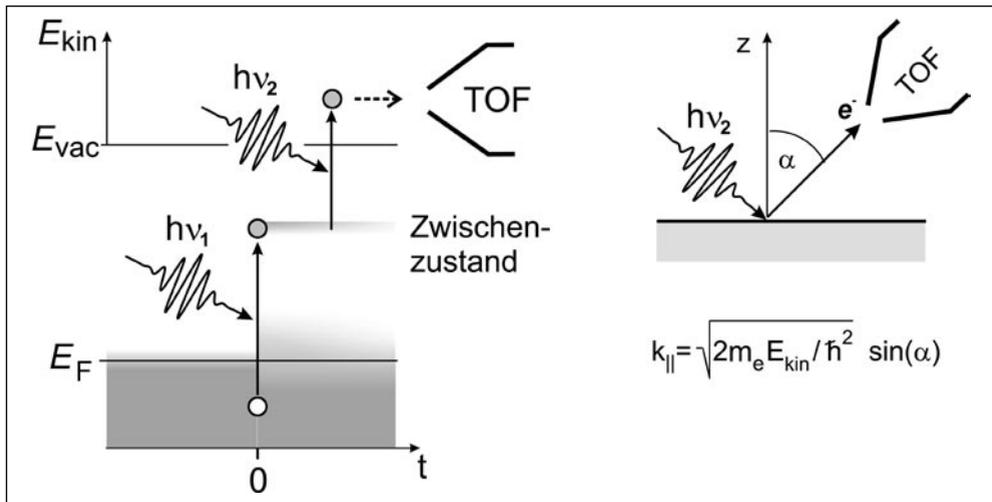


Abb. 11 Zeitaufgelöste Zwei-Photonen-Photoemissions-(2PPE)-Spektroskopie. *Links*: Der Pumpimpuls  $h\nu_1$  bevölkert Zwischenzustände, wie z. B. Adsorbat- oder Bildladungszustände, aus denen der Probestimpuls  $h\nu_2$  die angeregten Elektronen über das Vakuumniveau hebt. Die Überschussenergie wird als kinetische Energie im Photoelektronenspektrometer (TOF – *time-of-flight spectrometer*) gemessen. *Rechts*: Durch Variation der Achse des Photoelektronenspektrometers gegenüber der Oberflächennormalen (Winkel  $\alpha$ ) kann der Parallelimpuls  $k_{||}$  bzw. die Abhängigkeit des Parallelimpulses von der kinetischen Energie der Photoelektronen bestimmt werden. Der Graustufenverlauf um die Fermi-Energie  $E_F$  deutet an, daß bei endlicher Temperatur die Fermi-Dirac-Verteilung keine Stufenfunktion darstellt.

100–140 K für Cu) präpariert. In Abhängigkeit vom Metallsubstrat kann sich dabei eine durch Wasserstoffbrücken hervorgerufene, hexagonale Eisstruktur ausbilden. Ein Schichtdickenmaß ist die sogenannte Bilage (BL), die auf der Zickzack-Anordnung der Wassermoleküle in Seitenansicht beruht (THIEL und MADEY 1987, HENDERSON 2002). In Abbildung 12 sind zeitaufgelöste 2PPE-Spektren von einer 4 BL dicken amorphen Eisschicht auf einer Kuperoberfläche Cu(111) unter senkrechter Emission als Konturgrafik und als Zeitschnitte in Abhängigkeit der Verzögerungszeit und der Energie des Zwischenzustands dargestellt. Man erkennt zwei Signalbereiche:

- Ein breites, strukturloses Kontinuum  $e_{CB}$ , das sich bei Energien  $E-E_F$  von 3,0 bis 3,8 eV erstreckt und innerhalb von 100 fs zerfällt, und
- ein klares Maximum  $e_s$  bei 2,9 eV, das mit zunehmender Verzögerungszeit zu niedrigeren Energien schiebt und asymmetrischer wird.

Wir ordnen das Signal  $e_{CB}$  Elektronen zu, die durch den Pumpimpuls aus dem Valenzband des Kupfersubstrats ins Leitungsband der Wasseradsorbatschicht (CB – *conduction band*) angeregt werden, dort bis zum Bandboden relaxieren und durch den großen Überlapp der Elektronen-Wellenfunktionen wieder zum Substrat zurückrelaxieren. Das Maximum  $e_s$  dagegen lebt einige 100 fs und ist analog zur Energiestabilisierung in den Solvatisierungsexperimenten an Clustern der Solvatisierung des Überschusselektron in der Eisschicht zuzuschreiben. Daß der Solvatisierung, d. h. der Energieabsenkung der Elektronen, ein Lokalisierungsprozeß vor-

ausgeht, zeigen Dipersionsmessungen (GAHL et al. 2002). Innerhalb der ersten 100 fs, flacht die anfänglich parabelförmige  $E_{\text{kin}}-k_{\parallel}$ -Beziehung vollständig ab, was ein klares Indiz für die Lokalisierung der ins Wasser injizierten Metallelektronen darstellt. Hierbei wird deutlich, daß in Systemen, in denen durch Periodizität delokalisierte Elektronenzustände unterstützt werden, zwischen Lokalisierung und Solvatisierung unterschieden werden kann. In einem geschlossenen Bild läßt sich die Lokalisierung in der Eisschicht als erster Teil des gesamten Solvatisierungsprozesses beschreiben (Abb. 13). Die beobachteten Elementarprozesse lassen sich demnach in vier Schritte aufteilen:

- Der Pumpuls regt Elektronen aus dem Cu-Substrat ins Leitungsband der Wasserschicht an, was aufgrund eines großen Wellenfunktionsüberlapps zwischen Ausgangs- und Endzustand hinreichend effizient ist.
- Elektronen, die nicht »sofort« zum Metall zurückrelaxieren, können innerhalb von ca. 100 fs an geeigneten Stellen im Wassernetzwerk (z. B. an Defekten) nahe der unteren Leitungsbandkante eingefangen werden. Die elektronische Wellenfunktion lokalisiert entlang der Solvatisierungscoordinate  $q_1$ .
- In der daraufhin einsetzenden Energiestabilisierung durch Solvatumlagerung entlang  $q_2$  werden die Überschubelektronen weiter solvatisiert, bis
- sie durch Rücktransfer ins Metallsubstrat vom Probepuls nicht mehr über das Vakuumniveau gehoben werden können und somit nicht zum 2PPE-Spektrum beitragen.

Experimente an Adsorbatschichten auf Oberflächen eröffnen die Möglichkeit, durch Variation des Substrats und der Adsorbatschichtdicke gezielt Einfluß auf die zugrundeliegenden Prozesse der Elektronen-Solvatisierung zu nehmen. Bedeckungsabhängige Messungen zeigen z. B.,

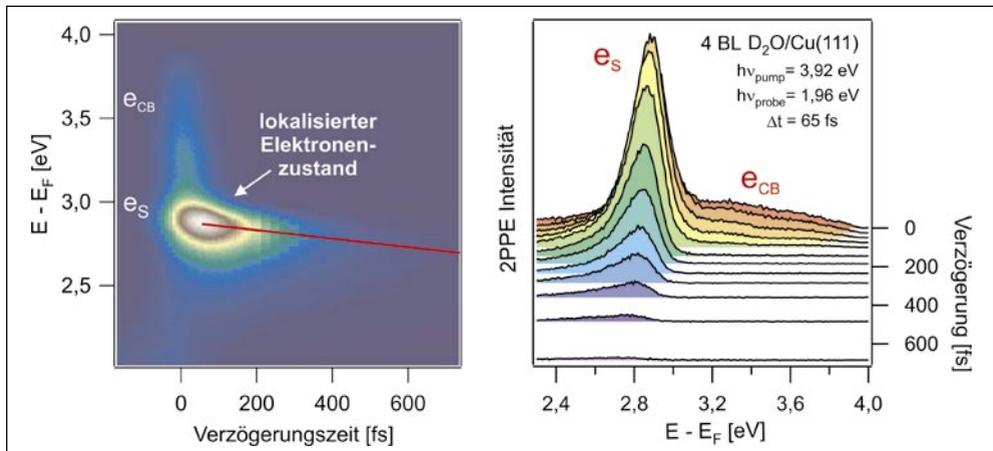


Abb. 12 2PPE-Spektren von 4 Bilagen (BL) D<sub>2</sub>O auf einer Cu(111)-Oberfläche als Konturgrafik (*links*) und Schnitte parallel zur Energieachse (*rechts*). Die Signalintensität ist als Funktion des energetischen Abstands des Zwischenzustands zur Fermienergie  $E-E_F = E_{\text{kin}} + \Phi - h\nu_2$  und in Abhängigkeit der Pump-Probe-Verzögerungszeit dargestellt. In der Konturgrafik bedeutet *blau* niedrige und *weiß* hohe Signalintensität. Die Pulsbreiten  $\Delta t$  für Pump- und Probepuls betragen jeweils 65 fs. (Rechte Bildhälfte veränderter Nachdruck aus GAHL et al. 2002, mit freundlicher Genehmigung der *American Physical Society*)

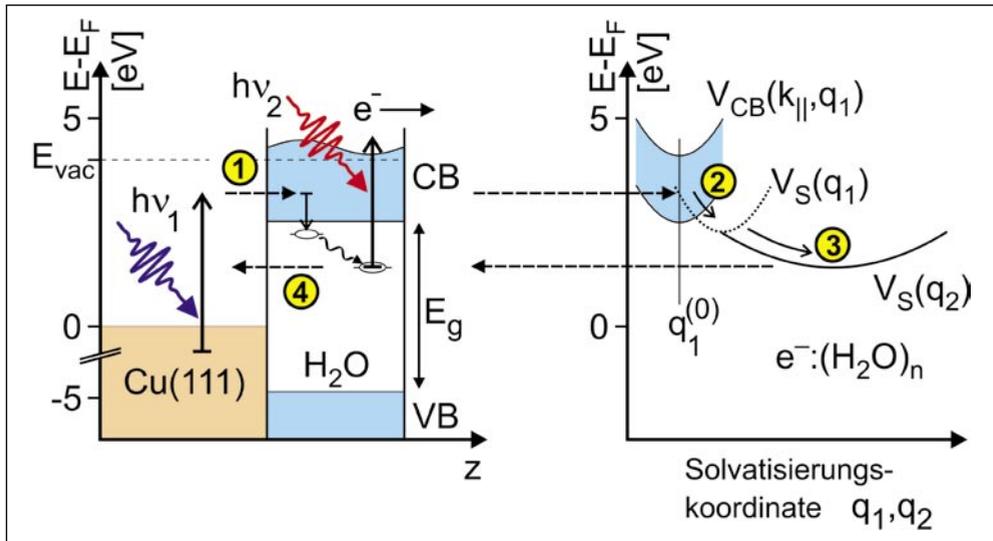


Abb. 13 Schema der beobachteten Elementarschritte nach der Photoanregung der Cu-Oberfläche: Elektronentransfer (1), Lokalisierung (2), Solvatisierung (3) und Rücktransfer (4). Die elektronische Struktur ist auf der linken Seite gezeigt, die Potentialflächen als Funktion der Solvatisierungskoordinate (Konfigurationskoordinate) auf der rechten Seite. (Veränderter Nachdruck aus GAHL et al. 2002, mit freundlicher Genehmigung der *American Physical Society*.)

daß mit zunehmender Schichtdicke die Solvatisierungsdynamik deutlich langsamer abläuft als in dünneren Eisschichten (GAHL et al. 2003). Solvatisierungsplätze mit unterschiedlicher Steifigkeit des Solvatnetzwerkes in der Adsorbatschicht werden für diese Beobachtungen verantwortlich gemacht. So können Elektronen, die in unmittelbarer Umgebung zur Vakuum-Wasser-Grenzfläche eingefangen werden, deutlich schneller stabilisiert werden als im Zentrum der Eisschicht, da bei der Solvatreorganisation in grenzschichtnahen Bereichen weniger intermolekulare Bindungen verändert werden müssen.

### Dank

Die hier vorgestellten Arbeiten sind in den Arbeitsgruppen von Prof. Dan NEUMARK (Berkeley) und Prof. Martin WOLF (Berlin) entstanden. Den beiden Arbeitsgruppenleitern sei herzlich für alle Unterstützung gedankt. Den Mitarbeitern in Berkeley M. ZANNI und A. DAVIS sowie C. GAHL und U. BOVENSIEPEN in Berlin dankt der Autor für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit. Der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina gilt der besondere Dank für die Zuerkennung des Förderpreises, der es dem Autor erlaubte, Forschungsarbeiten an der UC Berkeley durchzuführen. Dr. R. RIEDEL von der Leopoldina-Akademie sei herzlich gedankt für die freundliche und persönliche Betreuung während und auch im Anschluß des Förderzeitraums.

*Literatur*

- BAILEY, C. G., and JOHNSON, M. A.: Determination of the relative photodetachment cross sections of the two isomers  $(\text{H}_2\text{O})_6^-$  using saturated photodetachment. *Chem. Phys. Lett.* **265**, 185–189 (1997)
- BECKER, I., MARKOVICH, G., and CHESHNOVSKY, O.: Bound delocalized states in  $\Gamma\text{Xe}_n$  clusters. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 3391–3394 (1997)
- CHESHNOVSKY, O., YANG, S. H., PETTIETTE, C. L., CRAYCRAFT, M. J., and SMALLEY, R. E.: Magnetic time-of-flight photoelectron spectrometer for mass-selected negative cluster ions. *Rev. Sci. Instrum.* **58**, 2131–2137 (1987)
- COMBARIZA, J. E., KESTNER, N. R., and JORTNER, J.: Energy-structure relationships for microscopic solvation of anions in water clusters. *J. Chem. Phys.* **100**, 2851–2864 (1994)
- CRAWFORD, O. H.: Negative ions of polar molecules. *Mol. Phys.* **20**, 585–591 (1971)
- DAVIS, A. V., ZANNI, M. T., FRISCHKORN, C., and NEUMARK, D. M.: Time-resolved dynamics of the charge-transfer-to-solvent states in solvated iodide clusters. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **108**, 203–211 (2000)
- DESRANCOIS, C., ABDOUL-CARIME, H., and SCHERMANN, J. P.: Ground-state dipole-bound anions. *Int. J. Mod. Phys. B* **10**, 1339–1395 (1996)
- FELLERS, R. S., LEFORESTIER, C., BRALY, L. B., BROWN, M. G., SAYKALLY, R. J.: Spectroscopic determination of the water pair potential. *Science* **284**, 945–948 (1999)
- FRANCK, J., und SCHEIBE, G.: Über Absorptionsspektren negativer Halogenionen in Lösung. *Z. Phys. Chem. A* **139**, 22–31 (1928)
- FRASER, G. T., NELSON, D. D., CHARO, A., and KLEMPERER, W.: Microwave and infrared characterization of several weakly bound  $\text{NH}_3$  complexes. *J. Chem. Phys.* **82**, 2335–2346 (1985)
- FRISCHKORN, C., ZANNI, M. T., DAVIS, A. V., and NEUMARK, D. M.: Electron solvation dynamics in  $\Gamma(\text{NH}_3)_n$  clusters. *Faraday Discuss.* **115**, 49–62 (2000)
- GAHL, C., BOVENSIEPEN, U., FRISCHKORN, C., MORGENSTERN, K., RIEDER, K.-H., and WOLF, M.: Ultrafast electron solvation dynamics in  $\text{D}_2\text{O}/\text{Cu}(111)$ : influence of coverage and structure. *Surf. Sci.* **532–535**, 108–112 (2003)
- GAHL, C., BOVENSIEPEN, U., FRISCHKORN, C., and WOLF, M.: Ultrafast dynamics of electron localization and solvation in ice layers on  $\text{Cu}(111)$ . *Phys. Rev. Lett.* **89**, 107402-1–107402-4 (2002)
- GE, N.-H., WONG, C. M., LINGLE, R. L., MCNEILL, J. D., GAFFNEY, K. J., and HARRIS, C. B.: Femtosecond dynamics of electron localization at interfaces. *Science* **279**, 202–205 (1998)
- HABERLAND, H., KOLAR, T., and REINERS, T.: Negatively charged xenon atoms and clusters. *Phys. Rev. Lett.* **63**, 1219–1222 (1989)
- HART, E. J., and BOAG, J. W.: Absorption spectrum of the hydrated electron in water and aqueous solutions. *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 4090–4095 (1962)
- HENDERSON, M. A.: The interaction of water with solid surfaces: Fundamental aspects revisited. *Surf. Sci. Rep.* **46**, 1–308 (2002)
- HENDRICKS, J. H., DE CLERCQ, H. L., LYAPUSTINA, S. A., FANCHER, C. A., LIPPA, T. P., COLLINS, J. M., ARNOLD, S. T., LEE, G. H., and BOWEN, K. H.: In: KONDOW, T., KAYA, K., and TERASAKI, A. (Eds.): *Structures and Dynamics of Clusters*; pp. 321. Tokyo: Universal Academy Press 1996
- KRAUS, C. A.: Solutions of metals in non-metallic solvents; IV. Material effects accompanying the passage of an electrical current through solutions of metals in liquid ammonia. Migration experiments. *J. Amer. Chem. Soc.* **30**, 1323–1344 (1908)
- LEE, S., KIM, J., LEE, S. J., and KIM, K. S.: Novel structures for the excess electron state of the water hexamer and the interaction forces governing the structures. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 2038–2041 (1997)
- LEHR, L., ZANNI, M. T., FRISCHKORN, C., WEINKAUF, R., and NEUMARK, D. M.: Electron solvation in finite systems: Femtosecond dynamics of iodide-(water) $_n$  anion clusters. *Science* **284**, 635–638 (1999)
- LU, Q.-B., and SANCHE, L.: Enhanced dissociative electron attachment to  $\text{CF}_2\text{Cl}_2$  by transfer of electrons in precursors to the solvated state in water and ammonia ice. *Phys. Rev. B* **63**, 153403-1–153403-4 (2001)
- MARKOVICH, G., and CHESHNOVSKY, O.: Photoelectron spectroscopic study of charge-transfer states in clusters. *J. Phys. Chem.* **98**, 3550–3553 (1994)
- MARTYNA, G. J., and BERNE, B. J.: Structure and energetics of  $\text{Xe}_n^-$ . *J. Chem. Phys.* **88**, 4516–4525 (1988)
- MILLER, A. D., BEZEL, I., GAFFNEY, K. J., GARRETT-ROE, S., LIU, S. H., SZYMANSKI, P., and HARRIS, C. B.: Electron solvation in two dimensions. *Science* **297**, 1163–1166 (2002)
- PETEK, H., and OGAWA, S.: Femtosecond time-resolved two-photon photoemission studies of electron dynamics in metals. *Prog. Surf. Sci.* **56**, 239–310 (1998)
- SERXNER, D., DESSENT, C. E. H., and JOHNSON, M. A.: Precursor of the  $\Gamma_{\text{aq}}$  charge-transfer-to-solvent (CTTS) band in  $\Gamma(\text{H}_2\text{O})_n$  clusters. *J. Chem. Phys.* **105**, 7231–7234 (1996)
- THIEL, P. A., and MADEY, T. E.: The interaction of water with solid surfaces: Fundamental aspects. *Surf. Sci. Rep.* **7**, 211–385 (1987)

*Christian Frischkorn*

WEYL, W.: Über die Bildung des Ammoniums und einiger Ammoniummetalle. *Ann. Phys. (Leipzig)* *123*, 350–367 (1864)

ZANNI, M. T.: Photodissociation and charge transfer dynamics of negative ions studied with femtosecond photoelectron spectroscopy. Doktorarbeit (1999)

ZANNI, M. T., FRISCHKORN, C., DAVIS, A. V., and NEUMARK, D. M.: Dynamics of the charge-transfer-to-solvent states in  $I(Xe)_n$  clusters. *J. Phys. Chem. A* *104*, 2527–2530 (2000)

Dr. Christian FRISCHKORN  
Freie Universität Berlin  
Institut für Experimentalphysik  
Arnimallee 14  
14195 Berlin  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 30 83853588  
Fax: +49 30 83856059  
E-Mail: christian.frischkorn@physik.fu-berlin.de

## **Energie**

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung vom 17. bis 20. Oktober 2003  
zu Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 91, Nr. 339

Herausgegeben von Harald ZUR HAUSEN (Heidelberg)

(2004, 378 Seiten, 175 Abbildungen, 25 Tabellen, 39,95 Euro,

ISBN 3-8047-2171-0)

Während früher naturwissenschaftliche und technische Argumente in Diskussionen über Energiebedarf, -erzeugung und -nutzung bestimmend waren, werden diese heutzutage auf vielfältige Weise durch ökologische, soziale und kulturelle Aspekte verdrängt. Bürgerinitiativen, Umweltgruppen, Medien, Gewerkschaften, Parteien und auch Kirchen sind am Energiediskurs beteiligt. Daß Energie eine naturwissenschaftliche Basis hat, wird in der Öffentlichkeit häufig kaum noch wahrgenommen. Aus einem naturwissenschaftlich-technischen ist ein gesellschaftswissenschaftlich-kultureller Diskurs geworden. Angesichts der Vielzahl unterschiedlicher Prognosen zum Weltenergiebedarf und zur Energienutzung, die Experten und Politik der Öffentlichkeit vorlegen, kann das nicht verwundern. Die Leopoldina nahm das zum Anlaß, um auf ihrer Jahresversammlung verschiedene Energieszenarien zu erörtern. Ausgehend von den naturwissenschaftlichen Grundlagen werden sowohl die Auswirkungen der verschiedenen Formen von Energieträgernutzung auf die Umwelt, aber auch Leitbilder, Zielvorstellungen und ethische Prinzipien der Energieversorgung hinterfragt. Im Hinblick auf Komplexität, Globalität und Langfristigkeit des Energiebereiches liefern die Beiträge des Bandes eine auf dem heutigen Erkenntnisstand gegründete wissenschaftliche Standortbestimmung zu Fragen der Energieerzeugung und Energienutzung. Dabei werden Windkraft und Biomasse ebenso ausführlich betrachtet wie Kernenergie und Kernfusion. Die Tendenzen in der Nutzung fossiler Energieträger unterliegen einer kritischen Analyse. Außerdem werden technische Fragen (Solarzellen, Brennstoffzellen, Aufwindkraftwerke, energieeffizientes Gebäudemanagement) und ökonomische Probleme (z. B. der Strommarktliberalisierung) umfassend dargestellt. Ein Positionspapier faßt die Sicht der Leopoldina auf die für zukünftige politische, ökonomische und wissenschaftliche Weichenstellungen aktuell bedeutsame Energieproblematik zusammen.

---

Dr. rer. nat. habil. Nadeshda VOGEL

Geboren 1953 in Togliatti, Rußland. 1970 bis 1976 Physikstudium an der Physikalischen Fakultät der St. Petersburger Universität. Seit 1979 wissenschaftliche Assistentin an der Technischen Universität Chemnitz. Promotion 1984 zum Dr. rer. nat. über das Erosionsplasma in kurzen Abschaltbögen und seine Wechselwirkung mit den Elektroden. Seit 1992 wissenschaftliche Assistentin an der Technischen Universität Chemnitz, Lehrstuhl für »Optische Spektroskopie und Molekülphysik«; Arbeiten zur Diagnostik nichtstationärer Prozesse in laserinduzierten Entladungen und Laserplasmen. 1996 Förderpreis der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, dadurch Finanzierung eines halbjährigen USA-Aufenthaltes am *Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California*. Habilitation 2001 zum Dr. rer. nat. habil. über »Physics of ultrafast nonlinear phenomena in electrical and laser-induced discharges«.

## Laserplasmen – Analogien zur Astrophysik

Nadeshda VOGEL (Chemnitz)

Mit 3 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

Laserinduzierte Plasmen sind Quellen energetischer Teilchen und ultrakurzer Röntgenstrahlung. Ein möglicher Mechanismus für die Entstehung dieser energetischen Strahlung und beschleunigter Teilchen ist ein Kurzschluß von magnetischen Feldlinien in laserinduzierten Plasmen. Ähnlich, wie die magnetischen Feldlinien auf der Sonnenoberfläche, die durch Neuverbindung enorme Energiemengen freisetzen, wie z. B. bei einem Ausbruch eines solaren Flares oder koronaler Massenauswürfe, wird in laserinduzierten Plasmen magnetische Energie der selbstgenerierten Magnetfelder in Form der kinetischen Energie der beschleunigten Plasmafragmente frei.

Diese Arbeit präsentiert die zeitaufgelösten Messungen der Plasmaparameter wie: Elektronendichteverteilungen, Elektronentemperatur, Verteilung der selbstgenerierten Magnetfelder in laserinduzierten Plasmen bei der Wechselwirkung eines Laserpulses (100 mJ, 100 ps) mit den metallischen Targets in Luftatmosphäre. Die Evolution der beschleunigten Plasmafragmente mit den eingefrorenen Magnetfeldern wird mit hoher räumlicher (1–5  $\mu\text{m}$ ) und zeitlicher (100 ps) Auflösung verfolgt.

### *Abstract*

Laser-induced plasmas are the sources of energetic particles and an ultra short x-ray radiation. One of the possible explanations of the x-ray generation and particle acceleration is a reconnection of magnetic line of self-generated magnetic fields in laser-induced plasma. Similarly to coronal mass ejection, when a vast magnetic bubble of plasma erupts from the Sun's corona, the crossing of current lines at  $r = 0$  at the surface of resonance absorption observed in our experiments can lead to the crossing of magnetic field lines and to the explosive disruption of massive plasma blocks from the plasma body. The process is accompanied by a significant dissipation of power within the absorption layer. At the same time, the outflows of plasma convect the magnetic flux outwards.

This paper presents experimental investigations of plasma parameters in laser-produced plasmas during interaction of an intense laser pulse (pulse energy of 100 mJ and pulse duration of 100 ps) with Al-target in air. The dynamic of moving plasma blocks—laser bullets« with »frozen« magnetic fields was estimated by interferometric and polarimetric measurements with high temporal (100 ps) and spatial resolution (1–5  $\mu\text{m}$ ).

### **1. Experimentelle Untersuchungen von laserinduzierten Plasmen in Luft bei einer Leistungsdichte von $\sim 10^{14}$ W/cm<sup>2</sup>**

Bei der Wechselwirkung von Licht und Materie konnte das Licht bisher als schwache Störung angesehen werden. Mit dem Durchbruch in der Herstellung extrem hoher Lichtintensitäten in der Laserphysik sind die von Licht auf die Materie ausgeübten Kräfte vergleichbar mit atomaren Bindungskraften. Bei der Wechselwirkung solcher intensiver Laserstrahlung mit Materie entsteht fast unmittelbar eine hohe Ionisation mit Elektronendichten im Bereich von  $10^{24}$  cm<sup>-3</sup>, die zur Entstehung eines neuen Materiezustandes im extremen Nichtgleichgewicht führt. Dieser Materiezustand zeichnet sich durch die kollektiven Prozesse im Plasma aus. Dazu

gehören die Bildung dünner Propagationskanäle und oszillierender »Spiegel«, die zu einer Reflexion der einfallenden Laserpulse führen. Außerdem werden Magnetfelder im Mega-Gauss-Bereich erzeugt, die oftmals alle irdischen Felder übertreffen und damit die Möglichkeit zum Experimentieren unter Bedingungen eröffnen, die man sonst nur auf kompakten kosmischen Objekten findet (VOGEL und KOCHAN 2001).

In dieser Arbeit sollen die experimentellen Untersuchungen und Ergebnisse bei der Bestrahlung eines Al-Targets mit einer Leistungsdichte von  $\sim 10^{14}$  W/cm<sup>2</sup> in Luft diskutiert werden. Zur Diagnostik der durch Laserbeschuss erzeugten heißen dichten Materie wurden folgende Methoden verwendet: Kurzzeit-Interferometrie und Laserabsorptionsfotografie mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung; Faraday-Rotationsmessungen mit Hilfe der sondierenden Laserstrahlung; zeitaufgelöster Röntgenemissionsspektroskopie.

### *1.1 Ausbildung eines intensiven Mikropinchkanals und Ionenbeschleunigung*

Mit den genannten experimentellen Diagnostikmethoden gelang es, die zeitaufgelösten radialen Elektronendichteprofile im Fokus intensiver Laserstrahlung (Impulsenergie 60 mJ, Impulsdauer 100 ps,  $\lambda = 1064$  nm, Leistungsdichte im Fokus  $P = 3 \times 10^{13}$  W/cm<sup>2</sup>) mit extrem hoher räumlicher ( $< 1 \mu\text{m}$ ) und zeitlicher (100 ps) Auflösung zu erhalten (VOGEL 1996, VOGEL und SKVORTSOV 1998, VOGEL und KOCHAN 1998). Ein im Ergebnis generierter intensiver Elektronenstrahl ( $N_e > 10^{20}$  cm<sup>-3</sup>) und eine daraus folgende Ionenbeschleunigung direkt aus dem laserinduzierten Plasma wurde registriert. In Abbildung 1 ist ein enger Plasmakanal im laserinduzierten Plasma bei der Wechselwirkung eines intensiven Laserstrahls mit dem Al-Target in Luft dargestellt. Aus mehreren Aufnahmen für die verschiedenen Verzögerungszeiten zwischen der sondierenden Strahlung und dem fokussierten Laserpuls war es möglich, eine Ausbreitungsgeschwindigkeit der Elektronenfront im Kanal zu bestimmen. Sie beträgt  $1,4 \times 10^8$  cm/s. Mit einer Elektronendichte im Kanal von  $6 \times 10^{20}$  cm<sup>-3</sup> (siehe Abb. 1C) und einer gemessenen Plasmageschwindigkeit ist eine sehr hohe Stromdichte im laserinduzierten Mikrokanal (bis zu  $1,3 \times 10^{10}$  A/cm<sup>2</sup>) und eine damit verbundene Generation intensiver Magnetfelder zu erwarten. Mit Hilfe der Faraday-Rotationsmessungen (VOGEL 1996) wurden Magnetfeldstärken von 7,6 MG im Plasmakanal ermittelt. Die Wechselwirkung der mehrfach geladene Ionen mit dem zylinderförmigen Magnetfeld im Plasmakanal führt zur Ionenbeschleunigung mit Energien von einigen Megavolt.

### *1.2 Beschleunigte Plasmafragmente aus dem Fokus der Laserstrahlung*

Mit der Erhöhung der Energie im Hauptpuls der Laserstrahlung bis 100 mJ tritt neben der Filamentbildung ein bisher in der Literatur nicht beschriebener Effekt auf. Es kommt zu einer Abtrennung von einzelnen Plasmafragmenten im Absorptionsbereich. Diese Fragmente bewegen sich mit einer großen Geschwindigkeit entgegen der Laserstrahlung. Die mittlere Elektronendichte dieses Fragments beträgt ungefähr  $3 \times 10^{19}$  cm<sup>-3</sup>. In der Abbildung 2 sind die aufeinanderfolgenden Stadien der Abtrennung des Plasmafragments dargestellt. In der Arbeit von VOGEL und KOCHAN (2001) wurden diese Plasmafragmente als »light bullets« bezeichnet. Die durchgeführte Abschätzung der mittleren Geschwindigkeit der sich bewegenden Plasmafragmente ergab einen Wert von  $(2-5) \times 10^8$  cm/s.

Die Verteilungen der selbstgenerierten Magnetfelder in laserinduzierten Plasmen wurden mit Hilfe des magnetooptischen Faraday-Effektes bestimmt. Es wurden 5 Meßserien für die

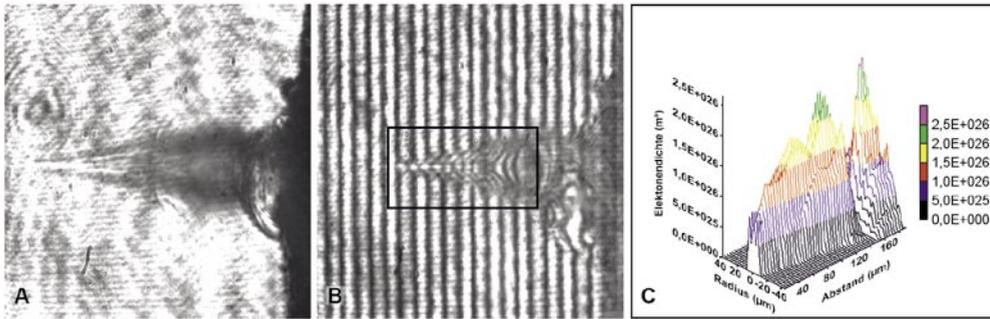


Abb. 1 (A) und (B) Absorptions- und interferometrische Aufnahmen des Plasmas mit einem Plasmakanal; (C) Elektronendichteverteilung im Plasmakanal für die Verzögerungszeit  $t = 130$  ps zwischen dem sondierenden Laserpuls mit  $\lambda = 532$  nm und dem fokussierten Laserpuls mit  $\lambda = 1064$  nm auf Al-Target in Luft. Die Intensität der Laserstrahlung im Fokus beträgt  $3 \times 10^{13}$  W/cm<sup>2</sup>.

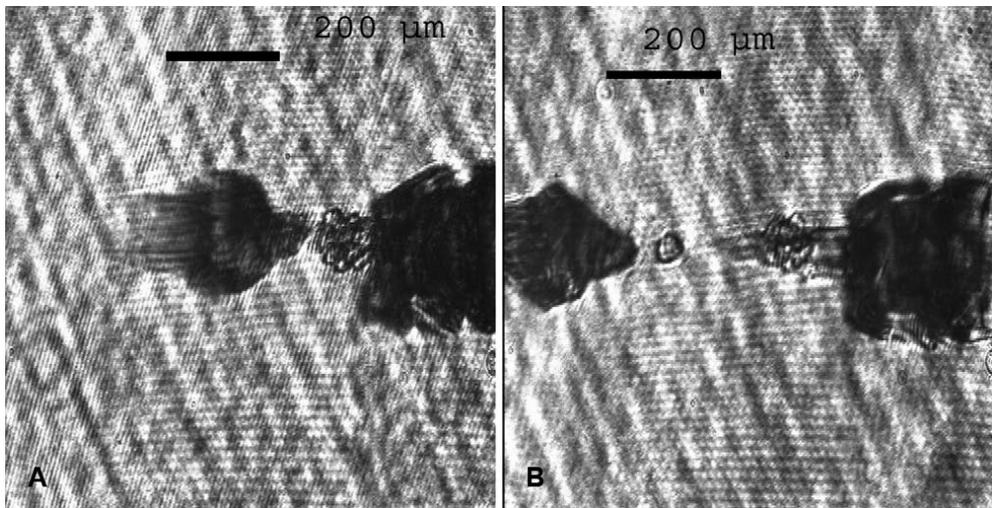


Abb. 2 Absorptionsphotographien zur Bildung der Abtrennung von Plasmafragmenten unter Wirkung einer Laserstrahlung mit hoher Intensität. Verzögerungszeit  $t = 0$  ps. Als eine mögliche Erklärung der Abtrennung von Plasmafragmenten wurde als Arbeitsergebnis folgender Mechanismus vorgeschlagen: Das durch Resonanzabsorption sich bildende Magnetfeld  $\mathbf{H}$  übt auf das Plasma gemäß  $\mathbf{f} = [\mathbf{J} \times \mathbf{H}] / c$  eine Kraft  $\mathbf{f}$  aus. Fließen im Plasma entlang der dünnen Skinschicht an der Oberfläche des laserinduzierten Plasmas die Ströme mit einer Stromdichte  $\mathbf{J}$ , ist diese Kraft so ausgerichtet, daß der vordere Teil des Plasmas entgegen der Ausbreitungsrichtung der Laserstrahlung beschleunigt wird.

Zeitpunkte  $-60, 0, +60, +120$  und  $+200$  ps relativ zum Maximum des Hauptpulses durchgeführt. Bestimmt wurden die Intensitäten am oberen und unteren Rand des Plasma-»Bullets« in Abhängigkeit von dem Drehwinkel des Analysators. Diese Intensitäten wurden auf diejenige im plasmafreien Bereich normiert. Der Analysator wurde in Schritten von  $1-2^\circ$  gedreht. Einige typische Bilder sind in der Abbildung 3 dargestellt.

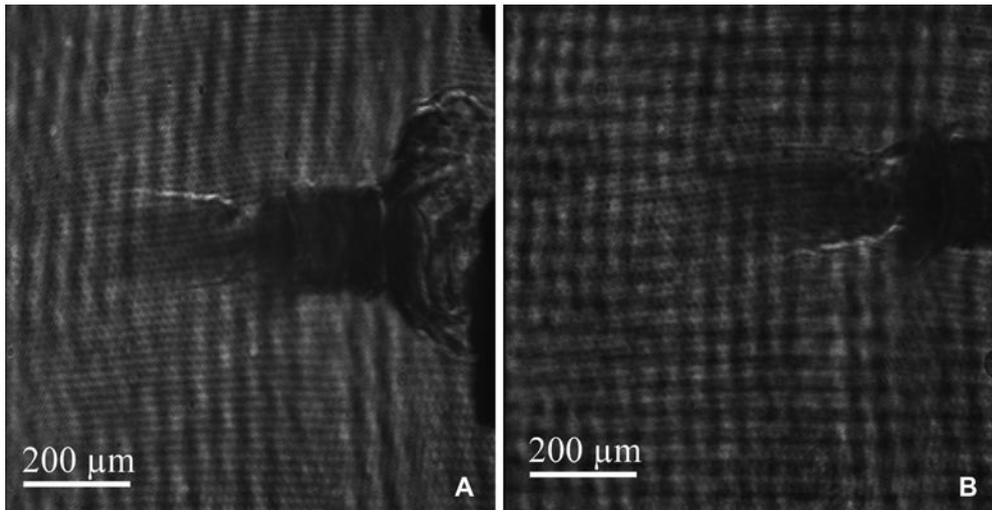


Abb. 3 Aufnahmen der Faraday-Drehung: (A)  $-27^\circ$ . (B)  $+33^\circ$ . Beim Winkel  $0^\circ$  stehen der Analysator und der Polarisator senkrecht zueinander. Ein positiver (negativer) Winkel bedeutet eine Drehung des Analysators im (gegen den) Uhrzeigersinn bei Sicht entgegen der Strahlausbreitung. Verzögerungszeit  $t = 0$  ps.

Aufgrund polarimetrischer und interferometrischer Messungen wurde die Größe des selbst-generierten Magnetfeldes zu 4–7 MG bestimmt.

## 2. Schlußfolgerungen

Die Resonanzabsorption der intensiven Laserstrahlung in der Nähe der Schockwellenfront führt zur Bildung von Mikrokanälen mit eingeschlossenen Magnetfeldern sowie zur Abtrennung und Beschleunigung massiver Plasmafragmente. Diese Effekte wurden mit einer »table-top«-Laseranlage unter Laborbedingungen registriert. Der physikalische Mechanismus für das Herausschleudern der massiven Plasmafragmente und Ionenbeschleunigung in den magnetischen Plasmakanälen ist aber sehr ähnlich zu den koronalen Massenauswürfen auf der Sonne. Sie entstehen durch die rasche, großflächige Umbildung von Magnetfeldern in der unteren Korona. An der Spitze einer koronalen Schleife werden entgegengesetzt polarisierte Magnetfelder zusammengeführt, vereinigen sich und lösen sich dadurch auf. Es entsteht ein magnetischer Kurzschluß, der zur Freisetzung von magnetischer Energie (Energieausstoß in den interplanetaren Raum bis  $10^{32}$  erg), die in koronalen Schleifen aufgebaut und gespeichert wurde, führt. Im Bereich der Wiedervereinigung magnetischer Linien erfolgt eine rasche Beschleunigung von Elektronen und Protonen auf Energien über MeV hinaus. Es folgen starke Radioausbrüche und die Generation harter Röntgen- und Gammastrahlung.

### Dank

Die Autorin bedankt sich recht herzlich bei der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina für die langjährige Unterstützung der Forschungsarbeiten und für das Ermöglichen der Präsentation der neuesten Forschungsergebnisse auf internationalen Tagungen.

*Literatur*

- VOGEL, N.: Optical guiding of high intensity laser pulses in plasma channel: interferometrical investigations. CHATTOPADHYAY, S. (Ed.): Seventh AAC Workshop, Lake Tahoe, California. AIP Conference Proceedings 398, 378–383 (1996)
- VOGEL, N., and SKVORTSOV, V. A.: Resonance self-channeling of directed energy flows and particle acceleration. Electromagnetic Waves and Electronic Systems Vol. 3, No.1–2,100–117 (1998)
- VOGEL, N., and KOCHAN, N.: Interferometric diagnostic of picosecond laser ablation in air. Appl. Surface Sci. 127–129, 928–934 (1998)
- VOGEL, N., and KOCHAN, N.: Experimental investigation of stochastic pulsation and formation of light bullets with megagauss magnetic fields by an intense laser pulse propagating in a preionized plasma. Phys. Rev. Lett. 86, 232–235 (2001)

Dr. rer. nat. habil. Nadeshda VOGEL  
Institut für Physik  
Optische Spektroskopie und Molekülphysik  
Technische Universität Chemnitz  
09107 Chemnitz  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel: +49 371 5313037  
Fax: +49 371 5313060  
E-Mail: n.vogel@physik.tu-chemnitz.de

## »Bewahren und Verändern im Kontext biologischer und kultureller Evolution«

### Gaterslebener Begegnung 2003

Gemeinsame Tagung des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina vom 22. bis 24. Mai 2003 in Gatersleben

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 90, Nr. 338  
Herausgegeben von Anna M. WOBUS (Gatersleben), Ulrich WOBUS (Gatersleben) und Benno PARTHIER (Halle/Saale)  
(2004, 244 Seiten, 15 Grafiken, 34 Abbildungen, 10 Tabellen, 29,95 Euro, ISBN 3-8047-2170-2)

Zum nunmehr zehnten Mal trafen sich in Gatersleben Natur- und Geisteswissenschaftler, Schriftsteller, Künstler, Journalisten und Politiker zum interdisziplinären Dialog über Fragen, die sich aus den Entwicklungen von Naturwissenschaft und Technik für die Gesellschaft ergeben. Naturwissenschaftler und Biologen sind dem Erhalt der in der Evolution entstandenen biologischen Vielfalt, aber auch dem Anspruch verpflichtet, dieses Potential verantwortungsvoll zum Wohle des Menschen einzusetzen und zu gestalten. Der Band enthält neben den *Anfragen an Wissenschaftler* (diesmal von der Schriftstellerin Helga SCHÜTZ, Potsdam) Beiträge zur Evolutionsbiologie (Konrad BACHMANN, Gatersleben, Evolution und Information; Jörg HACKER, Würzburg, Evolutionäre Infektionsbiologie), Ethologie (Wulf SCHIEFENHÖVEL, Andechs, Vom Instinkt zur Kultur: Zur Evolution geistiger Fähigkeiten – Beispiele aus traditionellen Kulturen Melanesiens), Humangenetik (Peter PROPPING u. a., Bonn, Humane Reproduktionsbiologie: Eingriff in die natürliche Evolution des Menschen?), Kulturwissenschaft (Sigrid WEIGEL, Berlin, Evolution der Kultur oder Kulturgeschichte der Evolutionstheorie – Epistemische Probleme am Schnittpunkt der zwei Kulturen) und Ethik (Klaus TANNER, Halle/Saale, Zwischen »Heuristik der Furcht« und Hoffnung auf Veränderung). Er spannt damit den Bogen von naturwissenschaftlichen Problemen über die Reflexion wissenschaftshistorischer und -philosophischer Zusammenhänge bis hin zur Debatte ethischer Standpunkte. Verbunden mit Gedichten der beteiligten Schriftsteller und Abbildungen der Werke der in Gatersleben zur Begegnung ausstellenden Künstler vermittelt der Band einen unkonventionellen Blick auf ein nach wie vor brisantes Thema.

*In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*

**Chemie**

---

Dr. rer. nat. Christine HAHN

Geboren 1970 in Gardelegen. 1988 bis 1993 Chemiestudium an der ehemaligen Technischen Hochschule Leuna-Merseburg. 1993 bis 1997 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anorganische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1996 zweieinhalbmonatiger Forschungsaufenthalt am *Dipartimento di Chimica* der Universität Neapel. Promotion 1997 zum Dr. rer. nat. über Organorhodium- und Organopalladium-Komplexe an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 1997/1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg. 1998 bis 2001 Forschungsaufenthalt am *Dipartimento di Chimica* der Universität Neapel. Seit 2002 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

## Substitution *versus* Addition – Dikationische Palladium(II)- und Platin(II)-Olefinkomplexe und ihre Reaktionen mit protischen Nucleophilen

Christine HAHN (Erlangen)

Mit 16 Abbildungen und 3 Tabellen

### Zusammenfassung

Als Beitrag zur Erschließung neuer Synthesemethoden zur rationellen Gewinnung organischer Zwischenprodukte wurden die Aktivierung einfacher Olefine durch Koordination an hochelektrophile Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexen und ihre Reaktionen mit Nucleophilen zur C–O-, C–N- bzw. C–C-Bindungsknüpfung untersucht. Unter Verwendung des dreizähligen Chelatliganden 2,6-Bis(diphenylphosphinomethyl)pyridin (PNP) gelang die Synthese einer Reihe neuer dikationischer Olefinkomplexe vom Typ  $[M(\text{PNP})(\text{CHR}=\text{CHR}')](\text{BF}_4)_2$  ( $M = \text{Pd}^{\text{II}}, \text{Pt}^{\text{II}}$ ). Die Bindungsverhältnisse der Olefine in den Komplexen wurden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopisch und durch Röntgenkristallstrukturanalyse charakterisiert. Die koordinierten Olefine erwiesen sich als stark elektrophil und addierten sehr leicht Nucleophile NuH mit schwacher Basizität ( $\text{NuH} = \text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}, \text{aromatische Amine}$ ).

Im Falle der Palladium(II)-Komplexe konkurriert die Additionsreaktion mit der Olefinsubstitution in einem schnellen Gleichgewichtsprozeß. Die gebildeten Additionsprodukte  $[\text{Pd}(\text{PNP})(\text{CHRCHR}'\text{Nu})]\text{BF}_4$  zeichnen sich durch eine ungewöhnlich hohe Stabilität gegenüber  $\beta$ -H-Eliminierung aus, die erstmalig eine  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopische Bestimmung von thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten für die Gesamt- und Teilreaktionen (Addition und Substitution) erlaubte. Mit den analogen Platin(II)-Olefinkomplexen zeigte sich die nucleophile Addition gegenüber der Substitution sowohl kinetisch als auch thermodynamisch als stark bevorzugte Reaktion. Für die  $\text{Pd}^{\text{II}}$ - und  $\text{Pt}^{\text{II}}$ -Komplexe mit unsymmetrisch substituierten Olefinen  $\text{CH}_2=\text{CHR}$  erfolgt der nucleophile Angriff mit einer hohen Regioselektivität (Markownikow-Addition).

Mit dem  $\text{Pt}^{\text{II}}$ -Ethenkomplex  $[\text{Pt}(\text{PNP})(\text{CH}_2=\text{CH}_2)](\text{BF}_4)_2$  wurde eine katalytische hochselektive Addition von relativ elektronenreichen Olefinen an Ethen als ein neuer Reaktionsweg der Hydrovinylierung entdeckt.

### Abstract

The activation of simple olefins by coordination at highly electrophilic palladium(II) and platinum(II) complexes and their reaction with nucleophiles resulting in C–O, C–N, and C–C bond formation were investigated as a contribution to new synthetic methodologies for rational production of organic intermediates. By use of the tridentate chelating ligand 2,6-bis-(diphenylphosphinomethyl)pyridine (PNP) a series of new dicationic olefin complexes  $[\text{M}(\text{PNP})(\text{CHR}=\text{CHR}')](\text{BF}_4)_2$  ( $M = \text{Pd}^{\text{II}}, \text{Pt}^{\text{II}}$ ) could be synthesized. The bonding conditions of the olefins in the complexes were characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and X-Ray crystal structure analysis. The coordinated olefins showed a highly electrophilic character and add very easily protic nucleophiles with weak basicity ( $\text{NuH} = \text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}, \text{aromatic amines}$ ).

In the case of the palladium(II) complexes the addition reaction competes with the substitution of the olefin in a fast equilibrium process. The formed addition products  $[\text{Pd}(\text{PNP})(\text{CHRCHR}'\text{Nu})]\text{BF}_4$  showed an unusually high stability toward  $\beta$ -H-elimination. This allowed for the first time the  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopic determination of thermodynamic equilibrium constants of the overall and individual reactions (addition and substitution). With the analogous platinum(II) olefin complexes the nucleophilic addition was found to be kinetic as well as thermodynamically favoured reaction over the substitution. For the  $\text{Pd}^{\text{II}}$  and  $\text{Pt}^{\text{II}}$  complexes with unsymmetrically substituted olefins  $\text{CH}_2=\text{CHR}$  the nucleophilic attack is highly regioselective (Markownikow addition).

A catalytic and highly selective addition of moderate electron-rich olefins to ethene was discovered with the  $\text{Pt}^{\text{II}}$  ethene complex  $[\text{Pt}(\text{PNP})(\text{CH}_2=\text{CH}_2)](\text{BF}_4)_2$  as a new reaction pathway for the hydrovinylation.

## 1. Einführung

Die Addition von Nucleophilen (Nu) an die olefinische C–C-Doppelbindung ist eine fundamentale Reaktion zur Einführung funktioneller Gruppen in Kohlenwasserstoffe und hat daher große Bedeutung für die organische Synthesechemie. Durch die Koordination einfacher Olefine  $\text{CHR}=\text{CHR}'$  ( $\text{R}, \text{R}' = \text{H}, \text{Alkyl}, \text{Aryl}$ ) an Metallkomplexen ( $[\text{M}]$ ) kann die Elektrophilie der C–C-Doppelbindung gesteigert und somit die Addition von Nucleophilen (Nu) erleichtert werden (EISENSTEIN und HOFFMANN 1981).

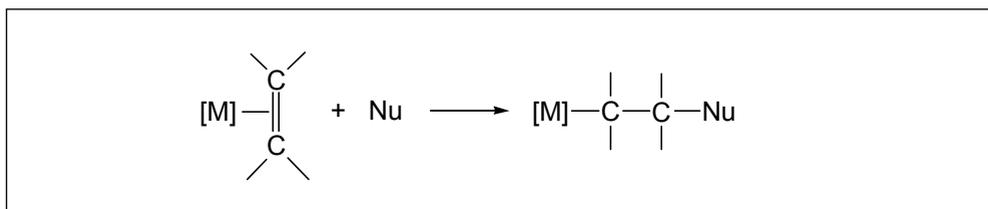


Abb. 1 Addition von Nucleophilen an Oletin - Metallkomplexe

Stöchiometrische Additionen stark basischer Nucleophile ( $\text{Nu} =$  aliphatische Amine, Alkoxide, Carboxylate und Alkyl-Anionen) an Palladium(II)- und Platin(II)-Olefinkomplexen unter C–N-, C–O- und C–C-Bindungsbildung sind seit langem bekannt (COLLMAN et al. 1987, McDANIEL 1995) und in ihrem mechanistischen Ablauf vielseitig untersucht worden (BÄCKVALL et al. 1979, ÅKERMARK et al. 1982). Für die Addition schwach basischer Nucleophile ( $\text{Nu} =$  z. B. aromatische Amine, Alkohole) wird jedoch eine sehr starke Aktivierung des Olefins notwendig. Theoretische Studien von SAKAKI zeigten (1987), daß mit Erhöhung der positiven Komplexladung die Elektrophilie des koordinierten Olefins stark gesteigert werden kann. Ebenso experimentell fanden MARESCA und NATILE (1994) eine im Vergleich zu Neutralkomplexen höhere Reaktivität monokationischer  $\text{Pt}^{\text{II}}$ -Olefinkomplexe. Der Effekt der zweifach positiven Ladung in  $\text{Pd}^{\text{II}}$ - und  $\text{Pt}^{\text{II}}$ -Olefinkomplexen ist, mit Ausnahme von einigen dikationischen Diolefinkomplexen (ROTONDO et al. 1976, PIETROPAOLO et al. 1978), bislang noch nicht weiter untersucht worden. Wegen der hohen positiven Ladung am Metallzentrum wird eine stark verminderte  $\pi$ -Rückdonation in der Metall-Olefin-Bindung angenommen und deshalb ist eine geringe Komplexstabilität zu erwarten.

Durch die Verwendung des dissoziationsstabilen dreizähligen Coliganden 2,6-Bis(diphenylphosphinomethyl)pyridin (PNP) gelang kürzlich die Darstellung erster Vertreter von dikationischen  $\text{Pd}^{\text{II}}$ -Olefinkomplexen, die eine bemerkenswert hohe Stabilität aufwiesen, so daß sie isoliert und strukturell charakterisiert werden konnten (HAHN et al. 1998).

In ersten Versuchen zur Reaktion mit sekundären aliphatischen Aminen zeichnete sich bereits eine sehr hohe Reaktivität dieser dikationischen  $\text{Pd}^{\text{II}}$ -Olefinkomplexe gegenüber der nucleophilen Addition ab, so daß weitere Studien, insbesondere mit schwach basischen Nucleophilen, sehr lohnenswert erschienen. Die Einbeziehung strukturanaloger Platin(II)-Olefinkomplexe in die Untersuchungen sollte zunächst zu Vergleichszwecken bei der Strukturaufklärung der Palladium(II)-Komplexe dienen, stellte aber auch eine interessante Erweiterung der Reaktionsstudien zur Olefinaktivierung durch ein elektrophiles Metallzentrum dar.

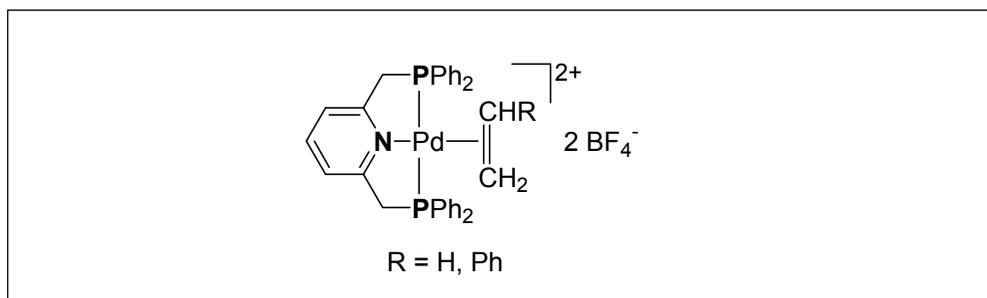


Abb. 2 Dikationischer Pd<sup>II</sup>-Olefinkomplex

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Synthese und Charakterisierung dikationischer Pd<sup>II</sup>- und Pt<sup>II</sup>-Olefinkomplexe

Durch Reaktion des Chloropalladium(II)-Komplexes mit zwei Äquivalenten Silbertetrafluoroborat in Gegenwart eines Überschusses an Olefin ließen sich entsprechend Gleichung [1] eine Reihe dikationischer Pd<sup>II</sup>-Komplexe mit verschiedenen Monoolefinen und Diolefinen synthetisieren (HAHN et al. 2001). Ausgehend vom Iodoplatin(II)-Komplex konnten ebenfalls mit der Silbersalzmethode strukturanaloge Pt<sup>II</sup>-Komplexe mit  $\alpha$ -Olefinen dargestellt werden (HAHN et al. 2002b). Ein alternativer Syntheseweg ist die Substitution des Ethens aus dem Ethenkomplex durch das jeweilige Olefin (vgl. Gleichung [2]), wodurch weitere Olefinkomplexe synthetisiert werden konnten, die mit der Silbersalzmethode nicht zugänglich waren.

Die neuen Olefinkomplexe konnten als relativ stabile Feststoffe isoliert und NMR-spektroskopisch sowie durch Elementaranalyse charakterisiert werden. Die Diolefine bilden Einkernkomplexe und koordinieren im Sinne eines Monoolefins nur mit einer C–C-Doppelbindung am M(PNP)-Fragment.

Die Röntgenkristallstrukturanalyse des Norbornadienkomplexes (Abb. 4) liefert einen weiteren Strukturbeweis für die einzählige Koordination des Diolefins am Pd(PNP)-Fragment. Als eine strukturelle Besonderheit ist die parallele Anordnung der C–C-Doppelbindung zur Koordinationsebene hervorzuheben, da in quadratisch planaren Komplexen die senkrechte Olefinkoordination als energetisch günstiger gilt (ALBRIGHT et al. 1979). Vermutlich spielen sterische Wechselwirkungen des Norbornadiens (C32–C38) mit den Phenylgruppen des PNP-Liganden eine Rolle.

Im Pt<sup>II</sup>-Ethenkomplex ist das Ethenmolekül erwartungsgemäß senkrecht zur Koordinationsebene gebunden (vgl. Abb. 5). Die Pt–C-Abstände [(2,181(8) Å, 2,180(6) Å] sind deutlich länger als die entsprechenden Abstände im Zeise-Salz K[PtCl<sub>3</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)] [2,128(3) Å, 2,135(3) Å] (LOVE et al. 1975). Dagegen scheint sich die zweifach positive Komplexladung nicht merklich auf die C–C-Bindungslänge auszuwirken: [Pt(PNP)(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)]<sup>2+</sup>, [1,359(10) Å] (HAHN et al. 2002b); [PtCl<sub>3</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)]<sup>−</sup> [1,375(4) Å] (LOVE et al. 1975).

Zur Beschreibung des elektrophilen Charakters der C–C-Doppelbindung in den dikationischen Pd<sup>II</sup>- und Pt<sup>II</sup>-Olefinkomplexen eignen sich besonders die durch die Koordination induzierten <sup>13</sup>C-NMR-Hochfeldverschiebungen  $\Delta\delta$  ( $\Delta\delta = \delta_{\text{koordiniert}} - \delta_{\text{frei}}$ ) der olefinischen

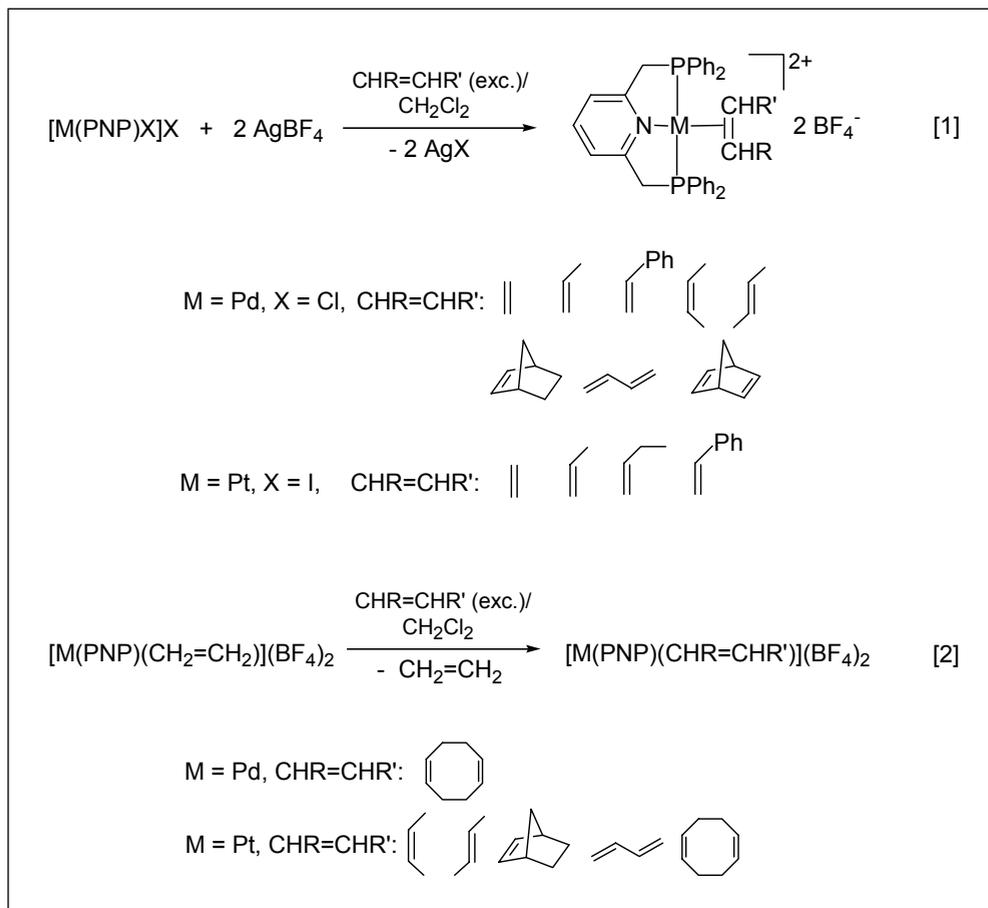


Abb. 3 Reaktion dikationischer Pd<sup>II</sup>-Komplexe mit verschiedenen Monoolefinen und Diolefinen (Gleichung [1]). Alternativer Syntheseweg (Gleichung [2])

Kohlenstoffkerne. Die gemessenen <sup>13</sup>C-NMR-Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Für die Pd<sup>II</sup>-Komplexe werden  $\Delta\delta$  Werte zwischen -14 und -36 ppm und für die Pt<sup>II</sup>-Komplexe zwischen -27 und -46 ppm beobachtet. Die Werte sind insgesamt deutlich geringer als die der isostrukturellen monokationischen Rhodium(I)-Olefin-Komplexe  $[\text{Rh}(\text{PNP})(\text{CH}_2=\text{CHR})]^+$  ( $\Delta\delta \approx -60$  ppm) (HAHN et al. 1997) und lassen somit auf eine relativ geringe Elektronendichte am koordinierten Olefin schließen. Dies steht im Einklang mit der erhöhten positiven Komplexladung und dem damit verbundenen verringerten  $\pi$ -Rückbindungsanteil in der Pd<sup>II</sup>- und Pt<sup>II</sup>-Olefinbindung.

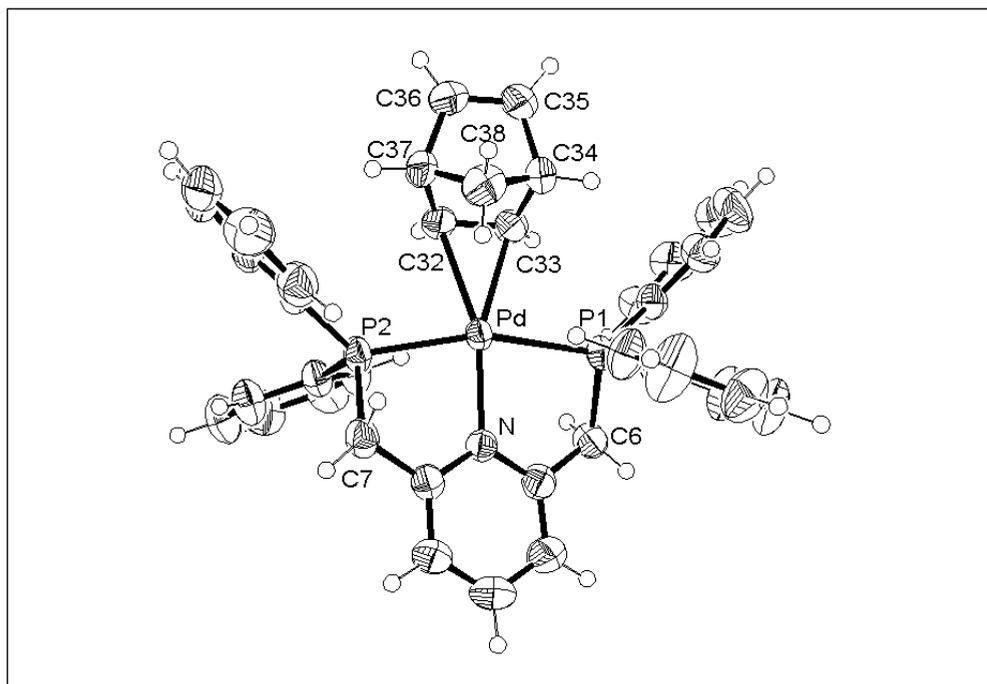


Abb. 4 ORTEP-Ansicht des Dikations [Pd(PNP)(NBD)]<sup>2+</sup>

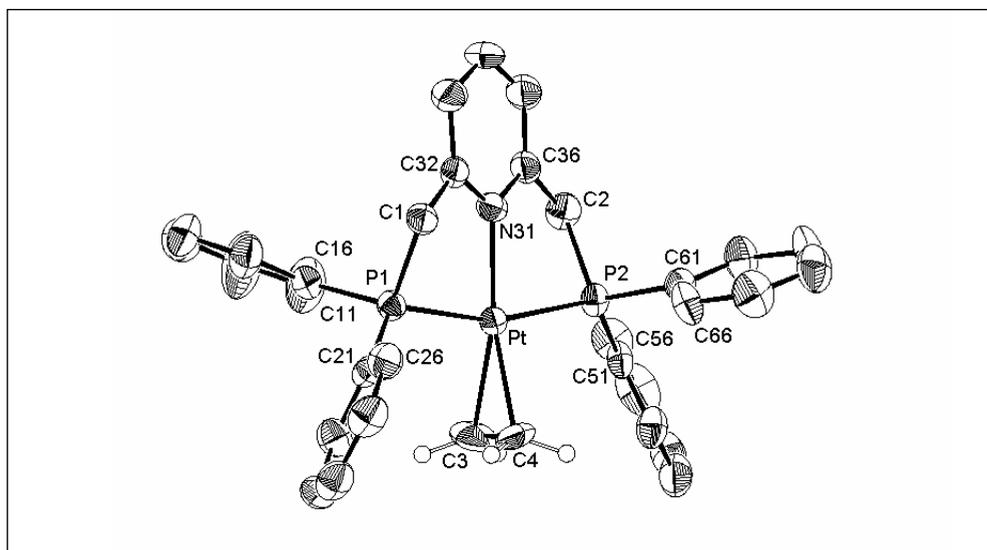


Abb. 5 ORTEP-Ansicht des Dikations [Pd(PNP)(CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup>

Tab. 1  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten  $\delta$  [ppm],  $\Delta\delta$  [ppm] und  $J_{\text{C-Pt}}$  [Hz] der olefinischen Kohlenstoffkerne in  $[\text{M}(\text{PNP})(\text{CHR}=\text{CHR}') ]^{2+}$  (M = Pd, Pt;  $\Delta\delta = \delta_{\text{koordiniert}} - \delta_{\text{frei}}$ )

CHR=CHR'	$[\text{Pd}(\text{PNP})(\text{CHR}=\text{CHR}') ]^{2+}$				$[\text{Pt}(\text{PNP})(\text{CHR}=\text{CHR}') ]^{2+}$					
	=CH <sub>2</sub>		=CH		=CH <sub>2</sub>		=CH			
	$\delta$	$\Delta\delta$	$\delta$	$\Delta\delta$	$\delta$	$\Delta\delta$	$J_{\text{C-Pt}}$	$\delta$	$\Delta\delta$	$J_{\text{C-Pt}}$
CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	88,0	-35,3			77,9	-45,4	116			
CH <sub>2</sub> =CHMe	86,4	-29,6	118,1	-16,5	74,3	-41,7	138	103,5	-31,1	108
CH <sub>2</sub> =CHEt	84,0	-28,7	120,3	-19,5	73,1	-42,7	131	107,7	-35,2	113
CH <sub>2</sub> =CHPh	77,2	-34,8	120,2	-15,3	66,5	-45,5	137	108,2	-27,3	81
Z-MeCH=CHMe			110,9	-14,4				96,9	-28,5	115
E-MeCH=CHMe			107,8	-17,6				99,2	-26,7	118
Norbornen			105,2	-30,5				91,9	-43,8	131
Norbornadien			114,1	-29,6						
Cyclooctadien			113,8	-14,7						
CH <sub>2</sub> =CHCH=CH <sub>2</sub>	79,9	-36,4	115,5	-21,4						

Die unterschiedlich starken Hochfeldverschiebungen  $\Delta\delta$  für =CH<sub>2</sub> und =CH in den koordinierten unsymmetrisch substituierten Olefinen CH<sub>2</sub>=CHR (vgl. Tab. 1) weisen auf eine starke Polarisierung der C–C-Doppelbindung hin, die im isostrukturellen monokationischen Rh<sup>I</sup>-Komplex nicht ausgeprägt ist (vgl. Abb. 6). Die geringeren  $\Delta\delta$ -Werte für die =CH-Signale deuten auf eine geringere Elektronendichte am Methin-Kohlenstoffatom hin, daher sollte dort der nucleophile Angriff bevorzugt stattfinden. Somit ist durch die zweifach positive Komplexladung nicht nur eine hohe Reaktivität des koordinierten Olefins, sondern auch eine hohe Regioselektivität zu erwarten.

## 2.2 Reaktionen mit protischen Nucleophilen

Durch Reaktion der dikationischen Pd<sup>II</sup>-Monoolefinkomplexe mit protischen Nucleophilen wie MeOH, H<sub>2</sub>O, Me<sub>2</sub>NH sowie schwach basischen aromatischen Aminen ArNH<sub>2</sub> (wie z. B. *p*-Methoxyanilin [ $\text{p}K_{\text{a}} = 5,3$ ] und *o*-Chloranilin [ $\text{p}K_{\text{a}} = 2,6$ ]) konnten in Gegenwart von NaHCO<sub>3</sub> als Hilfsbase (zur irreversiblen Protonenabstraktion und Produktstabilisierung) nahezu quantitativ entsprechende Additionsprodukte präparativ gewonnen werden (vgl. Gleichung [3]). Die  $\beta$ -funktionalisierten  $\sigma$ -Alkyl-Pd<sup>II</sup>-Komplexe ließen sich als völlig stabile Feststoffe isolieren und durch NMR-Spektroskopie charakterisieren. Wie bereits aus den  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopischen Daten erwartet, wurde für die Komplexe mit unsymmetrisch substituierten Olefinen CH<sub>2</sub>=CHR (R = Me, Ph) eine hohe Regioselektivität der Addition am Methinkohlenstoff (=CH-) gefunden (Markownikow-Addition). Die ungewöhnlich hohe Stabilität der  $\sigma$ -Alkyl-Pd<sup>II</sup>-Komplexe gegenüber  $\beta$ -H-Eliminierung erlaubte erstmalig eine direkte NMR-spektroskopische Untersuchung der nucleophilen Addition an Pd<sup>II</sup>-Olefinkomplexe in der Reaktionslösung.

Für verschiedene Pd<sup>II</sup>-Olefinkomplexe wurde nach dem Lösen in Methanol die schnelle Einstellung eines Gleichgewichtes gemäß Gleichung [6] beobachtet, das sich aus den Teilgleichgewichten Substitution [4] und Addition/Protonendissoziation [5] zusammensetzt. Die Lösung zeigte eine entsprechend stark saure Reaktion. Für die Gesamtgleichgewichte [6] wurden die

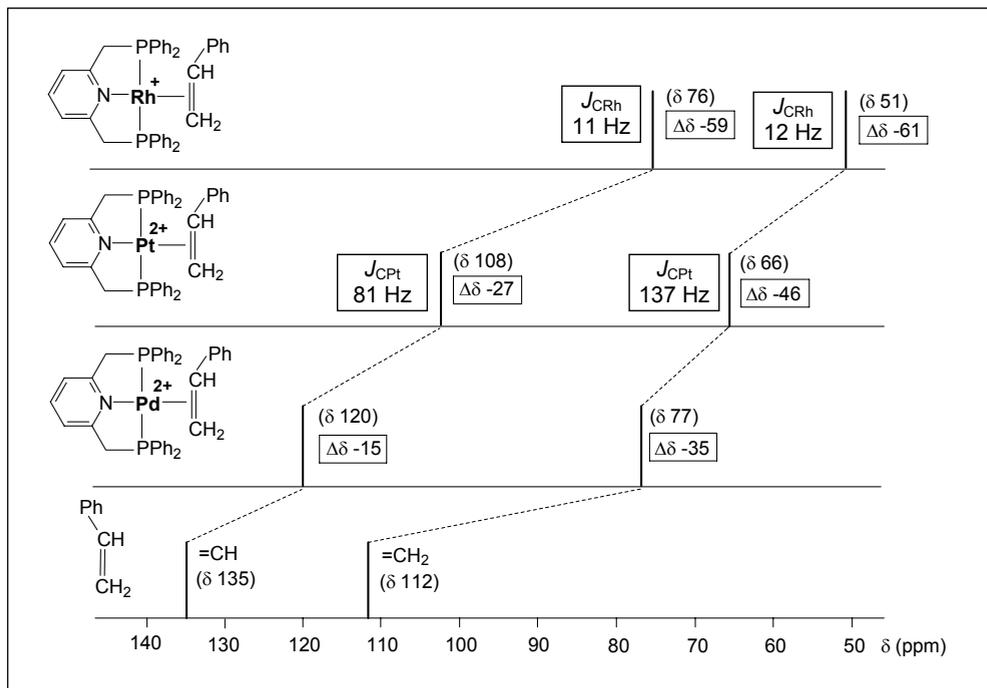


Abb. 6 Die durch die Koordination induzierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Hochfeldverschiebungen des Styrens  $\Delta\delta = \delta_{\text{koordiniert}} - \delta_{\text{frei}}$  sowie die  $^{13}\text{C}$ -Metall-Kopplungskonstanten  $J_{\text{CM}}$  verdeutlichen den Polarisierungseffekt in den dikationischen  $\text{Pd}^{\text{II}}$ - und  $\text{Pt}^{\text{II}}$ -Komplexen.

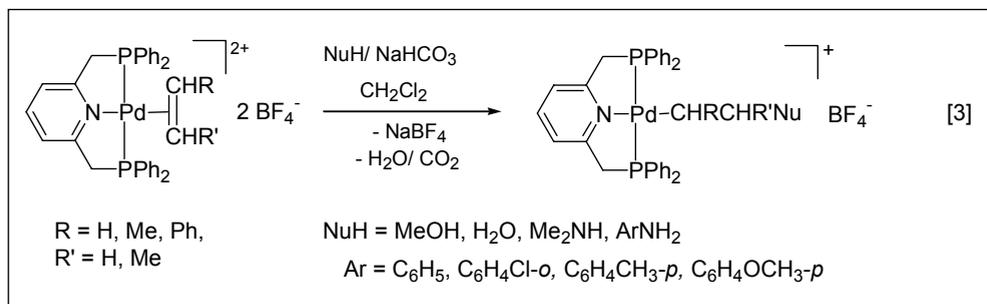


Abb. 7 Nucleophile Addition an dikationische  $\text{Pd}^{\text{II}}$ -Olefin Komplexe (Gleichung [3])

thermodynamischen Konstanten  $K$  durch Integration der entsprechenden  $^1\text{H}$ -NMR-Signale bestimmt, die eine Abnahme der relativen Stabilitäten der  $\sigma$ -Alkylkomplexe bzw. eine ansteigend konkurrierende Olefin-Substitution mit zunehmender Substituentengröße  $\text{R/R}'$  widerspiegeln (Tab. 2). Die Reversibilität der Reaktion in Gleichung [6] zeigte sich in der Verschiebung der Gleichgewichtslage entsprechend  $K$  bei Variation der Olefin- bzw. Protonenkonzentration.

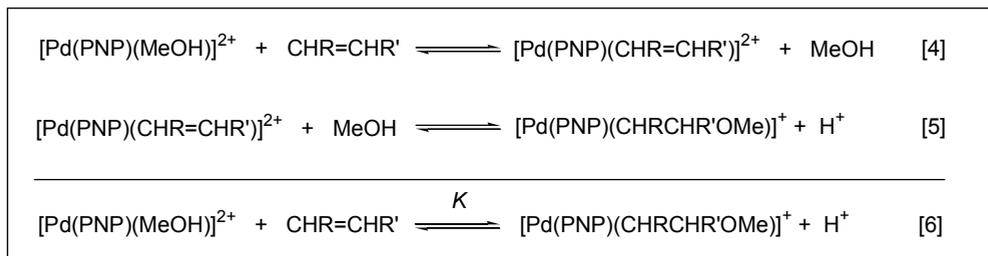


Abb. 8 Reaktionen des Pd<sup>II</sup>-Olefinkomplexes (Gleichung [4] – Substitution, Gleichung [5] – Addition/Protonendissoziation, Gleichung [6] Gesamtgleichgewicht)

Tab. 2 Thermodynamische Konstanten *K* für das Gleichgewicht Gleichung [6]

CHR=CHR'	<i>K</i>
CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	$8 \times 10^{-1}$
CH <sub>2</sub> =CHMe	$5 \times 10^{-2}$
<i>Z</i> -MeCH=CHMe	$1 \times 10^{-3}$
<i>E</i> -MeCH=CHMe	$< 3 \times 10^{-4}$
CH <sub>2</sub> =CHPh	–

Eine direkte Methanoladdition an die C–C-Doppelbindung wurde bislang nur für einige dikationische Platin(II)-Diolefin Komplexe beobachtet (PIETROPAOLO et al. 1978) oder durch einen dimeren Platin(III)-Komplex induziert (MATSUMOTO et al. 1998, LIN et al. 1998). Von monokationischen Platin(II)-Olefin Komplexen wurde berichtet, daß bei Umkristallisation in heißem Methanol keinerlei Reaktion zu beobachten war (weder Substitution noch Addition) (MARESCA et al. 1980).

Die dikationischen Pt<sup>II</sup>-Komplexe mit α-Olefinen ergaben sofort nach dem Lösen in Methanol in quantitativer Reaktion die entsprechenden β-Methoxyalkyl-Komplexe (Gleichung [7]), während die (*Z*)- und (*E*)-2-Buten-Komplexe nur zum Teil reagierten. Im Unterschied zu den Pd<sup>II</sup>-Komplexen fand jedoch in keinem Falle eine Substitution des Olefins durch Methanol statt. Damit zeigen die dikationischen Pt<sup>II</sup>-Olefin Komplexe sowohl im Vergleich zu monokationischen Pt<sup>II</sup>-Komplexen als auch zu den strukturanalogen dikationischen Pd<sup>II</sup>-Komplexen eine höhere Reaktivität gegenüber nucleophiler Addition.

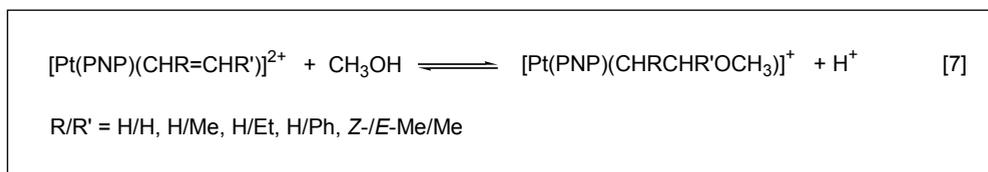


Abb. 9 Reaktion zu β-Methoxyalkyl-Komplexen (Gleichung [7])

Die Reaktion des Ethen-Pd<sup>II</sup>-Komplexes mit 5 Äquivalenten H<sub>2</sub>O in einer homogenen Dichlormethanolösung führte lediglich zur gleichgewichtmäßigen Substitution des Ethens. Die <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch bestimmte Gleichgewichtskonstante gibt eine 20fach höhere Stabilität des Ethenkomplexes gegenüber dem Aquakomplex an. Erst bei Sättigung der Lösung mit Ethen und Zugabe eines Überschusses an Wasser (unter Bildung eines Zweiphasengemisches) konnte ein Gemisch aus einem einfach- und einem zweifach-alkylierten Additionsprodukt (1:3) detektiert werden (vgl. Abb. 10). Mit der hohen Ethenkonzentration in der Reaktionslösung wird einerseits die Substitution zum Aquakomplex unterdrückt, und mit dem überschüssigen Wasser (das als Brønsted-Base wirkt) wird andererseits das Proton vom primär gebildeten Additionsprodukt aus der organischen in die wässrige Phase praktisch »extrahiert«, wodurch das Gleichgewicht komplett auf die Seite des β-Hydroxyethyl-Komplexes verschoben wird, der dann noch weiter zum Zweikernkomplex reagiert.

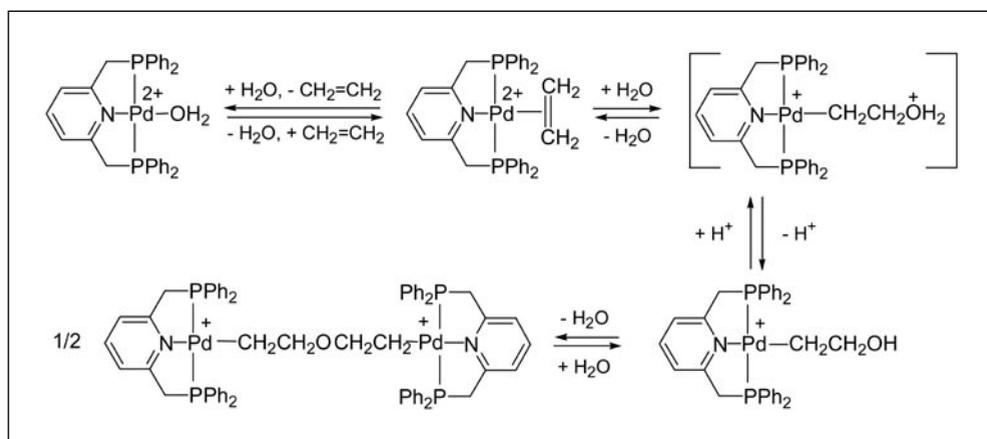
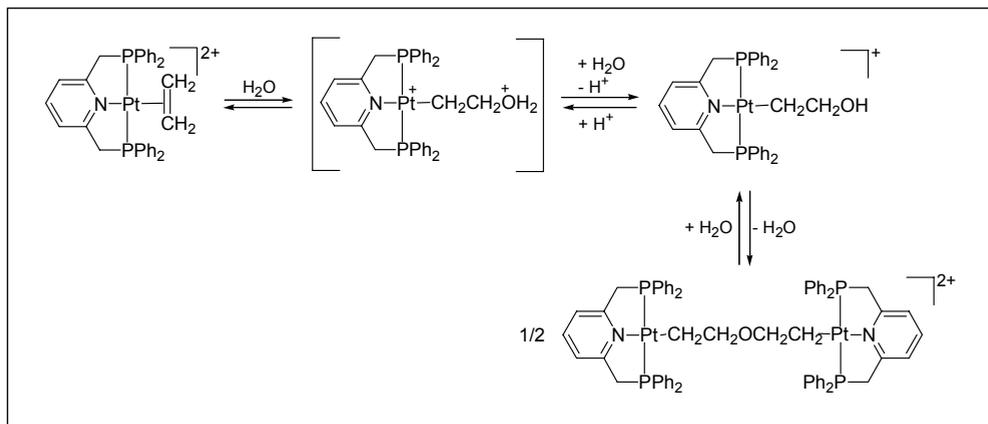


Abb. 10 Gesamtgleichgewichtsprozeß des Ethen-Pd<sup>II</sup>-Komplexes mit Wasser

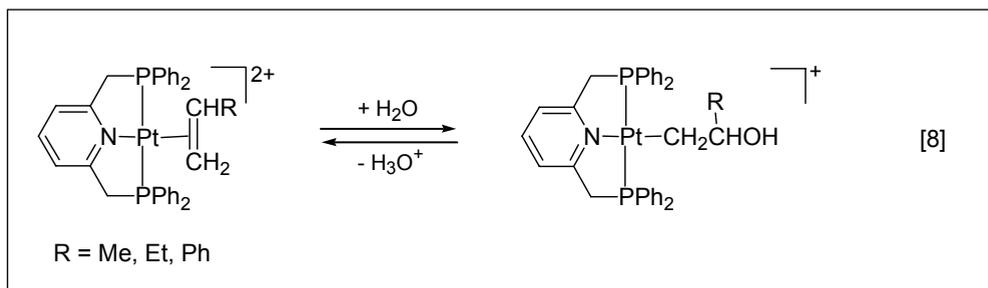
Dasselbe Additionsproduktgemisch wurde gleichermaßen erhalten, wenn anstelle des Ethenkomplexes der isolierte Aquakomplex [Pd(PNP)(H<sub>2</sub>O)](BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> eingesetzt wurde. Die Behandlung der isolierten Additionsprodukte mit HBF<sub>4</sub> in Gegenwart von Ethen führte zur gleichgewichtmäßigen Rückbildung des Ethenkomplexes. Diese Versuche zeigten die Reversibilität von Substitutions- und Additions-gleichgewicht.

Ähnliche Untersuchungen zur Reaktion mit Wasser wurden auch mit dem Propen-Pd<sup>II</sup>-Komplex durchgeführt, wobei die Additionsprodukte (Markownikow-Addition) unter entsprechenden Bedingungen sich dagegen nur schwer nachweisen ließen. Der Propen-Pd<sup>II</sup>-Komplex weist somit eine geringere Reaktivität gegenüber der nucleophilen Addition mit Wasser auf als der Ethen-Pd<sup>II</sup>-Komplex.

Der analoge Ethen-Pt<sup>II</sup>-Komplex reagiert mit einem Überschuß von Wasser, ähnlich wie der Ethen-Pd<sup>II</sup>-Komplex, zu einem Gemisch aus einfach- und einem zweifach-alkylierten Additionsprodukt (1:1) (vgl. Abb. 11). Jedoch wurde keine Ethen-Substitution durch das Wasser beobachtet.

Abb. 11 Reaktion des Ethen-Pt<sup>II</sup>-Komplexes mit einem Überschuß von Wasser

Die Addition an Propen-, 1-Buten- und Styren-Pt<sup>II</sup>-Komplex verlief ebenso quantitativ mit einem Überschuß an Wasser und ohne Zusatz von freiem Olefin sowie unter hoher Regioselektivität (Markownikow-Addition). In allen Fällen wurden nur einfache Additionsprodukte detektiert (Gleichung [8]), was sicher mit der sterischen Hinderung durch den Substituenten R zusammenhängt.

Abb. 12 Addition an Propen-, 1-Buten- und Styren-Pt<sup>II</sup>-Komplex mit einem Überschuß an Wasser und ohne Zusatz von freiem Olefin führt zu einfachen Additionsprodukten (Gleichung [8])

Mit der Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten für die reine nucleophile Addition kann ein direktes Maß der Olefinaktivierung in den dikationischen Pd<sup>II</sup>- und Pt<sup>II</sup>-Komplexen erhalten werden. Die Voraussetzung dafür ist die Detektierbarkeit des primär gebildeten Additionsproduktes  $[M(PNP)(CHRCHR'NuH)]^{2+}$  und der strikte Ausschluß der Deprotonierung durch überschüssiges Nucleophil (wegen gleichzeitiger Brønsted-Basefunktion, vgl. Gleichung [9]).

Wegen der zu geringen Basizität gibt es mit Wasser bzw. Methanol keinen Zugang zur experimentellen Bestimmung einer thermodynamischen Konstante der elementaren Additionsreaktion, da mit einem Äquivalent dieser Nucleophile sich kein nachweisliches Additionsprodukt bildet. Jedoch sollte dies mit einem stärker basischen Nucleophil wie Anilin möglich sein.



Abb. 13 Deprotonierung des primären Additionsproduktes  $[\text{M}(\text{PNP})(\text{CHRCHR}'\text{NuH})]^{2+}$  (Gleichung [9])

Durch Einsatz des isolierten Anilinkomplexes  $[\text{Pd}(\text{PNP})(\text{PhNH}_2)](\text{BF}_4)_2$  (= Substitutionsprodukt) konnte das Verhältnis von Nucleophil und  $\text{Pd}^{\text{II}}$ -Komplex von exakt 1:1 gewährleistet werden. Die Behandlung des Anilin- $\text{Pd}^{\text{II}}$ -Komplexes mit Ethen führte innerhalb einiger Minuten zur gleichgewichtsmäßigen Bildung des entsprechenden  $\beta$ -Ammonioethyl-Komplexes (vgl. Abb. 14). Diese Reaktion stellt formal eine »Insertion« des Ethens in die  $\text{Pd}$ -N-Bindung dar. Mechanistisch findet erst eine Substitution des Anilins durch das Ethen unter Bildung des Ethenkomplexes statt, der dann von dem freigesetzten Amin extern angegriffen wird. Die  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch bestimmte Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{ins}'}$  entspricht dem Verhältnis der relativen thermodynamischen Stabilitäten von Additions- und Substitutionsprodukt ( $K_{\text{ins}'} = K_{\text{add}}/K_{\text{sub}}$ ). Durch unabhängige Bestimmung der Substitutionsgleichgewichtskonstante (über zwei Hilfgleichgewichte von Ligandaustauschreaktionen mit Acetonitril und Pyridin) konnte die Additionskonstante  $K_{\text{add}}$  berechnet werden. Der ermittelten Wert  $K_{\text{add}} = 2 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$  (vgl. Tab. 3) zeigt, daß die nucleophile Addition des Anilins an den dikationischen Ethen- $\text{Pd}^{\text{II}}$ -Komplex ein thermodynamisch stark begünstigter Prozeß ist, während die Substitution in der gleichen Größenordnung konkurriert.

In analoger Weise wurden die Gleichgewichtskonstanten für den dikationischen  $\text{Pt}^{\text{II}}$ -Ethenkomplex bestimmt. Jedoch mußte zur Überwindung der starken kinetischen Hemmung der Substitution des Anilins durch das Ethen zur Reaktionsmischung Acetonitril zugegeben werden. Dadurch konnte die Gleichgewichtseinstellung relativ beschleunigt werden und war innerhalb von 10 Tagen zu beobachten. Die Addition ist nicht nur kinetisch, sondern auch thermodynamisch eine stärker bevorzugte Reaktion als im Falle des analogen  $\text{Pd}^{\text{II}}$ -Komplexes, bzw. die Substitution ist thermodynamisch weniger konkurrierend.

Ein Vergleich mit einem neutralen Ethen- $\text{Pt}^{\text{II}}$ -Komplex (vgl. Tab. 3), der praktisch keine Addition mit Anilin einging ( $K_{\text{add}} < 0,1 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), verdeutlicht den Effekt der Erhöhung der positiven Ladung auf die Verschiebung des Additionsgleichgewichtes ( $K_{\text{add}} = 3 \cdot 10^6 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) um einen Faktor von  $>10^7$ . Für Neutralkomplexe wurde die Substitution ebenfalls als eine langsame, gegenüber der Addition aber eine thermodynamisch stark bevorzugte (irreversible) Reaktion (AL-NAJJAR et al. 1979, GREEN et al. 1981) gefunden.

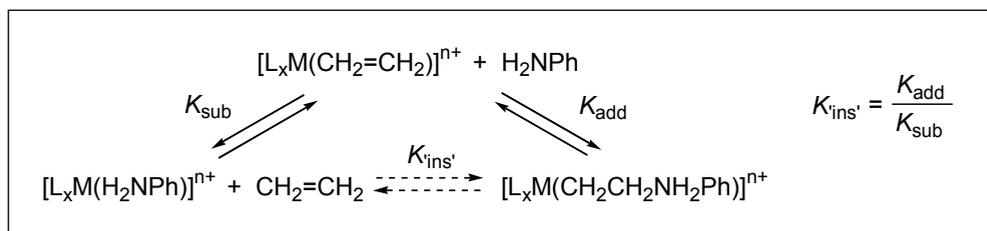


Abb. 14 Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten für die Addition ( $K_{\text{add}}$ ), Substitution ( $K_{\text{sub}}$ ) und »Insertion« ( $K_{\text{ins}'}$ );  $\text{L}_x = \text{PNP}$ ;  $\text{M} = \text{Pd}^{\text{II}}$ ,  $\text{Pt}^{\text{II}}$ ;  $n = 2$ .

Tab. 3 <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch ermittelte Gleichgewichtskonstanten für die Addition ( $K_{\text{add}}$ ), Substitution ( $K_{\text{sub}}$ ) und »Insertion« ( $K_{\text{ins}}$ ), vgl. Abb. 14

$[\text{L}_x\text{M}(\text{CH}_2=\text{CH}_2)]_n^+$	$K_{\text{add}}$ [l · mol <sup>-1</sup> ]	$K_{\text{sub}}$ [l · mol <sup>-1</sup> ]	$K_{\text{ins}} = K_{\text{add}}/K_{\text{sub}}$ [l · mol <sup>-1</sup> ]	Literatur
$[(\text{PNP})\text{Pd}(\text{CH}_2=\text{CH}_2)]_2^+$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	1	HAHN et al. 2001
$[(\text{PNP})\text{Pt}(\text{CH}_2=\text{CH}_2)]_2^+$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^4$	102	HAHN et al. 2002a,b
$[(\text{H}_2\text{NPh})\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{CH}_2=\text{CH}_2)]$	< 0,1	irrev.	–	GREEN et al. 1979

### 2.3 Katalytische Codimerisierung von Ethen mit relativ elektronenreichen Olefinen

Obwohl die dikationischen Pd<sup>II</sup>- und Pt<sup>II</sup>-Olefinkomplexe insgesamt eine hohe Reaktivität gegenüber protischen Nucleophilen mit O- und N-Donoratomen zeigten, haben diese O–C- und N–C-Bindungsknüpfungsreaktionen aufgrund der hohen Stabilität der β-funktionalisierten σ-Alkylkomplexe nur stöchiometrischen Charakter. Dagegen stellte die Fähigkeit des Ethen-Pt(II)-Komplexes  $[\text{Pt}(\text{PNP})(\text{CH}_2=\text{CH}_2)](\text{BF}_4)_2$  zur hochselektiven katalytischen Codimerisierung von Ethen mit relativ elektronenreichen Olefinen (≡ Hydrovinylierung) ein besonders interessanter Befund bezüglich der C–C-Bindungsknüpfung dar (vgl. Gleichung [10]; HAHN et al. 2002a). Die höchste Umsatzzahl von ca. 200 wurde mit 2-Methyl-2-buten in 4 h bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck Ethen bei einem Konzentrationsverhältnis [Olefin]/[Pt] von 300:1 erzielt.

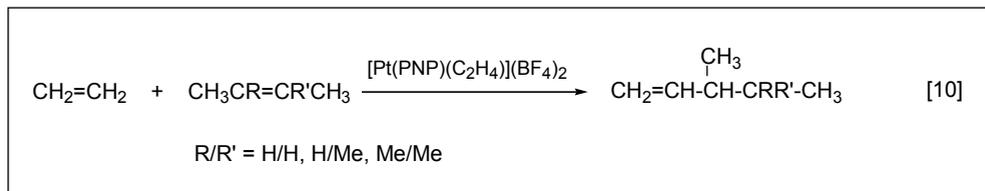


Abb. 15 Codimerisierung von Ethen mit relativ elektronenreichen Olefinen (Gleichung [10])

Die bislang bekannten Hydrovinylierungsreaktionen verlaufen über Metall-Hydrid-Zwischenstufen und einen Insertionsschritt (JOLLY und WILKE 1996). Im Falle des PNP-Pt<sup>II</sup>-Komplexes (1) wird dagegen ein externer nucleophiler Angriff des Olefins  $\text{CH}_3\text{CR}=\text{CR}'\text{CH}_3$  (A) und eine intramolekulare Alkyl- bzw. Hydridverschiebung (B) angenommen (vgl. Abb. 16), die durch Markierungsversuche mit deuteriertem Ethen nachgewiesen werden konnte.

### 3. Schlußbetrachtung

Durch die Verwendung des dreizähligen PNP-Liganden konnten stabile dikationische Palladium(II)- und Platin(II)-Olefinkomplexe dargestellt und damit der Einfluß der zweifach positiven Komplexladung zur Steigerung der Elektrophilie der C–C-Doppelbindung in

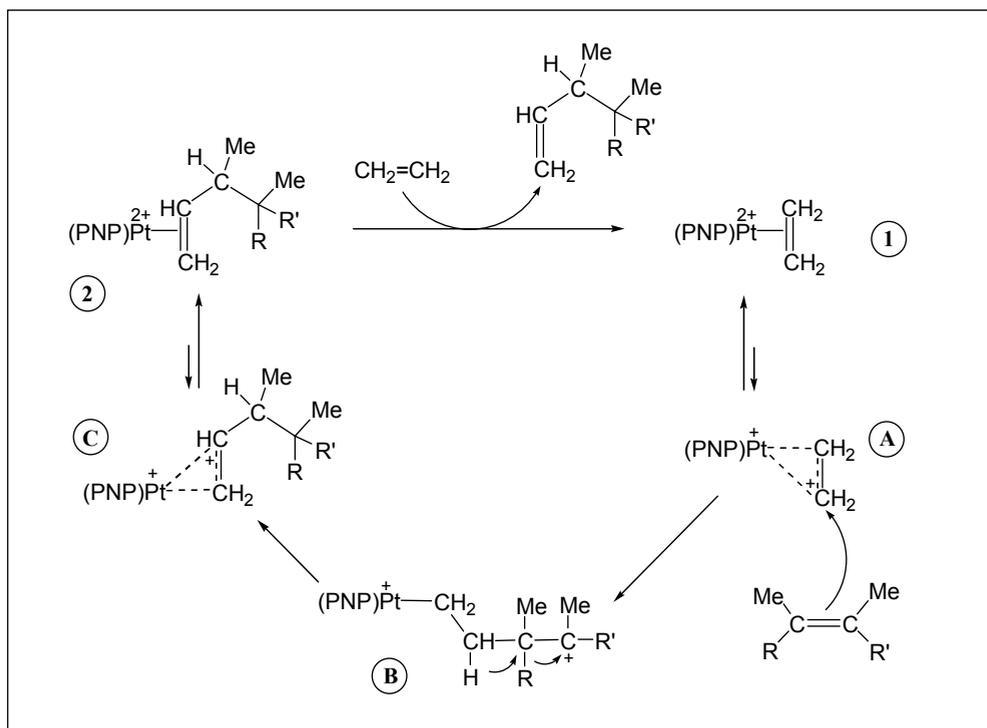


Abb. 16 Vorschlag zum Reaktionsmechanismus der katalytischen Codimerisierung von Ethylen mit relativ elektronenreichen Olefinen

einfachen Olefinen untersucht werden. Die durch nucleophile Addition gebildeten  $\sigma$ -Alkyl-Pd<sup>II</sup>-Komplexe zeigten eine ungewöhnlich hohe Stabilität gegenüber  $\beta$ -H-Eliminierung, was erstmalig eine umfassende NMR-spektroskopische Studie des Gesamtgleichgewichtsprozesses sowie die experimentelle Bestimmung von thermodynamischen Konstanten der Additions- und konkurrierenden Substitutionsreaktion erlaubte. Die Ergebnisse zeigen, daß die Olefine in den dikationischen Pd<sup>II</sup>-Komplexen gegenüber Nucleophilen sowohl kinetisch als auch thermodynamisch stark aktiviert sind. Die hohe Elektrophilie des koordinierten Olefins ermöglicht sogar die Addition von schwach basischen Nucleophilen wie Methanol und aromatischen Aminen auch in Abwesenheit von Hilfsbasen.

Für die isostrukturellen Pt<sup>II</sup>-Olefin Komplexe wurde im Vergleich zu den Pd<sup>II</sup>-Komplexen sowohl kinetisch als auch thermodynamisch eine stärkere Olefinaktivierung gefunden. Im Unterschied zu den Pd<sup>II</sup>-Komplexen ist die Substitution des Olefins durch das Nucleophil kinetisch stark gehemmt, so daß die Additionsreaktion zur dominierenden Reaktion wird. Die kinetische Hemmung der Substitution ist vermutlich auch die Ursache der besonderen Fähigkeit des Ethen-Pt<sup>II</sup>-Komplexes zur hochselektiven Codimerisierung von Ethen mit relativ elektronenreichen Olefinen, die im Falle des analogen Pd<sup>II</sup>-Komplexes nicht beobachtet wurde.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß mit den dikationischen Pd<sup>II</sup>- und Pt<sup>II</sup>-Olefin Komplexen eine höhere Elektrophilie der C-C-Doppelbindung und somit eine wesentlich höhere Reaktivität gegenüber nucleophiler Addition als mit neutralen oder monokationischen Olefin-

komplexen erreicht wird. Darüber hinaus wurde eine hohe Regioselektivität (MARKOWNIKOW) in allen Fällen beobachtet, was die Komplexe als interessante Substrate für neue C–C- und C–Heteroatom-Bindungsknüpfungsreaktionen erscheinen läßt (HAHN 2004).

### Dank

Mein Dank gilt an erster Stelle der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, die mir durch die Zuerkennung des Förderstipendiums die Realisierung meines Forschungsprojektes am *Dipartimento di Chimica* der *Università di Napoli »Federico II«* ermöglichte, sowie Herrn Dr. Roland RIEDEL für seine stets freundliche und zuvorkommende Betreuung während des gesamten Förderzeitraumes. Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Aldo VITAGLIANO für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken, der durch seine Diskussionsfreudigkeit und Originalität bei allen wissenschaftlichen und technischen Problemlösungen sehr stimulierend auf den Forschungsverlauf einwirkte. Bei Gabriella MIGNANO und Dr. Pasquale MORVILLO möchte ich mich besonders für die präparativen Zuarbeiten bedanken. Den Kollegen vom *Centro Interdipartimentale di Metodologie Chimico Fisiche* Leopoldo ZONA, Vincenzo PISCOPO und dem Direktor Italo GIUDICIANNI bin ich für die Bereitstellung verschiedener NMR-Geräte (Varian Gemini 200, Bruker AC-250, Bruker WH-400) sowie für ihre stetige Verfügbarkeit und technischen Hilfeleistungen bei der NMR-Spektroskopie zu besonderem Dank verpflichtet. Dr. Ida ORABONA und Prof. Federico GIORDANO (Università di Napoli) sowie Herrn Dr. Eberhardt HERDTWECK (TU München, Garching) danke ich für die Anfertigung der Röntgenkristallstrukturanalysen. Frau Filomena CAROZZA und Frau Dr. Elisa BURATTINI habe ich für ihre unkomplizierte und kooperative Hilfe in der Bibliothek und die unverzügliche Zustellung der bestellten Artikelkopien aus dem »POZZO« zu danken (HAHN 2004).

### Literatur

- ÅKERMARK, B., BÄCKVALL, J.-E., and ZETTERBERG, K.: Nucleophilic addition to  $\pi$ -olefin-,  $\pi$ -allyl- and  $\sigma$ -alkyl-palladium complexes. Examples of »Umpolung« by the use of organometallic reagents. *Acta Chem. Scand. B* 36, 577–585 (1982)
- ALBRIGHT, T. A., HOFFMANN, R., THIBEAULT, J. C., THORN, D. L.: Ethylene complexes. Bonding, rotational barriers, and conformational preferences. *J. Amer. Chem. Soc.* 101, 3801–3812 (1979)
- AL-NAJJAR, I. M., and GREEN, M.: Nucleophilic Attack on olefins co-ordinated to platinum. Part 2. Stabilities of 2-ammonioethanide  $\sigma$ -adducts and of five-co-ordinate complexes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1651–1656 (1979)
- BÄCKVALL, J. E., ÅKERMARK, B., and LJUNGGREN, S. O.: Stereochemistry and mechanism for the palladium(II)-catalyzed oxidation of ethylene in water (the Wacker process). *J. Amer. Chem. Soc.* 101, 2411–2416 (1979)
- COLLMAN, J. P., HEGEDUS, L. S., NORTON, J. R., and FINKE R. G.: Principles and Application of Organotransition Metal Chemistry; pp. 410–415. Mill Valley, CA: University Science Books 1987
- EISENSTEIN, O., and HOFFMANN, R. J.: Transition-metal complexed olefins: How their reactivity toward a nucleophile relates to their electronic structure. *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 4308–4320 (1981)
- GREEN, M., SARHAN, J. K. K., and AL-NAJJAR, I. M.: Nucleophilic attack on olefins coordinated to platinum. Part 3. Effect of substituents on the olefins on the formation of 2-ammonioethanide compounds (H<sub>3</sub>NCHRCHR'-Pt), of four-membered ring complexes, and of five-co-ordinate species. *J. Chem. Soc. D. Trans.* 1565–1571 (1981)
- HAHN, C.: Enhancing electrophilic alkene activation by increasing the positive net charge in transition-metal complexes and application in homogenous catalysis. *Chemistry—A European Journal* 2004. Published Online 20.8.2004, DOI: 10.1002/chem.200400550
- HAHN, C., CUCCIOLITO, M. E., and VITAGLIANO, A.: Coordinated olefins as incipient carbocations: Catalytic co-dimerization of ethylene and internal olefins by a dicationic Pt(II)-ethylene complex. *J. Amer. Chem. Soc.* 124, 9038–9039 (2002a)
- HAHN, C., MORVILLO, P., HERDTWECK, E., and VITAGLIANO, A.: Coordination of alkenes at a highly electrophilic site. New dicationic platinum(II) complexes: Synthesis, structure and reactions with nucleophiles. *Organometallics* 21, 1807–1818 (2002b)
- HAHN, C., MORVILLO, P., and VITAGLIANO, A.: Olefins coordinated at a highly electrophilic site – Dicationic palladium(II) complexes and equilibrium reactions with nucleophiles. *Eur. J. Inorg. Chem.* 419–429 (2001)
- HAHN, C., SIELER, J., and TAUBE, R.: Complex catalysis, XLIX. On the coordination of olefins and secondary amines at the cationic [2,6-Bis(diphenylphosphanylmethyl)pyridine]rhodium(I) fragment [Rh]PNP)]<sup>+</sup> – synthesis and characterization of [Rh(PNP)(L)]X (L = ethylene, styrene, HNR<sub>2</sub>; X = BF<sub>4</sub>, PF<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>). *Chem. Ber.* 130, 339–345 (1997)

- HAHN, C., VITAGLIANO, A., GIORDANO, F., and TAUBE, R.: Coordination of olefins and N-donor ligands at the fragment [2,6-bis((diphenylphosphino)methyl)pyridine]-palladium(II). Synthesis, structure, and amination of the new dicationic complexes  $[\text{Pd}(\text{PNP})(\text{CH}_2=\text{CHR})](\text{BF}_4)_2$  (R = H, Ph). *Organometallics* *17*, 2060–2066 (1998)
- JOLLY, P. W., and WILKE, G.: In: CORNILS, B., and HERRMANN, W. A. (Eds.): *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*. Vol. 2, pp. 1024–1048. Weinheim: VCH 1996
- LIN, Y.-S., TAKEDA, S., and MATSUMOTO, K.: Consecutive double nucleophilic attacks on an olefin promoted by a platinum(III) dimeric complex. *Organometallics* *18*, 4897–4899 (1999)
- LOVE, R. A., KOETZLE, T. F., WILLIAMS, G. J. B., ANDREWS, L. C., and BAU, R.: Neutron diffraction study of the Zeise's salt  $\text{KPtCl}_3(\text{C}_2\text{H}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}$ . *Inorg. Chem.* *14*, 2653–2657 (1975)
- MARESCA, L., and NATILE, G.: Cationic complexes of platinum(II) containing olefins: A type of electrophilic substrate. *Comments Inorg. Chem.* *16*, 95–112 (1994)
- MARESCA, L., NATILE, G., and RIZZARDI, G.: Stable  $\eta$ - and  $\sigma$ -ethene cationic complexes of platinum(II). *Inorg. Chim. Acta* *38*, 53–57 (1980)
- MATSUMOTO, K., NAGAI, Y., MATSUNAMI, J., MIZUNO, K., ABE, T., SOMAZAWA, R., KINOSHITA, J., and SHIMURA, H.: A Synthetic route to alkyl- $\text{Pt}^{\text{III}}$  dinuclear complexes from olefins and its implication on the olefin oxidation catalyzed by amidate-bridged  $\text{Pt}^{\text{III}}$  dinuclear complexes. *J. Amer. Chem. Soc.* *120*, 2900–2907 (1998)
- MCDANIEL K. F.: In: ABEL, E. W., STONE, A., and WILKINSON, G. (Eds.): *Comprehensive Organometallic Chemistry II*, Vol. 12, pp. 601–622. London: Pergamon Press London 1995
- PIETROPAOLO, R., CUSMANO, F., ROTONDO, E., and SPADARO, A.: Preparation and reactions of palladium(II) and platinum(II) dienyl complexes. *J. Organomet. Chem.* *155*, 117–122 (1978)
- ROTONDO, E., TRESOLDI, G., FARAONE, F., and PIETROPAOLO, R.: Displacement of dienes from planar complexes. 1. Reaction of (1,5-cyclooctadiene)dichloropalladium(II) with 2,2'-bipyridyl. *Inorg. Chem.* *15*, 2102–2107 (1976)
- SAKAKI, S., MARUTA, K., and OHKUBO, K.: Ab initio MO study of palladium-assisted nucleophilic attack on a coordinated olefin: Semiquantitative understanding of the reaction and the mechanism of palladium. *Inorg. Chem.* *26*, 2499–2505 (1987)

Dr. Christine HAHN  
Institut für Organische Chemie  
Universität Erlangen-Nürnberg  
Henkestraße 42  
91054 Erlangen  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 9131 8522990  
Fax: +49 9131 8526865  
E-Mail: christine.hahn@chemie.uni-erlangen.de

---

Dr. rer. nat. Christoph Andreas SCHALLEY

Geboren 1968 in Krefeld. 1988 bis 1994 Chemiestudium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau und der Technischen Universität Berlin. Promotion 1997 zum Dr. rer. nat. über die Gasphasenchemie von Peroxiden (Arbeitskreis Prof. Helmut SCHWARZ). Auszeichnung mit dem Schering-Preis 1997. Eineinhalbjähriger Postdoc-Aufenthalt in der Gruppe von Prof. Julius REBEK am Scripps Research Institute in La Jolla (Kalifornien) als Leopoldina-Stipendiat. 1999–2003 als Liebig-Stipendiat des Fonds der Chemischen Industrie Habilitand am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Seit Juli 2003 Privatdozent in Bonn, Heisenberg-Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Dozentenstipendiat des Fonds der Chemischen Industrie.

# Molekulares Tennis: Massenspektrometrische Untersuchung von selbst-organisierten molekularen Kapseln

Christoph Andreas SCHALLEY (Bonn)

Mit 12 Abbildungen

## *Zusammenfassung*

Der Artikel gibt einen Überblick über selbst-organisierende Kapseln aus zwei bzw. vier selbst-komplementären identischen Untereinheiten, die über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Mit der richtigen Krümmung der Monomere können sich so dynamische Containermoleküle bilden, die in ihrem Inneren Gastmoleküle einschließen können. Der Fokus liegt auf der Charakterisierung dieser Wirt-Gast-Komplexe mittels massenspektrometrischer Methoden. Dabei steht die Frage im Vordergrund, inwieweit die Massenspektrometrie in der Lage ist, über das Molekulargewicht hinaus Strukturinformationen zu liefern, die die Kapselstruktur belegen. Dafür werden Konkurrenzexperimente mit deformierten Monomeren diskutiert, die Selektivität gegenüber Gästen verschiedener Größe untersucht und die Bildung von Heterodimeren und Heterotetrameren hinsichtlich der Paßgenauigkeit der Monomere studiert. Stoßaktivierung in der Gasphase beweist, daß die Kapseln sogar nach der Ionisation noch ihre Struktur beibehalten und den Gast in ihrem Inneren einschließen.

## *Abstract*

The article gives an overview on self-assembling capsules built from two or four identical, self-complementary subunits, which are bound to each other through hydrogen bonding. When appropriately curved, the monomers can thus form dynamic container molecules that are capable of encapsulating guest molecules in their interior. The characterization of these host-guest complexes by mass spectrometric means forms the focus in particular with respect to the potential to gather evidence for a capsular structure from mass spectrometric experiments. Competition experiments with deformed monomers are discussed, the selectivity for differently sized guests is examined, and the formation of heterodimers and heterotetramers is investigated with respect to the geometric fit of the monomers. Collisional activation in the gas phase provides evidence even for a capsular structure after ionization. The guest is retained inside the cavity.

## **1. Einleitung**

Zur Optimierung der Materialausnutzung bei der Produktion bestehen Tennisbälle aus zwei identischen, in etwa 8-förmigen Hälften, die – um 90° gegeneinander verdreht und zu einem C gebogen – zusammengesetzt werden. Der Gedanke, makroskopische Objekte auf molekularer Ebene durch geeignete Moleküle hinsichtlich ihrer Form und Funktion abzubilden, ist nicht neu (SCHALLEY 2002). Daher ist es auch nicht verwunderlich, daß Julius REBEK und seine Gruppe den Tennisball zum Vorbild nahmen, um analog zu einer Tennisballhälfte gekrümmte Moleküle zu synthetisieren, die über eine Naht von Wasserstoffbrücken dimerisieren und dabei einen Hohlraum in ihrem Inneren aufspannen (CONN und REBEK 1997, SCHALLEY und REBEK 2000).

Zwei Prinzipien stecken dahinter, deren Bedeutung für die moderne Chemie nicht überschätzt werden kann, zumal sie in fast allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen: Zunächst einmal müssen die Bindungsstellen, d. h. im Falle der molekularen Tennisbälle die zur Bildung von Wasserstoffbrücken befähigten Atome, an exakt den richtigen Stellen im

Molekül positioniert sein, um die Bindung zu gewährleisten. Dieses Prinzip wird als »Präorganisation« bezeichnet und wurde 1987 mit dem Nobelpreis für Donald Cram gewürdigt (Cram 1988). Das zweite wichtige Konzept ist das der Selbstorganisation (Whitesides et al. 1991, Philp und Stoddart 1996). Es besagt, daß komplexe Gebilde aus einer Anzahl einfacher Baueinheiten aufgebaut werden können, wenn die Einheiten möglichst genau passend bei gleichzeitiger Rigidität an den richtigen Stellen zur Bindung befähigt, also in der chemischen Synthese geeignet »programmiert« worden sind. Ist das der Fall, bilden sich die komplexen Architekturen auch völlig ohne das Zutun des Chemikers, weil sie aufgrund maximaler Bindungsenergie energetisch bevorzugt sind. In der Regel erzeugt man mit diesem Ansatz nicht nur neue Strukturen, sondern auch neue Eigenschaften, die nur dem Komplex, nicht aber den Bauteilen eigen sind, also im Beispiel des Tennisballs etwa die Bildung des Hohlraums im Inneren, der zum Einschluß von Gastmolekülen herangezogen werden kann.

Von wesentlicher Bedeutung für die Anwendung beider Prinzipien sind schwache Bindungen, die eine reversible Bildung der Architekturen erlauben. Der Chemiker kennt starke, kovalente Bindungen, die das klassische Kriterium der Moleküldefinition sind: Alles was kovalent miteinander verbunden ist, gehört zum selben Molekül. Unter normalen Bedingungen, d. h. bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck ohne Zusatz reaktiver Reagenzien oder Katalysatoren, werden sie nur selten gebrochen. Hier finden wir also in aller Regel keine Umkehrbarkeit der chemischen Prozesse. Deswegen greift der Chemiker – und übrigens auch die Natur – auf nicht-kovalente Wechselwirkungen zurück. Darunter werden alle *intermolekularen* Kräfte zusammengefaßt, etwa Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Ladungen oder von Ladungen mit molekularen Dipolen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Ihre Bindungsstärke liegt, von Ausnahmen einmal abgesehen, im Bereich von 1 bis 15% der Stärke einer kovalenten Bindung. Die Anordnung vieler additiver nicht-kovalenter Einzelwechselwirkungen zwischen zwei Molekülen kann aber dennoch zu insgesamt substantiellen Bindungsenergien führen.

Wir wollen uns im Folgenden auf eine Reise durch einen kleinen Bereich der Supramolekularen Chemie begeben, auf der wir uns zuerst die Eigenschaften und Strukturen einiger der Kapseln ansehen wollen, um danach mit dem nötigen Wissen gewappnet zu sein, eine neue Methode zu ihrer strukturellen Charakterisierung kennenzulernen.

## 2. Der Tennisball und sein größerer Bruder, der Softball

Schauen wir uns den ersten Tennisball etwas genauer an. Im Zentrum von Abbildung 1 finden wir seine Struktur, wie sie mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse bestimmt werden konnte. Man erkennt deutlich die beiden C-förmigen Ballhälften, die in einer am Tennisball orientierten Geometrie exakt zusammenpassen. Zwischen den beiden Hälften bestehen nur Wasserstoffbrücken, aber keine kovalente Bindung, so daß sich beide Hälften in Lösung auch trennen und dann wieder mit anderen identischen Molekülen zu Kapseln verbinden können. Die Synthese ist im Kasten darüber skizziert (Wyller et al. 1993). Für den Tennisball besteht sie lediglich aus zwei relativ einfach durchzuführenden Synthesestufen. Bei den größeren Kapseln, die wir uns weiter unten ansehen werden, ist die Herstellung mitunter deutlich komplizierter und erfordert eine umfangreiche präparative Erfahrung. Im ersten Schritt wird das Glycoluril-Bindungsmotiv (*blau/grün*) aus seinen Vorläufern, einem Diketon (*grün*) und Harnstoff (*blau*), zusammengesetzt. Dieses Bindungsmotiv trägt alle erforderlichen Bindungsstellen, nämlich die beiden

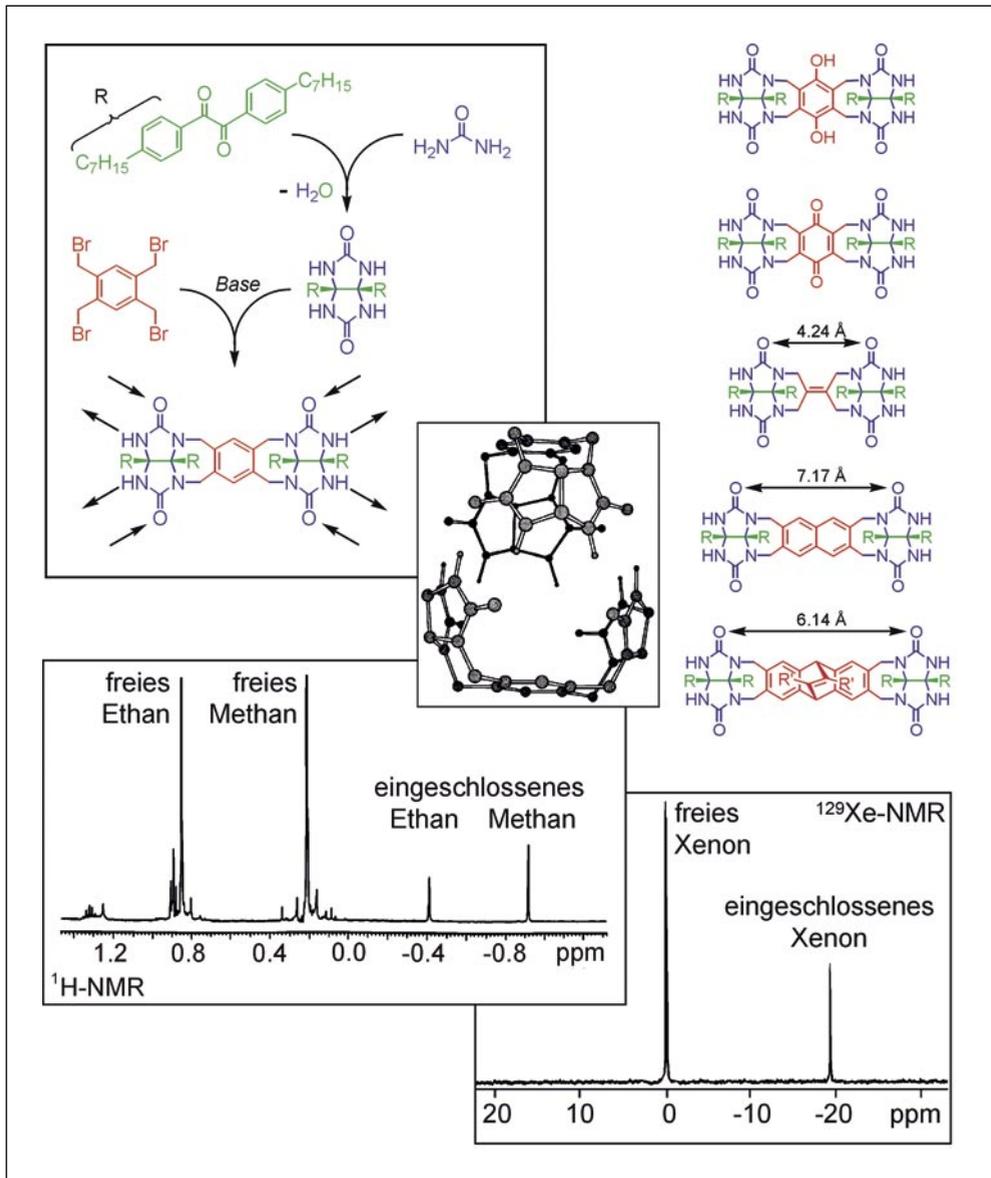


Abb. 1 *Mitte*: Kristallstruktur des molekularen Tennisballs (Seitenketten der Übersichtlichkeit halber weggelassen). *Links oben*: Synthese des Monomeren aus einfachen Vorläufern. Die Pfeile deuten die an der Bildung von Wasserstoffbrücken beteiligten funktionellen Gruppen an. *Links unten*: Ausschnitt aus dem  $^1H$ -NMR-Spektrum einer Lösung von Tennisball mit Methan und Ethan in Chloroform. Zwei Signale für jeden Gast werden beobachtet, die dem freien und dem in der Kapsel eingeschlossenen Gast zugeordnet werden können. *Daneben*:  $^{129}Xe$ -NMR-Spektrum einer entsprechenden Mischung mit Xenon als Gast. *Rechts oben*: Analoge Tennisballmonomere mit veränderten Mittelstücken.

Carbonylgruppen und die beiden Harnstoff-NH-Protonen, die später bei der Dimerisierung die Wasserstoffbrücken generieren werden, wie es durch die Pfeile angedeutet wird. Es ist wichtig zu erwähnen, daß innerhalb dieser Glykolorileinheit schon eine Krümmung existiert, die für die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zum Nachbarmonomeren essentiell ist. Zwei solche Motive können im zweiten Schritt mit einem passenden Mittelstück (*rot*) verbunden werden und fertig ist ein C-förmiges, ziemlich rigides Molekül, das die nötige konkave Form hat, um mit einem identischen Gegenstück eine Kapsel zu bilden.

Im Inneren des Tennisballs entsteht so ein Hohlraum, der zwar nicht besonders groß ist, aber dennoch ausreichend Platz bietet für ein Gastmolekül. Als Gäste kommen in Frage: Methan, Ethan, Stickstoff oder etwa ein Xenonatom. Dem Chemiker stellt sich damit die Frage, wie er den Gasteinschluß nachweisen kann. Das gelingt mit Hilfe der Kernresonanz-Spektroskopie (NMR). Methan und Ethan beispielsweise tragen Wasserstoffatome, die mit dieser Technik detektiert werden können. Da ihr Austausch in der Kapsel relativ langsam ist und die Lage der Signale im zugehörigen NMR-Spektrum sehr deutlich von der chemischen Umgebung abhängt, erhält man zwei Signale für jedes der beiden Moleküle. Eines erscheint an der erwarteten Position und kann dem frei in Lösung befindlichen Gast zugeordnet werden. Das andere befindet sich deutlich rechts davon, wir sagen hochfeldverschoben, im Spektrum in einem Bereich unter Null auf der ppm-Skala des Experiments, der in der Regel völlig frei von Signalen ist. Genauso eindeutig kann frei in Lösung befindliches Xenon vom im Inneren der Kapsel gebundenen Xenon mittels  $^{129}\text{Xe}$ -NMR-Spektroskopie unterschieden werden (Abb. 1 unten). Der Gasteinschluß ist damit zweifelsfrei bewiesen, ebenso die Bildung einer Kapsel, denn nur wenn es einen Hohlraum gibt, kann auch etwas darin aufgenommen werden.

Gerade der Einschluß von Xenon zeigt aber noch eine bemerkenswerte Eigenschaft. Die Bildung der Kapsel findet am günstigsten in Lösemitteln wie Dichlormethan statt, die nicht zur Bildung von Wasserstoffbrücken in der Lage sind und daher nicht mit dem anderen Monomeren konkurrieren können. In Dimethylformamid liegen dagegen freie, monomere Hälften vor, weil die Wasserstoffbrückendonoren durch Solvensmoleküle abgesättigt sind und daher nur noch eine geringe Tendenz zur Dimerisierung zweier Hälften zeigen. Fügt man dieser Lösung nun Xenon zu, kippt das fragile energetische Gleichgewicht auf die andere Seite, und xenonhaltige Kapseln bilden sich (BRANDA et al. 1995). Hier wirkt das Xenonatom wie ein Templat, eine Schablone sozusagen, die um sich herum die beiden Hälften der Kapsel so orientiert, daß es energetisch günstiger ist, intakte Kapseln zu bilden. Allein dieses Experiment zeigt schon die oft überraschende Subtilität (KANG und REBEK 1996) der beteiligten Effekte, ist doch das Xenon ein Edelgas, das chemisch inert ist und somit sicher keine starken Bindungen zu den Kapselhälften eingeht.

Schließlich wurden dann in späteren Arbeiten der Rebek-Gruppe modifizierte Tennisbälle synthetisiert (Abb. 1, oben rechts). Sie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Größe, sondern auch hinsichtlich der elektronischen Eigenschaften der Mittelstücke (GARCÍAS und REBEK 1996). Deutliche Effekte auf die Bindung von Gastmolekülen konnten beobachtet werden, die klar darauf hinweisen, daß ihre Verkapselung nicht rein statistisch ist und nicht allein durch mechanischen Einschluß geschieht, sondern zusätzlich durch schwache Wechselwirkungen mit den Kapselwänden begünstigt ist.

Denkt man an so visionäre, aber in genauso ferner Zukunft liegende Anwendungen reversibler Kapseln, wie den kontrollierten Transport von Medikamenten an exakt die Stelle im Körper, an der sie benötigt werden, so wird schnell klar, daß der Tennisball viel zu klein ist. Der Einschluß größerer Moleküle wäre erforderlich, daher auch die Synthese größerer, am

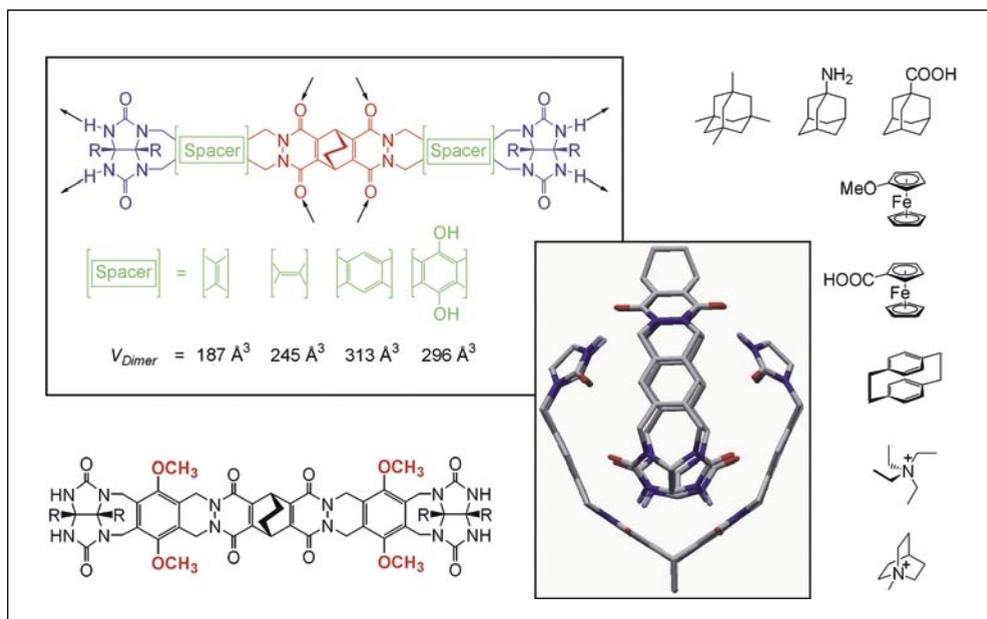


Abb. 2 Die Familie der Softbälle als Formelzeichnung (*oben links*) und im Computermodell (*Mitte*, ohne Seitenketten und kohlenstoffzentrierte Wasserstoffatome). Die Größe des Innenraums läßt sich durch Auswahl der passenden Spacergruppen einstellen. Die Pfeile deuten wieder die Wasserstoffbrückenpositionen an. *Rechts* sind typische Gäste für die Softbälle gezeigt, *links unten* ein nicht zur Dimerisierung befähigtes Derivat.

besten flexibel in der Größe einstellbarer Kapseln. Abbildung 2 zeigt eine Serie solcher Analoga des Tennisballs. In Anlehnung an einen beliebten nordamerikanischen Ballsport nennen wir sie »Softbälle« (RIVERA et al. 1998a). Ein zentrales Mittelstück mit vier Carbonylgruppen (*rot*) wird über variable Spacer (*grün*) mit den schon bekannten Glykoluril-Bindungsmotiven verknüpft und heraus kommt wieder ein konkaves Molekül, das zu einer Kapsel dimerisieren kann. Das Innenvolumen hängt vom Spacer ab und variiert zwischen etwa  $190 \text{ \AA}^3$  und  $310 \text{ \AA}^3$ . Es ist damit groß genug, um die in Abbildung 2 gezeigten Gastmoleküle von beträchtlicher Größe einzuschließen. Interessanterweise zeigen Kontrollexperimente mit dem vierfach methoxy-substituierten Monomeren (Abb. 2, *unten*), daß die Seitengruppen eine Dimerisierung verhindern, da sie sich gegenseitig in die Quere geraten.

Auch die Softbälle haben einige hochinteressante Eigenschaften. Zunächst einmal ist der Einschluß der Gäste deutlich größenabhängig. Bei geeigneter Formkongruenz von Gast und Kapsel hat sich eine Raumerfüllung im Kapselinneren von etwa 55 % als besonders günstig herausgestellt (MECOZZI und REBEK 1998). Kleinere Gäste solvatisieren die Innenseite der Kapsel unvollständig, so daß ihre Bindungsenergie an die Kapsel herabgesetzt ist; größere Gäste dehnen die Kapsel oder sind in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Beides führt ebenfalls zu einem Verlust an Bindungsenergie. Die optimale Balance ist bei etwa 55 % Raumerfüllung erreicht, vorausgesetzt der Gast hat eine ähnlich kugelige Form wie das Kapselinnere.

Die zweite ungewöhnliche Eigenschaft der Softbälle ist, daß sie bei geeigneter Modifikation zu chiraler Erkennung in der Lage sind. Chiralität ist in der Chemie die Händigkeit von Molekülen, oder – besser definiert – die Unmöglichkeit, ein Molekül mit seinem Spiegelbild

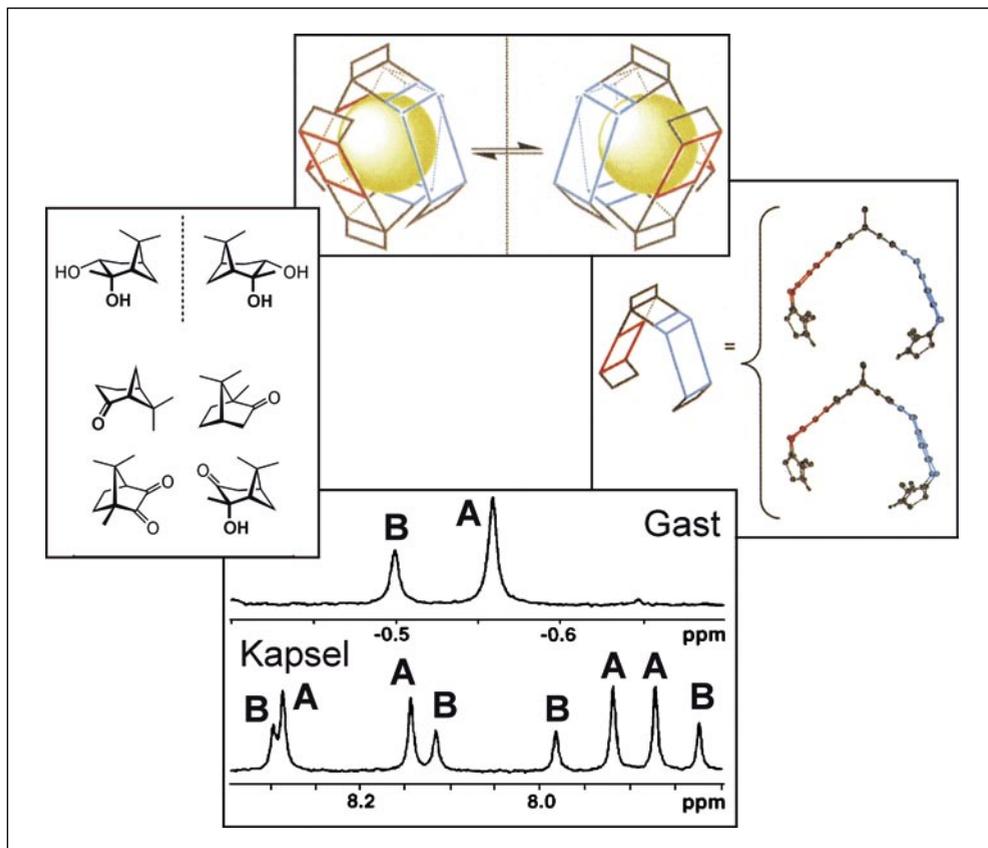


Abb. 3 Chirale Softbälle als Schemaskizze und ihre Gäste. Die NMR-Spektren zeigen sowohl für den Gast als auch die Kapsel zwei verschiedene Signalsätze, die der Bildung einer energetisch bevorzugten (A) und einer benachteiligten Kapsel (B) um einen enantiomerenreinen Gast herum zugeordnet werden können.

durch Drehung zur Deckung zu bringen. Obwohl Molekül und Spiegelbild die gleichen Atomkonnectivitäten haben, sind sie doch verschieden. Einige solche Moleküle, Derivate des Kampfers und Pinans, die in chiral reiner Form in der Natur vorkommen, sind in Abbildung 3 gezeigt. Bedingung für die Erzeugung eines chiralen Softballs ist, daß die beiden Spiegelebenen des Dimeren gebrochen werden müssen. Das geht am einfachsten durch Einbau zweier unterschiedlich langer Spacer zwischen das Mittelstück und die beiden Bindungsstellen des Monomeren, wie schematisch in Abbildung 3 abgebildet (RIVERA et al. 1998b). Jedes Monomere besitzt dann nur noch eine Spiegelebene der Länge nach und ist somit achiral, also nicht-händig. Dagegen ist der vollständige Softball chiral, weil die beiden Hälften durch die 90°-Drehung, die sie gegeneinander eingehen müssen um zu dimerisieren, gegenseitig ihre verbliebenen Spiegelebenen durchbrechen. Gibt man nun zu einer Lösung aus diesen Monomeren einen Gast, der nur in einer der beiden Formen existiert, so ist die Bildung einer der beiden chiralen Kapselformen um diesen Gast bevorzugt, während sich das entsprechende Kapsel-Spiegelbild nur in geringerer Menge um denselben Gast herumlegt. Nimmt man das Spiegelbild des Gasts für ein analoges Experiment, so wird bevorzugt auch das Spiegelbild der

Kapsel entstehen. Man erkennt auch das wieder am NMR-Spektrum, das sowohl für den Gast als auch die Kapsel doppelte Signalsätze enthält, von denen einer (*A* in Abb. 3) zur bevorzugten Kombination gehört, der andere (*B*) zum benachteiligten Kapsel-Gast-Komplex. Chiralität und ihre Erkennung spielt auch in biologischen Vorgängen eine große Rolle, so daß viele enzym-katalysierte Reaktionen des Stoffwechsels streng zwischen den beiden Formen eines Substrats unterscheiden und ausschließlich eines der beiden möglichen Produkte liefern.

Als letzte Besonderheit der Softbälle soll Erwähnung finden, daß sie in günstigen Fällen in der Lage sind, chemische Reaktionen durch gleichzeitigen Einschluß zweier Reaktanden in ihrem Inneren zu katalysieren (KANG und REBEK 1997, KANG et al. 1998). Abbildung 4 zeigt dies am Beispiel der Diels-Alder-Reaktion, bei der zwei neue kovalente Bindungen zwischen den Reaktionspartnern geknüpft werden. Im Falle von Chinon und Cyclohexadien (oberer Reaktionsweg) wird ein Produkt gebildet, das ein bevorzugter Gast für den Softball ist und daher zu Produktinhibition führt. Dadurch wird die Reaktion nur solange beschleunigt, bis alle Kapseln mit dem Produkt gefüllt sind. Nimmt man statt Cyclohexadien das Diensystem im unteren Reaktionsweg der Abbildung 4, so tritt das Produkt nach der Reaktion effizient

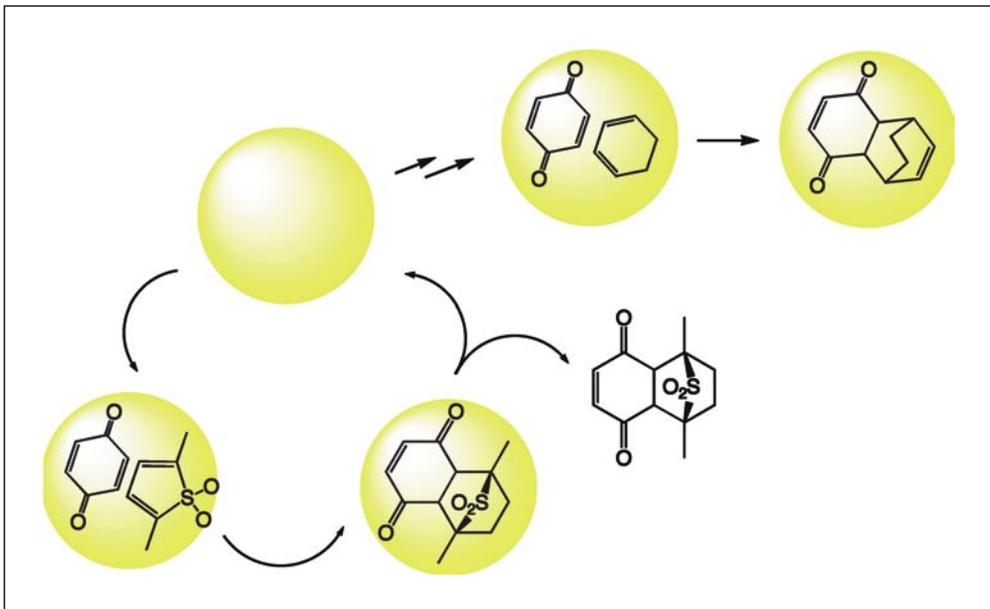


Abb. 4 Katalysezyklus für die Diels-Alder-Reaktion im Inneren eines Softballs. Der obere Reaktionsweg führt zu einem Produkt, das als Gast besonders günstig ist und daher zu Produktinhibition führt.

aus der Kapsel heraus und ermöglicht einen neuen Reaktionszyklus. In diesem Fall wird die Reaktion in der Tat katalysiert, also durch eine sehr geringe Menge an Kapseln in der Reaktionsmischung deutlich beschleunigt.

An dieser Stelle sollten wir kurz innehalten und einmal Revue passieren lassen, was wir bisher erreicht haben. Wir sind in der Lage, Kapseln herzustellen, die in ihren Innenräumen Gastmoleküle aufnehmen können. Das geschieht in Abhängigkeit von der Größe und der

Chiralität, es gibt also eine Selektivität der Kapseln hinsichtlich der Auswahl passender Gäste. Schließlich katalysieren sie auch noch Reaktionen in ihrem Inneren. Alle diese Eigenschaften finden sich in der einen oder anderen Ausprägung auch im aktiven Zentrum von Enzymen. Die Softbälle dürfen demnach als artifizielle »Enzymanaloga« betrachtet werden und tragen erheblich zum Verständnis der Wechselwirkungen bei, die zwischen Substrat und Enzym während der Reaktion bestehen.

### 3. Das Problem der Charakterisierung

Denkt man die beiden letzten Punkte weiter, so stößt man auf ein Problem bei der Charakterisierung der Kapseln. Die Standardmethode hierfür war bislang die NMR-Spektroskopie. Chirale Kapseln müssen zwangsläufig unsymmetrisch werden, da Spiegelsymmetrien hierfür verboten sind. Das erzeugt komplexere Spektren mit mehr als einem Signalsatz, zu dem sonst alle jeweils durch Symmetrie äquivalenten Wasserstoffatome zusammenfallen würden. Das zugehörige NMR-Spektrum wird mithin komplexer. Ähnliches ergibt sich aus der Überlegung, daß es für Katalysezwecke sinnvoll sein könnte, die Kapseln in ihrem Inneren mit katalytisch aktiven funktionellen Gruppen auszustatten. Das bedingt nicht nur wiederum erheblich größere Kapseln und dadurch aufwendigere Synthesen, sondern erzeugt zusätzliche Asymmetrien. Auch interessante Gäste werden komplexer, so daß insgesamt die Strukturanalyse mittels NMR-Spektrometrie an ihre Grenzen stößt. Signalüberlappungen verhindern die genaue Analyse der Spektren und machen die Zuordnungen der Signale und damit die Identifizierung der Kapseln schwierig oder gar unmöglich.

Abhilfe könnte eine komplementäre Methode bringen, die die Molekülmasse der dimeren Kapsel zu bestimmen erlaubt. Die Massenspektrometrie, eines der präzisesten Werkzeuge zu diesem Zweck, stößt aber auf Probleme, da sie auf die Anwesenheit von Ladungen im Analyten angewiesen ist. Eine Reihe von Methoden ermöglicht die Ionisation auch großer Moleküle, enge Grenzen sind aber bei der intakten Detektion schwach gebundener supramolekularer Aggregate gesetzt. Einen Weg zu finden, die Softbälle und andere Kapseln intakt und geladen in das Hochvakuum eines Massenspektrometers zu überführen, ist schon eine Herausforderung, die zusätzlich noch durch die Forderung nach der Analyse der Kapselstruktur erschwert wird. *A priori* mißt ein Massenspektrometer nur das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Hinweise auf die Struktur der Ionen kommen, wenn sie überhaupt erhältlich sind, nur indirekt aus Zerfallsreaktionen oder durch energetische Betrachtungen.

### 4. Intakte Ionisation der Softbälle

In der Tat können mit ein paar kleinen Tricks die Softbälle intakt ionisiert und in die Gasphase gebracht werden. Die erste Voraussetzung ist eine schonende Ionisationsmethode. Hier bietet sich die mit dem Nobelpreis 2002 gewürdigte *electrospray ionization* (ESI) an, die John FENN in die Analytik von Biomolekülen eingeführt hat (FENN et al. 1989). Ihr Prinzip ist, daß die Analyte in Lösung bei sehr geringen Flußraten von einigen Mikrolitern durch eine dünne Kapillare in die Ionenquelle des Massenspektrometers gepumpt werden. An der Kapillare liegt eine Hochspannung an, die für die Bildung positiv geladener Tröpfchen sorgt. Durch das Verdampfen des Solvens aus den Tröpfchen entstehen in einem komplizierten Prozeß schließlich vollständig

desolvatisierte Ionen, ohne daß schwach gebundene Komplexe vollständig zerstört werden. Jetzt kommt es noch auf die richtige Mischung der Probe an. Üblicherweise wird Methanol als Lösemittel verwendet, weil es zur Übertragung von Protonen auf den Analyten fähig ist und so die benötigte Ladung bereitstellt. Für die Untersuchung der Kapseln verbietet sich dieses Solvens aber schon deswegen, weil es die Wasserstoffbrücken und damit die Kapseln zerstört. Die Verwendung eines nicht-kompetitiven Lösemittels wie Dichlormethan verhindert aber die Protonierung, woraus sich die Konsequenz ergibt, daß eine Ladung in den Komplex eingebaut werden muß. Am elegantesten läßt sich das erreichen, indem man ein quartäres Ammoniumion anstelle des sonst neutralen Gasts in der Kapsel einschließt, so daß die Kapseln automatisch schon eine Ladung tragen. Mit diesem Verfahren ist tatsächlich eine intakte Ionisation der Softbälle möglich (Abb. 5, SCHALLEY et al. 1999c). Einige andere, intensitätsschwache Signale werden noch beobachtet, aber in allen Fällen ist die intakte Kapsel mit ihrer geladenen Fracht der intensivste Peak im Massenspektrum.

## **5. Strukturbestimmung mit Hilfe der Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie bietet aber noch weit mehr an als eine genaue Molekülmassenbestimmung. Die nächste Frage ist die nach der Struktur der Dimer-Gast-Komplexe in Lösung und Gasphase, die wir im letzten Kapitel so einfach ohne weiteren Nachweis als intakte Kapseln bezeichnet haben. Eine ganze Reihe von Experimenten kann hier durchgeführt werden. Da sind zunächst Kontrollexperimente mit deformierten oder blockierten Monomeren, von denen aus NMR-Untersuchungen (siehe oben) bekannt ist, daß sie keine Dimere bilden können. Diese Monomere geben auch in den ESI-Massenspektren keine Signale für Dimer-Gast-Komplexe, so daß wir schließen dürfen, daß eine unspezifische Bindung zweier Monomere an das zentrale Ammoniumion nicht zu den beobachteten Signalen führt. Ganz ähnlich kann man eine Mischung aus zwei verschiedenen Gästen einsetzen, wobei einer ein Gast sein sollte, der andere aber zu groß, um in die Kapsel hineinzupassen. Auch hier werden keine Signale für den Dimer-Gast-Komplex gefunden, der das größere Ion tragen sollte. Das schließt Strukturen wie z. B. eine geschlossene, im Inneren leere Kapsel aus, die den Gast an der Außenseite trägt. Schließlich führt die Zugabe von Methanol als kompetitivem Lösemittel zum Verschwinden der Kapselsignale. Das bestätigt ganz klar, daß im Dimer-Gast-Komplex Wasserstoffbrücken eine wesentliche Rolle spielen.

Das Argument der geometrischen Paßform der Monomere läßt sich auch über die Heterodimerbildung prüfen. Mischt man zwei Softbälle verschiedener Größe, so stellt man fest, daß das Heterodimere mit einer Intensität von weniger als der Hälfte der statistischen Erwartung im Spektrum erscheint. Bei einer Mischung aus zwei passenden Softballmonomeren von annähernd gleicher Größe zeigt sich in der Tat annähernd die erwartete 1:2:1-Verteilung von Homo- und Heterodimeren (Abb. 6). Ein solches Verhalten, bei dem die Paßform der beiden Monomere entscheidend ist, ist nur für intakte Kapseln zu erwarten.

Schließlich mag ein Kritiker einwenden, daß wir ja mit den bisher angeführten Argumenten nur die Struktur in Lösung untersuchen und das auf dem komplizierten Umweg über die Massenspektrometrie. Auf dem Weg in die Gasphase könnten sich die Komplexe aber umlagern und eine gänzlich andere Gasphasenstruktur einnehmen, die wir nicht kennen. Aber auch hier kann die Massenspektrometrie entscheidende Hinweise liefern. Den Ionen kann nach der Ionisation in der Gasphase durch Stoßaktivierung Energie zugeführt werden, so daß Zerfallsreaktionen in-

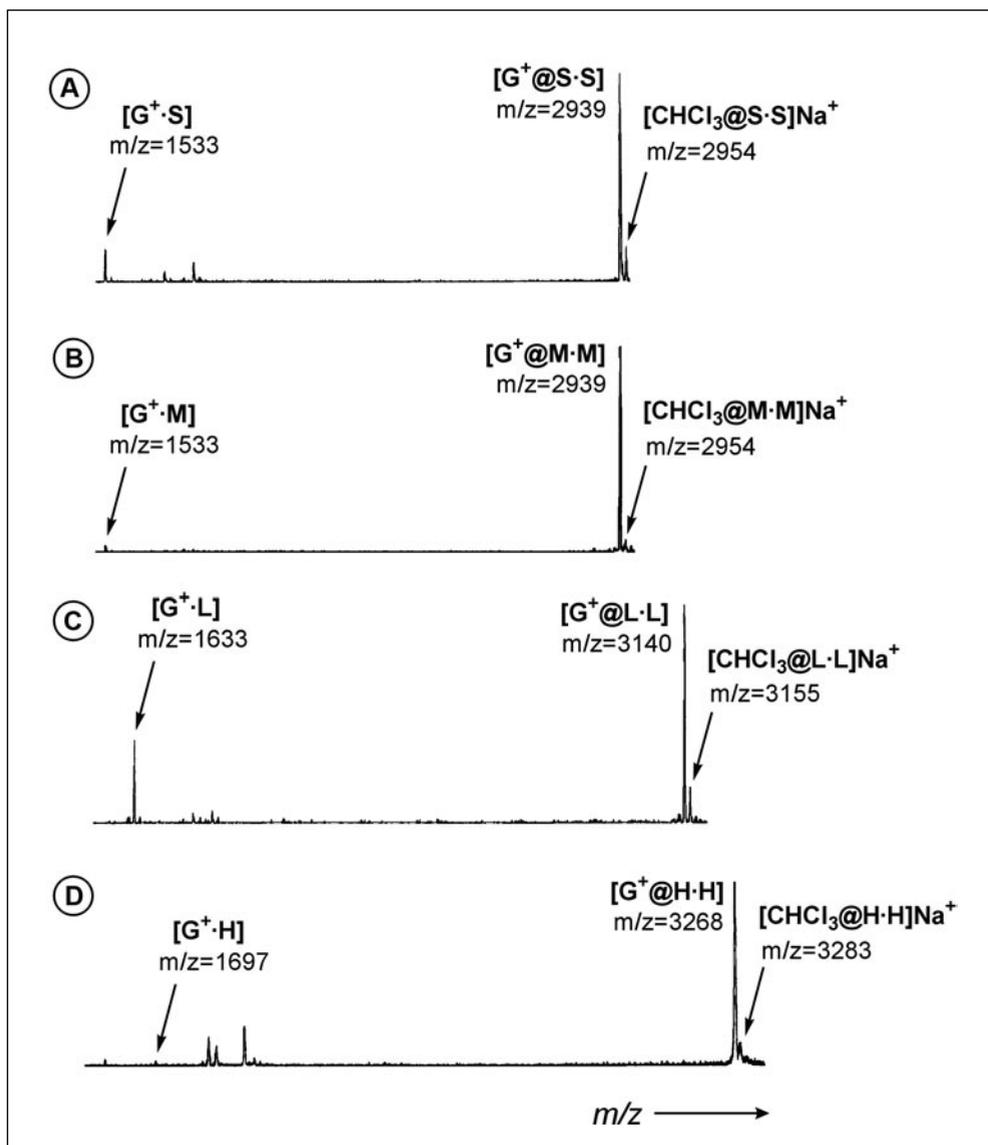


Abb. 5 Massenspektren der vier in Abbildung 2 gezeigten Softbälle von oben nach unten sortiert nach der Größe des Innenvolumens (S = small, M = medium, L = large und H = hydroxy softball). Als Gast wurde in allen Fällen N-Methylchinuclidinium verwendet.

duziert werden. Bei den Softbällen ist dieses Experiment besonders aussagekräftig: Als Zerfälle werden nämlich Brüche kovalenter Bindungen an der Peripherie der Kapsel beobachtet. Wie oben schon angemerkt, ist normalerweise die kovalente Bindung die starke, während die nicht-kovalente Wechselwirkung, hier zwischen Kapsel und Gast, eher schwach ist. Trotzdem zeigt das Experiment ganz klar, daß die Ladung, also auch der Gast, der sie trägt, noch im Komplex

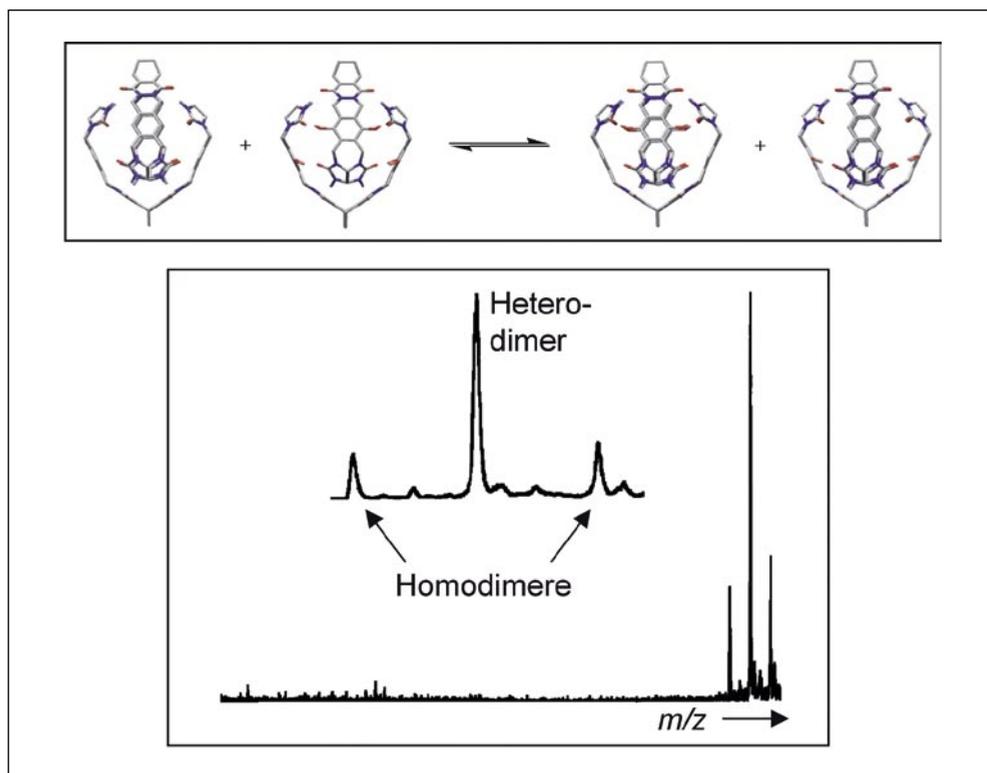


Abb. 6 Bildung von Heterodimeren aus zwei verschiedenen Softbällen. Die hier gezeigte nahezu statistische Verteilung von Homo- und Heterodimeren findet sich nur, wenn die beiden unterschiedlichen Monomere geometrisch zueinander passen.

vorhanden ist, während Bruchstücke aus der Peripherie verloren wurden. Offensichtlich ist der Verlust des Gasts mit einem erheblichen energetischen Aufwand verbunden, so daß er mit dem Bruch kovalenter Bindungen konkurrieren kann. Das kann nur dann der Fall sein, wenn er im Inneren der Kapsel sitzt, quasi gegen seine Abspaltung durch die umgebende Kapsel geschützt. Hieraus schließen wir, daß sogar im umgebungsfreien Raum im Hochvakuum eines Massenspektrometers die Kapseln intakt mit dem Gast im Hohlraum vorliegen.

## 6. Andere Bindungsmotive: Vom tetrameren »football« zu einem Kapselbaukasten

Natürlich ist das Softball-Motiv nicht das einzig mögliche, um Kapseln aus identischen, sich selbst organisierenden Bausteinen aufzubauen. Wir wollen uns im Folgenden einige andere Motive ansehen. Alle Kapseln, die hier besprochen werden, können ganz analog zu den Softbällen mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht und charakterisiert werden. Eingehen werden wir aber nur auf die Besonderheiten, die sich dabei ergeben haben, die unsere Erfahrung mit dieser neuen Methode erweitern und die illustrieren, daß die Massenspektrometrie sich mit der NMR-Spektroskopie hervorragend ergänzt.

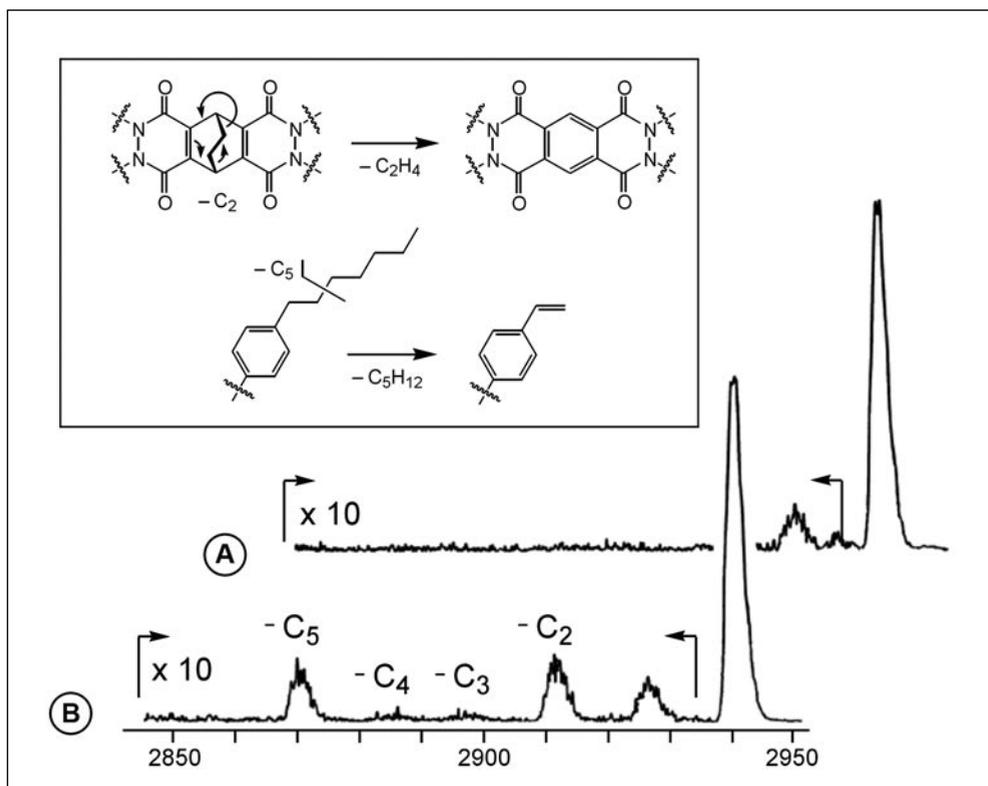


Abb. 7 (A) Ausschnitt aus dem Spektrum eines Softballs, das ein intensives Signal für den Dimer-Gast-Komplex zeigt. (B) Der gleiche Ausschnitt unter Stoßaktivierungsbedingungen. Fragmente aus kovalenten Bindungsbrüchen sind gemäß der Anzahl der im Fragment beteiligten Kohlenstoffatome gekennzeichnet. Der Kasten darüber zeigt mögliche, energetisch begünstigte Fragmentierungswege zu den beobachteten Fragmenten.

Als erstes Beispiel sollen die tetrameren »american footballs« dienen (Abb. 8, MARTÍN et al. 1998). Sie gehen formal einfach aus dem Tennisball hervor, indem man das Tennisballmonomere in der Mitte zerschneidet und das Mittelstück durch ein weiteres Wasserstoffbrückenbindungsmuster ersetzt. Dadurch ergibt sich eine Kapsel aus vier identischen Untereinheiten, die die gleichen Glykoluril-Bindungseinheiten enthält, darüber hinaus aber auch eine Sulfonylgruppe trägt, die die erforderliche Krümmung liefert. Ein Problem für die NMR-Spektroskopie ist hier der Nachweis der Heterotetramerenbildung. Mischt man die beiden in Abbildung 8 gezeigten Monomere, die sich nur in der Länge der die Löslichkeit vermittelnden Seitenketten unterscheiden, so sind die NMR-Spektren der Mischung bis auf marginale Unterschiede in den Intensitäten einiger Signale identisch mit denen der beiden reinen Kapseln. Die Situation wird zusätzlich kompliziert, weil man neben den Homotetrameren mehrere verschiedene Heterotetramere erwartet und zwar  $A_4 : A_3B : A_2B_2 : AB_3 : B_4$  im statistischen Verhältnis von  $1 : 4 : 6 : 4 : 1$ . Daß das in der Tat in den Massenspektren beobachtet wird, zeigt die Abbildung (SCHALLEY et al. 1999b). Hier ist erstmals bewiesen, daß die massenspektrometrische Herangehensweise Ergebnisse liefert, die sonst nur schwer zu erbringen wären.

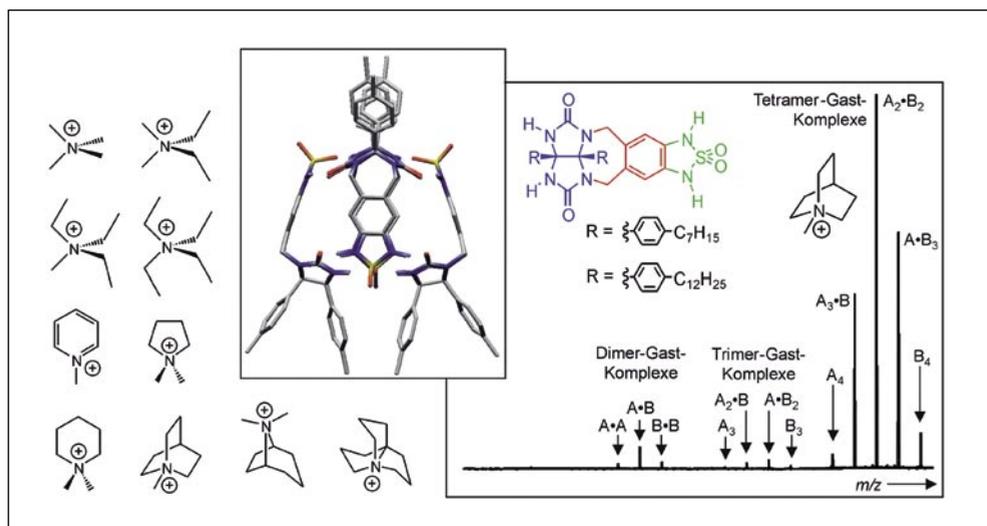


Abb. 8 Der »american football«, eine tetramere Kapsel im Computermodell (Mitte, ohne Seitenketten und kohlenstoffzentrierte Wasserstoffatome) zusammen mit der Formelzeichnung zweier Monomere mit unterschiedlich langen Seitenketten. Links: Typische kationische Gäste. Rechts: Massenspektrum einer 1:1-Mischung der beiden Monomere mit N-Methylchinuclidinium als Gast. Die beobachteten Intensitäten entsprechen in etwa den statistisch erwarteten Verhältnissen (1 : 4 : 6 : 4 : 1) und bestätigen die Bildung von Heterotetrameren.

Ein ganz anderes Bindungsmuster ist das der vierfach harnstoffsubstituierten Calixarene (Abb. 9), bei denen die Harnstoffseitenketten zweier Monomere ineinander verschränkt sind wie die Finger zweier betender Hände (SHIMIZU und REBEK 1995, MOGK et al. 1996). Dadurch bilden sich insgesamt 16 Wasserstoffbrücken, die die beiden Monomere zusammenhalten. Zwei Aspekte sollen hier schlaglichtartig beleuchtet werden. Zunächst ist interessant, daß der Einschluß von Kationen im Inneren der Calixaren-Kapseln zu erheblich höheren Raumerfüllungen führt, als oben diskutiert. Statt der erwarteten 55 % werden für die besten geladenen Gäste bis zu 78 % Packungsdichte ermittelt. Angedeutet haben wir auch, daß Raumerfüllungen von mehr als 55 % in der Regel zu energetischen Problemen führen. Größere Werte bedingen daher eine erhöhte Bindungsenergie zwischen Kapsel und Gast, mit der die Nachteile großer Raumerfüllung quasi bezahlt werden können. Rechnungen zeigen hier, daß die Krümmung des Calixaren-Topfes zu einer gegenseitigen Durchdringung der  $\pi$ -Systeme der beteiligten aromatischen Ringe führt. Das bewirkt eine partial negative Aufladung der Oberfläche im Inneren der Kapsel, die zur Bildung einer besonders günstigen Umgebung für Kationen führt. Während weitere Bindungskräfte wie zum Beispiel CH- $\pi$ -Wechselwirkungen beteiligt sein können, spielt die Anziehung der Ladung mit den negativen Enden der Dipole (etwa der Carbonylgruppen der Harnstoffe) vermutlich nur eine geringe Rolle, weil alle Dipole tangential zur Kapseloberfläche angeordnet und damit mit dem negativen wie positiven Pol etwa gleich weit von der Ladung entfernt sind. Interessanterweise bestätigt eine kürzlich erhaltene Röntgen-Kristallstruktur einer solchen Kapsel mit Tetraethylammonium als Gast die enorm hohen Werte der Raumerfüllung (THONDORF et al. 2002).

Der zweite Aspekt betrifft größere Gebilde (Abb. 10) aus kovalent miteinander verknüpften Monomeren der Tetraureidocalixarene. Auch hier zeigt sich wieder die Überlegenheit der

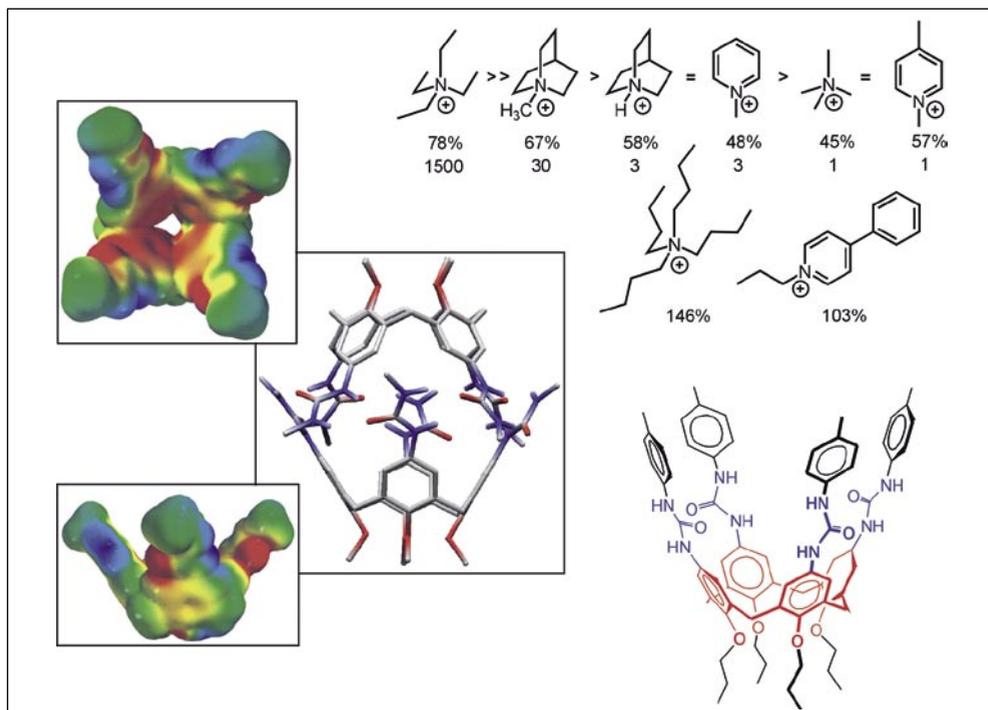


Abb. 9 Ein Tetraureidocalixaren (Formelzeichnung *rechts unten*) und das zugehörige wasserstoffverbrückte Dimere im Computermodell (*Mitte*, ohne Seitenketten und kohlenstoffzentrierte Wasserstoffatome) mit einer Serie von kationischen Gästen. Die Zahlen unter den Kationen geben die Güte als Gast relativ zum schlechtesten in der Serie und darüber die Raumerfüllung (%) des Kapselinneren wieder. Die beiden Kationen mit Raumerfüllungen von mehr als 100% passen nicht in die Kapsel und geben kein Signal für Dimer-Gast-Komplexe in den Massenspektren. *Links*: Elektrostatische Potentialoberfläche der Innen- und Außenseite des Calixarens (*rot*: negative Partialladung; *blau*: positive Partialladung).

Massenspektrometrie, da die Komplexität der NMR-Spektren kaum eine klare Analyse zuläßt. Verknüpft man zwei Monomere durch einen flexiblen Linker zwischen den oberen Rändern, die die Harnstoffeinheiten tragen, so bildet sich eine Kapsel, die sich *intramolekular* schließt und keine Oligomeren bildet (BRODY et al. 1999). Eine relativ starre Verknüpfung über den unteren, von den Harnstofffunktionen abgewandten Rand erlaubt eine solche intramolekulare Kapselbildung nicht mehr. Fügt man aber ausreichend viele unverbrückte Monomere hinzu, erhält man hantelförmige Doppelkapseln, die zwei geladene Gäste tragen und problemlos in den Massenspektren beobachtet werden können. Ganz analog ist auch die Bildung von Tripelkapseln möglich, wie in den Cartoons in Abbildung 10 angedeutet ist. Mit diesen Bausteinen läßt sich zeigen, daß man mit Hilfe der Massenspektrometrie intakte, nicht-kovalent-verbundene Architekturen aus bis zu sieben Untereinheiten (Mittelstück, drei Gäste, drei Kappen) nachweisen kann (SCHALLEY et al. 1999a). Vermutlich ist das noch nicht das Ende des Möglichen.

Als letztes sollen die Flexibälle besprochen werden (Abb. 11, O'LEARY et al. 2001). Sie wurden mit der Intention synthetisiert, einen Baukasten zur Verfügung zu stellen, der neben geeigneten Bindungsstellen (den schon bekannten Glykolorilen) auch verschiedene Mittelstücke

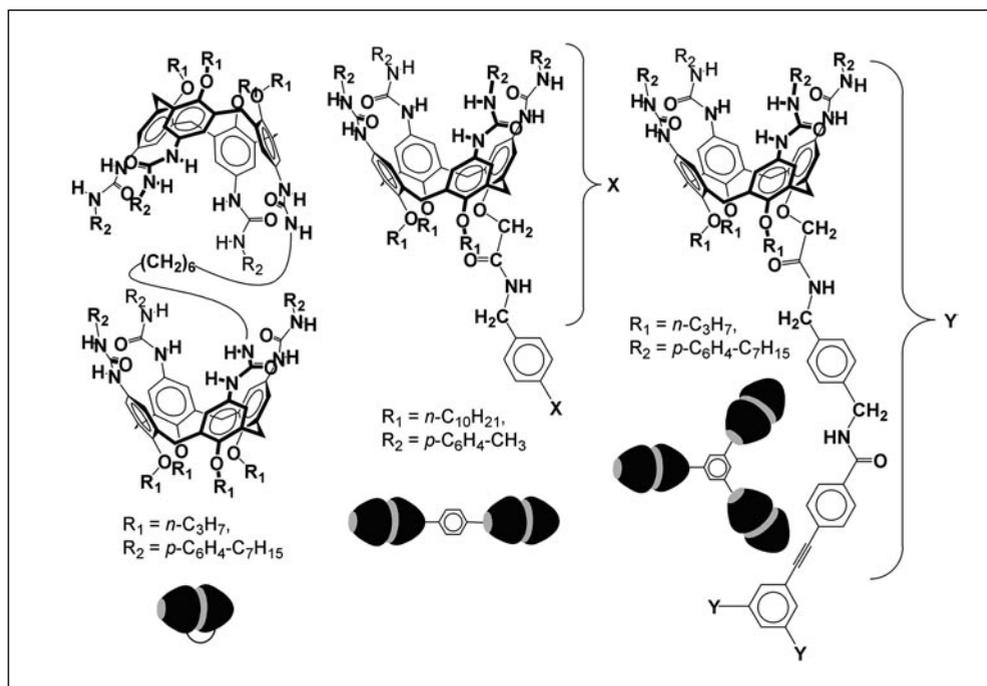


Abb. 10 Kovalent miteinander verbundene Monomere der Calixarene führen zu den jeweils darunter schematisch dargestellten, massenspektrometrisch nachweisbaren Gebilden.

enthält, die sich beliebig mit den Bindungsmodulen zu Kapseln verschiedener Größe und Form kombinieren lassen. Die Module werden dabei über Amid- oder Esterbindungen miteinander verknüpft, was den Kapseln eine bislang unerreichte Flexibilität verleiht, die sich unter anderem in einer deutlich abgeschwächten Größenselektivität beim Gasteinschluß ausdrückt. Auch die Flexibälle sind der massenspektrometrischen Analyse zugänglich, was am Beispiel der mit einem Innenvolumen von etwa  $1000 \text{ \AA}^3$  größten bisher im Arbeitskreis REBEK hergestellten Kapsel gezeigt werden soll (Abb. 12, LÜTZEN et al. 1999). Durch ihr enormes Innenvolumen erlaubt diese Kapsel den Einschluß sehr großer Gäste wie der gezeigten dikationischen Bipyridinium- und Acridiniumderivate oder des tris-Bipyridyl-Ruthenium-Komplexes. In der Tat war es in diesem Fall die Massenspektrometrie, die die ersten Hinweise auf die Bildung von Kapseln brachte, während die NMR-Spektroskopie eher zweideutige Ergebnisse lieferte. Verwirrend war zu Anfang, daß sich die NMR-Signale der Gäste nicht wie gewohnt nach rechts im Spektrum, also zu höherem Feld verschoben, sondern genau in die Gegenrichtung. Ein besonders hübsches Beispiel für einen Wirt-Gast-Komplex ist der Einschluß des Strontiumkryptats, der zur Bildung einer supramolekularen Zwiebel oder einer russischen Matroschka-Puppe auf molekularer Ebene führt. Ein solcher »Molekül«-im-Molekül-im-Molekül-Komplex war bis dato nur aus dem Festkörper bekannt (VÖGTLE und MÜLLER 1979, KAMITORI et al. 1987). Der Flexiball lieferte das erste Beispiel in Lösung, auf das inzwischen weitere gefolgt sind (DAY et al. 2002).

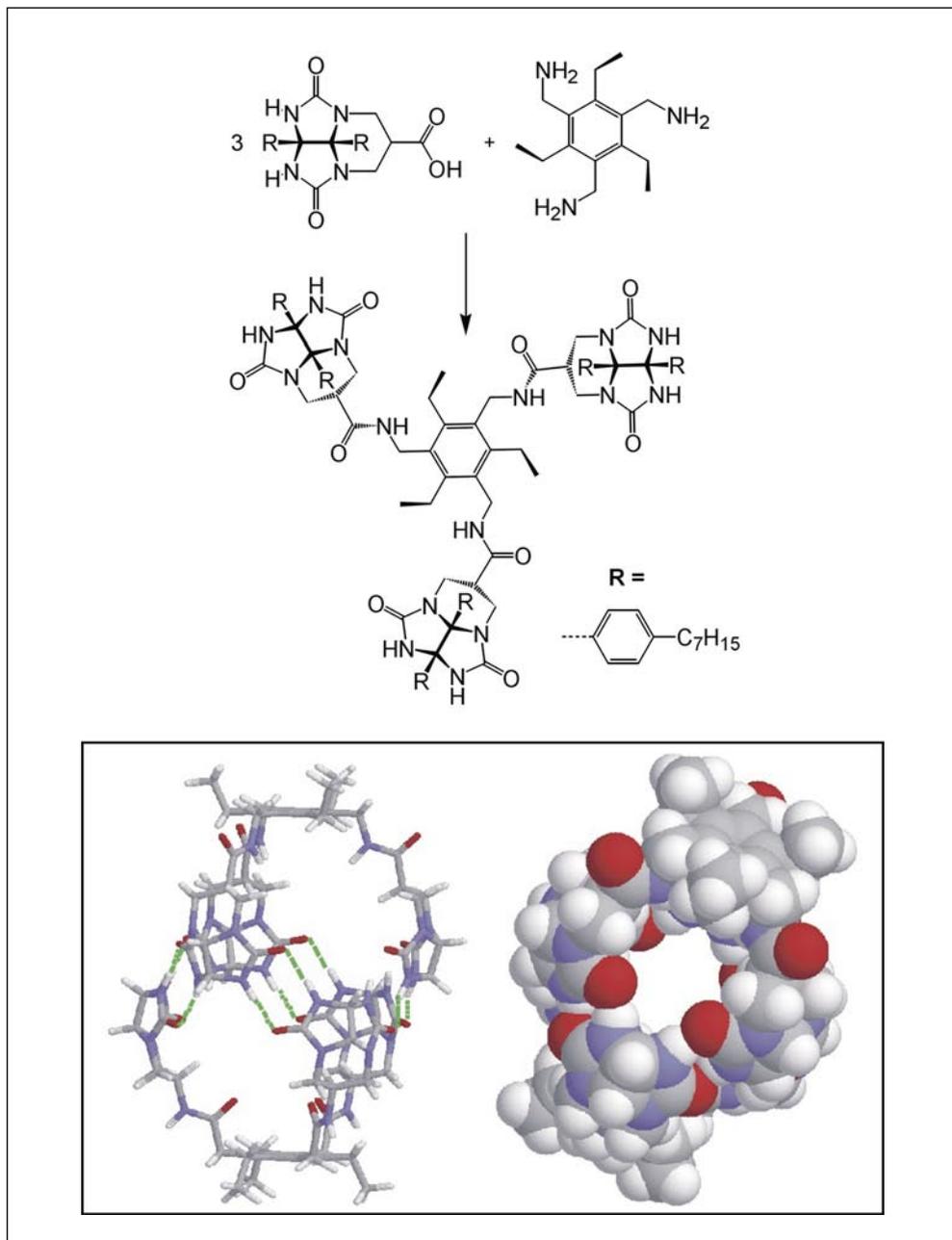


Abb. 11 Modular zusammengesetzte »Flexibälle« in Formeldarstellung. Das Computermodell des Dimeren ist *links* in Stabdarstellung gezeigt, um einen Blick ins Innere zu ermöglichen. *Rechts* sind die Atome raumfüllend gezeigt, um einen Eindruck zu vermitteln, wie groß die Öffnungen in den Kapselwänden sind.

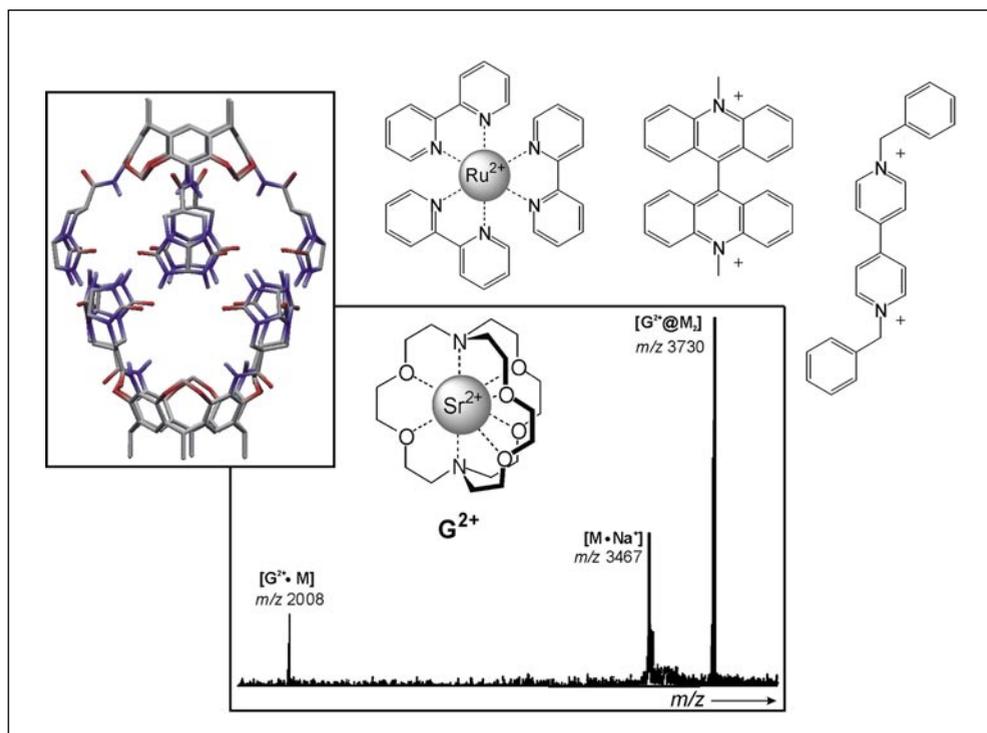


Abb. 12 Der zur Zeit größte, auf einem Resorcinarenmittelstück basierende Flexiball zusammen mit ausgewählten Gästen. Das Massenspektrum zeigt den Einschluß eines Strontium-Krypts als Gast an.

## 7. Schlußfolgerungen

Die hier beschriebenen Arbeiten führen mit der Massenspektrometrie eine neue Methode zur Analyse supramolekularer Kapseln ein, die sich – obwohl sie einer sehr speziellen Mischung von Ingredienzen bei der Probenvorbereitung bedarf – doch als erstaunlich breit anwendbar erwiesen hat. Sie ist in sofern komplementär zur NMR-Spektroskopie, als sie deren Grenzen zu überschreiten vermag, beispielsweise in der Analyse komplexer, unsymmetrischer Kapseln oder beim Nachweis der Heterotetramere. Umgekehrt ist sie aber vor allem bei der quantitativen Analyse allein schon dadurch limitiert, als sie sich durch den leeren Raum als Umgebung der betrachteten Spezies doch sehr weit von der Situation in Lösung entfernt. Hier ist die NMR-Spektroskopie deutlich überlegen. Jenseits aller Komplementarität gibt es aber ausreichend weitgehende Überschneidungen zwischen beiden Methoden, die eine gegenseitige Prüfung der Ergebnisse zulassen und die Validität der Massenspektrometrie eindrucksvoll belegen. Als besonders wertvoll erweist sich die Massenspektrometrie dadurch, daß sie zwar indirekte, aber klare Strukturhinweise gibt. Den supramolekularen Chemiker interessieren dabei nicht die Konnektivitäten der Atome innerhalb der Baueinheiten, sondern vielmehr die »Sekundärstruktur«, ein Begriff, der aus der Strukturchemie der Proteine entliehen ist und verdeutlichen soll, daß die Anordnung der einzelnen Bausteine im Komplex zueinander und ihre Wechselwirkungen untereinander von vorrangigem Interesse sind. Damit haben wir auch

dazu beigetragen, ein Fenster in ein neues Gebiet, der Supramolekularen Gasphasenchemie, aufzustoßen, das bislang nur in engen Grenzen überhaupt bearbeitet worden ist (SCHALLEY 2000, 2001, SCHALLEY et al. 2002, MANSIKKAMÄKI et al. 2003). Die Zukunft der Kapseln scheint immer mehr auf Anwendungen ausgerichtet zu sein. Auch wenn ein gezieltes »drug delivery« noch in weiter Ferne liegt, zeigen die Kapseln Potential für ihre Anwendung als Sensormaterialien, als flüssigkristalline Materialien oder etwa in Form von wasserstoffverbrückten Polymeren. Aus konzentrierten Lösungen von geschickt kovalent verbrückten Monomeren lassen sich sogar Fasern mit einiger Tragkraft ziehen (CASTELLANO et al. 1999, SCHALLEY 1999). Hier zeigen sich die ersten interessanten Materialeigenschaften, und weitere Überraschungen dürfen mit Spannung erwartet werden.

### Dank

Mein ganz besonderer Dank geht an Prof. Julius REBEK, bei dem ich eine außerordentlich schöne Postdoktorandenzeit verbringen durfte, und an Prof. Gary SIUZDAK, der mir seine Massenspektrometer vertrauensvoll überlassen hat, um daran Messungen machen zu können. Allen Mitarbeitern der Rebek-Gruppe sei für eine fruchtbare Zusammenarbeit gedankt. Ihre Namen sind in den Zitaten unserer gemeinsamen Publikationen genannt. Nicht zuletzt soll die finanzielle Unterstützung durch die *Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina* und das *Bundesministerium für Forschung und Bildung* erwähnt werden, ohne die das ganze Unternehmen nicht hätte stattfinden können. Mir liegt besonders am Herzen, hier Herrn Dr. Roland RIEDEL ausdrücklich in den Dank einzuschließen, der mich von Seite der Leopoldina in so persönlicher, hilfreicher und unbürokratischer Weise betreut hat.

### Literatur

- BRANDA, N., GROTZFELD, R. M., VALDÉS, C., and REBEK, J. Jr.: Control of self-assembly and reversible encapsulation of xenon in a self-assembling dimer by acid-base chemistry. *J. Amer. Chem. Soc.* *117*, 85–88 (1995)
- BRODY, M. S., SCHALLEY, C. A., RUDKEVICH, D. M., and REBEK, J. Jr.: Synthesis and characterization of an unimolecular capsule. *Angew. Chem.* *111*, 1738–1742 (1999); *Angew. Chem. Int. Ed.* *38*, 1640–1644 (1999)
- CASTELLANO, R. K., NUCKOLLS, C., EICHHORN, S. H., WOOD, M. R., LOVINGER, A. J., and REBEK, J. Jr.: Hierarchy of order in liquid crystalline polycaps. *Angew. Chem.* *111*, 2764–2767 (1999); *Angew. Chem. Int. Ed.* *38*, 2603–2606 (1999)
- CONN, M. M., and REBEK, J. Jr.: Self-assembling capsules. *Chem. Rev.* *97*, 1647–1668 (1997)
- CRAM, D. J.: The design of molecular hosts, guests, and their complexes. *Angew. Chem.* *100*, 1041–1053 (1988); *Angew. Chem. Int. Ed.* *27*, 1009–1020 (1988)
- DAY, A., BLANCH, R. J., ARNOLD, A. P., LORENZO, S., LEWIS, G. R., and DANCE, I.: A Cucurbituril-based gyroscane: A new supramolecular form. *Angew. Chem.* *114*, 285–287 (2002); *Angew. Chem. Int. Ed.* *41*, 275–277 (2002)
- FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F., and WHITEHOUSE, C. M.: Electrospray ionization – principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* *9*, 37–70 (1990)
- GARCÍAS, X., and REBEK, J. Jr.: Synthesis and encapsulation behavior of new redox-active dimeric assemblies. *Angew. Chem.* *108*, 1328–1331 (1996); *Angew. Chem. Int. Ed.* *35*, 1225–1228 (1996)
- KAMITORI, S., HIROTSU, K., and HIGUCHI, T.: Crystal and molecular structures of double macrocyclic inclusion complexes composed of cyclodextrins, crown ethers, and cations. *J. Amer. Chem. Soc.* *109*, 2409–2414 (1987)
- KANG, J., and REBEK, J. Jr.: Entropically driven binding in a self-assembling molecular capsule. *Nature* *382*, 239–241 (1996)
- KANG, J., and REBEK, J. Jr.: Acceleration of a Diels-Alder reaction by a self-assembled molecular capsule. *Nature* *385*, 50–52 (1997)
- KANG, J., SANTAMARÍA, J., HILMERSSON, G., and REBEK, J. Jr.: Self-assembled molecular capsule catalyzes a Diels-Alder reaction. *J. Amer. Chem. Soc.* *120*, 7389–7390 (1998)
- LÜTZEN, A., RENSLO, A. R., SCHALLEY, C. A., O’LEARY, B. M., and REBEK, J. Jr.: Encapsulation of ion-molecule complexes: Second sphere supramolecular chemistry. *J. Amer. Chem. Soc.* *121*, 7455–7456 (1999)
- MANSIKKAMÄKI, H., NISSINEN, M., SCHALLEY, C. A., and RISSANEN, K.: Self-assembling resorcinarene capsules: solid and gas phase studies on encapsulation of small alkyl ammonium cations. *New J. Chem.* *27*, 88–97 (2003)

- MARTÍN, T., OBST, U., and REBEK, J. Jr.: Molecular assembly and encapsulation directed by hydrogen-bonding preferences and the filling of space. *Science* *281*, 1842–1845 (1998)
- MECOZZI, S., and REBEK, J. Jr.: The 55 % solution: A formula for molecular recognition in the liquid state. *Chem. Eur. J.* *4*, 1016–1022 (1998)
- MOGK, O., BÖHMER, V., and VOGT, W.: Hydrogen bonded homo- and heterodimers of tetra urea derivatives of calix[4]arenes. *Tetrahedron* *52*, 8489–8496 (1996)
- O'LEARY, B. M., SZABO, T., SVENSTRUP, N., SCHALLEY, C. A., LÜTZEN, A., SCHÄFER, M., and REBEK, J. Jr.: »Flexiball Toolkit«: A modular approach to self-assembling capsules. *J. Amer. Chem. Soc.* *123*, 11519–11533 (2001)
- PHILP, D., and STODDART, J. F.: Self-assembly in natural and unnatural systems. *Angew. Chem.* *108*, 1242–1286 (1996); *Angew. Chem. Int. Ed.* *35*, 1154–1196 (1996)
- RIVERA, J. M., MARTÍN, T., and REBEK, J. Jr.: Structural rules governing self-assembly emerge from new molecular capsules. *J. Amer. Chem. Soc.* *120*, 819–820 (1998a)
- RIVERA, J. M., MARTÍN, T., and REBEK, J. Jr.: Chiral spaces: Dissymmetric capsules through self-assembly. *Science* *279*, 1021–1023 (1998b)
- SCHALLEY, C. A.: Self-assembling capsules: From studies in molecular recognition to hydrogen-bonded liquid crystals and fibers. *Adv. Mater.* *11*, 1535–1537 (1999)
- SCHALLEY, C. A.: Supramolecular chemistry goes gas phase: The mass spectrometric examination of non-covalent interactions in host-guest chemistry and molecular recognition. *Int. J. Mass Spectrom.* *194*, 11–39 (2000)
- SCHALLEY, C. A.: Molecular recognition and supramolecular chemistry in the gas phase. *Mass Spectrom. Rev.* *20*, 253–309 (2001)
- SCHALLEY, C. A.: Of molecular gyroscopes, matroshka dolls and other »nano«-toys. *Angew. Chem.* *114*, 1583–1586 (2002); *Angew. Chem. Int. Ed.* *41*, 1513–1515 (2002)
- SCHALLEY, C. A., CASTELLANO, R., BRODY, M. S., RUDKEVICH, D. M., SIUZDAK, G., and REBEK, J. Jr.: Investigating molecular recognition by mass spectrometry: Characterization of calixarene-based self-assembling capsule hosts with charged guests. *J. Amer. Chem. Soc.* *121*, 4568–4579 (1999a)
- SCHALLEY, C. A., MARTÍN, T., OBST, U., and REBEK, J. Jr.: Characterization of encapsulation complexes in the gas phase and solution. *J. Amer. Chem. Soc.* *121*, 2133–2138 (1999b)
- SCHALLEY, C. A., MÜLLER, T., LINNARTZ, P., WITT, M., SCHÄFER, M., and LÜTZEN, A.: Mass spectrometric characterization and gas phase chemistry of self-assembling supramolecular squares and triangles. *Chem. Eur. J.* *8*, 3538–3551 (2002)
- SCHALLEY, C. A., and REBEK, J. Jr.: Chemical encapsulation in self-assembling capsules. In: STODDART, J. F., VÖGTLE, F., and SHIBASAKI, M. (Eds.): *Stimulating Concepts in Chemistry*; pp. 199–210. Weinheim: Wiley-VCH 2000
- SCHALLEY, C. A., RIVERA, J. M., MARTÍN, T., SANTAMARÍA, J., SIUZDAK, G., and REBEK, J. Jr.: Structure determination of supramolecular architectures by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Org. Chem.* 1325–1331 (1999c)
- SHIMIZU, K. D., and REBEK, J. Jr.: Synthesis and assembly of self-complementary calix[4]arenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 12403–124074 (1995)
- THONDORF, I., BRODA, F., RISSANEN, K., VYSOTSKY, M., and BÖHMER, V.: Dimeric capsules of tetraurea calix[4]arenes. MD simulations and X-ray structure, a comparison. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1796–1800 (2002)
- VÖGTLE, F., and MÜLLER, W. M.: Complexes of  $\gamma$ -cyclodextrin with crown ethers, cryptands, coronates, and cryptates. *Angew. Chem.* *91*, 676–677 (1979); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *18*, 623–624 (1979)
- WHITESIDES, G. M., MATHIAS, J. P., and SETO, C. T.: Molecular self-assembly and nanochemistry: A chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science* *254*, 1312–1319 (1991)
- WYLER, R., DE MENDOZA, J., and REBEK, J. Jr.: A synthetic cavity assembles through self-complementary hydrogen-bonds. *Angew. Chem.* *105*, 1820–1823 (1993); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *32*, 1699–1701 (1993)

Dr. Christoph Andreas SCHALLEY  
Kekulé-Institut für Organische Chemie  
und Biochemie der Universität Bonn  
Gerhard-Domagk-Straße 1  
53121 Bonn  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 228 735784  
Fax: +49 228 735662  
E-Mail: c.schalley@uni-bonn.de

# **350 Jahre Leopoldina – Anspruch und Wirklichkeit**

## **Festschrift der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina 1652–2002**

Herausgegeben von

Benno PARTHIER (Halle/Saale) und Dietrich VON ENGELHARDT (Lübeck)

(2002, 816 Seiten, 130 Abbildungen, 8 Tabellen, 54,90 Euro, ISBN 3-928466-45-3)

Die älteste deutschsprachige Akademie prüft »Anspruch und Wirklichkeit« ihrer Vergangenheit und läßt 350 Jahre wechselvoller Geschichte in ihren naturwissenschaftlichen und medizinischen Rahmenbedingungen Revue passieren. Die Festschrift wendet sich an eine interessierte Öffentlichkeit, die allmählich diese besondere Akademie in der deutschen und internationalen Akademienlandschaft mit ihrer spezifischen wissenschaftlich-kulturellen Bedeutung wahrnimmt, nachdem die Wirkungen von 40 Jahren defizitärer Existenz »hinter dem eisernen Vorhang« überwunden werden konnten. (Klappentext)

Inhalt:

Teil I: Geschichte der Leopoldina in Schwerpunkten

Teil II: Die Leopoldina im Spiegel einzelner Wissenschaftsdisziplinen

Teil III: Querschnittsthemen

Teil IV: Anhänge

Mit Beiträgen von:

Gunnar BERG (Halle/Saale), Johanna BOHLEY (Halle/Saale), Dietrich VON ENGELHARDT (Lübeck), Menso FOLKERTS (München), Bernhard FRITSCHER (München), Sybille GERSTENGARBE (Halle/Saale), Fritz HARTMANN (Hannover), Lothar JAENICKE (Köln), Ilse JAHN (Berlin), Joachim KAASCH (Halle/Saale), Michael KAASCH (Halle/Saale), Kai Torsten KANZ (Lübeck), Andreas KLEINERT (Halle/Saale), Eberhard KNOBLOCH (Berlin), Dorothea KUHN (Marbach), Irmgard MÜLLER (Bochum), Uwe MÜLLER (Schweinfurt), Gisela NICKEL (Ober-Olm), Thomas NICKOL (Halle/Saale), Benno PARTHIER (Halle/Saale), Horst REMANE (Halle/Saale), Hermann-J. RUPIEPER (Halle/Saale), Klaus SANDER (Freiburg i. Br.), Thomas SCHNALKE (Berlin), Werner SCHROTH (Halle/Saale), Eugen SEIBOLD (Freiburg i. Br.), Eduard SEIDLER (Freiburg i. Br.), Richard TOELLNER (Rottenburg-Bieringen) und Gudrun WOLFSCHMIDT (Hamburg).

*Druck-Zuck GmbH, Seebener Straße 4, 06114 Halle/Saale*

Buchbestellung on-line: [www.druck-zuck.net](http://www.druck-zuck.net)

## **Geowissenschaften**

---

Prof. Dr. rer. nat. Nora NOFFKE

Geboren 1964 in Bremen. 1985–1992 Studium der Geographie und Geologie/Paläontologie an der Eberhardt-Carls-Universität Tübingen. Zweijähriges Promotionsstudium an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg von 1994 bis 1996. Promotion zum Dr. rer. nat. über den Einfluß benthischer Cyanobakterien auf Sedimentationsprozesse in gezeitenbeeinflussten Küstenbereichen verschiedener Klimazonen. Nach einem einjährigen Aufenthalt als DFG-Forschungsstipendiatin an der Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universität Frankfurt (Main), und einem einjährigen Forschungsaufenthalt als Leopoldina-Stipendiatin an der Harvard University Boston (USA), Assistant Professor an der Old Dominion University Norfolk, Virginia (USA).

## Geobiologie: eine neuentdeckte alte Wissenschaft

Nora NOFFKE (Norfolk)

Mit 7 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

Geobiologie ist die Fusion zweier wissenschaftlicher Grundlagendisziplinen, der Biologie und der Geologie. Während die Biologie sich mit Lebensprozessen der Gegenwart beschäftigt, behandelt die Geologie längst vergangene natürliche Systeme. Durch die Kombination von Denkansatz und Methodik beider Fachrichtungen wird die traditionelle Lücke zwischen beiden Disziplinen überbrückt, und neue Einsichten und Perspektiven für die Geowissenschaften gewonnen. Die Anwendung des dualen methodischen Konzeptes definiert die Geobiologie als angewandte Wissenschaft.

Das Beispiel der benthischen Cyanobakterien in Wattsedimenten der Nordsee zeigt, wie Untersuchungen im Gegenwartigen wichtige Erkenntnisse liefern für das Verstehen der Datenbasis aus Studien des Fossilberichtes. »Multidirektionale Rippelmarken« entstehen aus der Interferenz biologischer mit geologischen Prozessen: biostabilisierende Mikrobiota schützen die Sedimente vor Erosion durch Hydrodynamik. Messungen, durchgeführt im Labor und im Feld, zeigen auf, wie diese Sedimentstrukturen entstehen. Nur aufgrund dieser Kenntnis können fossile Beispiele dieser Strukturen als Fenster in die Vergangenheit dienen und die Rekonstruktion früherer Environments ermöglichen.

### *Abstract*

Geobiology did rise from the fusion of two scientific disciplines: biology and geology. Whereas biology investigates life processes of the modern world, geology studies natural systems of the past. The combination of the concepts and the methodological approaches of both disciplines bridges the gap between biology and geology. New insight and perspectives result that nourish the geosciences. The use of the dualistic approach defines Geobiology as an applied scientific discipline.

The example of the benthic cyanobacteria in the tidal flats of the North Sea shows, how actualistic investigations in the modern environment give results important for the understanding of the fossil record. »Multidirectional ripple marks« rise from the interaction between biological and geological processes. That is, biostabilizing microbiota shelter the sediments underneath against erosion caused by hydrodynamic energy. Measurements conducted in the lab or field show, how these sedimentary structures rise. Only with this knowledge, fossil examples of these structures can serve as a window and function as tools in the reconstruction of paleoenvironments.

### **1. Der Begriff »Geobiologie«**

Geobiologie ist ein interdisziplinärer Ansatz, die Interaktion biologischer und geologischer Prozesse zu verstehen. Der Begriff spiegelt die Anwendung von Untersuchungsmethoden beider Wissenschaftsbereiche wider mit dem Ziel, vergangene Welten zu rekonstruieren, und folgt früheren fruchtbaren Kombinationen von Geologie mit anderen Naturwissenschaften wie z. B. Geochemie oder Geophysik (NOFFKE 2002).

Die Elterndisziplinen der Geobiologie, Geologie und Biologie, sind Grundlagendisziplinen. Die Integration einzelner Teildisziplinen wie z. B. Paläontologie, Sedimentologie und Mineralogie mit Mikrobiologie, Botanik und Biochemie führt zu einer Synthese der Anwendung

aller verschiedenen Methoden und Ansätze. Diese Fusion der Elterndisziplinen führt zu einer gegenseitigen Inspiration und umrahmt jede Hypothese. Um eine Hypothese zu verifizieren, finden die Methodiken aller Teildisziplinen als unabhängige Werkzeuge Verwendung. Diese wechseln mit der angewandten Teildisziplin oder Gruppe von Teildisziplinen. Durch den Ansatz, die Untersuchungsmethoden beider Wissenschaftsbereiche zu kombinieren, wie im folgenden am Beispiel der Geophysik erläutert, erwachsen neue Aspekte und Perspektiven für beide Grundlagendisziplinen. Im Beispiel Geophysik führte die Anwendung physikalischer Untersuchungsmethoden unter anderem zur Entdeckung der Magnetstreifen der ozeanischen Kruste.<sup>1</sup> Mit Hilfe dieser Streifen konnten die Bewegung der Kontinente und die Bildung der Ozeane für die letzten 140 Millionen Jahre rekonstruiert werden. Damit wurde die Paläomagnetik Schlüssel zum Verständnis der Herkunft von Gebirgen, der Aktivität von Vulkanen oder auch der Hervorsagbarkeit von Erdbeben.

Daher ist Geobiologie nicht ein neuer Begriff für Geomikrobiologie, Biogeochemie, Paläobiologie und andere, wie oft verstanden. Tatsächlich bestehen beide Wissenschaftsbereiche und ihre Teildisziplinen weiter und, viel wichtiger, sie werden Quellen von Elementarwissen und interdisziplinären Argumenten für Biogeologie. Auf diese Weise werden die Grundlagendisziplinen von einem neuen methodologischen Ansatz unterstützt, und Geobiologie kann daher als angewandte Wissenschaft verstanden werden (NOFFKE 2002).

## 2. Geobiologie als angewandte Wissenschaft

Warum brauchen wir eine interdisziplinäre Wissenschaft Geobiologie? Dies liegt in der Tradition der beiden Ausgangsdisziplinen, sich inhaltlich gegenseitig auszuschließen (NOFFKE 2002). Das Fach Biologie beschäftigt sich im wesentlichen mit gegenwärtigen Lebensformen und ihren Interaktionen mit der Umwelt, und demgemäß umfassen ihre Untersuchungsmethoden direkte Messungen und Experimente in Feld und Labor.

Zwar kann dadurch die Natur der gegenwärtigen Zeitscheibe genau beschrieben und strukturiert, allerdings nicht die zeitliche Entwicklung, die Vergangenheit und die Zukunft bestimmt werden. Hier hilft die Geologie aus, die sich mit vergangenen Lebensformen, geologischen Prozessen und der Rekonstruktion vergangener Lebewelten befaßt. Aber im Vergleich zur Biologie können die Untersuchungsmethoden der Geologie nur deskriptiv sein: Fossilien, Sedimentstrukturen und Mineralbildungen unterliegen keinen meßbaren Veränderungen mehr, sondern sind im Gestein manifestierte Zeugen längst vergangener Prozesse, oder sie reflektieren Prozesse, die so langsam vonstatten gehen, daß wir sie mit unseren menschlichen Sinnen nicht mehr erfassen können (NOFFKE 2002). Die Bildung von Diamanten in großen Erdtiefen wäre ein solches Beispiel, oder aber auch die Auffaltung von klimabeeinflussenden Gebirgsketten als Folge plattentektonischer Bewegungen. Nur der Fossilbericht erlaubt es uns, solche Prozesse zu entdecken und zu rekonstruieren, und schließlich zu prüfen, welche Effekte sie auf die heutige, uns umgebende Lebewelt, hat.

---

1 Die Erde besteht aus einem zähflüssigem Innern und einer rigiden Kruste. Diese Kruste besteht aus spezifisch leichtem Gesteinsmaterial, welches die Kontinente, wie z. B. Afrika, aufbaut, und aus dichterem ozeanischer Kruste, die dem Meeresboden unterliegt. Die Kruste ist in mehrere Teile gebrochen (Erdplatten), die sich gegenseitig verschieben. Diese Bewegung heißt Plattentektonik.

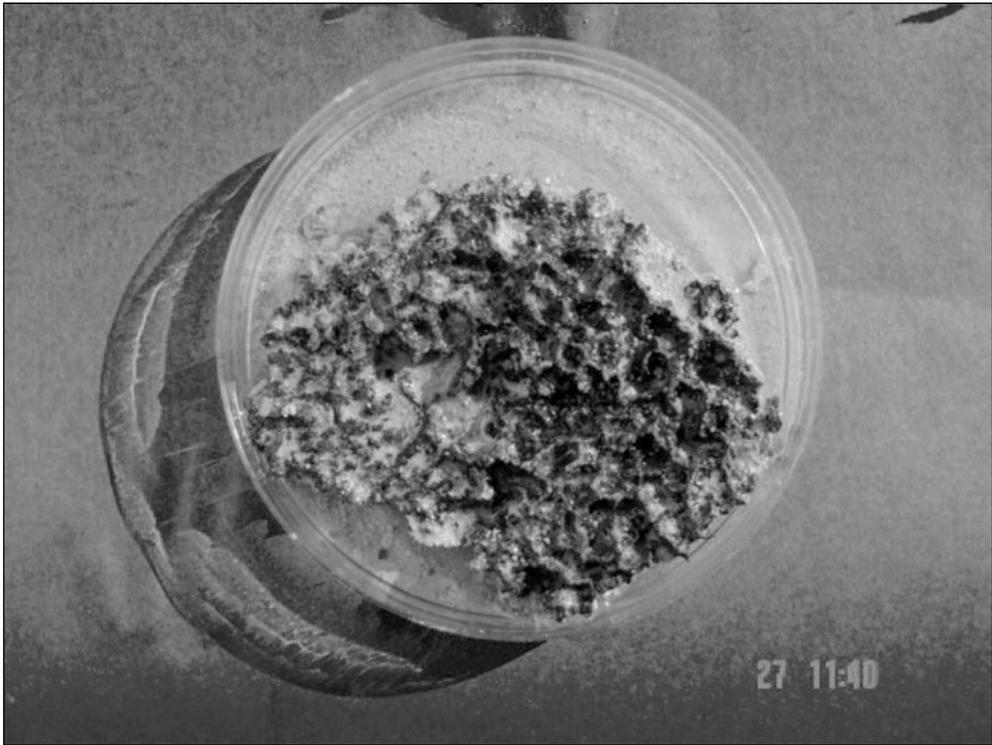


Abb. 1 Untersuchungsmethoden der Biologie: Die Biologie untersucht Lebensformen der Gegenwart und ihre Interaktionen mit Umweltparametern. Biowissenschaftler führen daher Messungen und Experimente in Labor und Feld durch. Die Abbildung zeigt Kulturen von Mikroorganismen.

Im umgekehrten Fall ermöglicht das Verständnis von Naturprozessen, die die Biologie in der Gegenwart meßtechnisch genau bestimmen kann, oftmals den Blick in die geologische Vergangenheit zu erweitern. Die Kenntnis etwa um metabolische Kreisläufe in Bakterien erlaubt Rückschlüsse auf längst vergangene Umweltbedingungen, wie sie auf der noch jungen Erde vor 3 Milliarden Jahren geherrscht haben müssen (EHLICH 1995).

Der Nachteil der geologischen, deskriptiven Methoden ist die Subjektivität der Interpretation der lithologischen Phänomene,<sup>2</sup> dem sogenannten »Fossilbericht«. Warum verlangt dieser Interpretation? Der Fossilbericht überliefert die Erdgeschichte nur unvollständig, da Gesteinsabfolgen lückenhaft sind oder taphonomische Selektion und diagenetische Vorgänge Fossilien oder Strukturen verfälschen (NOFFKE 2002). Die Geologen sagen: »Die Erdgeschichte besteht hauptsächlich aus Lücken.« Oder: »Das meiste in der Erdgeschichte wissen wir nicht.«

Das duale methodische Konzept der Geobiologie, die Fusion und Anwendung geologischer Methoden für die Beantwortung biologischer Fragen und umgekehrt, erfüllt die Notwendigkeit,

---

2 Lithologie: Die Lehre vom Gestein. Sie beschäftigt sich mit allen Phänomenen, die ein Gestein bestimmen: Mineralzusammensetzung, Sedimentstrukturen, Fossilien, Farbe, Bankung, und so weiter.

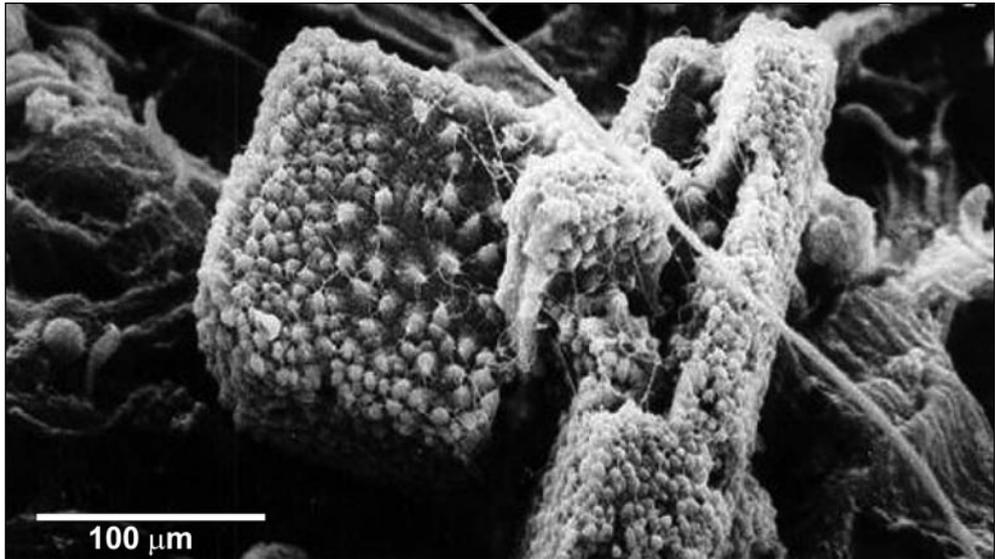


Abb. 2 Untersuchungsmethoden der Geologie: Die Geologie untersucht fossile Lebensformen und rekonstruiert vergangene Environments. Geowissenschaftler können nur Fossilien, Sedimentstrukturen oder Mineralbildungen, die im Gestein überliefert werden (den sogenannten »Fossilbericht«), deskriptiv vergleichen und interpretieren. Die Abbildung zeigt ein Halitmineral unter dem Rasterelektronenmikroskop.

die traditionell sich nicht überlappenden Foci beider Fächer zu überbrücken (NOFFKE 2002). Dies möchte ich am Beispiel der benthischen<sup>3</sup> Cyanobakterien in Wattbereichen der Nordsee erläutern.

### 3. Beispielsstudie: Benthische Cyanobakterien und ihr Einfluß auf sandige Wattsedimente der Nordsee

#### 3.1 Benthische Cyanobakterien und physikalische Sedimentationsdynamik

Cyanobakterien sind photoautotrophe Mikroorganismen, die zum Teil zu aktiver Bewegung fähig sind. Aufgrund ihrer Größe (Filamente von Cyanobakterien werden immerhin 1 cm lang!) wurden sie bis vor etwa 25 Jahren als Blaugrünalgen bezeichnet, bevor ihre prokaryotische Zugehörigkeit erkannt wurde (BOONE et al. 2001).

Ihre blaugüne Farbe verdanken sie Bakteriochlorophyll, einem Pigment, welches die Photosynthese, allerdings in einer von jener der Pflanzen abweichenden Form, ermöglicht. Cyanobakterien treten in verschiedensten marinen und terrestrischen Habitaten auf, und benthische Arten bilden auf quarzreichen Sanden in gezeitenbeeinflussten (tidalen) Küstenbereichen weite Bakterienrasen (ein Standardwerk zu den Mikrobenmatten der Nordsee ist GERDES und KRUMBEIN 1987). Solche Bakterienrasen werden Mikrobenmatten genannt, ein sehr bildlicher

---

3 Benthisch: bodenbewohnend. Benthos (griech.) bezeichnet bodenbewohnende Lebensformen.

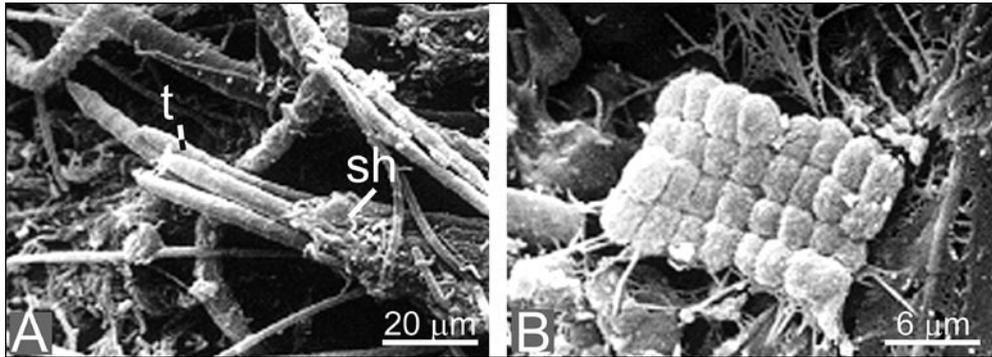


Abb. 3 Cyanobakterien, aufgenommen unter dem Rasterelektronenmikroskop: (A) *Microcoleus chthonoplastes*, eine fädige Cyanobakterienart, besteht aus Trichomen (t), die von einer Schleimhülle umgeben sind (sh). (B) *Merismopedia punctata*, eine kokkoide Cyanobakterienart, die kissenartige Zellkluster ausbildet. Man bemerke die filigranen Fäden, die von dem Zellcluster abgehen und auf dem Hartsubstrat, der Oberfläche eines Quarzkornes, münden. Diese Fäden sind extrazelluläre Substanzen, die durch die Präparation geschrumpft sind. (Aus: NOFFKE et al. 2003.)

Begriff, denn die blaugrün gefärbten, organischen Auflagen, die weite Sedimentoberflächen bedecken, sehen tatsächlich aus wie Teppiche, und sie können sogar wie solche angehoben und aufgerollt werden (Abb. 4; STAL 2000).

Der Querschnitt durch eine Mikrobenmatte, betrachtet unter dem Mikroskop, zeigt ein dichtes, netzartiges Geflecht aus Filamenten, das wie ein Teppich Mineralkörner umwebt.



Abb. 4 Moderne Mikrobenmatte, Watt der Insel Mellum, Nordsee: Cyanobakterien können sehr kohärente Bakterienrasen ausbilden, die sehr stark an einen Teppich erinnern. Daher werden diese Bakterienrasen als »Matten« bezeichnet. Man bemerke, wie zwar das unterliegende Sediment durch Wasserbewegung herauserodiert wurde, die Mikrobenmatte aber wie ein Tisch Tuch herabhängt. Maßstab: Messer, ca. 15 cm.

Adhäsive Schleime, die sogenannten »extracellular polymeric substances – EPS«, die von den Cyanobakterien ausgeschieden werden, sind als schimmernde Überzüge zu erkennen (Abb. 5). Oftmals umkleiden die Schleime Mineralkörner wie eine organische Hülle, weshalb sie auch als »Biofilme« bezeichnet werden (CHARAKLIS und WILDERER 1989). EPS dienen verschiedenen Lebensfunktionen von Mikroben, wie z. B. der chemischen Pufferung gegen osmotischen Druck, wie er etwa bei stark wechselnden Salinitäten des Meerwassers entsteht, aber sie spielen auch eine wesentliche Rolle für die Kohäsivität der Mikrobenmatte. Diese letztere Eigenschaft der organischen Lagen macht Mikrobenmatten so interessant für Geowissenschaftler, denn diese dicken, teppichartigen Mikrobenmatten beeinflussen die Sedimentationsdynamik, welche marine Ablagerungsräume beherrscht, nicht unwesentlich (Spezialarbeiten sind NOFFKE 1998, 1999, Quantifizierung in NOFFKE und KRUMBEIN 1999).

Was verstehen die Geologen unter Sedimentationsdynamik? Es werden unter diesem Begriff hydraulische Kräfte, die von Wellenschlag und Bodenströmungen verursacht werden, ihre Wirkungen auf das Sediment, Erosion und Deposition,<sup>4</sup> und schließlich die daraus

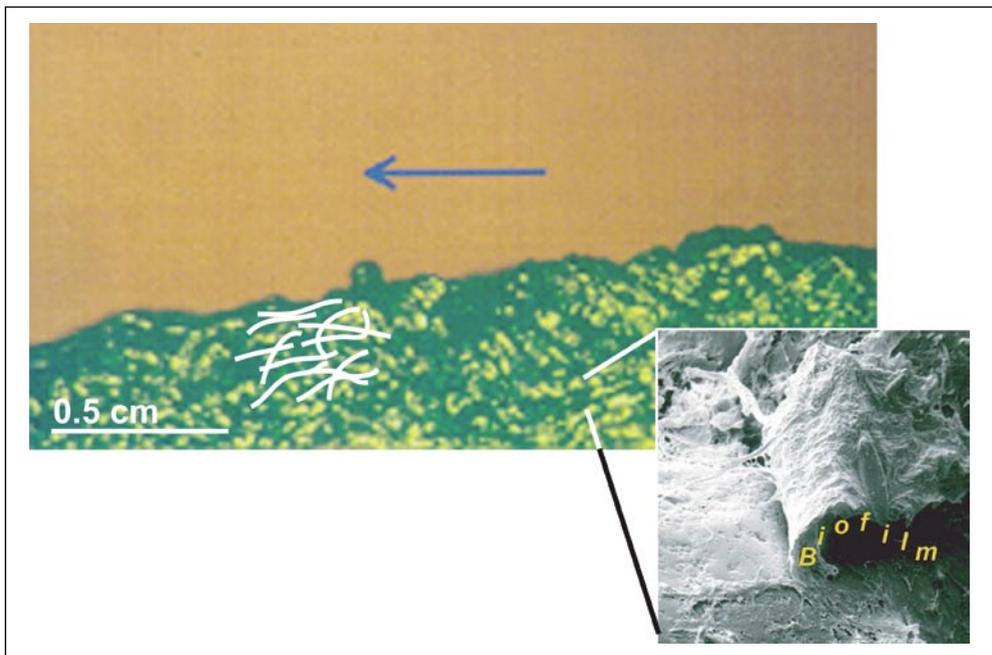


Abb. 5 Textur einer Mikrobenmatte: Das große Bild zeigt eine Seitenansicht auf eine Mikrobenmatte, aufgenommen unter dem Binokular. Die Fäden von Cyanobakterien umziehen und vernetzen die Sedimentkörner der Wattoberfläche. Die eingezeichneten Fäden sollen dies verdeutlichen. Die schimmernde Erscheinung der Mikrobenmatte stammt von den extrazellulären polymerischen Substanzen (EPS), Schleime, die von den Cyanobakterien z. B. als Schutz gegen Austrocknung ausgeschieden werden. Der Pfeil deutet eine Bodenströmung an, welche die Mikrobenmatte überstreicht. Das kleine Bild zeigt wie EPS der Mikrobenmatte das einzelne Sandkorn (links im Bild als hellgraue, genarbte Fläche zu erkennen) ummantelt. Solche organischen Filme werden »Biofilme« genannt.

4 Erosion und Deposition: Abtragung und Ablagerung.

resultierenden Sedimentstrukturen zusammengefaßt. Aber es sind nicht nur hydraulische und sedimentmechanische Parameter, die die Sedimentationsdynamik bestimmen. Auch klimatische Faktoren, die für verschiedene Klimazonen charakteristisch sind, beeinflussen das Sediment. Das gilt besonders für Wattbereiche, die regelmäßig trocken fallen und daher den Witterungsbedingungen ausgesetzt sind. Besonders deutlich wird dies am Beispiel der Evaporitbildung. Evaporite sind Minerale, die durch Verdunstung von im Sediment zirkulierenden, mineralführenden Wässern ausfallen. Populär sind Gips, Anhydrit, oder einfach Halit (Kochsalz). Aufgrund der klimabedingten Varianten, unterscheidet man physikalische und chemische Sedimentationsdynamik. Physikalisch heißt nur von physikalischen Kräften wie Hydraulik bestimmt. Chemisch heißt, daß Verdunstung und andere, hier nicht genannte chemische Prozesse, eine wesentliche Rolle spielen.

Zurück zum Beispiel der Wattsande der Nordsee. Die Nordsee liegt im kühl-gemäßigten Klimagürtel, und demnach werden die Sedimentoberflächen nur hydraulisch beeinflusst, etwa von der Flutströmung oder von starken Stürmen. Dies wird von Rippelmarken, wellenartige, zentimeter-hohe Strukturen im Sand, die die Wattoberflächen überziehen, bezeugt (Abb. 6). Jeder, der einmal eine Wattwanderung gemacht hat, ist mit den Rippelmarken vertraut, die jeden Tritt so unangenehm machen können.

Was passiert während der Bildung von Rippelmarken? Durch die Wasserbewegung werden Mineralkörner, wie etwa Sand, aus ihrer Lage an der Sedimentoberfläche herausgehoben (Bernoulli-Effekt) und auf dem Sediment rollend oder als Schwebfracht im Wasser weitertransportiert. Sobald die Mineralkörner in einen Strömungsschatten geraten, d. h. in einen Bereich, wie z. B. hinter einem Strömungshindernis, wo die hydrodynamische Energie plötzlich stark abfällt, kommen sie wieder zur Ablagerung. Überstreicht turbulent strömendes Wasser ein Sediment bestimmter Korngröße und Dichte (Feinsand), dann entstehen durch diese Vorgänge der Erosion und Deposition Rippelmarken charakteristischer Dimensionen (vergleiche hierzu die klassischen Arbeiten von ALLEN, z. B. ALLEN 1968).

### *3.2 Biostabilisierung von Sediment durch Cyanobakterien*

Was haben nun benthische Cyanobakterien und Rippelmarken mit Biogeologie zu tun? Wie im Eingangsabschnitt definiert, untersucht die Geobiologie geologische und biologische Parameter in gekoppelten Prozessen. Ein solcher gekoppelter Prozeß ist die sogenannte Biostabilisierung, die Fixierung von Sediment, wie z. B. Sand, durch Mikroorganismen (PATERSON 1994). Hierbei kommt es zur Überlagerung von Sedimentdynamik (geologischer Faktor) mit bakterieller Aktivität (biologischer Faktor). Erinnern wir uns an das Bild einer Mikrobenmatte (Abb. 4), ein dichter, kohärenter Rasen, dessen Filamente Mineralpartikel der Sedimentoberflächen verflacht. Diese Verflechtung hat eine sehr stark verfestigende Wirkung, denn erosive Zugkräfte, die durch die Sedimentoberfläche überstreifende Bodenströmungen entstehen, können dem bakteriell überwachsenen Substrat nichts anhaben. Diese »Biostabilisierung« von Sediment durch Cyanobakterienmatten wird durch verschiedene mechanische Effekte bewirkt (NOFFKE et al. 2001, NOFFKE 2003). Es ist nicht nur das organische Geflecht selbst, welches die Mineralpartikel in ihrer Position festhält. Das Netzwerk der Filamente reagiert auch elastisch auf die Bernoulli-Kräfte und verhindert somit jede lokale Zerstörung des Mattengeflechtes. Jedes Herauslösen eines Mineralkornes etwa könnte einen Kaskadeneffekt hervorrufen, der die mechanische Destruktion der gesamten Bakteriengemeinschaft zur Folge hätte. Zusätzlich versiegeln die gewaltigen Mengen an EPS die Sedimentoberfläche, und jeder, der einmal über

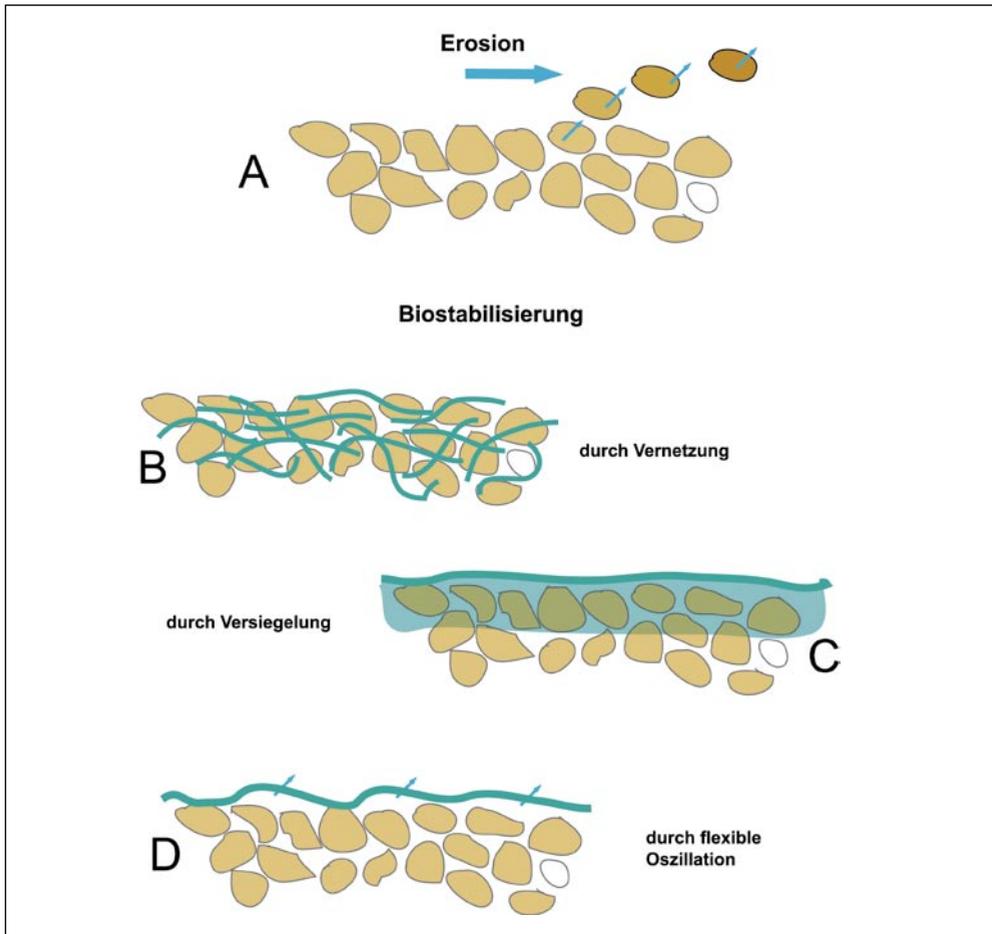
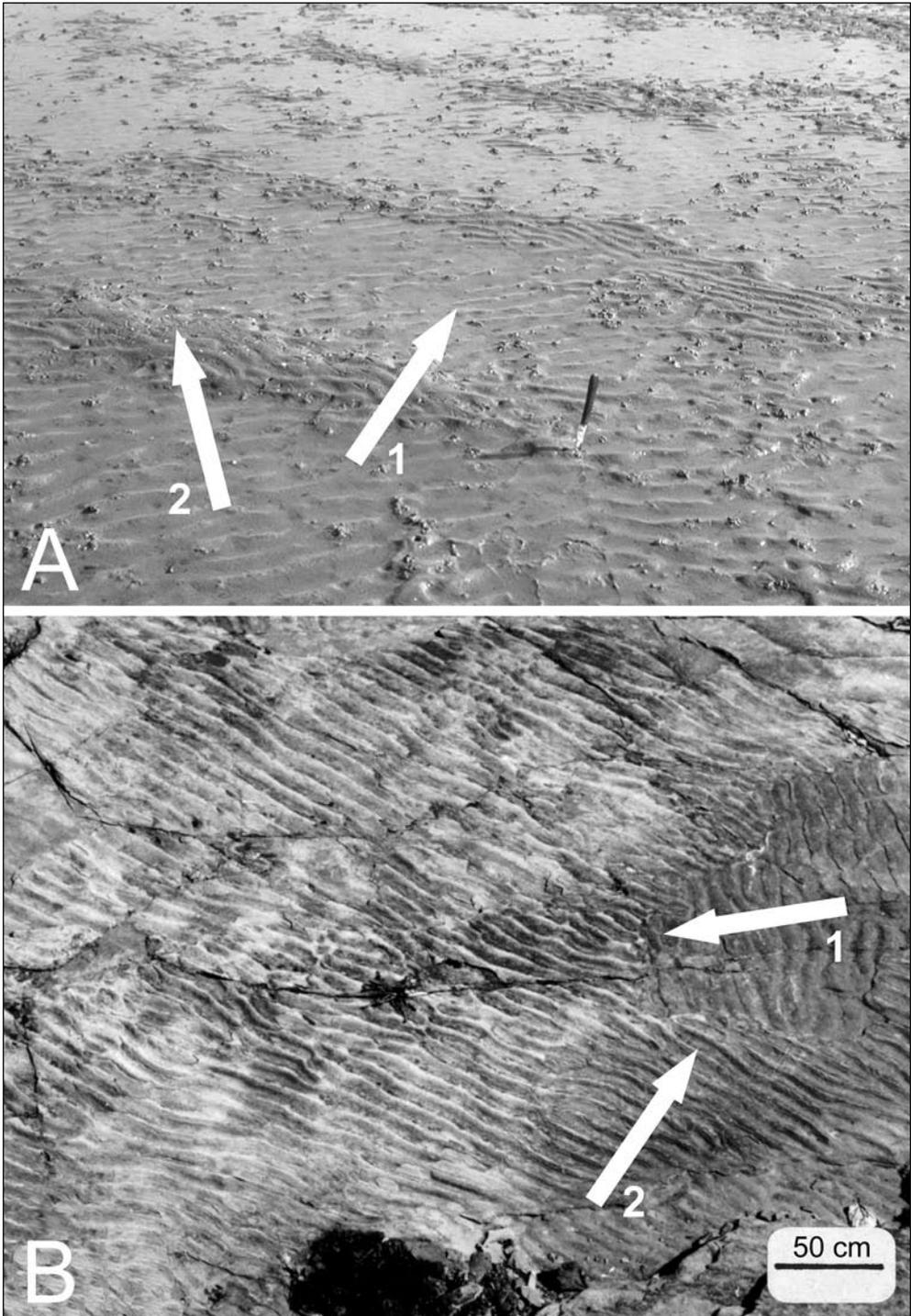


Abb. 6 Erosion und Biostabilisierung (Seitenansicht auf einen senkrechten Schnitt von Wattsediment): (A) Erosion durch einen über eine Sandoberfläche fließenden Bodenstrom bewirkt ein Anheben einzelner Mineralkörner und ein Herauslösen aus der Sedimentoberfläche. Das Mineralkorn, wie durch die kleinen Pfeile angedeutet, wird durch die Wasserbewegung weitertransportiert. (B) Biostabilisierung durch Vernetzung der Mineralkörner durch fädige Cyanobakterien. (C) Biostabilisierung durch Versiegelung der Mikrobenmattenoberfläche durch adhäsive, extrazelluläre, polymerische Substanzen. (D) Biostabilisierung durch flexible Oszillation. Ein Bodenwasserstrom bewirkt eine Auf- und Abbewegung der Mikrobenmatte, die flexibel auf die Bernoulli-Kräfte reagiert. Weitere Erläuterungen im Text.

Abb. 7 Multidirektionale Rippelmarken, rezent (A) und fossil (B): (A) Das rezente Beispiel stammt von Wattsedimenten der Insel Mellum, Nordsee. Deutlich sind zwei verschiedene Rippelmarkenrichtungen auf der Sedimentoberfläche zu erkennen. Sie entstanden durch zwei Bodenströme, die die Oberfläche in einem längeren Zeitabstand voneinander überstrichen haben, wobei 1 die erste und 2 die zweite Bodenströmung repräsentieren. Maßstab: Messer, 23 cm. (B) Das fossile Beispiel stammt aus Burkina Faso, Afrika. Die Gesteinsoberfläche zeigt ebenfalls zwei verschiedene Rippelmarkenrichtungen. Die Pfeile 1 und 2 markieren die rekonstruierten Richtungen der beiden aufeinander folgenden Bodenströme. Weitere Erklärungen im Text.



eine Mikrobenmatte gegangen ist, wird sich sicher an die feuchte und schlüpfrige Oberfläche erinnern. Für die Cyanobakterien bilden diese schleimigen Substanzen einen Schutzfilm, der die Reibungskräfte zwischen Mikrobenmatte und darüber hinweg schießendes Wasser, stark herabsetzt.

Verschiedene Cyanobakterienarten bewirken unterschiedliche Biostabilisierungsgrade (NOFFKE und KRUMBEIN 1999). In Experimenten mit einer Strömungskammer und in Feldmessungen wurden durch die Besiedlung der Sedimentoberfläche durch die kokkoide Cyanobakterienart *Meresmopedia punctata* 3-fach erhöhte Stabilisierungseffekte hervorgerufen. Werte, die Parallelmessungen an sterilen Sanden um das 5-fache übersteigen, wurden in Präsenz von *Oscillatoria limosa*, einem Organismus, der einzelne, hochbewegliche Trichome ausbildet, gemessen. Star der biostabilisierenden Cyanobakterien ist aber *Microcoleus chthonoplastes*, der »Bodenbildner«, so die Übersetzung des wissenschaftlichen Namens (KRUMBEIN 1987): seine sedimentfixierende Wirkung erreichte die 12-fache Höhe, verglichen mit sterilem Sand (YALLOP et al. 1994)! Damit kann dieser Organismus selbst kräftigen Winterstürmen trotzen, die so typisch für die Nordseeküste sind (NOFFKE und KRUMBEIN 1999).

Die Überlagerung von Biostabilisierung (und noch einige andere Aktivitäten von Cyanobakterien, die hier nicht erwähnt wurden) mit physikalischer Sedimentationsdynamik führt zur Ausbildung charakteristischer »Mikrobiell induzierter Sedimentstrukturen«, einer Gruppe von Strukturen, die erst jüngst definiert und in die Klassifikation der Primären Sedimentstrukturen<sup>5</sup> aufgenommen wurde (NOFFKE et al. 2001, 2003). Ein attraktives Beispiel sind »Multidirektionale Rippelmarken« (NOFFKE 1998).

### 3.3 Biostabilisierung versus Erosion: die Genese Multidirektionaler Rippelmarken

Bei einer Wanderung über die Wattsande wird ersichtlich, daß die Besiedlung der tidalen Sedimente durch Cyanobakterien nicht einheitlich ist. Vielmehr hat die Besiedlung fleckenartigen Charakter. Ursache hierfür ist die Empfindlichkeit der Cyanobakterien gegenüber der Sedimentumlagerung durch Wasserbewegung. Während nämlich bereits etablierte, dicke Mikrobenmatten robuste Festungen gegenüber Strömungswirbel darstellen, wie oben ausgeführt, sind einzelne Zellen oder Filamente der Erosion nicht gewachsen. Wie aber erfolgt die Besiedlung einer Wattfläche? Sobald im Frühjahr die Häufigkeit und Intensität der Stürme nachläßt, besiedeln erste Cyanobakterien, besonders die hochmobilen *Oscillatoria limosa*, die weiten Wattoberflächen. Innerhalb weniger Stunden können sie an verschiedenen Stellen eine erste, sehr filigrane Mikrobenmattenlage ausbilden. Diese initialen Mikrobenmattenflecken überwachsen die Rippelmarken, welche bei dem letzten Frühjahrssturm gebildet wurden. Diese Matten-»patches« haben nur wenige Dezimeter Ausdehnung, reichen aber aus, um das Sediment darunter zumindest etwas zu stabilisieren. Das heißt, während eines folgenden Sturmes werden alle Rippelmarken derjenigen Sedimentoberflächenanteile, welche nicht von *O. limosa* stabilisiert werden, umgelagert und eine neue Rippelmarkengeneration entsteht. Ein Wattwanderer sieht nun demzufolge zwei Rippelmarkenrichtungen: die erste, welche fleckenhaft auf der Sandoberfläche erhalten ist, da sie biostabilisiert wurde, und die zweite, die durch die jüngste Umlagerung entstand (Abb. 6A). Im Laufe weniger Tage folgt die Cyanobakterienart

---

5 Primäre Sedimentstrukturen werden noch während der Sedimentablagerung gebildet. Im Gegensatz dazu gibt es die Sekundären Sedimentstrukturen, die viel später, z. B. durch chemische Vorgänge im Sediment, geformt werden.

*Microcoleus chthonoplastes* der Besiedlungsstruktur von *O. limosa*. Seine hochstabilisierende Wirkung auf das Sediment erhöht das Erhaltungspotential der ältesten Rippelmarken. *O. limosa* aber breitet ihre Mikrobenmatten randlich immer weiter aus und überwächst nun, wenn auch wiederum nur fleckhaft, auch die jüngste Rippelmarkengeneration. In einem weiteren Sturm wird eine dritte Rippelmarkengeneration geformt, und zwar wiederum nur in den nicht von den Cyanobakterien besiedelten Wattoberflächenanteilen. Nun würde ein Wattwanderer drei Rippelmarkenrichtungen auf der Sandoberfläche zählen (Abb. 7A). Diese Rippelmarkenmuster werden als »Multidirektionale Rippelmarken« bezeichnet (NOFFKE 1998) und sind eindrucksvolle Zeugnisse der Interferenz zwischen Biostabilisierung durch sich im Verlaufe der Sommermonate ausbreitenden Mikrobenmatten mit Erosion durch in Häufigkeit und Intensität abnehmenden Stürmen. Doch nun ein Blick von den gegenwärtigen Watten der Nordsee in die Vergangenheit.

### 3.4 Der Kreis schließt sich: die Bedeutung fossiler Multidirektionaler Rippelmarken

Multidirektionale Rippelmarken sind auch im Fossilbericht, im Gestein also, zu finden. Welche Daten über die Paläoumweltbedingungen und die bakterielle Besiedlung können sie liefern? Rippelmarken treten in jeder Wassertiefe auf. Die Präsenz dieses multidirektionalen Musters weist auf das frühere Vorkommen von Cyanobakterien hin. Da diese photoautotroph sind, war die Wassertiefe sehr gering. Vermutlich überliefern die Sandsteine einen früheren Gezeitenbereich, sehr ähnlich wie der der heutigen Nordsee.

Die fossile Sedimentoberfläche zeigt zwei deutliche und eine etwas undeutliche Rippelmarkenrichtung. Das heißt, mindestens zwei Strömungsrichtungen haben die Cyanobakterien und ihr Substrat beeinflusst. Die Mikroben konnten ihr Substrat effektiv biostabilisieren, wie die von jeder Erosion unberührten Rippelmarken-»patches« zeigen. Da die Rippelmarken relativ deutlich zu sehen sind, waren die verursachenden Mikrobenmatten noch nicht sehr weit entwickelt. Eine mature Mikrobenmatte hat eine plane Oberfläche, denn erst diese fortgeschrittene Anreicherung von Biomasse in »alten« Matten kann die Rippelmarken völlig auskleiden, wie in Abbildung 4 zu sehen. Die Rippelmarken zeigen an, daß die Bodenströme eine Geschwindigkeit von 20 bis 50 cm/s hatten, wobei 1 das erste, und 2 das zweite Umlagerungsereignis darstellt.

Die Kenntnis der Bildungsprozesse und der Rolle, die die Mikroorganismen spielen, ist, wie das Beispiel der Multidirektionalen Rippelmarken zeigt, Schlüssel, den Fund der gleichen Sedimentstruktur richtig zu interpretieren. Aber der Fund weist gleichzeitig darauf hin, daß es zum Zeitpunkt der Sedimentablagerung, also vor etwa 600 Millionen Jahren, Cyanobakterien gegeben hat, die physiologische Fähigkeiten entwickelt hatten, mobile Quarzsande in einem Gezeitenbereich zu besiedeln. Die Sonnenstrahlung hatte bereits nicht mehr die hohen UV-Anteile wie in der frühesten Erdgeschichte, ansonsten wäre es selbst den lichtabhängigen Cyanobakterien nicht möglich gewesen, Wattbereiche, die ja regelmäßig trocken fallen, zu besiedeln.

## 4. Perspektiven

Das Beispiel der Multidirektionalen Rippelmarken in Sanden und Sandsteinen dokumentiert, daß das duale Untersuchungskonzept der Geobiologie die Kenntnis der Mikrobenmattenent-

wicklung und der Interaktionen zwischen Cyanobakterien und physikalischer Sedimentdynamik stark erweitert hat. Eine ökologische Interpretation der Gesteinsabfolgen mit den fossilen Multidirektionalen Rippelmarken allein hätte fehlerhaft sein und zu anderen Umweltrekonstruktionen führen können. Andererseits belegen die Fossilfunde Stadien der Evolution der Fähigkeiten benthischer Cyanobakterien. Der generelle Nutzen des Untersuchungskonzeptes der Geobiologie liegt neben dem in diesem Beitrag demonstrierten historisch-geologischen Schwerpunkt in der Erarbeitung globaler Umweltprobleme, wie z. B. dem Glashauseffekt der Atmosphäre, oder aber auch in der Exploration extraterrestrischer Environments, wie in den geplanten Missionen zum Mars.

### Literatur

- ALLEN, J. P. L.: Current Ripples. Their Relation to Patterns of Water and Sediment Motion. Amsterdam: North Holland Publ. 1968
- BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W., and GARRITY, G. M.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. New York: Springer 2001
- CHARAKLIS, W. G., and WILDERER, P. A.: Structure and Function of Biofilms. Dahlem Workshop Reports, Life Sciences Research Report 46. Chichester 1989
- EHRlich, H. L.: Geomicrobiology. New York: Dekker Inc. 1995
- GERDES, G., and KRUMBEIN, W. E.: Biolaminated Deposits. Berlin: Springer 1987
- NOFFKE, N.: Multidirected ripple marks rising from biological and sedimentological processes in modern lower supratidal deposits (Mellum Island, southern North Sea). *Geology* 26, 879–882 (1998)
- NOFFKE, N.: Erosional remnants and pockets evolving from biotic-physical interactions in a recent lower supratidal environment. *Sedimentary Geology* 123, 175–181 (1999)
- NOFFKE, N.: The concept of geobiological studies: the examples of bacterially generated structures in physical sedimentary systems. *Palaios* 17/6, 1–2 (2002)
- NOFFKE, N., and KRUMBEIN, W. E.: A quantitative approach to sedimentary surface structures contoured by the interplay of microbial colonization and physical dynamics. *Sedimentology* 46, 417–426 (1999)
- NOFFKE, N., GERDES, G., KLENKE, T., and KRUMBEIN, W. E.: Microbially induced sedimentary structures – a new category within the classification of primary sedimentary structures. *J. Sedimentary Research* 71, 649–656 (2001)
- NOFFKE, N., GERDES, G., KLENKE, T., and KRUMBEIN, W. E.: Benthic cyanobacteria and their influence on the sedimentary dynamics of peritidal depositional systems (siliciclastic, evaporitic salty and evaporitic carbonatic). *Earth Science Review* 12, 1–14 (2003)
- STAL, L. J.: Cyanobacterial mats and stromatolites. In: WHITTON, B. A., and POTTS, M. (Eds.): *The Ecology of Cyanobacteria*; pp. 62–120. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 2000
- PATERSON, D. M.: Microbiological mediation of sediment structure and behaviour. In: STAL, L. J., and CAUMETTE, P. (Eds.): *Microbial Mats*; pp. 97–109. Berlin: Springer 1994
- YALLOP, M. L., DE WINDER, B., PATERSON, D. M., and STAL, L. J.: Comparative study on primary production and biogenic stabilization of cohesive and non-cohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences* 39, 565–582 (1994)

Prof. Dr. rer. nat. Nora NOFFKE  
Old Dominion University  
Ocean, Earth & Atmospheric Sciences  
4600, Elkhorn Avenue  
Norfolk, VA 23529  
USA  
Tel.: +1 757 6833313  
Fax: +1 757 6835303  
E-Mail: [NNoffke@odu.edu](mailto:NNoffke@odu.edu)

## **Genetik/Molekularbiologie und Zellbiologie**

---

Dr. rer. nat. Olaf MAIER

Geboren 1963 in Kulmbach, Studium der Biologie von 1984 bis 1990 an der Universität Regensburg. Mitarbeiter im Zoologischen Institut und verschiedener Behörden. Mitarbeiter im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin. Promotion 1998 an der Humboldt-Universität Berlin. Zweijähriges Projekt am Department of Physiological Chemistry der Universität Groningen (Niederlande) von 1999 bis 2001 gefördert durch die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina. Gegenwärtig weiter tätig in der Abteilung für Membranzellbiologie der Reichsuniversität Groningen.

## Charakterisierung des vesikulären Transports von Sphingolipiden in polarisierten HepG2-Zellen

Olaf MAIER und Dick HOEKSTRA (Groningen)

Mit 10 Abbildungen

### Zusammenfassung

Die meisten Zelltypen besitzen distinkte Plasmamembrandomänen mit einer charakteristischen Protein- und Lipidzusammensetzung. Besonders deutlich ist dies in Epithelzellen, bei denen basolaterale und apikale Plasmamembrandomänen unterschieden werden können, die durch *Tight Junctions* voneinander getrennt sind. Derartig »polarisierte« Zellen benötigen eine hochentwickelte Sortiermaschinerie um, trotz des ständigen Membranflusses zwischen den Zellorganellen und der Plasmamembran, ihre Membranzusammensetzung aufrecht zu erhalten. Obwohl die polarisierte Struktur bereits durch Sortierung im biosynthetischen Transportweg, d. h. im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ausgebildet werden kann, ist für ihre Aufrechterhaltung auch die Sortierung im endozytotischen Transportweg erforderlich. In früheren Arbeiten konnte, durch Verwendung fluoreszierender Sphingolipid-Derivate, eine Rolle des Subapikalen Kompartiments (SAC) bei der Sortierung zur basolateralen und apikalen Membran von HepG2-Hepatomazellen nachgewiesen werden. Da der Membrantransport überwiegend durch Vesikel erfolgt, wurde in diesem Projekt die Bildung von Sphingolipid-haltigen Transportvesikeln an TGN und SAC in einem *In-vitro*-System untersucht. Dazu wurden HepG2-Zellen, nach der Akkumulation fluoreszierender Sphingolipide in SAC bzw. TGN, mechanisch permeabilisiert und die Freisetzung der Transportvesikel unter definierten Bedingungen analysiert. Wir konnten zeigen, daß die Vesikelbildung an SAC und TGN unterschiedlich reguliert wird und daß verschiedene Sphingolipide im SAC voneinander sortiert und in distinkte Transportvesikel verpackt werden. Dagegen konnte eine Sortierung neu synthetisierter Sphingolipide im TGN bislang nicht direkt nachgewiesen werden. Die Ergebnisse demonstrieren die herausragende Rolle des SAC im polarisierten Transport von Hepatozyten und reflektieren vermutlich den Befund, daß in Hepatozyten der Transport der meisten neu synthetisierten apikalen Proteine über die basolaterale Membran erfolgt.

### Abstract

The plasma membrane of most cell types is composed of distinct domains with a characteristic protein and lipid composition. This is especially apparent in epithelial cells where basolateral and apical plasma membrane domains are separated by tight junctions. Such »polarized« cells require a sophisticated sorting machinery to maintain their specific membrane composition in spite of a continuous membrane flux between intracellular membranes and the plasma membrane. Although polarity formation can start already by sorting within the biosynthetic transport pathway, i.e. in the trans-Golgi network (TGN), sorting within endosomal compartments is necessary to maintain the polarized structure. Using fluorescently labeled sphingolipid analogues, it was previously shown that the subapical compartment (SAC) plays an important role in the sorting to the basolateral and apical membrane of HepG2 hepatoma cells. Since membranes are predominantly transported *via* vesicular carriers, an *in vitro* system was established to compare the formation of sphingolipid-containing transport vesicles at TGN and SAC. After the accumulation of fluorescently labeled sphingolipid analogues in TGN and SAC, respectively, HepG2 cells were mechanically permeabilized and the release of transport vesicles from both compartments was investigated under defined conditions. Evidence was obtained that vesicle formation at SAC and TGN is differently regulated and that sphingolipids are sorted from each other in the SAC membrane and packaged into distinct transport vesicles. In contrast, direct proof for the sorting of newly synthesized sphingolipids in the TGN is still lacking. The results demonstrate the prominent role of the SAC in the polarized transport of hepatocytes and may reflect the finding that in hepatocytes most apical proteins are transported from the TGN *via* the basolateral membrane to their final localization.

## 1. Polarisierter Membrantransport in Epithelzellen

Die meisten Zelltypen zeichnen sich durch distinkte Plasmamembrandomänen mit einer charakteristischen Protein- und Lipidzusammensetzung aus. Besonders deutlich ist dies in Epithelzellen, z. B. von Niere, Darm und Leber, bei denen basolaterale und apikale Plasmamembrandomänen unterschieden werden können, die durch *Tight Junctions* voneinander getrennt sind. Dabei ist die apikale Membran dem Organlumen zugewandt, z. B. dem Gallenkanälchen oder dem Darmlumen, während die basolaterale Membran mit der extrazellulären Matrix des Gewebes in Kontakt ist. Im allgemeinen zeichnet sich die apikale Membran durch einen hohen Gehalt an Glykosphingolipiden aus, die in der exoplasmatischen Schicht der Membran lokalisiert sind und deren lateraler Transport durch die *Tight Junctions* verhindert wird. Distinkte Plasmamembrandomänen können jedoch auch in Zellen unterschieden werden, die keine *Tight Junctions* ausbilden. Beispiele sind die Myelinscheide von Oligodendrocyten, die eine besonders hohe Konzentration an Galactosylceramid und Sulfatid (3-sulfogalactosylceramid) aufweist, sowie die axonale Membran von Neuronen.

Für die Ausbildung ihrer distinkten Membrandomänen benötigen derartig »polarisierte« Zellen eine hochentwickelte Sortieremaschinerie, um, trotz des ständigen Membranflusses zwischen den Zellorganellen und der Plasmamembran, ihre Membranzusammensetzung aufrechtzuerhalten (ROTHMAN 1996). Das Verständnis dieser Maschinerie ist von entscheidender Bedeutung, nicht nur um zu wissen, wie die polarisierte Struktur in gesunden Zellen ausgebildet wird, sondern insbesondere auch, um die Vorgänge zu verstehen, die zur krankhaften De-Differenzierung von polarisierten Zellen, z. B. bei der Entstehung von Krebszellen, führen.

Abhängig vom Zelltyp kann die polarisierte Struktur bereits durch Sortierung im biosynthetischen Transportweg ausgebildet werden (Abb. 1). Proteine und Lipide werden hier im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)<sup>1</sup> sortiert und direkt zur apikalen oder basolateralen Membran transportiert (TRAUB und KORNFELD 1997, IKONEN und SIMONS 1998). Da die Plasmamembran jedoch kontinuierlich internalisiert wird, ist für die Aufrechterhaltung der polarisierten Struktur auch die Sortierung im endozytotischen Transportweg erforderlich (MELLMAN 1996, MOSTOV et al. 2000). Nach ihrer Internalisierung werden hier die Membranen zunächst zu frühen, apikalen bzw. basolateralen, Endosomen transportiert (Abb. 1). Von dort werden lösliche Stoffe überwiegend zu späten Endosomen und Lysosomen transportiert, während ein Großteil der membrangebundenen Anteile direkt rezykliert wird. Dadurch wird eine Vermischung von apikalen und basolateralen Membranen weitgehend vermieden. Allerdings wird ein Teil der Membranen weiter ins Zellinnere transportiert und gelangt in das sogenannte gemeinsame Endosom, eine tubulo-vesikuläre Struktur im pericentriolären Bereich, in dem sich apikale und basolaterale Membranproteine treffen (KNIGHT et al. 1995). Hier werden die Membranen voneinander sortiert und entweder zurück zu ihrer Ausgangsmembran oder zur gegenüberliegenden Plasmamembrandomäne transportiert, d. h. transzytiert. Gut untersucht ist insbesondere die Transzytose des polymeren Immunglobulinrezeptors, der dimeres IgA von der basolateralen zur apikalen Membran transportiert (MOSTOV 1994).

---

1 BSA: bovines Serumalbumin; C<sub>6</sub>NBD: 6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazol-4-yl)amino] hexanoyl; DAB: Diaminobenzidin; DSC: Dünnschichtchromatographie, GK: Gallenkanal-artige Struktur; GlcCer: Glucosylceramide; MDCK: Madin-Darby canine kidney; PDMP: D-threo-1-phenyl-2-decanoyl amino-3-morpholino-1-propanol; SAC: Subapicales Kompartiment; SM: Sphingomyelin; TFP: Trifluoperazin; TGN: Trans-Golgi-Netzwerk.

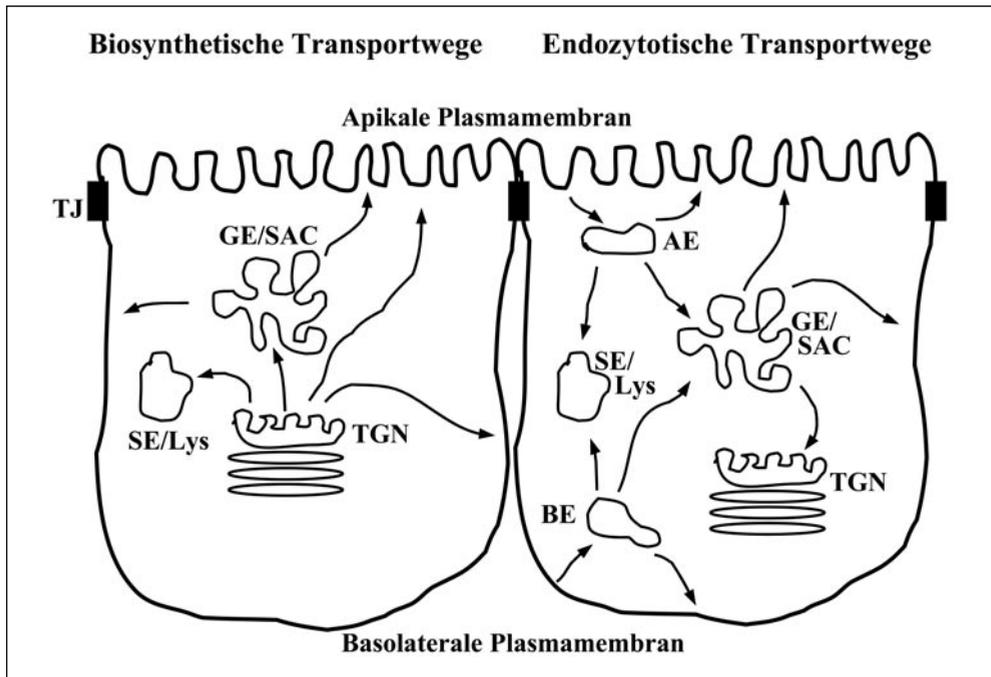


Abb. 1 Schematische Darstellung von biosynthetischen und endozytotischen Transportwegen in polarisierten Epithelzellen. Abkürzungen: AE: apikales frühes Endosom; BE: basolaterales frühes Endosom; GE: gemeinsames Endosom; Lys: Lysosom; SAC: Subapikales Kompartiment; SE: spätes Endosom; TGN: Trans-Golgi-Netzwerk; TJ: Tight Junction.

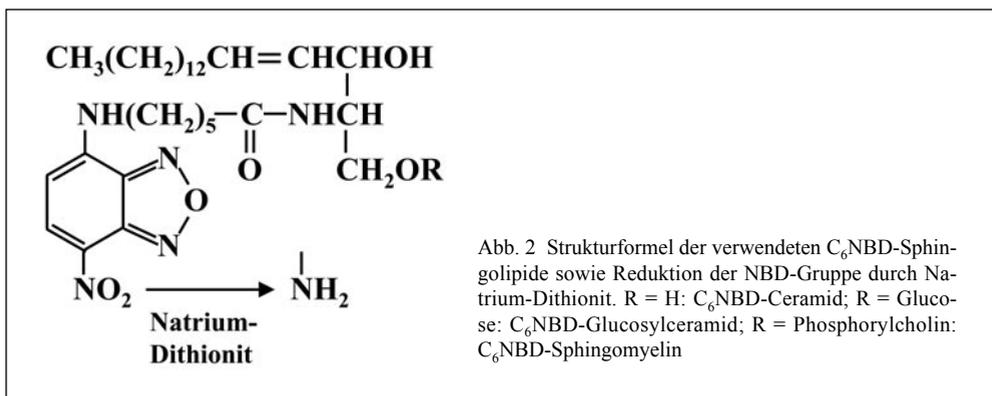
Im Detail wurde der polarisierte Transport neu synthetisierter Proteine und Lipide bisher vor allem in Nierenzellen, d. h. MDCK-Zellen, untersucht, und hier werden die meisten der bisher untersuchten Proteine im TGN voneinander sortiert und direkt zu ihrer Zielmembran transportiert (Ikonen und Simons 1998). Im Gegensatz dazu werden in Hepatozyten die meisten Proteine der kanalikulären Membran zunächst zur sinusoidalen Membran transportiert (Bartles und Hubbard 1990, Bastaki et al. 2002). Dort werden sie wieder endozytiert und durch Transzytose zur kanalikulären Membran transportiert. Die Sortierung zur basolateralen und apikalen Membran muß hier daher überwiegend im endosomal Transportweg erfolgen. In der Tat konnte in HepG2-Hepatomzellen ein Subapikales Kompartiment (SAC) identifiziert werden, das vermutlich zum Gemeinsamen Endosom homolog ist und als Sortierungsstation im polarisierten Membrantransport fungiert (van IJzendoorn und Hoekstra 1999a). In den letzten Jahren konnte allerdings für einige Proteine, insbesondere für verschiedene neusynthetisierte ABC-Transporter ein direkter Transport zur kanalikulären Membran nachgewiesen werden (Kipp und Arias 2000, Roelofs et al. 2000, Ait-Simane und Hoekstra 2003). Obwohl einige dieser Proteine eventuell zunächst zum SAC transportiert und dort sortiert werden (Abb. 1), ist es daher wahrscheinlich, daß auch in Hepatozyten das TGN bei der Ausbildung der polarisierten Plasmamembranstruktur von Bedeutung ist.

Für den spezifischen Transport zur basolateralen bzw. apikalen Membran sind verschiedene Sortierungssignale verantwortlich. Der basolaterale Transport wird vor allem durch Aminosäu-

resequenzen in der zytoplasmatischen Domäne des Transportproteins vermittelt, die sich durch eine Tyrosin- bzw. Dileucin-haltige Sequenz auszeichnen (HEILKER et al. 1999). Diese binden direkt an Adaptorproteine (SUGIMOTO et al. 2002) und können daher gleichzeitig die Konzentrierung der Proteine in die sich ausbildenden Transportvesikel sowie die Abschnürung dieser Vesikel selbst induzieren. Im Gegensatz dazu sind die Signale für den apikalen Transport häufig in der luminalen Domäne der Transportproteine lokalisiert. Insbesondere die Modifizierung der Proteine mit Kohlenhydrat-Seitenketten an Asparagin bzw. Serin/Threonin ist hierbei von Bedeutung (BENTING et al. 1999, ALFALAH et al. 2002). Zusätzlich spielen für die Sortierung jedoch vor allem auch spezielle Membrandomänen eine wichtige Rolle, die sich durch einen hohen Gehalt an Cholesterol und (Glyco)-Sphingolipiden auszeichnen (SIMONS und IKONEN 1997, MAIER et al. 2001). Der Befund, daß in Fischer-Ratten-Thyroid-Zellen die Inhibierung der Sphingolipidsynthese spezifisch die Sortierung zur apikalen Membran beeinflusst (LIPARDI et al. 2000), zeigt, daß Sphingolipide für die Ausbildung einer polarisierten Zellstruktur von besonderer Bedeutung sind.

Wir sind daher insbesondere am Transport von Sphingolipiden in polarisierten Zellen interessiert. Für unsere Studien verwenden wir fluoreszierende Sphingolipid-Derivate, die am Kohlenstoff-6 der Fettsäure durch eine NBD-Gruppe modifiziert wurden (LIPSKY und PAGANO 1983, Abb. 2). Neben der Möglichkeit den Transport dieser C<sub>6</sub>NBD-Sphingolipide direkt im Fluoreszenzmikroskop zu verfolgen, besitzen sie weitere Vorteile: Zum einen kann die Fluoreszenz durch Reduktion der NO<sub>2</sub>-Gruppe mit Natrium-Dithionit ausgelöscht werden (Abb. 2). Zum anderen können sie relativ leicht mit BSA aus der exoplasmatischen Schicht der Plasmamembran herausgelöst werden, und die extrahierten Sphingolipide können leicht durch Dünnschichtchromatographie (DSC) aufgetrennt und im Fluorimeter quantifiziert werden.

Obwohl die von uns verwendeten Sphingolipid-Derivate in vielen Aspekten ihres intrazellulären Transports den natürlichen Sphingolipiden entsprechen (vgl. MAIER et al. 2002), wäre die Analyse der endogenen Sphingolipide zu bevorzugen. Dies ist jedoch mit den derzeitigen Möglichkeiten nicht durchführbar, da für die spezifische Akkumulation der Sphingolipide im SAC bzw. TGN die Verwendung extrahierbarer und modifizierbarer Sphingolipide essentiell ist, um die »Kontamination« der Ausgangsmembranen, insbesondere mit Teilen der Plasmamembran und frühen Endosomen, zu vermeiden. Nur durch die spezifische Markierung mit identifizierbaren Sphingolipiden kann sichergestellt werden, daß die analysierten Vesikel tatsächlich von dem beabsichtigten Donororganell freigesetzt wurden. Frühere Arbeiten zeigten



zudem, daß C<sub>6</sub>NBD-Sphingolipide im SAC von HepG2-Zellen auf eine Weise sortiert werden, die vom Fortschreiten der Zellpolarität abhängig ist (VAN IJZENDOORN und HOEKSTRA 1998, 2000) und rechtfertigen daher die Verwendung dieser Sphingolipid-Derivate als Markerlipide für apikale und basolaterale Transportwege von SAC (und TGN) sowie für die Charakterisierung der jeweiligen Transportvesikel.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß in MDCK-Zellen und Caco-2-Zellen, nach Inkubation mit C<sub>6</sub>NBD-Ceramid, die neu synthetisierten C<sub>6</sub>NBD-Glucosylceramid (C<sub>6</sub>NBD-GlcCer) und -Sphingomyelin (C<sub>6</sub>NBD-SM) im TGN sortiert werden. C<sub>6</sub>NBD-GlcCer wird bevorzugt zur apikalen Membran transportiert, während C<sub>6</sub>NBD-SM gleichermaßen zur apikalen und basolateralen Membran gelangt (VAN MEER et al. 1987, VAN'T HOF und VAN MEER 1990). Dies entspricht auch der Verteilung der natürlichen Sphingolipide in diesen Zellen. Für HepG2-Zellen, die in Zellkultur Gallenkanal-artige Strukturen (GK) ausbilden, wurde gezeigt, daß sie Sphingolipide direkt zur kanalikulären Membran transportieren können, aber es ist unklar, ob SM und GlcCer im TGN voneinander sortiert werden (ZEGERS und HOEKSTRA 1997). Ein Problem bei der Analyse des direkten apikalen Transports in HepG2-Zellen ist die Lokalisation der GKs zwischen den Zellen, so daß sie wegen der *Tight Junctions* nicht vom umgebenden Medium zugänglich sind. Im Gegensatz zu MDCK-Zellen können die dort lokalisierten Sphingolipide daher nicht durch BSA extrahiert und anschließend quantifiziert werden. Wir konnten allerdings mittlerweile indirekte Hinweise dafür finden, daß auch in HepG2-Zellen GlcCer vom TGN vorwiegend zur apikalen Membran transportiert wird (MAIER und HOEKSTRA 2003).

## **2. Markierung von HepG2-Zellen mit fluoreszierenden Sphingolipid-Derivaten**

Von C<sub>6</sub>NBD-Ceramid ist bekannt, daß es sich im Golgi-Apparat anreichert (Lipsky und Pagano 1985). Um die Sortierung neu synthetisierter Sphingolipide im TGN zu analysieren, wurden die Zellen daher bei 18 °C mit C<sub>6</sub>NBD-Ceramid inkubiert (vgl. Abb. 3A). Bei dieser Temperatur wird der vesikuläre Export aus dem TGN weitgehend blockiert. Nach 2 h wurde das C<sub>6</sub>NBD-Ceramid-haltige Medium entfernt, und die Zellen wurden für 2 weitere Stunden in Gegenwart von BSA bei 18 °C inkubiert, um die Sphingolipide, die trotz des Temperaturblocks zur basolateralen Membran transportiert wurden, zu extrahieren. Anschließend wurden die Zellen kurz bei 4 °C mit Natrium-Dithionit behandelt, um die Fluoreszenz in den kanalikulären Strukturen auszulöschen. Danach sind die Sphingolipide perinukleär lokalisiert, während kanalikuläre Strukturen nicht markiert sind (Abb. 4A, B). Während der Inkubation wurde etwa 50% des Ceramids zu SM und GcCer metabolisiert, wobei etwa dreimal soviel SM wie GlcCer gebildet wurde (Abb. 4C). Andere Metabolite konnten nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Ceramid werden bei 18 °C weder C<sub>6</sub>NBD-SM noch -GlcCer in signifikanten Mengen zur Plasmamembran transportiert, sie werden also beide in der Zelle akkumuliert (Abb. 4D). Dies steht im Gegensatz zu LLC-Pk1-Zellen, einer Nierenzelllinie, in denen GlcCer auch bei 18 °C zur Plasmamembran transportiert wird (Raggers et al. 1999), und ist ein deutlicher Hinweis, daß der Membrantransport in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich erfolgt.

Werden die Zellen nach der Markierung des TGN für 30 min bei 37 °C in Gegenwart von BSA inkubiert, so sind etwa 50% aller kanalikulären Strukturen markiert (Abb. 5), die Sphingolipide werden also direkt zur apikalen Membran transportiert. Diese Markierung ist sensitiv gegenüber der Inkubation mit Natrium-Dithionit, die Sphingolipide werden also direkt zur

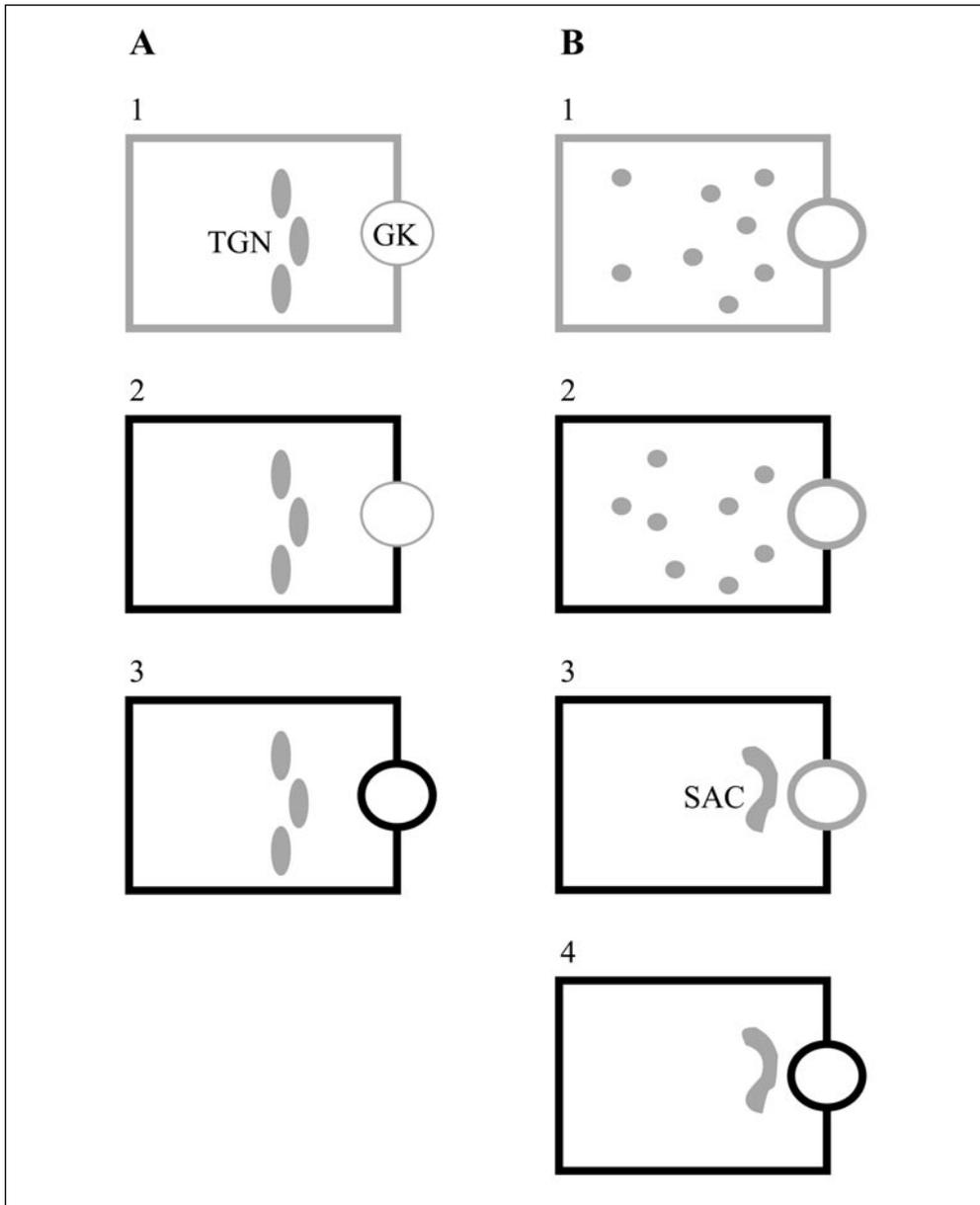


Abb. 3 Schematische Darstellung der Inkubationsschritte für die Akkumulation von  $C_6$ NBD-Sphingolipiden in TGN (A) und SAC (B). Strukturen, die  $C_6$ NBD-Sphingolipide enthalten, sind grau dargestellt. Abkürzungen: GK: Gallenkanal-artige Struktur, SAC: Subapikales Compartment, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk.

exoplasmatischen Schicht der kanalikulären Membran transportiert. Nach längerer Inkubation verringert sich die Zahl der markierten kanalikulären Strukturen wieder, da die Sphingolipide zur basolateralen Membran transportiert und dort durch BSA extrahiert werden. Obwohl die

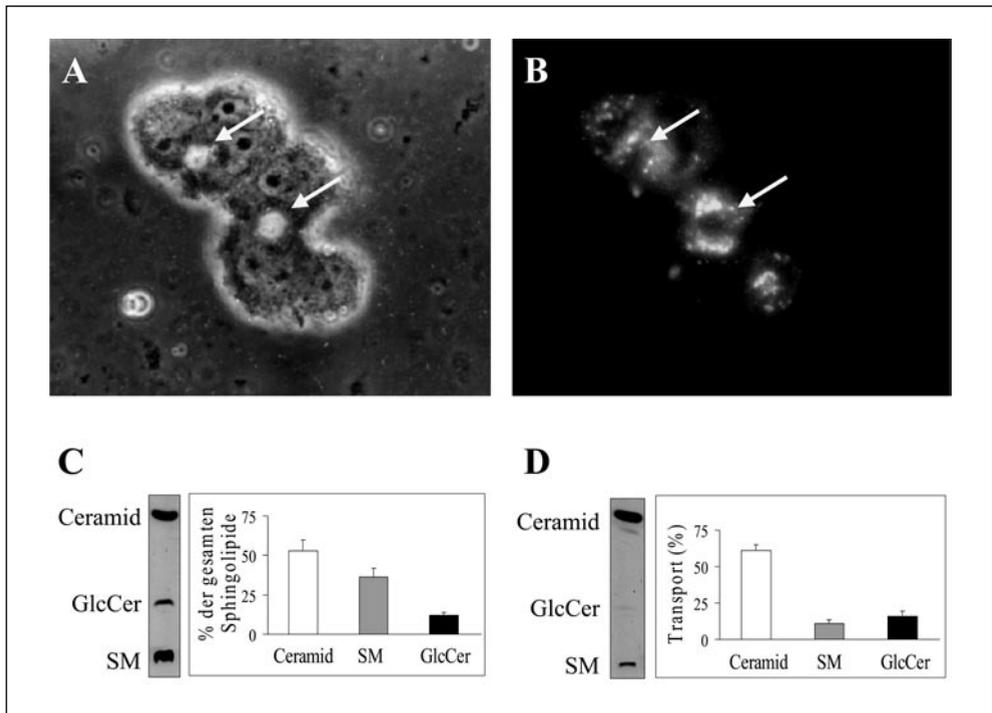


Abb. 4 Akkumulation neusynthetisierter Sphingolipide im TGN. Nach der Inkubation mit  $C_6$ NBD-Ceramid bei  $18^\circ\text{C}$  ist der perinukleäre Bereich im Fluoreszenzmikroskop deutlich markiert (B). Dagegen sind GKs (Pfeile), identifiziert im Phasenkontrast (A), nicht markiert. (C): Metabolismus von  $C_6$ NBD-Ceramid während der Inkubation, 100% entspricht der Summe aller Zell-assoziierten NBD-Lipide. (D): Transport von  $C_6$ NBD-Sphingolipiden zur basolateralen Membran bei  $18^\circ\text{C}$ . 100% entspricht der Gesamtmenge des jeweiligen Lipids in Zellen und Medium. Gezeigt sind eine repräsentative DSC-Analyse sowie Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Zellen etwa dreimal soviel  $C_6$ NBD-SM wie -GlcCer synthetisieren, verringert die Zugabe von PDMP, das gezielt die Synthese von GlcCer hemmt, aber keinen Einfluß auf Synthese und basolateralen Transport von  $C_6$ NBD-SM hat, die Anzahl positiver GKs um ca. 40% (Abb. 5D). Dies ist bislang der deutlichste Hinweis dafür, daß, in relativen Mengen, mehr GlcCer als SM zur apikalen Membran transportiert wird, also eine Sortierung der beiden Sphingolipide im TGN von HepG2-Zellen erfolgt.

Um spezifisch das SAC zu markieren, wurden die Zellen mit  $C_6$ NBD-SM und/oder -GlcCer für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert (Abb. 3B). Anschließend wurden die Sphingolipide in der basolateralen Membran durch BSA extrahiert und die intrazellulären Sphingolipide bei  $18^\circ\text{C}$  im SAC akkumuliert. Schließlich wurde die Markierung in der kanalikulären Membran durch Natrium-Dithionit ausgelöscht. Aus früheren Arbeiten (VAN IJZENDOORN et al. 1997, VAN IJZENDOORN und HOEKSTRA 1998) ist bekannt, daß bei der anschließenden Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$   $C_6$ NBD-GlcCer vom SAC zur kanalikulären Membran transportiert wird, so daß nach 30 min 80% der apikalen Strukturen markiert sind. Dagegen wird  $C_6$ NBD-SM überwiegend zur basolateralen Membran transportiert. Die beiden Sphingolipide werden also zu unterschiedlichen Zielmembranen transportiert, ein deutlicher Hinweis darauf, daß sie im SAC sortiert werden.

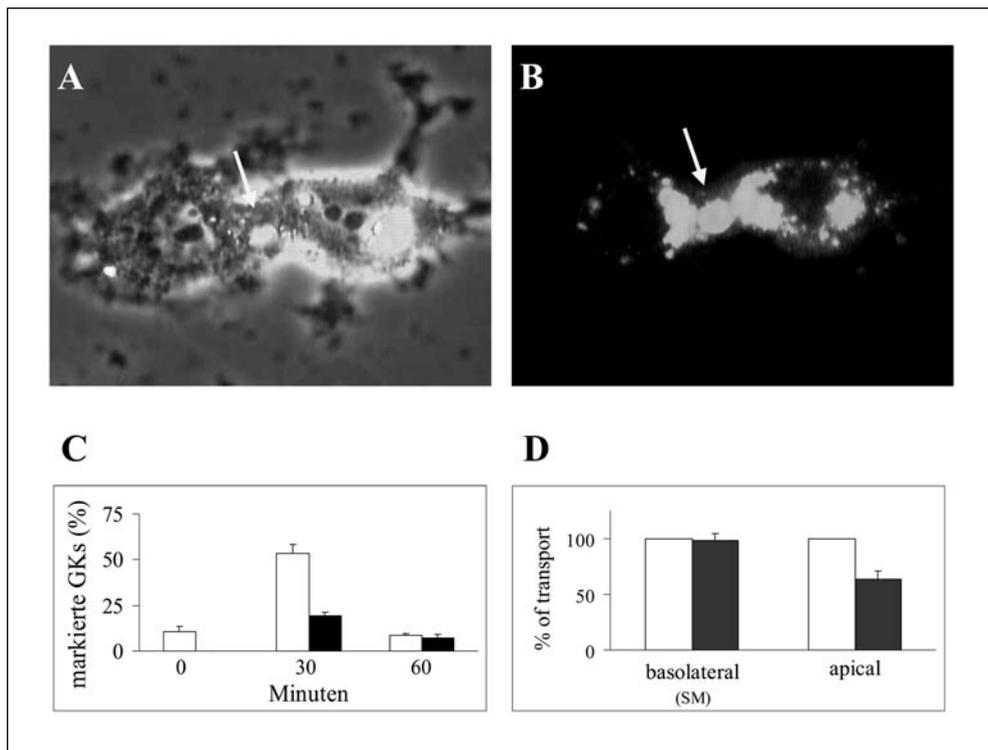


Abb. 5 Direkter Transport von neusynthetisierten C<sub>6</sub>NBD-Sphingolipiden zur kanalikulären Membran. Die Zellen wurden mit C<sub>6</sub>NBD-Ceramid inkubiert und bei 37 °C in Gegenwart von BSA inkubiert. GKs (Pfeile) wurden im Phasenkontrast identifiziert (A) und ihre Markierung im Fluoreszenzmikroskop analysiert (B). (C): Quantifizierung des apikalen Transports. Die Markierung in den GKs zeigte ein Maximum nach 30 min (weiße Balken) und war sensitiv gegenüber Natrium-Dithionit (schwarze Balken). (D): Effekt von 10 μM PDMP auf den basolateralen Transport von C<sub>6</sub>NBD-SM und die Anzahl markierter GKs. Die Werte in Kontrollzellen (weiße Balken) wurden gleich 100 gesetzt, und die Werte, die in PDMP-behandelten Zellen (schwarze Balken) gewonnen wurden, wurden damit korreliert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

### 3. Charakterisierung der Bildung Sphingolipid-haltiger Transportvesikel *in vitro*

Der intrazelluläre Membrantransport erfolgt beinahe ausschließlich über Transportvesikel, die sich vom Donororganell abschnüren und nach ihrem gerichteten Transport spezifisch mit der Akzeptormembran fusionieren. Um den polarisierten Transport, z. B. von GlcCer und SM, zur apikalen bzw. basolateralen Membran zu bewerkstelligen, ist es daher erforderlich, daß beide Sphingolipide vor der Abschnürung der Vesikel in der Membran des Donororganells voneinander getrennt werden und dann in distinkten Vesikeln freigesetzt und zur Akzeptormembran transportiert werden.

Um die Erfordernisse für die Sortierung sowie den Mechanismus der Vesikelbildung genauer zu charakterisieren, ist die direkte Analyse der beteiligten Membranen erforderlich. Die Hauptaufgabe des Projekts war es daher, ein *In-vitro*-System zu entwickeln, mit dem die Bildung Sphingolipid-haltiger Vesikel direkt analysiert werden kann. Zudem kann mit einem

derartigen *In-vitro*-System nicht nur die Bildung der Transportvesikel analysiert werden, die gebildeten Vesikel können isoliert und ihr Sphingolipidgehalt analysiert werden. Es können daher direkte Hinweise gewonnen werden, ob die Sphingolipide sortiert und in distinkte Vesikel verpackt worden sind. Da für den polarisierten Transport in Hepatozyten zwei potentielle Sortierungsstationen, TGN und SAC, existieren, wurde das *In-vitro*-System so ausgerichtet, daß eine vergleichende Analyse der Vesikelbildung an beiden Zellkompartimenten ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu beschränkten sich bisherige *In-vitro*-Systeme fast ausschließlich auf die Sortierung neusynthetisierter Proteine (WANDINGER-NESS et al. 1990, TOOZE und HUTTNER 1990, SIMON et al. 1996) und Lipide (KOBAYASHI et al. 1992, BABIA et al. 1994) im TGN.

Um die Freisetzung Sphingolipid-haltiger Transportvesikel von TGN und SAC zu analysieren, wurden die Zellen, wie oben beschrieben, entweder mit C<sub>6</sub>NBD-Ceramid oder mit einer Mischung von C<sub>6</sub>NBD-SM und -GlcCer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt und vorsichtig durch eine Nadel gepreßt, um sie so zu permeabilisieren, daß die intrazellulären Organellen weitgehend intakt bleiben, die Löcher in der Plasmamembran jedoch groß genug sind, um die gebildeten Vesikel aus der Zelle freizusetzen. Während des Permeabilisationsschritts wurden etwa 25 % der im SAC akkumulierten Sphingolipide aus den Zellen freigesetzt (Abb. 6A). Dagegen wurden nur etwa 15–20 % der TGN-assoziierten Sphingolipide freigesetzt (Abb. 6B), ein Hinweis, daß das SAC entweder fragiler ist oder zum Teil aus kleineren Strukturen besteht als das TGN.

Da in der intakten Zelle die Sphingolipide letztendlich in der exoplasmatischen Schicht der Plasmamembran lokalisiert sind, müssen sie sich zuvor in der lumenalen Membranschicht der Donororganellen und Vesikel befinden. Die permeabilisierten Zellen wurden daher für 30 min bei 4 °C mit BSA inkubiert, um Sphingolipide, die eventuell in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert sind, zu entfernen. Wie erwartet waren nur etwa 11 % des neusynthetisierten C<sub>6</sub>NBD-SM, aber 30 % des C<sub>6</sub>NBD-GlcCer in der TGN-Membran zugänglich für BSA (Abb. 6B). Dies entspricht ihrer Synthese in der lumenalen bzw. zytoplasmatischen Golgi-Membran (FUTERMAN et al. 1990, JECKEL et al. 1992). Allerdings muß GlcCer für die Synthese der übrigen Glycosphingolipide in die lumenale TGN-Membran transloziert werden (LANNERT et al. 1994), und dementsprechend war ein Großteil des neusynthetisierten C<sub>6</sub>NBD-GlcCer vor BSA geschützt. Nur etwa 13 % beider im SAC akkumulierten Sphingolipide waren zugänglich für BSA, sie sind also fast ausschließlich in der lumenalen Membran des SAC lokalisiert (Abb. 6A).

Schließlich wurden die Zellen in Gegenwart von ATP und exogen zugefügten zytosolischen Proteinen 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Da durch die Prozedur vermutlich nicht alle Zellen ausreichend permeabilisiert werden, wurde auch BSA zugesetzt, um Sphingolipide, die in intakten Zellen zur Plasmamembran transportiert wurden, zu extrahieren. Die gebildeten Transportvesikel wurden schließlich bei 100000 × g pelletiert. In diesem Pellet sollten sich daher ausschließlich Membran-gebundene und von BSA geschützte Sphingolipid-Derivate befinden, d. h., sie befinden sich im Lumen von Transportvesikeln, die vom Donororganell freigesetzt worden sind.

Da der vesikuläre Transport in den Zellen bei niedrigen Temperaturen blockiert ist und abhängig von ATP und zytosolischen Proteinen erfolgt, ist es für die Beurteilung jedes *In-vitro*-Assays essentiell, zunächst diese Vorgaben zu testen. In der Tat ist für die Bildung von Transportvesikeln sowohl vom SAC als auch vom TGN eine Temperatur von 37 °C notwendig (Abb. 7A, B). Werden ATP oder zytosolische Proteine weggelassen, so erfolgt gleichfalls keine Vesikelbildung. Nur bei Zugabe von ATP und Zytosol erfolgt eine signifikante Freisetzung von

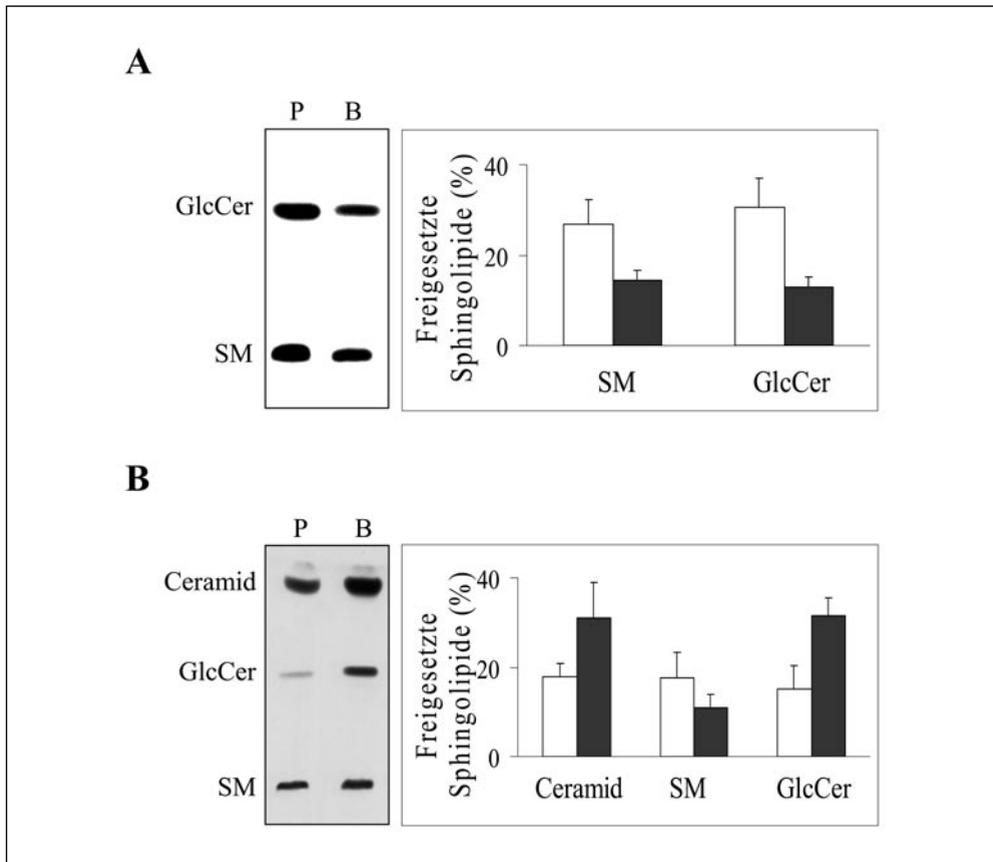


Abb. 6 Freisetzung von  $C_6$ NBD-Sphingolipiden während Permeabilisierung und BSA-Behandlung der Zellen. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus  $C_6$ NBD-SM und -GlcCer (A) bzw.  $C_6$ NBD-Ceramid (B) inkubiert, um die Lipide in SAC bzw. TGN zu akkumulieren. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und mit BSA inkubiert. Lipide, die während der Permeabilisierung (P, weiße Balken) bzw. der BSA-Inkubation (B, schwarze Balken) freigesetzt wurden, wurden mittels DSC analysiert. Gezeigt sind eine repräsentative DSC-Analyse sowie Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Transportvesikeln, die Sphingolipide enthalten. Zusätzlich muß ausgeschlossen werden, daß es während der Inkubation bei 37 °C zur unspezifischen Fragmentierung des Donororgansells kommt, da dies zur Freisetzung kleiner Membranbruchstücke führen würde, die fälschlicherweise als Transportvesikel identifiziert werden könnten. Der Befund, daß trotz der vermutlich größeren Fragilität des SAC seine lumenale Membran während der Permeabilisierung nicht in signifikantem Maß für BSA zugänglich wird, ist ein indirekter Hinweis, daß es nicht zur unspezifischen Fragmentierung des SAC kommt. Allerdings ist bisher kein residentes Markerprotein für das SAC bekannt, und daher konnte lediglich die Fragmentierung des Golgi, durch Analyse der Freisetzung von Galactosyltransferase, direkt untersucht werden. Die spezifische Aktivität von Galactosyltransferase in den Membranen, die temperaturabhängig von den Zellen freigesetzt wurden, war 75 % geringer als für die in den Zellen zurückgehaltener Membranen (Daten

nicht gezeigt). Dies zeigt, daß es nicht zu einer signifikanten Fragmentierung und Freisetzung der Golgimembranen kommt. Die Grundvoraussetzungen für die weitere Charakterisierung der Vesikelbildung sind daher gegeben.

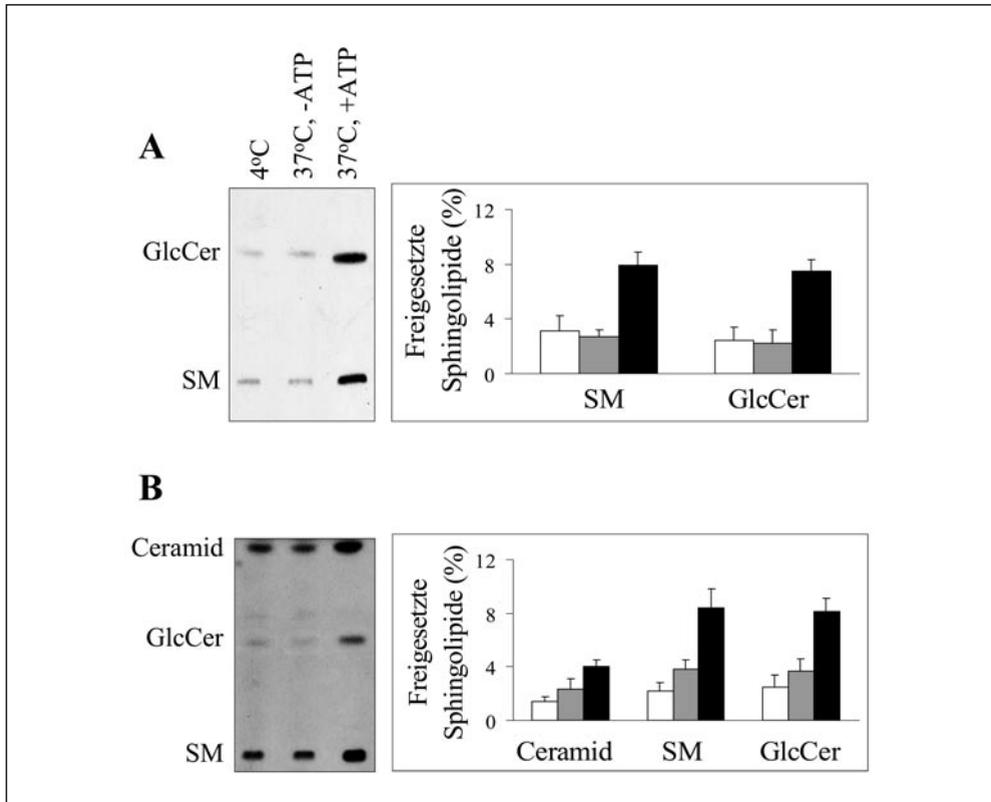


Abb. 7 Die Vesikelbildung an SAC und TGN ist temperatur- und energieabhängig. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus  $C_6$ NBD-SM und -GlcCer (A) bzw.  $C_6$ NBD-Ceramid (B) inkubiert, um die Lipide in SAC bzw. TGN zu akkumulieren. Nach Permeabilisierung und BSA-Inkubation wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C (weiße Balken) oder bei 37 °C ohne (graue Balken) bzw. mit (schwarze Balken) exogen zugefügtem ATP und Zytosol inkubiert. Die Zellen wurden entfernt und die Vesikelsuspension 2 h bei  $100000 \times g$  zentrifugiert. Die Lipide wurden extrahiert und mittels DSC analysiert. 100% entspricht der Gesamtmenge des jeweiligen Lipids in der Zelle nach der Behandlung mit BSA. Gezeigt sind eine repräsentative DSC-Analyse des vesikulären Pellets sowie Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Zunächst testeten wir, inwieweit mit dem *In-vitro*-Assay Aussagen über die Regulation der Vesikelbildung gemacht werden können. Aus früheren Experimenten war bekannt, daß der Calmodulin-Antagonist Trifluoperazin (TFP) den Export von SM aus dem SAC blockiert, aber keinen Einfluß auf den Transport von GlcCer vom SAC zur kanalikulären Membran hat (van IJzendoorn und Hoekstra 1999b). Aus dem *In-vitro*-Assay wird deutlich, daß Zugabe von TFP die Bildung von  $C_6$ NBD-SM-haltigen Vesikeln am SAC hemmt, während die Bildung von GlcCer-haltigen Vesikeln nicht beeinflusst ist (Abb. 8). Ein deutlicher Hinweis, daß sich

beide Sphingolipide in unterschiedlichen Substrukturen des SAC befinden. Im Gegensatz zur inhibierenden Wirkung von TFP auf die Freisetzung von SM vom SAC, stimulierte TFP die Bildung SM-haltiger Vesikel vom TGN. Es ist unwahrscheinlich, daß dies auf eine unspezifische Fragmentierung des TGN zurückzuführen ist, da TFP keinen Einfluß auf die Freisetzung von GlcCer hatte und höhere TFP-Konzentrationen die Freisetzung von SM leicht inhibierten. Offenbar wird daher die Vesikelbildung an SAC und TGN unterschiedlich reguliert.

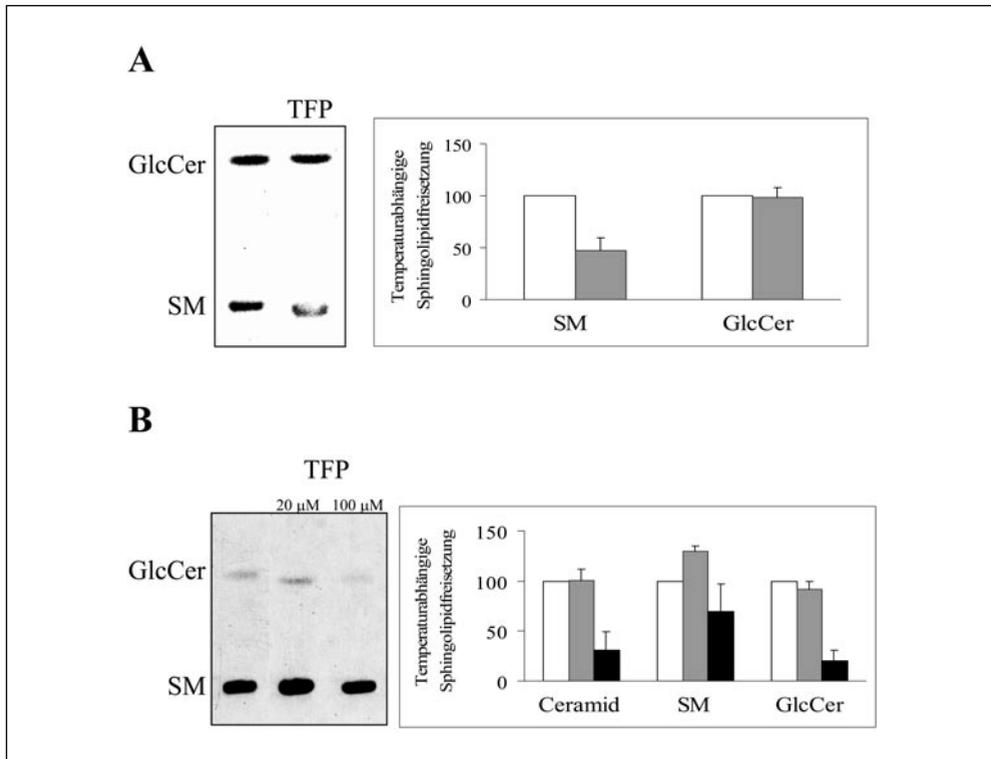


Abb. 8 Die Freisetzung von  $C_6$ NBD-SM von SAC und TGN wird durch TFP unterschiedlich beeinflusst. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus  $C_6$ NBD-SM und -GlcCer (A) bzw.  $C_6$ NBD-Ceramid (B) inkubiert, um die Lipide in SAC bzw. TGN zu akkumulieren. Nach Permeabilisierung und BSA-Inkubation wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C bzw. 37 °C in Gegenwart von exogen zugefügtem ATP und Zytosol ohne (weiße Balken) oder mit 20 μM TFP (graue Balken) inkubiert. In einigen Fällen wurden die Zellen nach Markierung mit  $C_6$ NBD-Ceramid mit 100 μM TFP inkubiert (schwarze Balken in B). Die Zellen wurden entfernt und die Vesikelsuspension 2 h bei 100000 × g zentrifugiert. Die Lipide wurden extrahiert und mittels DSC analysiert. Um die temperaturabhängige Sphingolipidfreisetzung zu berechnen, wurden die 4 °C-Werte von den 37 °C-Werten subtrahiert und die in Kontrollzellen erhaltenen Werte gleich 100 gesetzt. Gezeigt sind jeweils eine repräsentative DSC-Analyse der vesikulären Freisetzung bei 37 °C sowie Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Im Folgenden versuchten wir die freigesetzten Vesikel genauer zu charakterisieren. Aus früheren Arbeiten (z. B. Babia et al. 1994) ist bekannt, daß sich unterschiedliche Vesikelpopulationen häufig in ihrer Dichte unterscheiden. Für eine erste Analyse bietet sich daher die Auftrennung der isolierten Vesikel durch Dichtegradientenzentrifugation an. Um zu analysieren, ob  $C_6$ NBD-SM

und -GlcCer in unterschiedlichen Vesikeln freigesetzt werden, wurde die Vesikelsuspension aus dem *In-vitro*-Assay daher direkt auf einen Saccharosegradienten (20–50 % Saccharose) gelegt und 16 h zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradientenfraktionen mit Natrium-Dithionit behandelt, um sämtliche C<sub>6</sub>NBD-Fluoreszenz, die sich nicht in der lumenalen Membranschicht der Vesikel befindet, auszulöschen, und die Lipide wurden extrahiert. C<sub>6</sub>NBD-SM-haltige Vesikel, die aus dem SAC freigesetzt wurden, waren in Fraktionen mit einer Saccharosekonzentration von etwa 30 % angereichert, während C<sub>6</sub>NBD-GlcCer fast ausschließlich bei einer Saccharosekonzentration von etwa 42 % nachzuweisen war (Abb. 9A). Auch C<sub>6</sub>NBD-SM ist in diesen Fraktionen nachzuweisen, aber in deutlich geringeren Mengen als GlcCer. Dies zeigt klar, daß SM und GlcCer vom SAC in unterschiedlichen Vesikeln freigesetzt werden, sie müssen also in der SAC-Membran lateral voneinander getrennt worden sein. Im Gegensatz dazu waren beide Sphingolipide, nach ihrer Freisetzung vom TGN, in Fraktionen mit einer Saccharosekonzentration von etwa 30 % angereichert (Abb. 9B). Ein direkter Nachweis der Trennung von neu synthetisiertem SM und GlcCer konnte daher mit dieser Methode nicht erbracht werden. Dies steht im Gegensatz zu früheren Arbeiten in MDCK- und HT29-Zellen, in denen die neu synthetisierten C<sub>6</sub>NBD-SM und -GlcCer in distinkten Transportvesikeln aus dem Golgi freigesetzt werden (Kobayashi et al. 1992, Babia et al. 1994).

Abschließend wurden die distinkten Transportvesikel, die vom SAC freigesetzt werden, genauer analysiert. Ihre gezielte morphologische Charakterisierung im Elektronenmikroskop wird durch den Gehalt an C<sub>6</sub>NBD-Sphingolipiden ermöglicht, da Diaminobenzidin (DAB) bei gezielter Anregung der NBD-Gruppe in ein osmiophiles, elektronendichtes Präzipitat konvertiert wird (PAGANO et al. 1989). Dazu wurden die entsprechenden Gradientenfraktionen gesammelt und pelletiert, nachdem ihre Saccharosekonzentration auf 10 % eingestellt worden war, um mögliche Veränderungen aufgrund osmotischer Unterschiede zu vermeiden. Die Pellets wurden 30 min in Gegenwart von DAB bei einer Wellenlänge von 460 nm belichtet, mit OsO<sub>4</sub> inkubiert und weiter für die Elektronenmikroskopie präpariert, jedoch nicht zusätzlich kontrastiert. In unbelichteten Kontrollen konnten keine markierten Vesikel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach Belichtung der Fraktionen, in denen C<sub>6</sub>NBD-SM angereichert ist, konnte eine Vielzahl von sphärischen Vesikeln unterschieden werden. Insbesondere kleine Vesikel mit einem Durchmesser von 50–60 nm sind DAB-positiv und vermutlich die Vesikel die C<sub>6</sub>NBD-SM enthalten (Abb. 10A). Diese Vesikel sind auch in den Fraktionen von etwa 42 % Saccharose nachzuweisen, sind dort allerdings wesentlich seltener (Abb. 10B). Im Gegensatz dazu finden sich hier vor allem größere Vesikel von etwa 100 nm Durchmesser, die eine kelchartige Form aufweisen, und vermutlich vor allem C<sub>6</sub>NBD-GlcCer enthalten. In welchen Vesikeln sich das C<sub>6</sub>NBD-SM befindet, das in diesen Fraktionen nachzuweisen ist, ist bisher noch nicht geklärt. Insgesamt entsprechen die Resultate früheren Daten zum Transport aus dem gemeinsamen Endosom in MDCK-Zellen, von dem aus der Transferrin-Rezeptor in kleinen Vesikeln zur basolateralen Membran transportiert wird, während der polymere Immunoglobulin-Rezeptor in größeren, kelchförmigen Vesikeln zur apikalen Membran transportiert wird (GIBSON et al. 1998).

Insgesamt konnten wir in diesem Projekt ein *In-vitro*-System entwickeln, mit dem die Freisetzung Sphingolipid-haltiger Transportvesikel von TGN und SAC zuverlässig analysiert werden kann. Mit Hilfe dieses Systems konnten wir zeigen, daß die Vesikelbildung an SAC und TGN unterschiedlich reguliert wird und daß verschiedene Sphingolipid-Derivate in der lumenalen Membranschicht des SAC voneinander sortiert und in distinkte Transportvesikel verpackt werden. Dagegen konnte eine Sortierung neu synthetisierter Sphingolipide im TGN

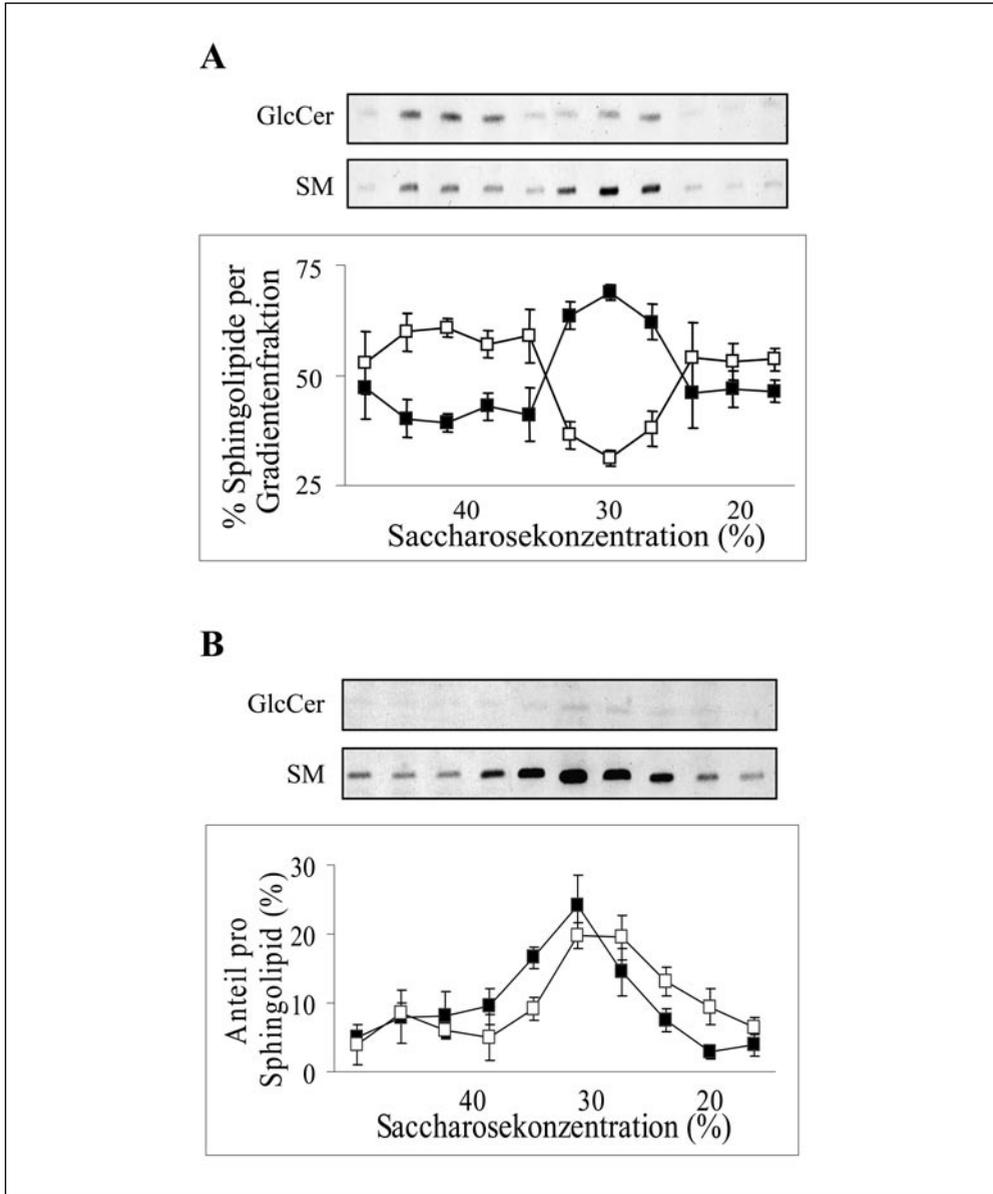


Abb. 9 Distinkte C<sub>6</sub>NBD-SM bzw. -GlcCer enthaltende Vesikel werden vom SAC, aber nicht vom TGN freigesetzt. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus C<sub>6</sub>NBD-SM und -GlcCer (A) bzw. C<sub>6</sub>NBD-Ceramid (B) inkubiert, um die Lipide in SAC bzw. TGN zu akkumulieren. Nach Permeabilisierung und BSA-Inkubation wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit exogen zugefügtem ATP und Zytosol inkubiert. Die Zellen wurden entfernt und der vesikuläre Überstand direkt auf einen Saccharosegradienten (20–50%, w/w) gelegt. Die Gradienten wurden 16 h bei 100000 × g zentrifugiert und fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit Natriumdithionit behandelt, die Lipide extrahiert und mittels DSC analysiert. In (A) ist der relative Anteil von C<sub>6</sub>NBD-SM (schwarze Quadrate) bzw. C<sub>6</sub>NBD-GlcCer (weiße Quadrate) in der jeweiligen Gradientenfraction dargestellt, um die Anreicherung des jeweiligen Lipids darzustellen. In (B) ist die Verteilung beider Sphingolipide über den gesamten Gradienten gezeigt. Gezeigt sind jeweils eine repräsentative DSC-Analyse der Gradienten sowie Mittelwerte und Extremwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

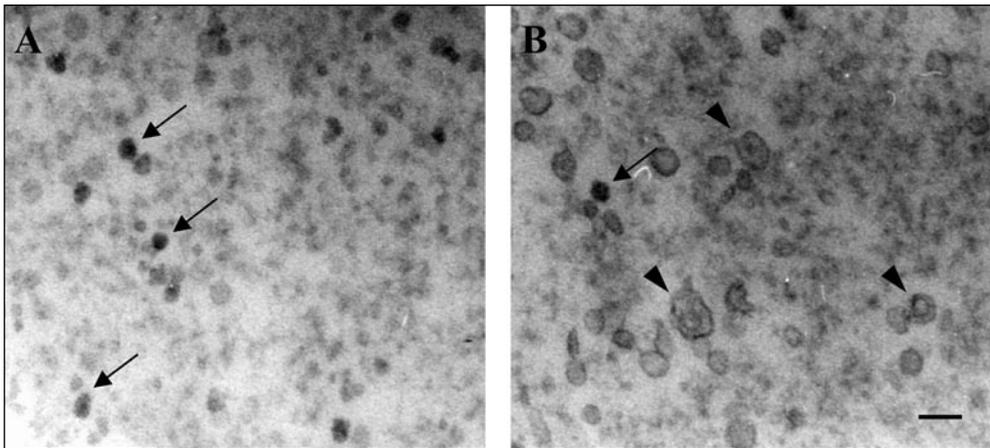


Abb. 10 Vom SAC freigesetzte,  $C_6$ NBD-enhaltende Vesikel sind morphologisch unterschiedlich. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus  $C_6$ NBD-SM und -GlcCer inkubiert, permeabilisiert und für 30 min bei 37 °C in Gegenwart von exogenem ATP und Zytosol inkubiert. Nach Saccharosegradientenzentrifugation der Vesikel wurden die Fraktionen mit 30–33% Saccharose (A) bzw. 40–44% Saccharose (B) vereinigt, die Saccharosekonzentration wurde auf 10% eingestellt, und die Vesikel wurden pelletiert. Die Pellets wurden 30 min mit 0,15% DAB bei einer Wellenlänge von 460 nm inkubiert, mit  $OsO_4$  inkubiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert. Pfeile (in A und B) zeigen kleine sphärische Vesikel, während kelchförmige Vesikel (in B) durch Pfeilspitzen bezeichnet sind. Balken: 100 nm.

bislang noch nicht direkt nachgewiesen werden. Allerdings erfolgt in Hepatozyten der Transport der meisten apikalen Proteine über die basolaterale Membran. Das endosomale Membransystem ist daher wesentlich stärker an der Ausbildung der polarisierten Zellstruktur beteiligt als in vielen anderen Zellen, und die Resultate sind daher im Einklang mit der herausragenden Rolle des SAC im polarisierten Transport von Hepatozyten.

### Dank

Das Projekt wurde unter Leitung von Professor Dick HOEKSTRA an der Rijksuniversiteit Groningen durchgeführt und stützte sich auf frühere Arbeiten insbesondere von Jan Willem KOK, Mirjam ZEGERS und Sven VAN IJENDOORN. Die  $C_6$ NBD-modifizierte Sphingolipide wurden durch Karin KLAPPE synthetisiert, und Ruby KALICHARAN war bei der Präparation für die Elektronenmikroskopie behilflich.

### Literatur

- ALFALAH, M., JACOB, R., and NAIM, H. Y.: Intestinal dipeptidyl peptidase IV is efficiently sorted to the apical membrane through the concerted action of N- and O-glycans as well as association with lipid microdomains. *J. Biol. Chem.* 277, 10683–10690 (2002)
- AÏT-SLIMANE, T., and HOEKSTRA, D.: Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol. Biol. Cell* 14, 611–624 (2003)
- BABIA, T., KOK, J. W., VAN DER HAAR, M., KALICHARAN, R., and HOEKSTRA, D.: Transport of biosynthetic sphingolipids from Golgi to plasma membrane in HT29 cells: involvement of different carrier vesicle populations. *Eur. J. Cell Biol.* 63, 172–181 (1994)
- BARTLES, J. R., and HUBBARD, A. L.: Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol.* 191, 825–841 (1990)

- BASTAKI, M., BRAITERMAN, L. T., JOHNS, D. C., CHEN, Y. H., and HUBBARD, A. L.: Absence of direct delivery for single transmembrane apical proteins or their »secretory« forms in polarized hepatic cells. *Mol. Biol. Cell* *13*, 225–237 (2002)
- BENTING, J. H., RIETVELD, A. G., and SIMONS, K.: N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* *146*, 313–320 (1999)
- FUTERMAN, A. H., STIEGER, B., HUBBARD, A. L., and PAGANO, R. E.: Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* *265*, 8650–8657 (1990)
- GIBSON, A., FUTTER, C. E., MAXWELL, S., ALLCHIN, E. H., SHIPMAN, M., KRAEHEBUHL, J. P., DOMINGO, D., ODORIZZI, G., TROWBRIDGE, I. S., and HOPKINS, C. R.: Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic pathway of polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* *143*, 81–94 (1998)
- HEILKER, R., SPIESS, M., and CROTTET, P.: Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* *21*, 558–567 (1999)
- IKONEN, E., and SIMONS, K.: Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *9*, 503–509 (1998)
- JECKEL, D., KARRENBauer, A., BURGER, K. N., VAN MEER, G., and WIELAND, F.: Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J. Cell Biol.* *117*, 259–267 (1992)
- KIPP, H., and ARIAS, I. M.: Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J. Biol. Chem.* *275*, 15917–15925 (2000)
- KNIGHT, A., HUGHSON, E., HOPKINS, C. R., and CUTLER, D. F.: Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol. Biol. Cell* *6*, 597–610 (1995)
- KOBAYASHI, T., PIMPLIKAR, S. W., PARTON, R. G., BHAKDI, S., and SIMONS, K.: Sphingolipid transport from the trans-Golgi network to the apical surface in permeabilized MDCK cells. *FEBS Lett.* *300*, 227–231 (1992)
- LANNERT, H., BÜNNING, C., JECKEL, D., and WIELAND, F. T.: Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* *342*, 91–96 (1994)
- LIPARDI, C., NITSCH, L., and ZURZOLO, C.: Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in Fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting. *Mol. Biol. Cell* *11*, 531–542 (2000)
- LIPSKY, N. G., and PAGANO, R. E.: Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *80*, 2608–2612 (1983)
- LIPSKY, N. G., and PAGANO, R. E.: A vital stain for the Golgi apparatus. *Science* *228*, 745–747 (1985)
- MAIER, O., and HOEKSTRA, D.: Trans-Golgi network and subapical compartment of HepG2 cells display different properties in sorting and exiting of sphingolipids. *J. Biol. Chem.* *278*, 164–173 (2003)
- MAIER, O., AIT-SLIMANE, T., and HOEKSTRA, D.: Membrane domains and polarized trafficking of sphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol.* *12*, 149–161 (2001)
- MAIER, O., OBERLE, V., and HOEKSTRA, D.: Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chem. Phys. Lipids* *116*, 3–18 (2002)
- MELLMAN, I.: Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *12*, 575–625 (1996)
- MOSTOV, K. E.: Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 63–84 (1994)
- MOSTOV, K., VERGES, M., and ALTSCHULER, Y.: Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 483–490 (2000)
- PAGANO, R. E., SEPANSKI, M. A., and MARTIN, O. C.: Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: interaction with endogenous lipids provides a trans-Golgi marker for both light and electron microscopy. *J. Cell Biol.* *109*, 2067–2079 (1989)
- RAGGERS, R. J., VAN HELVOORT, A., EVERS, R., and VAN MEER, G.: The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. *J. Cell Sci.* *112*, 415–422 (1999)
- ROELOFSEN, H., WOLTERS, H., VAN LUYN, M. J. A., MIURA, N., KUIPERS, F., and VONK, R. J.: Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* *119*, 782–793 (2000)
- ROTHMAN, J. E.: The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci.* *5*, 185–194 (1996)
- SIMON, J. P., IVANOV, I. E., SHOPSIN, B., HERSH, D., ADESNIK, M., and SABATINI, D. D.: The *in vitro* generation of post-Golgi vesicles carrying viral envelope glycoproteins requires an ARF-like GTP-binding protein and a protein kinase C associated with the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* *271*, 16952–16961 (1996)
- SIMONS, K., and IKONEN, E.: Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569–572 (1997)
- SUGIMOTO, H., SUGAHARA, M., FÖLSCH, H., KOIDE, Y., NAKATSU, F., TANAKA, N., NISHIMURA, T., FURUKAWA, M., MULLINS, C., NAKAMURA, N., MELLMAN, I., and OHNO, H.: Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit  $\mu$ 1B in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2374–2382 (2002)

*Charakterisierung des vesikulären Transports von Sphingolipiden in polarisierten HepG2-Zellen*

- TOOZE, S. A., and HUTTNER, W. B.: Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways. *Cell* *60*, 837–847 (1990)
- TRAUB, L. M., and KORNFELD, S.: The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 527–533 (1997)
- VAN IZENDOORN, S. C. D., and HOEKSTRA, D.: (Glyco)sphingolipids are sorted in sub-apical compartments in HepG2 cells: a role for non-Golgi-related intracellular sites in the polarized distribution of (glyco)sphingolipids. *J. Cell Biol.* *142*, 683–696 (1998)
- VAN IZENDOORN, S. C. D., and HOEKSTRA, D.: The subapical compartment: a novel sorting centre? *Trends. Cell Biol.* *9*, 144–149 (1999a)
- VAN IZENDOORN, S. C. D., and HOEKSTRA, D.: Polarized sphingolipid transport from the subapical compartment: Evidence for distinct sphingolipid domains. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3449–3461 (1999b)
- VAN IZENDOORN, S. C. D., and HOEKSTRA, D.: Polarized sphingolipid transport from the subapical compartment changes during cell polarity development. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1093–1101 (2000)
- VAN IZENDOORN, S. C. D., ZEGERS, M. M. P., KOK, J. W., and HOEKSTRA, D.: Segregation of glucosylceramide and sphingomyelin occurs in the apical to basolateral transcytotic route in HepG2 cells. *J. Cell Biol.* *137*, 347–357 (1997)
- VAN MEER, G., STELZER, E. H., WIJNAENDTS VAN RESANDT, R. W., and SIMONS, K.: Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J. Cell Biol.* *105*, 1623–1635 (1987)
- VAN 'T HOF, W., and VAN MEER, G.: Generation of lipid polarity in intestinal epithelial (Caco-2) cells: sphingolipid synthesis in the Golgi complex and sorting before vesicular traffic to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* *111*, 977–986 (1990)
- WANDINGER-NESS, A., BENNETT, M. K., ANTONY, C., and SIMONS, K.: Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J. Cell Biol.* *111*, 987–1000 (1990)
- ZEGERS, M. M. P., and HOEKSTRA, D.: Sphingolipid transport to the apical plasma membrane domain in human hepatoma cells is controlled by PKC and PKA activity: a correlation with cell polarity in HepG2 cells. *J. Cell Biol.* *138*, 307–321 (1997)

Dr. Olaf Maier  
Abteilung für Membranzellbiologie  
Reichsuniversität Groningen  
A. Deusinglaan 1  
9713 AV Groningen  
Niederlande  
Tel.: +31 50 3632085  
Fax: +31 50 3632728  
E-Mail: o.maier@med.rug.nl

## **Festliche Übergabe des Präsidentenamtes von Benno Parthier an Volker ter Meulen**

am 13. Februar 2003 im Freylinghausen-Saal der Franckeschen Stiftungen  
zu Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 89, Nr. 335  
Herausgegeben vom Präsidium der Akademie  
(2003, 54 Seiten, 17 Abbildungen, 22,80 Euro, ISBN 3-8047-2039-0)

Die Übergabe des Präsidentenamtes in der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina lieferte die Gelegenheit für eine erneute Standortbestimmung der Akademie, nachdem die Leopoldina erst 2002 ihr 350. Gründungsjubiläum begangen hatte. Nach der Begrüßung durch Leopoldina-Vizepräsident Ernst-Ludwig Winnacker (Bonn/München) beschäftigte sich der scheidende Präsident Benno Parthier (Halle/Saale) mit den erforderlichen Weichenstellungen und Entwicklungen der Wirkungsfelder der Akademie in den zurückliegenden Jahren seiner Präsidentschaft. In seiner Antrittsrede umriß der neue Präsident Volker ter Meulen (Würzburg) die weiteren Aufgaben der Leopoldina und ging dabei auch auf die heißdiskutierte Frage einer nationalen Akademie für Deutschland ein. In seinem Festvortrag sprach Wolfgang Frühwald (München) zum Thema »Eine liebenswerte Wissenschaft und ein glücklicher Sisyphos. Zum Leben und zur Arbeit einer nationalen Akademie«.

*In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*

# **Biochemie und Biophysik**

---

Dr. rer. nat. Berit JUNGnickel

Geboren 1967 in Jena. 1987 bis 1992 Biochemiestudium an der Humboldt-Universität Berlin. Anschließend Arbeiten im Labor von Prof. Dr. Tom A. RAPOPORT (Max Delbrück Centrum Berlin und Harvard-Universität Boston) zum Proteintransport durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums. Promotion 1997 zum Dr. rer. nat. an der Humboldt-Universität Berlin. 1997 bis 2001 Arbeiten bei Prof. Dr. Klaus RAJEWSKY und PD Dr. Ralf KÜPPERS (Universität Köln) zur Rolle der Keimzentrumsreaktion bei der Entstehung von humanen B-Zelllymphomen. Seit 2001 Nachwuchswissenschaftlerin am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit München.

## Die Rolle der Keimzentrumsreaktion in der Entstehung humaner B-Zell-Lymphome

Berit JUNGnickel (München)

Mit 2 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

Die effiziente Bekämpfung von Krankheitserregern durch das Immunsystem benötigt die Aktion und Interaktion von spezialisierten Immunzellen. B-Zellen haben die Aufgabe, eine Vielzahl von Antikörpern zu produzieren, deren Vielfalt der Variabilität der Krankheitserreger optimal angepaßt sein muß. Um diese Aufgabe zu bewältigen, verfügen B-Zellen über die Fähigkeit, durch einzigartige genetische Prozesse die für die Antikörper kodierenden Gene zu verändern. Zwei dieser Prozesse sind die in Keimzentren stattfindende Somatische Hypermutation und die Klassenwechselrekombination, deren molekulare Mechanismen bisher nur wenig verstanden sind. Beide Prozesse sind für eine effiziente Immunantwort essentiell. Sie haben aber auch das Potential, genetische Fehler in die DNA der Zellen einzuführen, die letztendlich zur Krebsentstehung führen können. Bezeichnend für dieses Potential ist der Befund, daß die meisten B-Zell-Lymphome von B-Zellen abstammen, die eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben.

Um die Rolle der Keimzentrumsreaktion bei der Entstehung von B-Zell-Lymphomen zu verstehen, untersuchen wir (a) spezifische genetische Defekte in bestimmten Lymphomen; (b) die Entstehung von Defekten in bestimmten Genen während der Keimzentrumsreaktion; (c) den Mechanismus der Somatischen Hypermutation; sowie (d) die Regulation von Teilprozessen der Hypermutation/Klassenwechselrekombination während der normalen Entwicklung von B-Zellen und deren Deregulation in Lymphomen. Der Beitrag gibt eine Übersicht über diese Herangehensweisen und zeigt die Ergebnisse einzelner Projekte dieses Problemkreises.

### *Abstract*

The efficient removal of pathogens by the immune system requires the action and interaction of specialized immune cells. B cells are producing a variety of antibodies, and their variability has to be adjusted to the variability of possible pathogens. To comply with this task, B cells are able to change the structure of their antibody genes by unique genetic processes. Two of these important processes are somatic hypermutation and class switch recombination in germinal centers, but their molecular mechanisms are only poorly understood. Both processes are essential for an efficient immune response. On the other hand, they have the potential to introduce aberrations into the DNA of the cells, which may eventually lead to the development of cancer. Evidence of this oncogenic potential is the finding that most B cell lymphomas are derived from B cells that have undergone a germinal center reaction.

In order to study the role of the germinal center reaction in the pathogenesis of B cell lymphomas, we are investigating (i) specific defects in defined lymphoma entities, (ii) the generation of defects in particular genes during the germinal center reaction, (iii) the mechanism of somatic hypermutation and (iv) the regulation of individual steps of hypermutation and class switch recombination during the normal development of B cells and their deregulation in lymphomas. This report is giving an overview of these approaches and shows the results of individual projects of this research area.

### **1. Einleitung**

Der Beitrag berichtet über meine Tätigkeit als Postdoktorandin in den Labors von Prof. Klaus RAJEWSKY und Dr. Ralf KÜPPERS in Köln, die vom Postdoktoranden-Förderprogramm der Leopoldina unterstützt wurde. Der Schwerpunkt meiner Arbeiten in dieser Zeit lag im Grenzgebiet

zwischen Immunologie, Genetik und Krebsforschung, und zwar in der Untersuchung der Rolle der Keimzentrumsreaktion bei der Entstehung humaner B-Zell-Lymphome.

Zur Einführung in dieses Themengebiet möchte ich daran erinnern, daß die bemerkenswerteste Eigenschaft des menschlichen Immunsystems darin besteht, eine Vielzahl von Krankheitserregern bzw. Pathogenen spezifisch zu erkennen und diese so effizient zu bekämpfen, daß die Infektion zumeist rasch überwunden werden kann. Diese Funktion wird im wesentlichen von drei Zelltypen vermittelt. Antigenpräsentierende Zellen können Pathogene oder Antigene aufnehmen und anderen Zellen des Immunsystems präsentieren, d. h. sie sozusagen für diese Zellen »sichtbar« machen. T-Zellen können infizierte Zellen spezifisch vernichten oder aber andere Immunzellen in ihrer Funktion unterstützen. B-Zellen haben die Aufgabe, Antikörper zu produzieren, die an bestimmte Krankheitserreger spezifisch binden und damit zu deren Vernichtung beitragen können.

Die von B-Zellen produzierten Antikörper haben eine Reihe interessanter und einzigartiger Eigenschaften. Sie haben eine typische Y-Struktur und bestehen aus zwei verschiedenen funktionellen Domänen. Die sogenannte variable Region, deren genaue Struktur für jeden Antikörper spezifisch ist, vermittelt die Bindung an das Antigen, d. h. eine bestimmte Struktur z. B. eines Krankheitserregers. Die sogenannte konstante Region, die sich zwischen verschiedenen Antikörpern weniger unterscheidet, ist für die Effektorfunktionen des Antikörpers zuständig – so z. B. für die Rekrutierung anderer Immunzellen zur Bekämpfung des Pathogens (TONEGAWA 1983).

Der bemerkenswerte Fakt, daß innerhalb desselben Moleküls sowohl eine Domäne mit variabler Struktur als auch eine Domäne mit konstanter Struktur vereinigt sind, beruht auf genetischen Prozessen, die während der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark stattfinden. Die für die Antikörper kodierenden Gene haben eine modulare Struktur, wobei es eine Vielzahl dieser sogenannten V-, D- und J-Module gibt. In einem Prozeß, der V(D)J-Rekombination genannt wird, werden durch Genumlagerungen jeweils ein V-, ein D- und ein J-Modul zu einer funktionellen variablen Region zusammengefaßt. Durch Kombination verschiedener Module ergibt sich eine sehr große Vielzahl an möglichen Strukturen der variablen Region des Antikörpers. Die zugrundeliegenden genetischen Prozesse sind so reguliert, daß jede B-Zelle, die das Knochenmark verläßt, Antikörper mit einer einzigen für sie charakteristischen Bindungsspezifität produziert, die das weitere Schicksal dieser B-Zelle bestimmt.

Allerdings reicht die hiermit erreichte Vielfalt, Reaktivität und Funktionalität der Antikörper für eine effiziente Immunantwort nicht aus. Bei einer akuten Immunreaktion finden deshalb zwei weitere genetische Prozesse statt, die die Diversität der Antikörper noch weiter erhöhen und vor allem deren Affinität und Effektorfunktion optimal auf die jeweils zu bekämpfende Infektion anpassen (RAJEWSKY 1996).

In einem dieser Prozesse, der Somatischen Hypermutation, werden Mutationen spezifisch in die variable Region der Antikörperegene eingeführt. Dabei liegt die Mutationsrate in diesem Bereich um einen Faktor von einer Million über der spontanen Mutationsrate des menschlichen Genoms. Wie der Zelle eine Beschränkung dieser Mutationen auf diese eine Genregion gelingt, ist bisher nur unzureichend verstanden. Die Mutationen verändern die Affinität der Antikörper für ihr Antigen, lassen jedoch seine Spezifität und Effektorfunktionen unverändert. Aus einem Pool von Zellen mit gleicher Spezifität, aber unterschiedlicher Affinität für ein Antigen werden im Laufe der Immunantwort die B-Zellen mit der höchsten Affinität selektiert. Das bedeutet, daß die Effizienz der Bekämpfung des jeweiligen Krankheitserregers durch Erhöhung der Effizienz der Antikörper verbessert wird.

Im zweiten genetischen Prozeß, der Klassenwechselrekombination, werden in den Antikörpergenen die Module, die für eine bestimmte konstante Antikörperregion kodieren, entfernt. Dadurch wird ein anderes Modul, was für eine konstante Region mit veränderter Effektorfunktion kodiert, für die Produktion des Antikörpers verwendet. In diesem Prozeß ändern sich also nicht die Spezifität und Affinität des Antikörpers, sondern die von ihm vermittelten Funktionen innerhalb der Immunantwort.

Somatische Hypermutation und Klassenwechselrekombination finden in den Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe statt, wie z. B. den Tonsillen oder Lymphknoten (MACLENNAN 1994). Eine Keimzentrumsreaktion wird eingeleitet, wenn während einer Immunantwort bestimmte für den Erreger spezifische B-Zellen über Interaktionen mit T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden. Die aktivierten B-Zellen bilden dann Keimzentren, in denen sie sich sehr stark vermehren und durch Hypermutation und Klassenwechselrekombination ihre Antikörpergene verändern. Die Selektion von B-Zellen mit effektiveren Antikörpern findet ebenfalls im Rahmen dieser Reaktion statt. B-Zellen, die das Keimzentrum verlassen, differenzieren entweder zu Plasmazellen, deren Funktion die Produktion der optimierten Antikörper in großen Mengen ist, oder aber sie werden zu Gedächtniszellen, die uns einen Langzeitschutz vor einer weiteren Infektion mit diesem Krankheitserreger vermitteln.

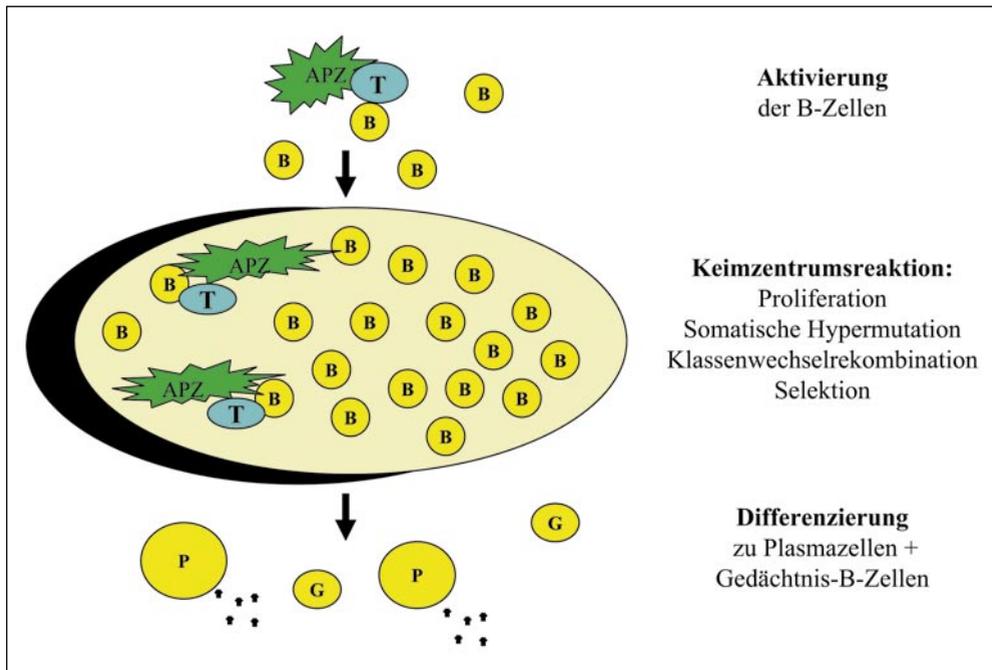


Abb. 1 Die Keimzentrumsreaktion. B-Zellen mit einer für die Immunantwort relevanten Spezifität werden außerhalb des Keimzentrums aktiviert. Im Keimzentrum proliferieren diese B-Zellen und führen Somatische Hypermutation und Klassenwechselrekombination durch. B-Zellen mit höherer Affinität für das Antigen werden selektiert und differenzieren zu antikörperproduzierenden Plasmazellen beziehungsweise Gedächtnis-B-Zellen.

APZ: Antigenpräsentierende Zelle, T: T-Zelle, B: B-Zelle, P: Plasmazelle, G: Gedächtnis-B-Zelle

Die während der Keimzentrumsreaktion stattfindenden genetischen Prozesse – Somatische Hypermutation und Klassenwechselrekombination – sind essentiell für eine optimale Immunantwort. Wir wissen das unter anderem daher, daß Individuen mit Störungen in diesen Prozessen unter schweren Immundefekten leiden. Andererseits sind aber sowohl Hypermutation als auch Klassenwechselrekombination mit einem gewissen Risiko behaftet. Wenn diese genetischen Modifikationsprozesse fehlerhaft ablaufen, können Veränderungen in wichtigen anderen Genen der Zelle zur Krebsentstehung beitragen. Ein Hinweis darauf, daß die Keimzentrumsprozesse eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von B-Zellneoplasien spielen, ist der Befund, daß die meisten dieser Tumoren von B-Zellen abstammen, die eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben (KÜPPERS et al. 1999). So zeigen viele Lymphome, wie z. B. das Burkitt-Lymphom und das Hodgkin-Lymphom, klare Anzeichen von Mutationen in den Antikörpergenen, die auf Hypermutation im Keimzentrum zurückzuführen sind.

Es gibt zwei wesentliche mögliche Ursachen für die mit der Keimzentrumsreaktion assoziierte Lymphomentstehung. Einerseits entstehen sowohl bei der Hypermutation als auch bei der Klassenwechselrekombination Brüche in der DNA-Doppelhelix. Solche Strangbrüche können eventuell im Zuge ihrer Reparatur mit Brüchen in anderen Genen verbunden werden, so daß es zur Umordnung genetischen Materials kommen kann, den sogenannten chromosomalen Translokationen (KÜPPERS und DALLA-FAVERA 2001). Durch diese Umordnung kann die Regulation bestimmter Gene nicht mehr korrekt erfolgen, und ein Zuviel oder Zuwenig bestimmter Genprodukte in der Zelle kann dazu beitragen, daß diese Zelle zur Krebszelle wird. Andererseits können während der Hypermutation auch Mutationen in andere wichtige Gene in der Zelle eingeführt werden; und die so veränderten Gene können ebenfalls zur Krebsentstehung beitragen. Wir haben es bei der Keimzentrumsreaktion und den damit assoziierten genetischen Prozessen also mit einer physiologischen Reaktion zu tun, die das Risiko der B-Zellen, zu Krebszellen zu werden, signifikant erhöht.

Bei der Untersuchung der Ursachen der keimzentrumsassoziierten Lymphomentstehung werden verschiedene Herangehensweisen verbunden. Ein sehr interessantes Arbeitsfeld ist der Mechanismus der Somatischen Hypermutation und der Klassenwechselrekombination, da beide Prozesse bisher nur schlecht verstanden sind. Insbesondere die Regulation der Bildung von Strangbrüchen, deren Reparatur und die Regulation der Mutagenese sind für die Krebsentstehung relevant. Andererseits stellt sich die Frage, in welche Gene während der Hypermutation Mutationen eingeführt werden können. Letztendlich bietet auch das Studium von spezifischen Mutationen in keimzentrumsassoziierten Tumoren eine Gelegenheit, Mechanismen der Lymphomentstehung besser zu verstehen. Bei der Erläuterung der während meiner Postdoktorandenzeit bearbeiteten Projekte werde ich mit einem Beispiel zum letzteren Themengebiet beginnen.

## 2. Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

Das Hodgkin-Lymphom ist das häufigste Lymphom der westlichen Welt. Es ist eine ungewöhnliche Tumorart, da die entarteten Zellen, die sogenannten Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen, nur etwa 1 % der Tumormasse ausmachen. Sie sind von einer großen Zahl anderer Zellen des Immunsystems umgeben, insbesondere von T-Zellen. In einem Biopsieschnitt eines Hodgkin-Tumors sieht man einzelne, große und oft mehrkernige HRS-Zellen, die von zahlreichen normalen Lymphozyten umgeben sind (KÜPPERS 2002).

Ein charakteristisches Merkmal der HRS-Zellen ist die Ausprägung eines gewissermaßen »hyperaktiven« Phänotyps. Dieser zeigt sich unter anderem an der Expression zahlreicher Aktivierungsmarker, wie z. B. CD30, in der Ausschüttung vieler immunmodulatorischer Substanzen und in der wahrscheinlich damit assoziierten Aktivierung einer aberranten Immunreaktion im Tumorgewebe. Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß ein möglicher Grund für dieses Verhalten der HRS-Zellen die konstitutive Aktivierung eines Transkriptionsfaktors ist, der viele Immunreaktionen induziert und reguliert: NF $\kappa$ B. Dieser Faktor ist in allen menschlichen Zellen vorhanden und zumeist inaktiv, da er durch Bindung an einen Inhibitor, I $\kappa$ B, im Zytosol der Zelle zurückgehalten wird. Viele Signale und Stimuli, die NF $\kappa$ B induzieren, führen zum Abbau dieses Inhibitors, so daß NF $\kappa$ B in den Kern wandern kann und dort die Transkription bestimmter Zielgene induzieren kann. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B bewirkt eine Reihe von zellulären Reaktionen. So werden zum Beispiel Immunzellen aktiviert, die Zellteilung wird stimuliert, und die Zellen erwerben eine gewisse Resistenz gegenüber programmiertem Zelltod, d. h. Apoptose.

Eine mögliche Ursache für die konstitutive Aktivierung von NF $\kappa$ B in Hodgkin-Lymphomzellen ergab sich aus der Beobachtung, daß einige Hodgkin-Lymphomzell-Linien nicht mehr in der Lage sind, den NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  zu bilden (WOOD et al. 1998). Dieser Befund war auch der Ausgangspunkt meiner Arbeiten. Wir konnten zeigen, daß dieser Defekt in den Zelllinien auf Mutationen im I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen zurückzuführen ist (JUNGNICKEL et al. 2000). In zwei der untersuchten Linien fanden wir eine Situation, die für die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen typisch ist: In einer der beiden Genkopien waren Mutationen zu detektieren, die zur Synthese verkürzter und damit nicht-funktionaler I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine führten. Die zweite Kopie war nicht nachweisbar, also wahrscheinlich deletiert. Deshalb können die Zellen kein funktionelles I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein bilden und zeigen hohe konstitutive NF $\kappa$ B-Aktivität.

Um zu untersuchen, ob solche Mutationen tatsächlich eine Rolle in der Entstehung von Hodgkin-Lymphomen spielen, haben wir auch in primären Hodgkin-Lymphomzellen das I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen analysiert (JUNGNICKEL et al. 2000). Da die malignen HRS-Zellen im Tumorgewebe nur sehr selten vorkommen, wurden für die Analyse einzelne HRS-Zellen aus Gewebeschnitten von Biopsieproben mikromanipuliert. Aus diesen Zellen wurden über eine Multiplex-Einzelzell-PCR die sechs Exons des I $\kappa$ B $\alpha$ -Gens amplifiziert und sequenziert. Auch in zwei der untersuchten primären Tumoren konnten wir mit dieser Methodik Mutationen im I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen nachweisen, die zur Synthese verkürzter und damit nicht-funktionaler Proteine führen. Diese Mutationen waren in allen malignen Zellen des Tumors vorhanden und wurden also wahrscheinlich während der Entartung der Zellen eingeführt.

Wir können also aus diesen Arbeiten schlußfolgern, daß Mutationen im I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen eine Rolle in der Pathogenese einiger Fälle des Hodgkin-Lymphoms spielen, so daß man I $\kappa$ B $\alpha$  möglicherweise als Tumorsuppressorgen einordnen kann.

Im Laufe dieser Studie haben wir uns auch der Frage zugewandt, ob Mutationen im I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen eventuell während der Keimzentrumsreaktion entstehen können. Allerdings konnten wir in primären Keimzentrumszellen keine Mutationen in diesem Gen finden. Auch in anderen keimzentrumsabhängigen Tumoren war das I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen nicht mutiert. Solche Mutationen sind also anscheinend spezifisch mit der Entartung der HRS-Zellen im Hodgkin-Lymphom assoziiert.

Die Untersuchungen in Keimzentrumszellen führten zu einer Kooperation, die Gelegenheit gibt, etwas über ein zweites Themengebiet zur keimzentrumsassoziierten Lymphomentstehung zu berichten.

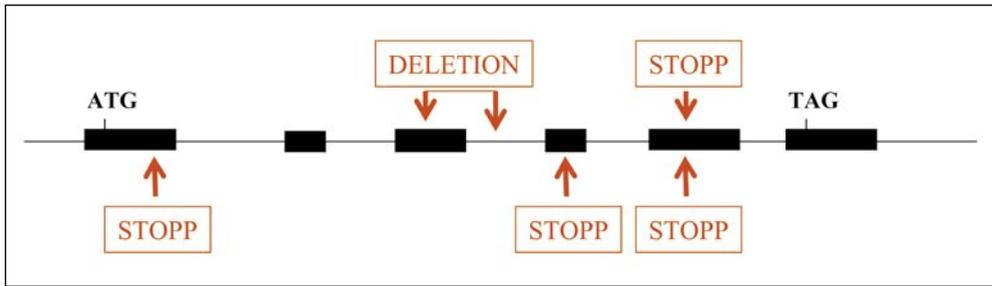


Abb. 2 Mutationen im IκBα-Gen in Hodgkin-Lymphomzellen. Die genomische Struktur des IκBα-Gens mit 6 Exons (schwarze Balken) und die Begrenzung der kodierenden Region durch Translationsstart (ATG) und Translationsstopp (TAG) sind angegeben. Die in Hodgkin-Zell-Linien gefundenen Mutationen sind durch Pfeile oberhalb der Exons bezeichnet; Pfeile unterhalb der Exons markieren Mutationen in primären Lymphomzellen.

### 3. Hypermutationen in anderen Genen in Keimzentrumzellen

Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Markus MÜSCHEN in Köln haben wir das Auftreten von Mutationen in einem anderen potentiellen Tumorsuppressorgen – CD95/Apo1/Fas – in Keimzentrumzellen untersucht. Defekte in diesem Gen sind häufig in B-Zellneoplasien zu finden. Da CD95 eine Rolle in der Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) spielt, führen solche Mutationen oft zu einer Apoptoseresistenz der Zellen.

In unserer Studie konnten wir zeigen, daß solche Mutationen im CD95-Gen auch in normalen Keimzentrum-B-Zellen gefunden werden können (MÜSCHEN et al. 2000). Diese Mutationen betreffen einerseits die Region des Exons 9, welches für die »death domain«, die kritische Region für die Induktion der Apoptose, kodiert. Mutationen in dieser Domäne sind funktionell sehr relevant, da sie einen dominant negativen Effekt haben können. Auch im 5'-Bereich des Genes findet man viele Mutationen. Sowohl diese Lage der Mutationen im CD95-Gen als auch ihre Abwesenheit in B-Zellen vor der Keimzentrumreaktion läßt vermuten, daß sie durch eine Fehlleitung des Hypermutationsprozesses eingeführt werden. Neben bcl-6 ist CD95 damit das zweite für die Lymphomentstehung relevante Gen, für das eine erhöhte Mutierbarkeit während der Keimzentrumreaktion gezeigt werden konnte. Wie eine solche Fehlleitung der Hypermutation geschieht, ist momentan noch nicht verstanden. Einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis können nur Untersuchungen erbringen, die sich mit dem Mechanismus der Hypermutation beschäftigen.

### 4. Untersuchungen zum Mechanismus der Somatischen Hypermutation

Für die Erforschung der Somatischen Hypermutation benutzt man Zellkulturmodelle, die sich von Burkitt-Lymphomzellen ableiten (DENEPOUX et al. 1997, SALE und NEUBERGER 1998). Das Burkitt-Lymphom ist ein sehr aggressives Lymphom, das sich durch schnelles Wachstum des Tumors auszeichnet. Typisch für Burkitt-Lymphomzellen ist die Translokation des c-myc-Gens, eines wesentlichen Regulators der Zellteilung, in den Immunglobulinloкус. Diese genetische Veränderung führt zur Hyperaktivierung von c-myc und trägt damit zur malignen Transformation der Zellen bei. Burkitt-Lymphomzellen ähneln Keimzentrum-B-Zellen; und sie

führen ebenso wie diese Zellen somatische Hypermutation ihrer Antikörpergene durch. Einige aus Burkitt-Lymphomzellen gewonnene kultivierbare Zelllinien haben diese Eigenschaft der konstitutiven Hypermutation in Kultur behalten, so daß man sie zur Untersuchung dieses Prozesses *in vitro* einsetzen kann. Andere Linien haben die Fähigkeit zur Hypermutation verloren, wahrscheinlich durch Verlust oder Inaktivierung eines oder mehrerer für die Hypermutation entscheidender Faktoren.

Um dem Mechanismus bzw. der Regulation der Somatischen Hypermutation näherzukommen, haben wir eine Reihe von etablierten Burkitt-Lymphomzell-Linien bezüglich ihrer Hypermutationsfähigkeit untersucht. Dabei konnten wir sowohl mutierende als auch nicht mutierende Linien identifizieren. Ausgangsüberlegung des Projektes war nun, die Unterschiede in der Genexpression in diesen Linien zu untersuchen, um Gene zu identifizieren, die am Prozeß der Hypermutation beteiligt sein könnten. Dafür wurden verschiedene Verfahren der Genexpressionsanalyse eingesetzt.

Das wesentliche Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß sich hypermutierende und nicht hypermutierende Linien bezüglich der Expression einiger Faktoren unterscheiden, die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind. Dieses Ergebnis ist deshalb interessant, weil es Modelle gibt, die eine Beteiligung solcher Reparaturwege an der Hypermutation vorschlagen (SALE und NEUBERGER 1998, PAPAVALIOU und SCHATZ 2000). Neben diesen Faktoren wurde eine Reihe anderer interessanter Genprodukte identifiziert. Natürlich muß noch untersucht werden, ob diese Faktoren direkt an der Hypermutation beteiligt sind oder ob ihre Expression nur parallel zur Expression von Hypermutationsfaktoren reguliert wird.

Inzwischen wurde der erste Faktor identifiziert, der für den Prozeß der Hypermutation und auch für die Klassenwechselrekombination essentiell ist (MURAMATSU et al. 2000, REVY et al. 2000). Die aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID) ist ein potentiell RNA-(oder DNA-)deaminierendes Enzym, dessen Fehlen zum kompletten Verlust der Somatischen Hypermutation und Klassenwechselrekombination in B-Zellen führt. Mutationen im menschlichen AID-Gen bilden die Grundlage für das Hyper-IgM-Syndrom 2, eine erbliche schwere Immundefizienz, bei der keine adäquate Reifung der Immunantwort möglich ist. AID ist nicht nur essentiell für diese genetischen Prozesse, sondern stellt anscheinend auch einen wesentlichen Schaltmechanismus für deren Induktion dar. Erstaunlicherweise kann nämlich die artifizielle Expression von AID in Nicht-Keimzentrumszellen und sogar in Nicht-B-Zellen die Hypermutation und Klassenwechselrekombination induzieren, so daß man AID als Schlüsselenzym dieser Prozesse bezeichnen kann (HONJO et al. 2002). Obwohl zur genauen Funktion von AID eine Reihe von Modellen existiert, ist die Art der Wirkung dieses Faktors bisher noch nicht geklärt. Wir wissen inzwischen, daß für die Unterschiede in der Hypermutationsfähigkeit einiger (jedoch nicht aller) Burkitt-Lymphomzell-Linien Unterschiede in der AID-Expression verantwortlich sind.

Aus der Synthese dieser Befunde ergibt sich ein interessantes Konzept, das eine wesentliche Grundlage unserer momentanen Arbeit darstellt. Einerseits wissen wir, daß Somatische Hypermutation und Klassenwechselrekombination durch DNA-Strangbrüche und Mutationen zu Veränderungen von potentiellen Onkogenen beitragen können. Beide Prozesse werden durch AID induziert, ein Gen das spezifisch im Keimzentrum exprimiert wird. Andererseits wissen wir, daß Komponenten der DNA-Reparaturprozesse, die Fehlern bei Hypermutation und Klassenwechselrekombination vorbeugen können, ebenfalls während der Keimzentrumsreaktion aktiviert werden. Man kann also annehmen, daß eine koordinierte Regulation dieser Wege der DNA-Schädigung und der DNA-Reparatur notwendig ist, um eine generelle Schädigung des

Zellgenoms zu verhindern und damit der Krebsentstehung vorzubeugen. Im Gegenzug könnte das bedeuten, daß sich B-Zelllymphome durch eine Störung in dieser Balance auszeichnen – so z. B. hohe AID-Aktivität und niedrige Reparaturaktivität.

Ausgehend von diesem Konzept konzentrieren sich unsere Arbeiten im Moment auf drei Schwerpunkte. Wir arbeiten weiterhin am Mechanismus der Somatischen Hypermuation, insbesondere untersuchen wir die Funktion von interessanten Genen, die an diesem Prozeß beteiligt sein könnten, über Methoden der spezifischen RNA-Interferenz. Andererseits interessieren wir uns für die Regulation von AID während der normalen und malignen B-Zellentwicklung, da AID wahrscheinlich in Prozesse der DNA-Schädigung involviert ist. Letztendlich arbeiten wir auch intensiv an der Untersuchung der Regulation und Deregulation der DNA-Reparatur während der Keimzentrumsreaktion. Inzwischen habe ich die Möglichkeit erhalten, am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit in München eine Arbeitsgruppe aufzubauen, die sich über die nächsten Jahre mit diesem Themenkreis beschäftigen wird.

### Dank

Zum Abschluß meines Beitrages möchte ich vielen Kollegen und Förderern danken, die zum Erfolg meiner bisherigen Arbeiten beigetragen haben. In vielen Fällen waren diese Untersuchungen Kooperationen, so zum Beispiel die IκBα-Analysen mit Andrea STARATSCHKE-JOX und Volker DIEHL in Köln sowie Andreas BRÄUNINGER und Martin-Leo HANSMANN in Frankfurt, oder aber die CD95-Analysen mit Markus MÜSCHEN in Köln. Insbesondere danke ich Klaus RAJEWSKY und Ralf KÜPPERS in Köln, in deren Labors ich die Arbeiten in meiner Postdoktorandenzeit durchführen konnte. Ein besonderes Dankeschön geht natürlich auch an die Leopoldina für die Finanzierung dieses Aufenthalts. Georg BORNKAMM danke ich für die Möglichkeit des Aufbaus einer Arbeitsgruppe in München und der Deutschen Krebshilfe für die Unterstützung unserer jetzigen Arbeiten.

### Literatur

- DENEPOUX, S., RAZANAJOANA, D., BLANCHARD, D., MEFFRE, G., CAPRA, J. D., BANCHEREAU, J., and LEBECQUE, S.: Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity* 6, 35–46 (1997)
- HONJO, T., KINOSHITA, K., and MURAMATSU, M.: Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 165–196 (2002)
- JUNGNICKEL, B., STARATSCHKE-JOX, A., BRÄUNINGER, A., SPIEKER, T., WOLF, J., DIEHL, V., HANSMANN, M. L., RAJEWSKY, K., and KÜPPERS, R.: Clonal deleterious mutations in the IκappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J. Exp. Med.* 191(2), 395–402 (2000)
- KÜPPERS, R.: Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv. Cancer Res.* 84, 277–312 (2002)
- KÜPPERS, R., and DALLA-FAVERA, R.: Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580–5594 (2001)
- KÜPPERS, R., KLEIN, U., HANSMANN, M. L., and RAJEWSKY, K.: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *New Engl. J. Med.* 341 (20), 1520–1528 (1999)
- MACLENNAN, I. C. M.: Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139 (1994)
- MURAMATSU, M., KINOSHITA, K., FAGARASAN, S., YAMADA, S., SHINKAI, Y., and HONJO, T.: Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563 (2000)
- MÜSCHEN, M., RE, D., JUNGNICKEL, B., DIEHL, V., RAJEWSKY, K., and KÜPPERS, R.: Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J. Exp. Med.* 192, 1833–1840 (2000)
- PAPAVASILIOU, F. N., and SCHATZ, D. G.: Cell-cycle-regulated DNA double-strand breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 408, 216–221 (2000)
- RAJEWSKY, K.: Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751–758 (1996)
- REYV, P., MUTO, T., LEVY, Y., GEISSMANN, F., PLEBANI, A., SANAL, O., CATALAN, N., FORVEILLE, M., DUFOURCOQ-LAGELOUSE, R., GENNERY, A., TEZCAN, I., ERSOY, F., KAYSERILI, H., UGAZIO, A. G., BROUSSE, N., MURAMATSU, M., NOTARANGELO, L. D., KINOSHITA, K., HONJO, T., FISCHER, A., and DURANDY, A.: Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575 (2000)

*Die Rolle der Keimzentrumsreaktion in der Entstehung humaner B-Zell-Lymphome*

- SALE, J. E., and NEUBERGER, M. S.: TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity* 9, 859–869 (1998)
- TONEGAWA, S.: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581(1983)
- WOOD, K. M., ROFF, M., HAY, R. T.: Defective I $\kappa$ B $\alpha$  in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- $\kappa$ B. *Oncogene* 16, 2131–9 (1998)

Dr. Berit JUNGNICHEL  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit München  
Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik  
Marchioninstraße 25  
81377 München  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 89 7099287  
Fax: +49 89 7099500  
E-Mail: jungnickel@gsf.de

---

Dr. rer. nat. Burkhard MÄDLER

Geboren 1964 in Potsdam, Brandenburg. 1983 bis 1988 Physikstudium an der Karl-Marx-Universität Leipzig. Danach wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Kosmosforschung (Akademie der Wissenschaften der DDR) in Berlin-Adlershof. Zwischenzeitlich Wehrdienst. Ab 1990 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Fakultät für Physik und Geowissenschaften der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gotthard KLOSE (Physik der Biomembranen). Ab 1994 Doktorand in oben genannter Arbeitsgruppe. 1997 Promotion zum Thema: »Phasen- und Strukturverhalten wäßriger Lipid/Tensid-Mischungen«. Ab 1999 Postdoktorandenstipendium der Leopoldina mit dreijährigem Forschungsaufenthalt an der University of British Columbia, Vancouver (Kanada) in der Arbeitsgruppe von Prof. Alex MACKAY – Thema: »In vivo Kernresonanzspektroskopie und -tomographie am menschlichen Gehirn – Analyse von <sup>1</sup>H-Spektren, Relaxations- und Kreuzrelaxationsprofilen und deren Anwendung zur diagnostischen und therapeutischen Überwachung bei Multipler Sklerose«. Ab Februar 2003 Clinical Research Scientist bei Philips Medical, Canada.

## **Entwicklung kernmagnetischer Resonanzmethoden zur diagnostischen Anwendung bei degenerativen Erkrankungen der weißen Gehirnsubstanz beim Menschen**

Burkhard MÄDLER und Alex MACKEY (Vancouver)

Mit 15 Abbildungen und 2 Tabellen

### *Zusammenfassung*

Wasser spielt eine Schlüsselrolle bei der Funktion und Strukturbildung biologischen Gewebes. Jede bisher bekannte Lebensform beruht praktisch auf den physikochemischen Eigenschaften dieses Lebensträgers. Wasser bildet ebenfalls den Hauptbestandteil des menschlichen Gehirns und stellt aufgrund einzigartiger kernmagnetischer Eigenschaften der Protonen im Wechselspiel mit ihrer molekularen Umgebung ein faszinierendes Objekt für detaillierte experimentelle Studien mittels der bildgebenden Kernresonanz (Magnetische Resonanz-Tomographie – MRT) dar.

Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Methoden und Untersuchungen war die Etablierung von neuen Techniken der bildgebenden Magnetresonanztomographie und -spektroskopie im klinischen Routinebetrieb. Darüber hinaus sollte ihre Eignung bei der quantitativen Analyse entzündlicher Erkrankungen des menschlichen Zentralnervensystems (ZNS), wie z. B. Multiple Sklerose (MS), als auch bei der Diagnose degenerativer Prozesse in der weißen Gehirnsubstanz, z. B. bei genetisch bedingten Stoffwechselstörungen (Phenylketonurie – PKU), getestet werden.

Diese Techniken sollen es erlauben, über das bisher bekannte Maß hinaus, validierte diagnostische Befunde besonders für abnormale Veränderungen des menschlichen Gehirns und des peripheren Nervensystems zu ermöglichen.

Während gängige, etablierte MRT-Methoden zwar relativ empfindlich sind, enthalten sie jedoch kaum spezifisch quantitative Information. MS-Läsionen sind z. B. mittels konventioneller MRT-Methoden klar zu lokalisieren und von gesundem Gewebe zu unterscheiden. Sie erlauben aber kaum detaillierte Aussagen zu strukturellen oder pathophysiologischen Veränderungen dieses Gewebes. Ziel muß es daher sein, Hirnmodelle zu entwickeln und bestehende zu verfeinern, welche es ermöglichen, die beobachteten NMR-Phänomene im physikalischen Sinne zu verstehen und zu beschreiben.

Es werden im folgenden zwei neuartige MRT-Methoden vorgestellt: die quantitative Bestimmung und Auswertung der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  zur Quantifizierung des Myelingehtes der Markscheiden sowie die Diffusionstensorbildung zur Analyse der strukturellen Integrität der Axonenfaserbündel. Diese Methoden sind Bestandteil des Untersuchungsprotokolls einer umfangreichen dreijährigen Studie an der MS-Klinik der *University of British Columbia* in Vancouver, Kanada.

### *Abstract*

Water plays an important key role for the function and structure formation of biological tissue. So far, every known species and every life process depend on the physicochemical properties of this life carrier. Water also makes up the main constituent of the human brain and peripheral nervous system. On account of its unique nuclear magnetic properties in interplay with the molecular surroundings, water is a fascinating object for detailed experimental studies exploiting the technique of magnetic resonance imaging (MRI) invented in the early 1970s by LAUTERBUR, MANSFIELD and DAMADIAN.

The study's main objective was the development and probing of new, innovative imaging and spectroscopic MR-techniques to facilitate their use for clinical routine purposes, especially in the field of inflammatory diseases of the central nervous system (e.g. Multiple Sclerosis, Phenylketonuria, Schizophrenia, Alzheimer etc.). Additionally, these techniques shall open new insights about the properties and structural formation processes of abnormal and/or degenerative processes in the human brain.

Whereas established MRI-techniques are notorious for being very sensitive, they are not very specific to pathology or pathophysiology. Multiple Sclerosis lesions, for example, can be very well localized and distinguished from healthy

tissue with conventional MRI methods but this information does not provide detailed insides about the structural changes or damages in a lesion. The ultimate goal therefore is the development of new and refinement of existing brain models that will allow to understand and to interpret the magnetic resonance properties of the brain.

This article describes two new innovative MRI methods to approach these problems: a novel spatially resolved spin-spin relaxation time measurement to identify and quantify myelin content of certain brain structures and a modification of the diffusion tensor imaging technique to analyse the structural integrity of axon fibre bundles.

Both methods are currently implemented into a protocol for a three years serial clinical MS-study at the University of British Columbia in Vancouver, Canada.

## 1. Einführung

Das Gehirn ist ein überaus komplexes Organ, das eine Vielzahl sehr unterschiedliche, im makro- wie mikrophysikalischen Sinne inhomogene, Strukturen beinhaltet. Etwa die Hälfte des Hirnvolumens besteht aus Neuronen oder Nervenzellen. Ihre Zahl von rund  $10^{11}$  entspricht in etwa der Anzahl der Sterne in unserer Galaxie – und ist damit ein Ausdruck für die enorme Komplexität dieses Organs. Auch wenn kein Neuron dem andern gleicht, so sind sie sich doch in ihrem generellen Aufbau gleich, den man in drei Zellregionen untergliedern kann: Zellkörper, Dendriten und Axon (vgl. Abb. 1). Der übrige Teil des Hirnvolumens, der nicht von Neuronen beansprucht wird, besteht im wesentlichen aus Gliazellen, den Strukturstabilisatoren und Versorgungszellen (FLANAGAN 1979).

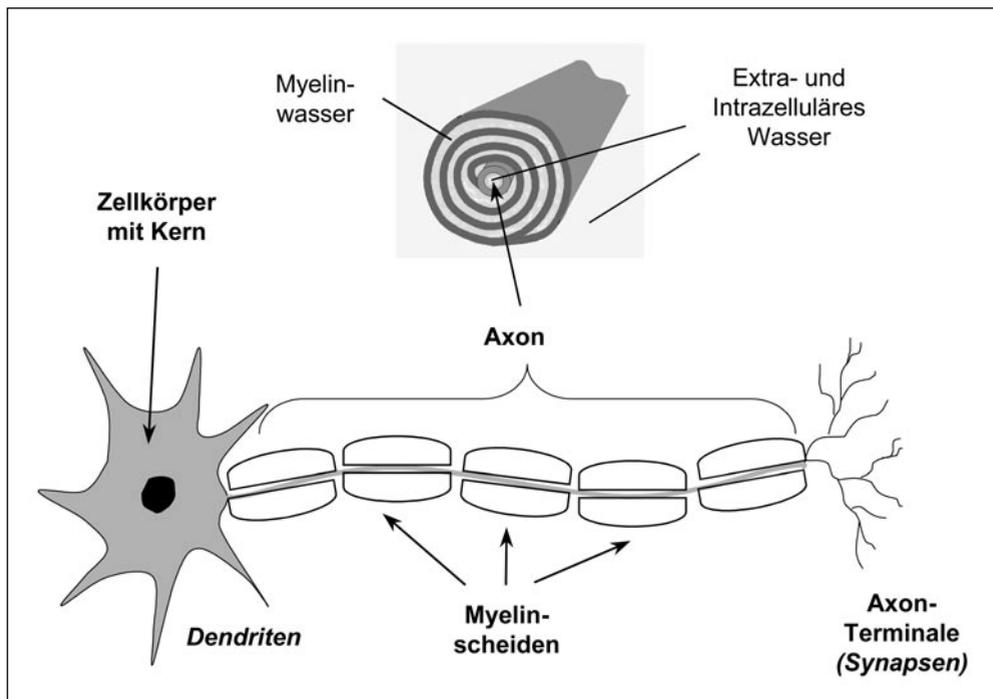


Abb. 1 Schematische Abbildung eines Neurons mit Axon und Myelinscheiden. Das eingefügte Piktogramm repräsentiert einen Querschnitt durch ein myelinisiertes Axon (nicht maßstabsgerecht) mit Myelin-, sowie extra- und intrazellulärem Wasser.

Auch ein anderer Zelltyp ist allgegenwärtig im Zentralnervensystem (ZNS) – die Schwannschen Zellen, die alle Axonen mehr oder minder stark wie einen Schutzmantel umgeben, in einigen Fällen nur als lose assemblerte, bimolekulare Schicht, meistens jedoch erzeugen die Schwannschen Zellen im postembryonalen Stadium der Gehirnentwicklung eine mehrere hundert bis tausend molekulare Schichten zählende Struktureinheit, die sich spiralförmig um die Axonen wickelt – die sogenannte Myelinscheide (vgl. Abb. 1; HUBEL 1988). Myelin bildet eine Sammelbezeichnung für verschiedene fettähnliche Stoffe (Lipoide). Es besteht aus einer Vielzahl von strukturell und funktionell unterschiedlichen Lipiden (amphiphile Moleküle, die sowohl wasser- als auch fettlösliche Eigenschaften verbinden und spontan zur Selbststrukturierung in polaren Lösungsmitteln neigen).

Die Myelinschicht wirkt wie ein Isolator. Sie verringert die elektrische Kapazität der Axonmembran und erhöht gleichzeitig ihren ohmschen Widerstand. Dadurch wird die Ausbildung und Weiterleitung von Aktionspotentialen im Gegensatz zu einer »nackten«, unmyelinieren Membran wesentlich beschleunigt und effektiviert (RITTER 1987). Kommt es durch entzündliche Prozesse in der weißen Substanz des ZNS zu einer nachhaltigen Schädigung der Myelinscheiden, wie im Falle der Multiplen Sklerose, ist damit häufig eine unmittelbare Störung des peripheren Nervensystems und somit der Reizweiterleitung von oder zu den Rezeptoren verbunden.

Unter Myelin-Krankheiten werden im allgemeinen Krankheiten zusammengefaßt, die bevorzugt Myelin angreifen, und zwar entweder das Myelin im zentralen Nervensystem (wie bei der Multiplen Sklerose und den Leukodystrophien), oder das Myelin im peripheren Nervensystem. Im peripheren Nervensystem kann Myelin wieder selbständig neu gebildet werden, im zentralen Nervensystem dagegen nicht (Www 2003a).

Eine weitere Untergliederung beinhaltet die Gruppe der Demyelinierungserkrankungen, die andauernd und nachhaltig zu einer Veränderung oder zum kompletten Verlust der Myelinscheiden führen. Sie werden in erworbene (häufigste Form ist MS) und erblich bedingte, neurodegenerative Krankheiten (Leukodystrophie, Phenylketonurie, Pelizaeus-Merzbacher Krankheit etc.) unterschieden.

### 1.1 Multiple Sklerose (MS)

Unter *Multipler Sklerose* (MS) (Www 2003a) wird eine entzündliche Erkrankung des Nervensystems verstanden (*multiple*: zahlreich, verstreut, vielfach, an verschiedenen Orten des zentralen Nervensystems sich entwickelnde Entzündungsherde; *sklerose*: Verhärtung der ursprünglich entzündlichen Herde durch Bildung von Narbengewebe). Sklerotische Herde sind von verschiedener Größe. Inwieweit sie in funktionsfähiges Nervengewebe rückwandelbar sind, ist bisher noch nicht vollständig geklärt (MARTIN et al. 1992).

Nach wie vor ist zur Sicherung einer MS-Diagnose die Untersuchung des Nervenwassers (Liquors) wichtig. Bestimmte Eiweißkörper weisen auf eine besondere Form der Entzündung im Zentralnervensystem hin, auch wenn sie keine hinreichenden Indizien für MS sind. Ein detailliertes und nichtinvasives Hilfsmittel zur Diagnose über die entzündlichen und pathogenen Stufen der MS ist zwar mit Hilfe der MRT möglich, eine zweifelsfreie Indikation von MS ausschließlich aufgrund der MRT-Daten ist nach wie vor aber nicht möglich.

Die Ursache von MS ist nach wie vor ungeklärt. Das Mark im Großhirn (auch *weiße Substanz* genannt) besteht im wesentlichen aus Nervenfasern, wobei im Gegensatz zur Großhirnrinde (*graue Substanz*), die Achsenzylinder (*Axon*) der Nervenfasern durch eine aus Myelin beste-

hende Markscheide umgeben sind. Durch eine noch nicht vollständig geklärte Autoimmun- oder Immunfehlerreaktion (LUMSDEN 1970) mit einhergehender vergrößerter Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (**Blood Brain Barrier**) (GROSSMAN et al. 1986, KOOPMANS et al. 1989, MARTIN 1992, STEINMAN 1996, CALABRESI et al. 1998) für spezifische myelintoxische Makrophagen (autoreaktive T-Zellen) und unspezifische Lymphozyten (STEINMAN 1996), kommt es zur Zerstörung dieser Myelinschicht – das Axon wird freigelegt. Die Folge sind Ödeme, Entzündungen mit fortschreitender Demyelinierung und Gliose (Wucherungen der Glia – das Neuron umgebende Stützzellen), die letztendlich zum vollständigen Verlust des Axons und damit der Informationsweiterleitung im weißen Nervengewebe führen (DAVIE et al. 1995). Die Folge sind sensorische und motorische Störungen. Der Krankheitsausbruch geschieht in der Regel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Die unterschiedlichen Verlaufsformen werden grob unterschieden in:

- schubförmig remittierend;
- primär schubförmig / sekundär chronisch progredient;
- chronisch progredient;
- primär schubförmig/sekundär chronischer Verlauf mit erneuten Schüben.

Eine aktuelle Schätzung ergibt weltweit etwa 2,5 Millionen MS-erkrankte Patienten (USA: 0,3 Mio.; BRD: 130 000; GB: 85 000; Kanada: 50 000). Die Inzidenzrate (Erkrankungen pro 100 000 Einwohner) scheint mit der geographischen Breite zu den Polen hin zuzunehmen.

### 1.2 Phenylketonurie (PKU)

Die Phenylketonurie ist eine autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung. Dabei ist ein Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 12 mutiert. Überschüssiges Phenylalanin (Phe), eine essentielle Aminosäure, wird im gesunden Organismus mit Hilfe des Enzyms Phenylalanin-Hydroxylase zu der Aminosäure Tyrosin abgebaut. Durch die Inaktivierung des Abbaus von Phenylalanin sammelt es sich im Blut und wird über den Urin ausgeschieden. Ein anderer Teil wird zu Phenylbrenztraubensäure und weiter zu Phenylacetat, Phenyllactat und O-Hydroxyphenylelessigsäure umgewandelt und dann ebenfalls über den Urin ausgeschieden. Der Hauptgrund für die schwerwiegenden Folgen der PKU ist primär in der weit über das Normalmaß hinausgehenden Konzentrationserhöhung an Phenylalanin im Blut und dem Überwinden der Blut-Hirn-Schranke (**Blood Brain Barrier**) zu sehen, das in diesem Übermaß weitgehende negative Folgen auf die Bildung des Gehirns besitzt (CURTIUS et al. 1972, ISHIMARU et al. 1993, PIETZ et al. 1997, PIETZ 1998, PIETZ et al. 1998, HUTTENLOCHER 2000).

Die Wahrscheinlichkeit an Phenylketonurie zu erkranken, liegt etwa bei 1:10 000 bis 1:15 000. Unbehandelte Kinder zeigen schwere geistige Defekte, epileptische Anfälle, Hypertonie der Muskeln, Hirnkleinwuchs, Pigmentstörungen auf der Haut, ekzemähnliche Hautveränderungen und allgemeine Übererregbarkeit.

In den Industrienationen wird in der Regel etwa sechs Tage nach der Geburt routinemäßig der Phenylalaninspiegel im Blut des Säuglings mittels Blutprobe ermittelt (SWEETMAN 1996).

Als recht erfolgreiche Therapie bietet sich eine Spezialdiät mit phenylalanin armer Kost unmittelbar nach der Geburt des Kindes bzw. nach der Diagnose an. Diese Diät muß mindestens bis zur Pubertät streng eingehalten werden. Ob sie lebenslang genommen werden muß, ist zur Zeit noch strittig und außerdem kaum durchführbar (unbequem, sehr kostspielig für die Patienten). Es hat sich gezeigt, daß einige Patienten im Erwachsenenalter eine hohe Resi-

stanz selbst gegenüber stark erhöhten Phe-Werten zeigen, ohne auffällig zu reagieren (sowohl psychisch als auch physisch). Bei anderen hingegen führen schon kleine Abweichungen von einer strengen Diät zu deutlichen Einbußen in ihrer Lebensqualität und in ihrem persönlichen Wohlbefinden (TAYLOR et al. 1984, THOMPSON et al. 1990, WEGELAGE et al. 1995, 1996, CERONE 1999, BRENTON und PIETZ 2000, TREFZ et al. 2000).

Ein Hauptziel unserer Studie war die Entwicklung von klinischen MRT-Methoden, die eine Einteilung der PKU-Patienten in diese zwei Gruppen erleichtern helfen soll.

### *1.3 Die magnetische Kernspintomographie (MRT)*

Die Magnetische Resonanz-Tomographie (MRT; auch MRI – *magnetic resonance imaging*) ist ein bildgebendes Verfahren der Kernspinresonanz (NMR – *nuclear magnetic resonance*). Sie erstellt Schnittbilder, wie die Computertomographie, allerdings ohne Röntgenstrahlen einzusetzen. Statt dessen wird der Körper einem Magnetfeld ausgesetzt und festgestellt, wie sich Körpergewebe in diesem Magnetfeld verhält. Für eine detaillierte Darstellung siehe z. B. SLICHTER (1996) und CALLAGHAN (1991).

Diese Untersuchungstechnik beruht auf der Eigenschaft, daß Atomkerne mit einer ungeraden Ordnungszahl über eine Eigenrotation, den sogenannten Kernspin, verfügen. Eine Vielzahl dieser gleichartigen Kernspins (Spins derselben Kernsorte, z. B. Protonen im Wasser) führen in einem statischen Magnetfeld  $B_0$  zu einer makroskopischen Magnetisierung, die mittels äußerer Einstrahlung eines Hochfrequenzfeldes (HF-Impulse) manipuliert werden kann. Die Absorption oder Emission von Energie während dieses Wechselwirkungsprozesses kann gemessen und in ein anatomisches Schichtbild umgewandelt werden. Entscheidend für die kontrastbildliche Darstellung ist der unterschiedliche Wassergehalt in den verschiedenen Körpergeweben. Erkrankte Gewebe enthalten häufig mehr Wasser als gesunde Gewebe. Wegen der erhöhten Dichte von Wasserstoffkernen im erkrankten Gewebe (Ödem) kann man diese dann vom gesunden Gewebe unterscheiden. Außerdem spielen dynamische Prozesse eine Rolle, Zeiten, die das angeregte System benötigt, um wieder in den thermischen Gleichgewichtszustand zurückzukehren (Relaxation). Die möglichen Formen der Bildkontraste durch Relaxationseffekte sind quasi unerschöpflich (MACKEY 2002).

Die Analyse von Kernspin-Relaxationsdaten mit den charakteristischen Zeiten  $T_1$  und  $T_2$  ist neben den normalen bildgebenden Spin-Dichte-Verteilungsdarstellungen die ergiebigste Informationsquelle der MRT. Daher wird neben der einfachen Protonenkonzentration pro Volumeneinheit (Spin-Dichte-Kontrast) der Bildkontrast in der MRT häufig als direktes Abbild der  $T_1$ - bzw.  $T_2$ -Relaxationseigenschaften (von Wasser)<sup>1</sup> im untersuchten Gewebe dargestellt. Auch sehr aktuelle und neue Verfahren der funktionellen MRT stützen sich z. B. auf Relaxationsdaten (MACKEY et al. 1994, WHITTALL et al. 1997, VAVASOUR et al. 1998) oder Kontrastverfahren aufgrund von Magnetisierungstransferprozessen (Kreuzrelaxation) (HENKELMAN et al. 1993, WOLFF und BALABAN 1994, MORRISON und HENKELMAN 1995, MORRISON et al. 1999, STANISZ et al. 1999, VAVASOUR et al. 2000).

---

1 Wenn nicht anders vermerkt, ist im folgenden immer das Relaxationsverhalten von Wasser im Zellgewebe gemeint. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Signal von Nichtwasserkomponenten des menschlichen Gehirns (Makromoleküle), ausgenommen Fett und mobile Lipide, liefert aufgrund der kurzen  $T_2$ -Zeiten ( $<1\text{ms}$ ) i. A. keinen relevanten Beitrag zum Protonen-MRT-Signal.

Das genaue Verständnis von *In-vivo*-MRT-Relaxationsdaten in der nichtinvasiven Humanmedizin birgt ein enormes Potential, spezifische Informationen über die mikroskopische Struktur, molekulare Dynamik und funktionelle Zusammenhänge im menschlichen Gehirn zu sammeln. Das ist nicht nur von rein wissenschaftlichem Interesse, sondern öffnet ebenfalls Türen zur Entwicklung neuer diagnostischer Methoden oder zu therapeutischen Anwendungen bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen verschiedenster Zellgewebe (z. B. MRT gestützte Thermo-therapie maligner Tumoren, MRT-unterstützte Chirurgie).

Abbildung 2 zeigt typische MRT-Bilder eines MS- und eines PKU-Patienten. Die weißlichen Flecke (Pfeile) kennzeichnen die sogenannten Läsionen oder Plaques. Die entstehenden Bilder sind sehr genau. Mit Hilfe der Kernspintomographie können Herde bis zu einer Auflösung von nur  $2 \times 2$  mm abgebildet werden. Auch aktive Plaques sind feststellbar, wenn der Patient ein Kontrastmittel verabreicht bekommt (GROSSMAN et al. 1986, McDONALD et al. 1992, KATZ et al. 1993). Die aktiven Läsionen verschwinden oft wieder nach Abklingen eines akuten Schubes.

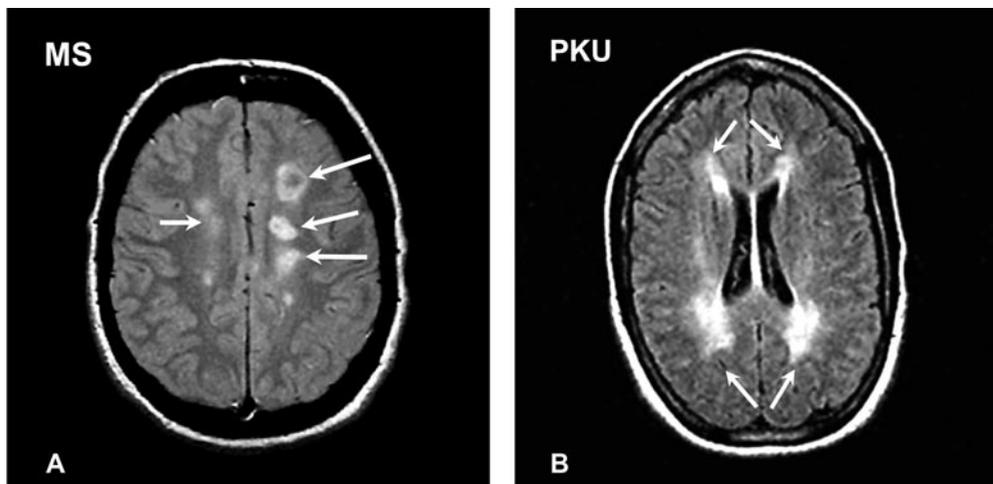


Abb. 2 Beispiele von  $T_2$ -relaxationsgewichteten Spin-Echo-MRT-Bildern eines Multiple-Sklerose- (A) und eines Phenylketonurie-Patienten (B). Die Pfeile kennzeichnen die abnormalen Veränderungen in der weißen Substanz.

#### 1.4 Relaxation

Relaxationsphänomene sind ein extrem komplexes Gebiet innerhalb der Kernresonanz (SLICHTER 1996, ABRAGAM 1983, CALLAGHAN 1991). Im folgenden soll daher nur auf die für die bildgebenden oder spektroskopischen *In-vivo*-Techniken relevanten Aspekte eingegangen werden. Allgemein gesprochen ist das NMR-Ursprungssignal, d. h. die makroskopische Magnetisierung, nach der Anregung durch einen externen HF-Impuls, der Anzahl der angeregten Kernspins direkt proportional (quantitativer Aspekt der NMR). Die Abfallzeit mit der diese Magnetisierung durch den Verlust der anfangs in Phase präzedierenden Kernspins verloren geht, wird ohne Berücksichtigung der Inhomogenitäten des äußeren statischen magnetischen Feldes  $B_0$  mit der sogenannten Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$  beschrieben. Ein anderer Prozeß, der die Rückkehr des angeregten Spinsystems in den thermodynamischen Grundzustand be-

schreibt, ist die Spin-Gitter-Relaxation, und sie wird durch die Zeitkonstante  $T_1$  beschrieben (dynamischer Aspekt der NMR).

Im menschlichen Organismus können diese beiden charakteristischen Zeiten in Abhängigkeit von der Art und dem pathologischen Zustand des Gewebes sehr unterschiedlich sein (MACKAY et al. 2002). Sie ermöglichen dadurch nicht nur den Zugang zu einer enormen Vielzahl verschiedener qualitativer Kontrastmethoden in der bildgebenden Kernresonanztomographie, sondern halten bereits immer häufiger Einzug in die quantitative klinische Diagnostik.

Bei einer Temperatur von 37 °C (Körpertemperatur) und einer Magnetfeldstärke von 1,5 T weist chemisch reines Wasser gleiche  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten der beiden äquivalenten Protonen von etwa 3 s auf. In Eis hingegen, wo die dominierenden Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Protonen nicht mehr durch thermische Umorientierung der Wassermoleküle ausgemittelt wird, können diese Zeiten enorm divergieren ( $T_2 = 10\text{--}100 \mu\text{s}$  – kleiner je niedriger die Temperatur;  $T_1 > 10\text{--}100 \text{s}$  – größer je niedriger die Temperatur) (BLOEMBERGEN et al. 1948).

In biologischem Gewebe wird die  $T_2$ -Relaxation in erster Linie dadurch bestimmt, wie stark die Wasserprotonen mit den sie umgebenden Nicht-Wasserprotonen (Proteine und andere Makromoleküle) wechselwirken. Ein weiterer empfindlicher  $T_2$ -Relaxationsprozeß entsteht durch die unkorrelierte Bewegung der Wassermoleküle durch thermische Bewegung (Brownische Bewegung) und Diffusion.  $T_2$  kann in diesen Fällen von einigen Millisekunden bis zu Sekunden variieren. Protonensignale anderer Nicht-Wasserprotonen (ausgenommen Fett und mobile Lipidkomponenten) tragen aufgrund ihrer extrem kurzen  $T_2$  von  $< 1 \text{ms}$  an klinischen Tomographen nicht zu einem meßbaren Signal bei (POON und HENKELMAN 1992, MACKAY et al. 1994, WHITTALL et al. 1997).

Die in der medizinischen MRT-Diagnostik üblichen Auswerteverfahren gehen zum Teil von einem einfach exponentiellen Verhalten der Relaxationszeiten aus. Damit sind aber nur qualitative Aussagen über den Zustand des Zellgewebes im Vergleich zu klinisch »normalem«, nichtpathologischem Zellgewebe möglich. Eine kritische Betrachtung, z. B. der Protonen-Relaxationsdaten, liefert zwar generell ein exponentielles Verhalten, das sich aber sowohl durch ein einfach- als auch durch mehrfach-exponentielles Verhalten anpassen läßt. Das  $T_2$ -Relaxationsprofil des menschlichen Gehirns ist z. B., im Gegensatz zum  $T_1$ -Profil, welches sich sehr gut durch ein einfach exponentielles Relaxationsverhalten beschreiben läßt (BREGER et al. 1989, WHITTALL et al. 1997), stark multi-exponentiell geprägt. Es weist somit auch einen höheren Informationsgehalt gegenüber einer herkömmlichen  $T_1$ -Sequenz auf. Aber gerade die Analyse multiexponentieller Relaxationskurven ist eine mathematische Herausforderung und wird seit Jahren kontrovers diskutiert (vgl. WHITTALL et al. 1997 für weitere Referenzen). Wir haben die Methode des kleinsten Quadrate-Fits modifiziert, um zu robusteren und weniger rauschabhängigen Resultaten bei der multiexponentiellen Analyse von Relaxationsdaten zu gelangen (MÄDLER et al. 2000a,b, 2002a).

## **2. Experimentelle Methoden**

Die im folgenden zusammengestellten Ergebnisse sind Resultate einer Studie an insgesamt 12 gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts im Alter zwischen 20 und 55 Jahren, die an einem klinischen 1,5 T GE Signa-Tomographen an der Universitätsklinik der UBC im Zeitraum März 2000 bis August 2002 durchgeführt wurden. Die PKU-Studie erfolgte an jeweils 10 gesunden und 10 PKU-Patienten vergleichbaren Alters und Geschlechts am selben Gerät.

*T<sub>2</sub>-Relaxation*: Einzelschicht 32- und 48-Echo-CPMG-Sequenz (Eigenentwicklung) mit variablen TR = 3 ... 3,6 s, 32 Echos mit TE = 10 ms gefolgt von 16 Echos mit variablen TE = 10–300 ms, k-Raummatrix 256 × 128, Bildmatrix 256 × 256, FOV 24 cm, Bandbreite 32 kHz, 4 Einzelexperimente zur Mittelung, Meßzeit: 25 min.

*Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI)*: Herzschlaggetriggerte Einzelschuß-Spin-Echo-EPI-Sequenz mit variablem Diffusionsgradienten 0–20 mT/m (16 verschiedene Gradientenstärken) und 7 verschiedene Gradientenrichtungen ([x],[y],[z],[xyz],[−xy−z],[x−y−z],[−x−yz]), 112 Einzelbilder, aus denen der Diffusionstensor pixelweise berechnet wurde; 2 bis 4 Einzelexperimente mit Gradientenzeiten  $\delta$  zwischen 25 ms und 40 ms sowie Beobachtungszeiten  $\Delta$  zwischen 85 ms und 115 ms (b-Intervall: 0 bis 2000 s/mm<sup>2</sup>); Gesamtmeßzeit ca. 6 min.

### 2.1 *T<sub>2</sub>-Relaxationsprofile der grauen und weißen Gehirnschubstanz*

Die Quantifizierung von *T<sub>2</sub>*-Relaxationsprofilen stützt sich auf die Annahme eines direkten Zusammenhangs der Wasserrelaxationszeit und der absoluten Wasserkonzentration im betrachteten Gewebe. Wie in einer Vielzahl von Studien gezeigt, weist die Spin-Gitter-Relaxationszeit *T<sub>1</sub>* im menschlichen Gehirn ein monoexponentielles Verhalten auf, d. h., es gibt lediglich einen Relaxationsprozeß mit einer NMR-typischen Korrelationszeit, deren Absolutwert zwar von der Art des betrachteten Gewebes abhängen kann, jedoch keine weiteren Details bezüglich unterschiedlicher Relaxationsmechanismen liefert (BREGGER et al. 1989, 1991, WHITTALL et al. 1997). Die Spin-Spin-Relaxationszeit *T<sub>2</sub>* zeigt zwar in der grauen Gehirnschubstanz ein ähnliches Erscheinungsbild, weist aber im Gegensatz dazu in der myelinreichen weißen Gehirnschubstanz ein sehr charakteristisches multiexponentielles Verhalten auf, was sich im Bild eines komplexen Relaxationszeitverteilungsprofils manifestiert (vgl. Abb. 3).

Wie MACKAY et al. zeigten, kann dieses Verhalten anhand dreier unterschiedlicher Wasserreservoirs beschrieben werden (MACKAY et al. 1994):

- die kurze Komponente mit  $T_2 \approx 15$  ms wird dem stark orientierten und dynamisch eingeschränkten myelin-assoziierten Wasser zugeordnet;
- $50\text{ms} < T_2 < 150$  ms: intra- und extrazelluläres Wasser;
- $T_2 > 2$  s »Freies« Wasser der Gehirnrüssigkeit (CSF).

Es konnte gezeigt werden, daß unterschiedliche Strukturen der weißen Schubstanz verschiedene Relaxationsprofile aufweisen (POON und HENKELMAN 1992, MACKAY et al. 1994, WHITTALL et al. 1997, VAVASOUR et al. 1998). Mit dem quantitativen Zusammenhang der Relaxationsprofilamplitude vom Wassergehalt ist erstmals ein nichtinvasiver Zugang zur Bestimmung des absoluten Wassergehaltes verschiedener Gewebearten möglich (bisher nur mittels Biopsie). Auf dieser Grundlage erfolgte die Messung des absoluten Wassergehaltes für verschiedene Gewebestrukturen des menschlichen Gehirns (Tab. 1).

Das numerische Problem der Multiexponentialanalyse besteht in der Lösung von *N* Koeffizienten einer angenommenen *T<sub>2</sub>*-Verteilung  $f(T_2^i)$  für die unterschiedlichen Signal-Amplituden bei den Echozeiten *TE* mit  $A = A(TE)/A_0$ :

$$A = \sum_i^N f(T_2^i) \exp\left(-\frac{TE^i}{T_2^i}\right). \quad [1]$$

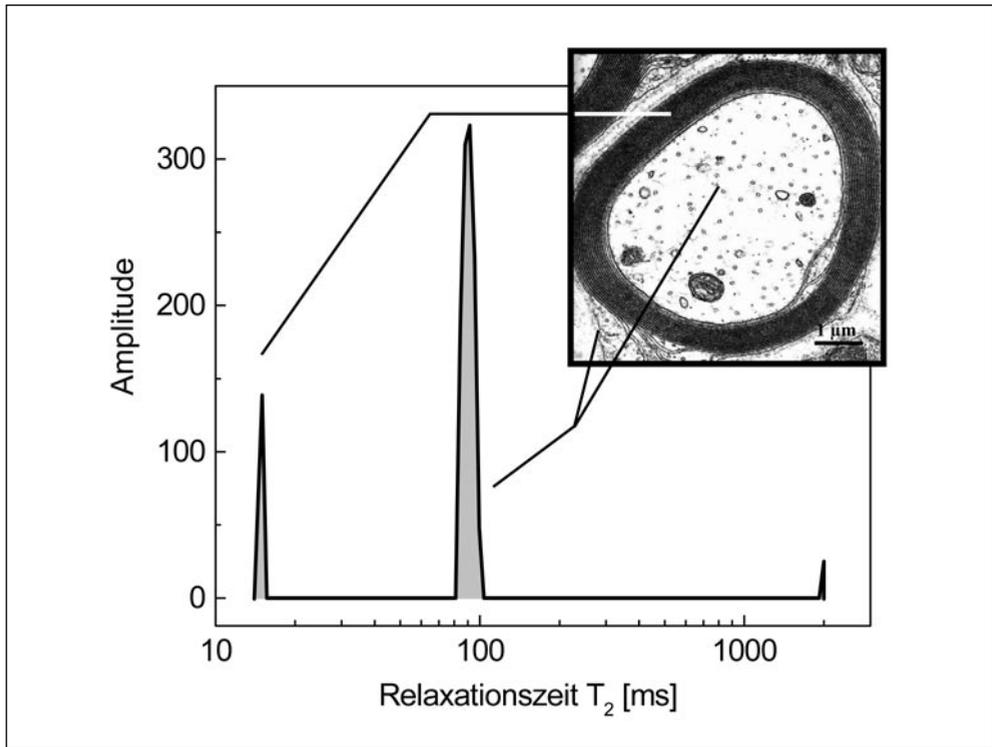


Abb. 3 Zuordnung der kurzen und mittleren  $T_2$ -Relaxationskomponenten zu verschiedenen Kompartments des Axons. Die mikroskopische Aufnahme zeigt die multilamellaren Myelinschichten, welche das Axon umgeben.

Tab. 1 Gegenüberstellung des mittleren absoluten Wassergehalts und des Myelin-Wasseranteils verschiedener typischer Gehirnstrukturen.

Gehirnstruktur	Absoluter Wassergehalt $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Myelin-Wasser-Fraktion MWF
Corpus callosum, Genu	0,721 ± 0,010	0,099 ± 0,010
Corpus callosum, Splenium	0,718 ± 0,010	0,013 ± 0,010
Minor forceps	0,705 ± 0,008	0,085 ± 0,009
Major forceps	0,697 ± 0,007	0,101 ± 0,009
Internal capsules	0,708 ± 0,009	0,150 ± 0,010
Mittelwert (weiße Substanz)	0,709	0,113
Caudate nucleus	0,875 ± 0,010	0,028 ± 0,004
Putamen	0,830 ± 0,009	0,039 ± 0,005
Thalamus	0,798 ± 0,010	0,058 ± 0,005
Insular cortex	0,841 ± 0,009	0,022 ± 0,004
Cortical GM	0,796 ± 0,007	0,022 ± 0,003
Mittelwert (graue Substanz)	0,828	0,034

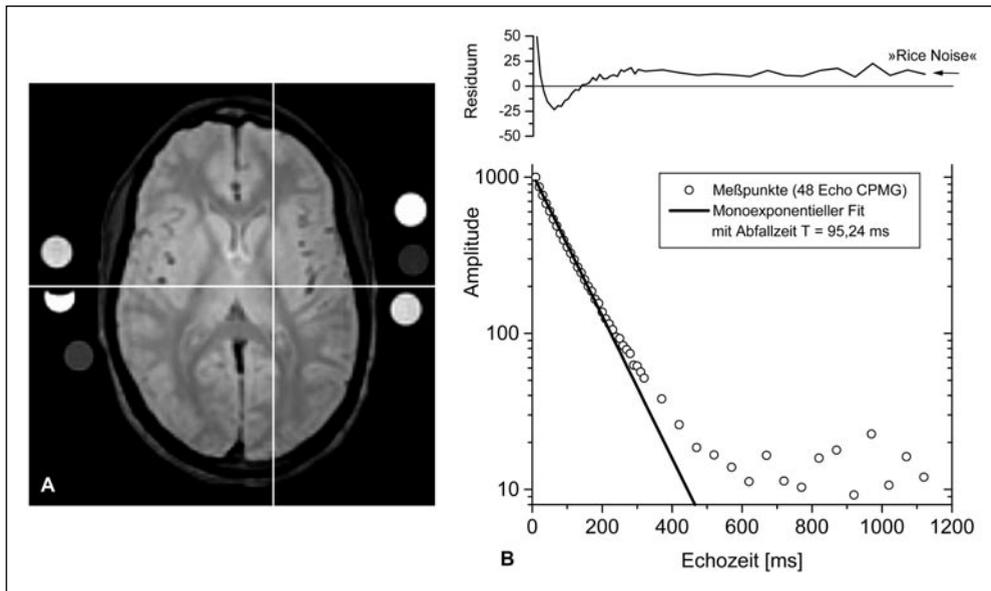


Abb. 4  $T_2$ -CPMG-Echo-Relaxationskurve (B) des in der linken Abbildung markierten Bildpunktes im *corpus callosum* eines gesunden Volontärs (A). Deutlich sind die Abweichungen des Fits von einem monoexponentiellen Verhalten (durchgezogene Linie) besonders bei Vorhandensein einer Rayleigh-Verteilung des Rauschvektors (»Rice Noise«) zu sehen. Die hellen und dunklen Kreise in der Abb. 1A sind die Wasserreferenzstandards bekannter  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten.

Die  $(T_2^i)$  repräsentieren ein Gitter von  $N$  benutzerdefinierten unterschiedlichen  $T_2$ -Werten. Der modifizierte NNLS-Algorithmus findet die Lösungen (oder Amplituden  $f(T_2^i)$ ) die den Misfit minimieren. Ein Standardkriterium für die Qualität des Fits ist die L2-Norm (Euklidische Norm):

$$\chi^2 = \sum_i^N \left| \frac{A(T_2^i) - A_{fit}(T_2^i)}{\sigma_i} \right|^2. \quad [2]$$

Klinische MRT-Bilder leiden oft aufgrund des Zeitfaktors – und weil die Untersuchungen für die Patienten nicht ungebührlich lange dauern sollen – unter schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen (*signal-to-noise ratio* – SNR). Wie aus der Literatur bekannt, führt das bei der inversen Analyse exponentiell abfallender Systeme zu einer unendlichen Anzahl unterschiedlicher Lösungen, die alle im gleichen Maße dem Kriterium des kleinsten Quadrate-Fits genügen (Minimum in  $\chi^2$ ) (WHITTALL et al. 1997). Deshalb wurde der NNLS-Algorithmus um zwei Modelle erweitert. Die Regularisierungsmethode (ENGL 1996) wichtet die L2-Norm der berechneten Lösung und ihrer Abweichung von der wirklichen (erlaubt einen durch den Regularisierungsparameter definierten Misfit der berechneten Lösung). Das führt zu einer geglätteten Verteilungsform im Gegensatz zur sonst sehr deltapeak-förmigen Lösungscharakteristik der NNLS L2-Norm (vgl. Abb. 5).

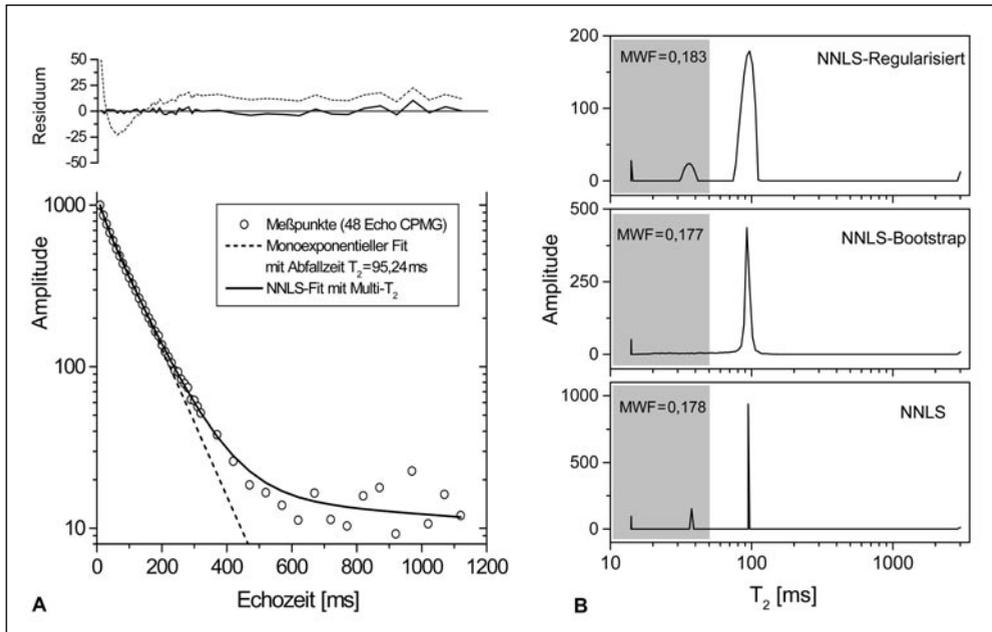


Abb. 5 Beispiele für multiexponentielle Datenanalyse mittels verschiedener Nicht-negative-kleinste-Quadrate (*non-negative least squares* – *NNLS*)-Algorithmen. In (A) ist dieselbe Echosignalabfallkurve wie in Abb. 4 zu sehen. Die durchgezogene schwarze Linie zeigt das Resultat mittels NNLS-Fit und das dazugehörige Residuum. (B) zeigt die entsprechenden  $T_2$ -Verteilungen für die unterschiedlichen NNLS-Verfahren. Die Angabe der Myelinwasserfraktion (MWF) bezieht sich auf ein Integrationsintervall zwischen  $10 \text{ ms} < T_2 < 50 \text{ ms}$  (grauer, schraffierter Bereich).

Die Bootstrap-Methode (»sich selbst an den Schnürsenkeln herausziehen«) beinhaltet die Modellierung verschiedener experimentell möglicher Rauschvektoren und testet damit die Varianz der numerisch berechneten Lösung unter dem Einfluß experimentellen Rauschens. Dies kann für Tausende experimenteller Datenvektoren in sehr kurzer Rechenzeit geschehen und führt zu ähnlichen breiten Verteilungsfunktionen der numerischen Lösung wie die Regularisierung (vgl. Abb. 5; MÄDLER et al. 2002a).

## 2.2 Diffusion-Tensor-Bildgebung (Diffusion Tensor Imaging)

Die für das Verständnis wichtigen diffusionsrelevanten Parameter seien im folgenden kurz erklärt. Während die Relaxometrie im wesentlichen empfindlich auf die molekulare Umgebung des beobachteten Wassers reagiert (Korrelationszeiten im Mikrometerbereich und Längenskalen im Submillimeterbereich) gibt die translatorische Diffusion ein gemittelt Abbild der molekularen Umgebung des beobachteten Wassers auf einer Längenskala von einigen Mikrometern. Entsprechend der Einstein-Gleichung für freie Diffusion (dreidimensional isotrope Diffusion) wächst das mittlere zeitliche Verschiebungsquadrat  $\langle r^2(t) \rangle$  proportional mit der Beobachtungszeit  $t$  bei konstantem Diffusionskoeffizienten  $D$ ,

$$\langle r^2(t) \rangle = 6Dt \quad [3]$$

Für freies Wasser bei 37 °C ( $D = 2,95 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ) und einer angenommenen minimalen Beobachtungszeit  $\Delta = 10 \text{ ms}$  für einen typischen klinischen MR-Tomographen ergibt sich eine mittlere Verschiebungsweglänge von etwa 10  $\mu\text{m}$ . Diese Weglänge übersteigt die Abmessungen fast aller zellulären Strukturen um ein Vielfaches. Somit ist das beobachtete Diffusionsverhalten in den meisten Fällen eingeschränkt (Diffusionsbarrieren durch interne Zellstrukturen oder -membranen) und aufgrund der heterogenen Zusammensetzung des menschlichen zellulären Gewebes zusätzlich anisotrop. Der Diffusionskoeffizient  $D$  in Gleichung [3] kann demnach nicht mehr als ein Skalar aufgefaßt werden, sondern muß als Größe mit Tensoreigenschaften (Eigenschaften variieren in Abhängigkeit von der Beobachtungsrichtung) verstanden werden. Daraus ergeben sich die relativ komplexen mathematischen Zusammenhänge wie z. B. in LE-BIHAN (1995) nachzulesen. Die Bestimmung des gesamten Diffusionstensors  $\hat{\mathbf{D}}$  mit seinen  $3 \times 3$  Elementen,

$$\hat{\mathbf{D}} = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix}, \quad [4]$$

von denen jeweils die Kreuzterme mit denselben Indizes gleich sind ( $D_{xy} = D_{yx}$  etc.), erfordert demnach mindestens sechs linear unabhängige Messungen (sieben bei unbekannter Signalamplitude zur Zeit  $t = 0$ ). Dies wird durch die geeignete Wahl von sechs, oder mehr, nicht-kollinearen Gradientenrichtungen für die diffusionsgewichtete Bildgebung erreicht. Der Nachteil der Tensorarstellung für  $\hat{\mathbf{D}}$  besteht darin, daß diese Größen jedoch von der Art des Bezugssystems abhängen (das Laborkoordinatensystem). Für eine rotationsinvariante Darstellung der Diffusionstensorelemente (unabhängig vom Laborkoordinatensystem) gibt es eine Reihe von Möglichkeiten, die im wesentlichen die Bestimmung der Eigenwerte  $\lambda_i$  des Tensors  $\hat{\mathbf{D}}$  beinhalten. Dies wird durch eine Matrixtransformation auf Diagonalgestalt  $\Lambda$  mit einer Rotationsmatrix  $\mathbf{R}(\mathbf{R}^T = \mathbf{R}^{-1})$  erreicht:

$$\Lambda = \mathbf{R}\hat{\mathbf{D}}\mathbf{R}^T \quad [5]$$

Die Art, in der die drei Eigenwerte  $\lambda_i$  voneinander verschieden sind, sagt etwas über den Grad der Anisotropie der Diffusion aus. Jeder Diffusionstensor hat seine ihm typischen Eigenwerte und ist dadurch mit der Angabe dieser vollständig charakterisiert. In der Literatur haben sich jedoch eine Reihe von den Eigenwerten abgeleitete Größen zur Beschreibung des Diffusionsverhaltens durchgesetzt, die im wesentlichen die Diffusionsgeometrien beschreiben. Ein diagonalisierter Diffusionstensor läßt sich mittels seines Ranges in einen von drei Fällen einordnen:

- linear:  $\lambda_1 \gg \lambda_2 \approx \lambda_3$  (ein Eigenwert dominiert): Diffusion findet hauptsächlich entlang einer Richtung statt, die dem größten Eigenwert entspricht.

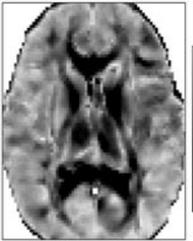
- planar:  $\lambda_1 \approx \lambda_2 \gg \lambda_3$  (zwei Eigenwerte dominieren): Diffusion erfolgt hauptsächlich in einer Ebene, die von beiden Eigenvektoren aufgespannt wird.
- isotrop (kugelförmig):  $\lambda_1 \approx \lambda_2 \approx \lambda_3$ : Diffusion erfolgt ohne eine Vorzugsrichtung (isotrope Diffusion).

In diesem Hauptachsensystem von Eigenvektoren kann jede Eigenvektormatrix in diese drei Komponenten zerlegt werden (vgl. Abb. 6 und Gleichung [6]).

$$\frac{1}{\bar{\lambda}} \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{bmatrix} = c_{\text{linear}} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} + c_{\text{planar}} \begin{bmatrix} \frac{1}{2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} + c_{\text{spherical}} \begin{bmatrix} \frac{1}{3} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{3} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{3} \end{bmatrix} \quad [6]$$

$\lambda_1 \gg \lambda_2 \approx \lambda_3$   
  
 Lineare Komponente

$\lambda_1 \approx \lambda_2 \gg \lambda_3$   
  
 Planare Komponente

$\lambda_1 \approx \lambda_2 \approx \lambda_3$   
  
 Isotrope Komponente

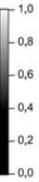


Abb. 6 Normierte Darstellungen des Diffusions-Eigenwertetensors in Form eines linearen, planaren und isotropen Anteils. Die eingefügten Bilder sind exemplarische Beispiele für ihre visuelle Darstellung.

Die Koeffizienten  $c_i$  werden als *Lineare*, *Planare* und *Isotrope Diffusivität* bezeichnet. Sie haben nach wie vor die physikalische Dimension einer Diffusion ( $\text{m}^2/\text{s}$ ). Darüber hinaus wird ebenfalls eine Reihe von normierten Invarianten in der Literatur erwähnt, denen jedoch der Nachteil der physikalischen Dimensionslosigkeit anhaftet. Im folgenden sind einige der weiter verwendeten Invarianten charakterisiert (BASSER et al. 1994, BASSER und PIERPAOLI 1998, BASSER 2002, CONTURO et al. 1996, BAHN 1999a, b, ULUG und VAN ZIJL 1999):

Spur:  $\text{Spur}(\hat{\mathbf{D}}) = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 = 3 \bar{\lambda}$  [7]

Determinante:  $\text{Det}(\hat{\mathbf{D}}) = \lambda_1 \lambda_2 \lambda_3$  [8]

Standardabweichung:  $\sigma(\hat{\mathbf{D}}) = \frac{1}{\sqrt{3}} \sqrt{(\lambda_1 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_2 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_3 - \bar{\lambda})^2}$  [9]

$$\text{Fraktionelle Anisotropie: } FA = \sqrt{\frac{3}{2}} \cdot \frac{\sqrt{3}\sigma(\hat{\mathbf{D}})}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}} \quad [10]$$

$$\text{Anisotropie: } A_\sigma = \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{\sigma(\hat{\mathbf{D}})}{\lambda} \quad [11]$$

Der Signalabfall eines NMR-Spin-Echos in Anwesenheit zweier unipolarer gepulster Gradienten vor und nach einem 180° Refokussierungs-HF-Impuls unter Einbeziehung von Translationsdiffusion und Vernachlässigung von beobachtungszeitabhängigen Relaxationseffekten ergibt sich aus (CALLAGHAN 1991, LEBIHAN 1995, BASSER 2002):

$$\frac{A(b)}{A_0} = \exp(-\mathbf{b} \circ \hat{\mathbf{D}}) = \exp\left(-\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} D_{ij}\right) \quad [12]$$

mit dem generalisierten Vektorprodukt des 3 × 3 Diffusionstensors  $\hat{\mathbf{D}}$  und der sogenannten b-Matrix  $\mathbf{b}$ , welche die Gradientenstärke und -richtung berücksichtigt:

$$\mathbf{b} = \alpha^2 \bar{g}_k \cdot \bar{g}_k^T = \alpha^2 g^2 \bar{r}_k \cdot \bar{r}_k^T \quad [13]$$

Der Parameter  $\alpha$  setzt sich aus dem gyromagnetischen Verhältnis, der Gradientendauer und der Beobachtungszeit entsprechend der Stejskal-Tanner-Gleichung (STEJSKAL und TANNER 1965) zusammen.

Für eine Gradientenrichtung reduziert sich Gleichung [12] auf einen skalaren Ausdruck, der die Echosignaldämpfung mit dem scheinbaren Diffusionskoeffizienten  $D_{ADC}$  (*apparent diffusion coefficient*) in Beziehung setzt:

$$\frac{A(b)}{A_0} = \exp(-bD_{ADC}) \quad [14]$$

$D_{ADC}$  hängt vom Laborbezugssystem ab (der Richtung der Gradienten und der Orientierung der Probe) und hat somit nur Bedeutung bei relativen Vergleichen. Zur quantitativen Analyse und zur Ableitung von Strukturparametern ist die vollständige Kenntnis des Diffusionstensors  $\hat{\mathbf{D}}$  nötig.

Durch Hauptachsentransformation und Berechnung der Eigenvektoren kann für jeden Bildpunkt, falls existierend, eine dominierende Diffusionsrichtung (Richtung des größten Eigenvektors) aus  $\hat{\mathbf{D}}$  ermittelt werden. Abbildung 7 (*links*) zeigt eine entsprechende Darstellung, welche die Projektion des jeweils größten Eigenvektors in die  $xy$ -Ebene beschreibt (Länge der Striche entspricht dem Betrag der Projektion in der  $xy$ -Ebene, Richtung entspricht der Richtung des größten Eigenvektors).

Wie eine Vielzahl von Experimenten verifizieren konnte, ist bei Vorhandensein einer ausgeprägt linearen Diffusion die Richtung des größten Eigenvektors mit der Richtung der Axonenfaserbündel identisch (BASSER et al. 2000). Ein Beispiel zeigt die rechte Darstellung in Abbildung 7 als einen vergrößerten Ausschnitt des Frontalbereichs eines menschlichen Gehirns mit den *minor forceps* und dem *genu des corpus callosum*.

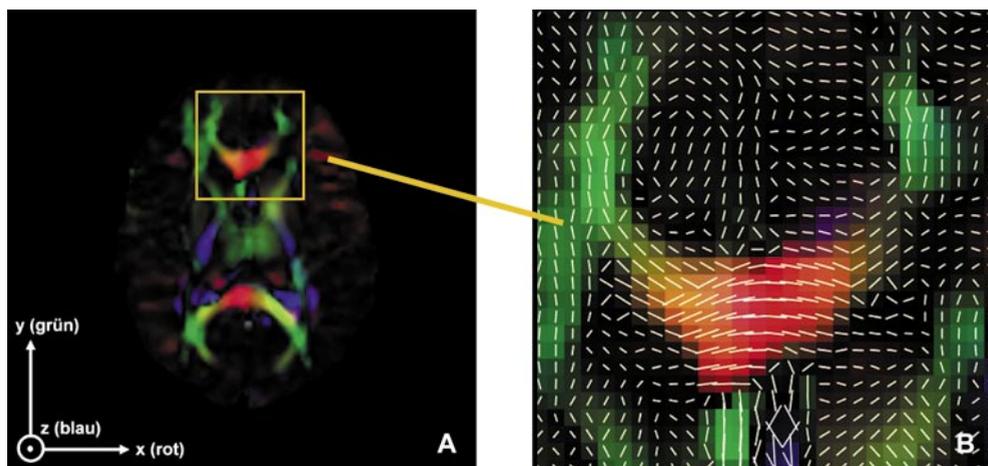


Abb. 7 Farbkodierte Darstellung des Verlaufs des größten Eigenvektors des Diffusionstensors für jedes Bildpixel mit Berücksichtigung der linearen Diffusionskomponente (A). Die Farben kodieren den Verlauf der Diffusion (rot: links ↔ rechts; grün: vorn ↔ hinten; blau: oben ↔ unten) und die Intensitäten den linearen (eindimensionalen) Charakter (je dunkler desto isotroper). In (B) ist ein vergrößerter Ausschnitt aus dem Bereich des *corpus callosum* (genu) abgebildet. Die Längen der Striche symbolisieren Betrag und Richtung der dominierenden Eigenvektoren in der axialen Projektionsebene als Vorstufe einer möglichen Rekonstruktion des Verlaufs der Axonenfaserbündel.

Komplizierter wird der Sachverhalt bei sich kreuzenden oder nichtkreuzenden, aber sich berührenden Fasern. Um auch in diesem Falle korrekte Aussagen über den Verlauf einzelner Axonenfaserbündel zu machen, sind in den letzten Jahren eine Reihe komplizierter mathematischer Algorithmen entwickelt worden, die über die DT-Bildgebung hinausgehende Informationen sowie statistische Tests und Energieminimierungsroutinen einbeziehen (FRANK 2001).

Mittels eines dreidimensionalen DT-Datensatzes, der das gesamte Gehirn erfasst, können somit Axonenfaserbündelverläufe sehr detailgetreu rekonstruiert werden. Das war bisher nur mittels optischer Mikroskopieverfahren im invasiven Tierversuch möglich oder blieb einzig dem Pathologen bei der Sezierung von *Post-mortem*-Gehirnen vorbehalten. Die nichtinvasive DT-Bildgebung mit der Erweiterung der Axonenfasertrajektometrie hat eine Vielzahl möglicher und sehr vielversprechender Applikationen, deren Darstellung den Rahmen dieser Abhandlung sprengen würde. Für einen Überblick empfiehlt sich BASSER (2000).

Für die Diffusionstensorbildgebung (DTI) wurden sieben verschiedene Gradientenrichtungen (Raumrichtungen des Laborkoordinatensystems) mit jeweils 16 verschiedenen *b*-Größen und einer Echo-Planar-Imaging-(EPI)-*Read-Out*-Sequenz benutzt. Das ergibt einen Gesamtdatensatz von 112 Einzelbildern, aus denen durch Umformung von Gleichung [12] der vollständige Diffusionstensor und die Signalamplituden bei  $TE = 0$  ms für jeden einzelnen Bildpunkt berechnet werden können.

Zur Berechnung der Tensordaten, Hauptachsentransformationen und Eigenwertberechnungen wurde ein Softwarepaket, aufbauend auf der Makroprogrammiersprache PV-Wave (Visual Numerics), entwickelt, daß auch klinischen Anwendungen zur Verfügung steht. Aufgrund des Rechenzeitaufwandes ist eine sofortige Datenauswertung am MR-Tomographen jedoch nicht möglich, sondern muß im Nachhinein an einer separaten Workstation erfolgen.

### 3. Resultate

#### 3.1 Myelin-Wassergehalt

Systeme mit homogener Wasserstruktur und -dynamik zeigen eine Deltafunktion in ihrer  $T_2$ -Relaxationsverteilung, was mit dem Auftreten nur eines Relaxationsprozesses und damit einer Korrelationszeit assoziiert werden kann. Heterogene, komplexe Systeme führen einerseits zu einer Verbreiterung der  $T_2$ -Verteilungen als auch zum Auftreten unterschiedlicher Relaxationszeiten, die unterschiedlichen molekularen Umgebungen des Wassers zugeordnet werden können. Abbildung 3 zeigt die Zuordnung eines typischen *In-vivo*- $T_2$ -Relaxationsprofils zu den verschiedenen Wasserreservoirs in der weißen Substanz.

Mittels der Annahme, daß das Integral über die Relaxationszeitverteilung direkt proportional der absoluten Gesamtwasserkonzentration ist, sowie der Verwendung äußerer Wasserreferenzstandards bekannter  $T_1$ -,  $T_2$ -Zeiten und Konzentration (vgl. Abb. 4, *links*) lassen sich die absoluten Wasserkonzentrationen der jeweiligen Gewebearten ermitteln. Für die Bestimmung des Myelin-Wasser-Anteils (Myelin-Wasser-Fraktion – MWF) ist die entsprechende Integration in den eingeschränkten Bereichsgrenzen von  $10 \text{ ms} < T_2 < 50 \text{ ms}$  durchzuführen:

$$\text{MWF} = \frac{\int_{0,01s}^{0,05s} S(T_2) dT_2}{\int_{0,01s}^{1,0s} S(T_2) dT_2} \quad [15]$$

Dabei ist jedoch die bei einer Wiederholzeit  $TR$  gemessene Signalintensität  $S_{TR}$  noch bezüglich der  $T_1$ -relaxationsbedingten Signaldämpfung zu korrigieren:

$$S_{\infty} = \frac{S_{TR}}{1 - \exp\left(\frac{-TR}{T_1}\right)} \quad [16]$$

Die sich daraus ergebenden mittleren Wasserkonzentrationen und der prozentuale Myelin-Wasser-Anteil (MWF) für eine Studie an 10 gesunden Probanden sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Deutlich ersichtlich weisen die Strukturen der grauen Substanz zwar einen höheren Absolutwassergehalt auf, wie zu erwarten, liegt jedoch der Myelinwasser-Anteil relativ niedrig (diese Strukturen enthalten keine oder nur geringe Prozentsätze an myelinbeschichteten Axonen). Der hohe Anteil von Myelinwasser im Thalamus (GM) läßt sich damit erklären, daß es *erstens* schwierig ist, das Gebiet für die Auswertung so einzugrenzen, daß es nur Gewebe des Thalamus enthält, und *zweitens* diese Struktur von Natur aus hohe Anteile an myelgestützter weißer Substanz enthält. Die erstmalige quantitative *In-vivo*-Bestimmung des absoluten Wassergehaltes mittels einer nichtinvasiven Methode liefert nicht nur nützliche Daten bezüglich des Zustandes des Gewebes, sondern ermöglicht darüber hinaus auch die absolute Quantifizierung markanter Stoffwechselprodukte mittels der *In-vivo*-NMR (Spektroskopie). Darauf wird im Kapitel über die Resultate an PKU-Patienten näher eingegangen.

### 3.2 Myelin-Kontrastbildung

Mittels eines  $T_2$ -Filters, der nur Relaxationsanteile mit  $T_2$ -Zeiten zwischen 10 und 50 ms berücksichtigt, läßt sich auch ein Myelinwasser-Konzentrationsprofil pixelweise berechnen – ein sogenanntes Myelinkontrastbild (Beispiele in Abb. 8, 11, 12, 15).

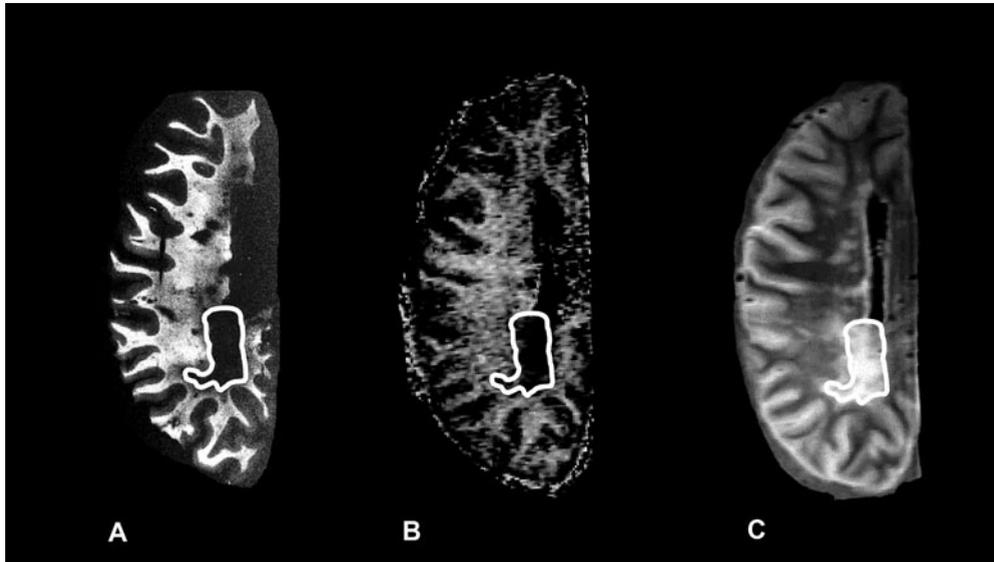


Abb. 8 Verschiedene Darstellungen eines axialen, fixierten (*post mortem*) Gehirnschnittes eines MS-Patienten. (A) optische Aufnahme eines mit *Luxol-Blau* gefärbten pathologischen Schnittes, (B) Darstellung der Myelin-Konzentration mittels der  $T_2$ -Relaxations-MRT; (C) MRT-Protonendichtebild (mit freundlicher Genehmigung von C. LAULE)

Wie zu erwarten, liegt eine besonders hohe Myelinkonzentration (helle Bildintensitäten) in den Bereichen der weißen Gehirnschubstanz (Bereiche mit geringerer Bildintensität in Abb. 4, *links*) vor und hier besonders in den *internal capsules*, dem *genu* und *splenium* des *corpus callosum* (vgl. Abb. 10).

Am Beispiel einer *Post-mortem*-Untersuchung eines MS-Patienten ist die gute Ergänzung dieser Technik mit herkömmlichen Verfahren gegenübergestellt. Abbildung 8 (*links*) zeigt eine axiale, seziierte Schicht eines Gehirns, bei dem das Myelin mittels *Luxol-Blau* angefärbt wird. Eine große Läsion (Fehlen von Myelin) ist im Bereich der parietalen weißen Substanz zu sehen (ROI in Abb. 8). Zwar ist diese Läsion auch in einem herkömmlichen protonengewichteten MRT-Bild zu unterscheiden (Abb. 8C), doch ist keine Entscheidung darüber möglich, inwieweit die von der Läsion betroffene weiße Substanz tatsächlich schon demyelinisiert ist. Diese Frage wird eindeutig mittels der  $T_2$ -Myelinkontrasttechnik gelöst. Wie in der mittleren Abbildung ersichtlich, zeigt das mittels  $T_2$ -Relaxationsanalyse erhaltene Myelinprofil deutliche Demyelinierung. Der eigentliche Bereich tatsächlicher vollständiger Demyelinierung ist aber signifikant kleiner, als die konventionelle MRT erwarten lassen würde (weiß umrandete ROI's). Somit kann schon der rein qualitative Aspekt der Myelindichteverteilungen interessante Hinweise auf die Ausdehnung und den Grad der Läsion geben. Viel präzisere Aussagen lassen sich jedoch

mit einer quantitativen Analyse erreichen. Am Beispiel einer klinischen Vergleichsstudie von Phenylketonuriepatienten und gesunden Probanden soll dies belegt werden.

### 3.3 Phenylketonurie

Die wenigen klinischen MRT- und *in-vivo*-spektroskopischen Studien zur genetischen Stoffwechselerkrankung PKU (SHAW et al. 1991, THOMPSON et al. 1993, ULLRICH et al. 1994, KREIS et al. 1995, NOVOTNY et al. 1995, PIETZ et al. 1995, 1996a, b, MÖLLER et al. 1997, 2000, WEGLAGE et al. 1998, KREIS 2000, LEUZZI et al. 2000) kommen mehr oder weniger zu dem Schluß, daß es neben den zwar auffälligen Plaques in der weißen Substanz, besonders in den Bereichen der lateralen Ventrikel (Pfeile in Abb. 2, *rechts*), ansonsten kaum abnormale MRT-Parameter zu beobachten gibt. Die Konzentration von Phenylalanin (Phe) ist selbst bei Patienten, die keine strenge Diät einhalten und daher stark erhöhte Phe-Werte im Blut aufweisen, im Gehirn nur schwer nachweisbar. KREIS et al. entwickelten die sogenannte Differenzspektroskopie zur *In-vivo*-Quantifizierung von Phe (KREIS et al. 1995) und konnten damit zumindest eine kinetische Verlangsamung des Phe-Abbaus bei PKU-Patienten und Verabreichung zusätzlicher externer Dosen von Phe feststellen. Ein Nachweis für die direkte Korrelation von erhöhtem Blut-Phe und Gehirn-Phe gelang ihnen aber damit nicht. Diese Frage ist von besonderer Bedeutung für die Klärung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (*Blood Brain Barrier* – BBB) bei PKU-Patienten.

In der hier vorgestellten Studie wurden 10 PKU-Patienten sowie 10 komplementäre gesunde Kontrollpersonen demselben MRT-Protokoll unterzogen: protonengewichtete MRT-Bildgebung, eine FLAIR (*fluid attenuated inversion recovery*)-Sequenz zur Unterdrückung von sogenannten Strömungs- und Flußartefakten (durch Blutgefäße und Strömung der Gehirnflüssigkeit), <sup>1</sup>H-Single-Voxel-Spektroskopie mit Wasserunterdrückung und 48-Echo-CPMG-T<sub>2</sub>-Relaxationsbildgebung.

Ein typisches <sup>1</sup>H-Metabolitenspektrum bei 1,5 T zeigt Abbildung 9. Die Quantifizierung der Hauptstoffwechselkomponenten Choline (Cho), Kreatin (Cre) und N-Acetylaspartat (NAA) ist mittels LC-Model (Programmpaket Steve PROVENCHER) und durch die Messung des absoluten Wassergehaltes im selbigen Voxel erfolgt. Die Resonanz des Phe liegt bei höheren chemischen Verschiebungen (niedrigeren Frequenzen) zwischen 7,1–7,2 ppm. Die Trennung des Phe-Signals ist durch breitliniige Signalüberlagerung von Makromolekülen sehr erschwert und lag in fast allen Fällen unterhalb der Nachweisgrenze.

Wie in Tabelle 2 zusammengefaßt, gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen der drei Metaboliten Cholin, Kreatin und NAA. Unsere verstärkte Aufmerksamkeit galt daher der Analyse des Myelingehtes. Durch die Präsenz der teilweise sehr großflächigen Läsionen und Abnormalitäten in der weißen Substanz war die Frage zu klären, inwieweit das Myelin tatsächlich, trotz strenger Diät in den Entwicklungsjahren der Patienten bis etwa zum 16. Lebensjahr, verändert oder angegriffen ist.

Abbildung 10 stellt die Ergebnisse der ROI-basierten Analyse bestimmter Hirnstrukturen der grauen und weißen Substanz zusammen. Die überwiegende Anzahl dieser Strukturen weist im Mittel bei PKU-Patienten geringere MWF auf als bei den entsprechenden Vergleichspersonen. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nur für *putamen*, *minor forceps* und *genu*, wobei die Strukturen der weißen Substanz im statistischen Mittel einen niedrigeren Myelinanteil, die der grauen Substanz jedoch einen höheren MWF für PKU-Patienten aufweisen.

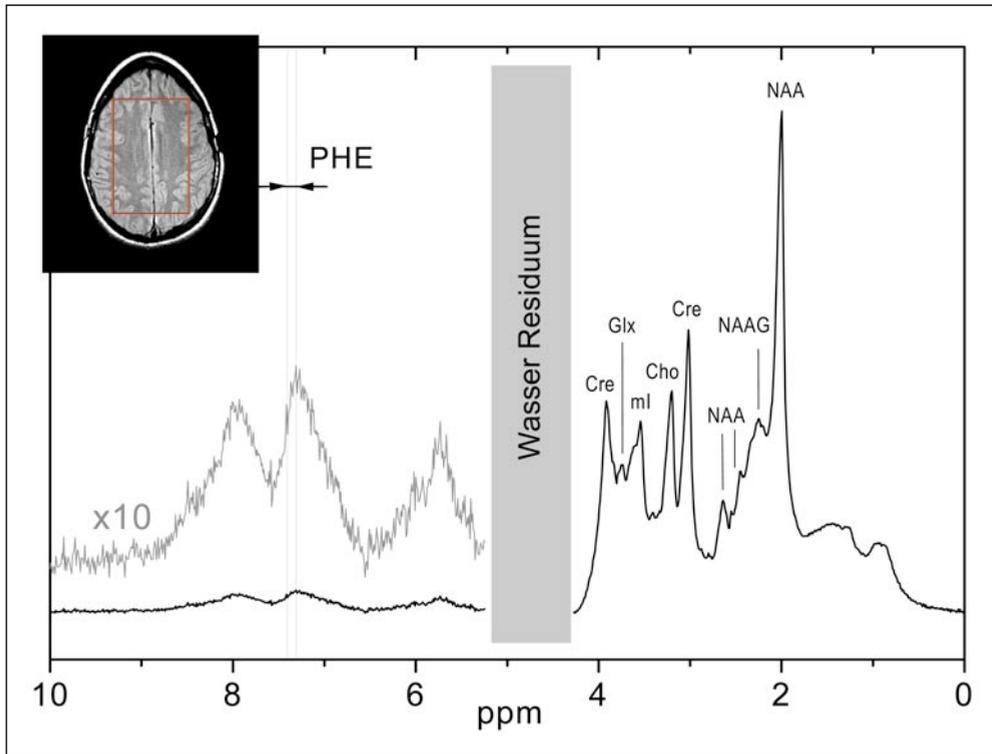


Abb. 9 Typisches *In-vivo*-<sup>1</sup>H-Spektrum eines etwa 100 ml großen Voxels der weißen Substanz aus dem Bereich des Centrum semiovale eines gesunden Probanden. Gekennzeichnet sind die typischen Hirnmetaboliten, die bei einer Magnetfeldstärke von 1,5 T detektiert werden können: Kreatin (Cre), Glutamin/Glutamat (Glx), myo-Inositol (ml), Choline/Phosphocholine (Cho), N-Acetylaspartat (NAA/NAAG). Die Resonanzlinie des Phenylalanin (Phe) liegt bei weit geringeren Frequenzen und ist von breitbandigen Basisliniensignalen (Makromoleküle) überlagert, was die Trennung und Quantifizierung enorm erschwert. Bei gesunden Probanden liegt die natürliche Phe-Konzentration im Gehirn unterhalb der Nachweisgrenze.

Tab. 2 Konzentrationen (in mM) und Standardabweichung (in Klammern) der Hauptmetaboliten Cho, Cre und NAA für jeweils 10 PKU-Patienten und 10 normale Kontrollpersonen.

Metabolit	Normal	PKU
Cholin (mM)	1,53 (0,16)	1,72 (0,25)
Kreatin (mM)	7,60 (0,28)	8,40 (0,56)
NAA (mM)	9,29 (0,55)	10,20 (0,65)

Daß die Strukturen der weißen Substanz niedrigere Myelingehalte aufweisen, scheint die Hypothese zu unterstützen, daß es trotz Einhaltung strenger phenylalaninreicher Diät zu bleibenden Schädigungen der Myelinscheiden kommt, die auch eine Erklärung für die bekannten neurologischen Störungen der Patienten wären.

Mit der pixelweisen Konstruktion der Gesamtmyelin-Verteilung läßt sich diese Schlußfolgerung erhärten. Alle PKU-Patienten zeigten mehr oder weniger starke Defizite in den

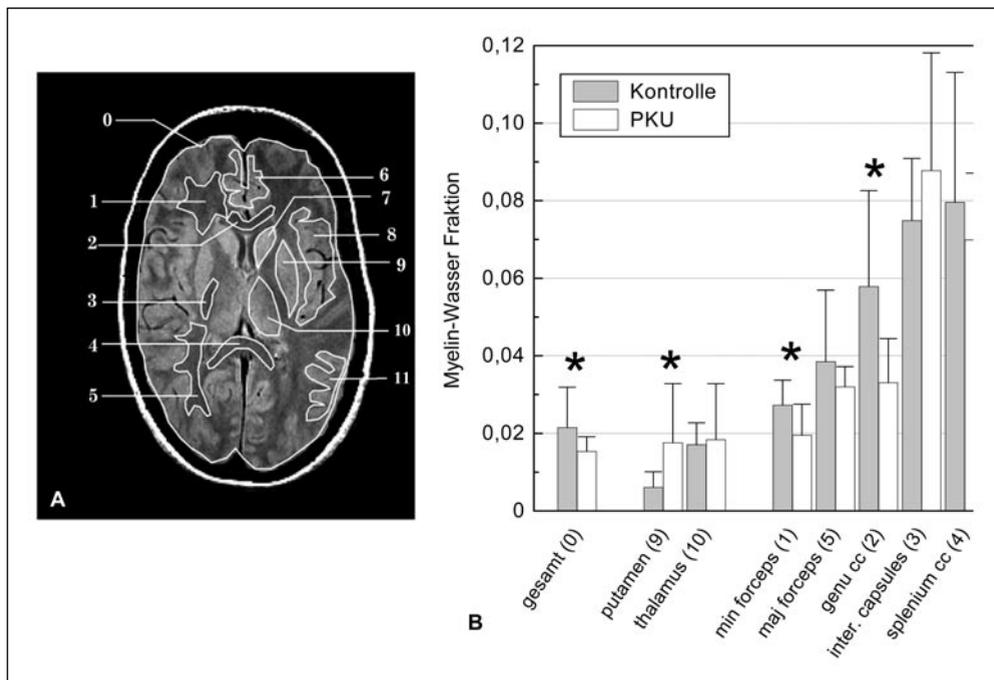


Abb. 10 Zusammenfassung der Analyse der Myelin-Wasser-Fractionen für 10 gesunde Probanden und 10 PKU-Patienten. Der Analyse der MWF erfolgte auf der Basis verschiedener ROIs an 5 Strukturen der weißen Substanz (WM) (A: 1–5) und 6 Strukturen der grauen Substanz (GM) (A: 6–11) einer axialen Gehirnschicht durch das Genu und Splenium des Corpus callosum als auch an einem ROI, das sämtliche Strukturen beinhaltet (A: 0). (B) stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen zusammen. Strukturen, die mit einem Stern gekennzeichnet sind, bezeichnen Resultate innerhalb des 95%-Signifikanzintervalls.

Myelinkontrastbildern. Ein typisches Beispiel ist in Abbildung 11 dargestellt. Besonders die vereinzelt vollständige Absenz von Myelin in Bereichen der *minor* und *major forceps* (rechte Pfeile in Abb. 11, *rechts*) macht dies deutlich. Diese teilweise dramatisch anmutenden Sachverhalte scheinen im Widerspruch zu den vorher diskutierten Ergebnissen zu stehen, wohingegen eine ROI-basierte Analyse zu weniger drastischen Resultaten führt. Ruft man sich aber ins Gedächtnis, daß die ROI-Analyse einen Mittelwert über einen relativ großen anatomischen Bereich im Gehirn bewertet (einige 100 bis 1000 Bildpunkte), können einzelne, lokal begrenzte Myelindefekte natürlich in der Mittelwertanalyse untergehen. Weiterhin ist das Definieren der ROIs stark subjektiv durch den Analysator geprägt (die ROIs werden mittels Auge und Computermaus durch den Auswertenden am Bildschirm definiert).

Dieses Problem umgehend wurde eine operatorunabhängige Bewertung der Myelinverteilungen mittels Histogrammanalyse entwickelt. Abbildung 12 zeigt Beispiele für das geometrische Mittel der  $T_2$ -Verteilung (*links*) und der Myelin-Wasser-Fraktion MWF (*rechts*). Die entsprechenden normierten Histogramme, d. h. normierte Anzahl der Pixel mit gleichen Absolutwerten (unten), zeigen deutliche Verschiebungen zwischen gesunden und PKU-Probanden. Während die Verteilungskurven der MWF bei PKU-Patienten zu kleineren Werten verschoben sind (d. h. im Mittel weniger Myelin), zeigen die Verteilungskurven des geometrischen Mittels

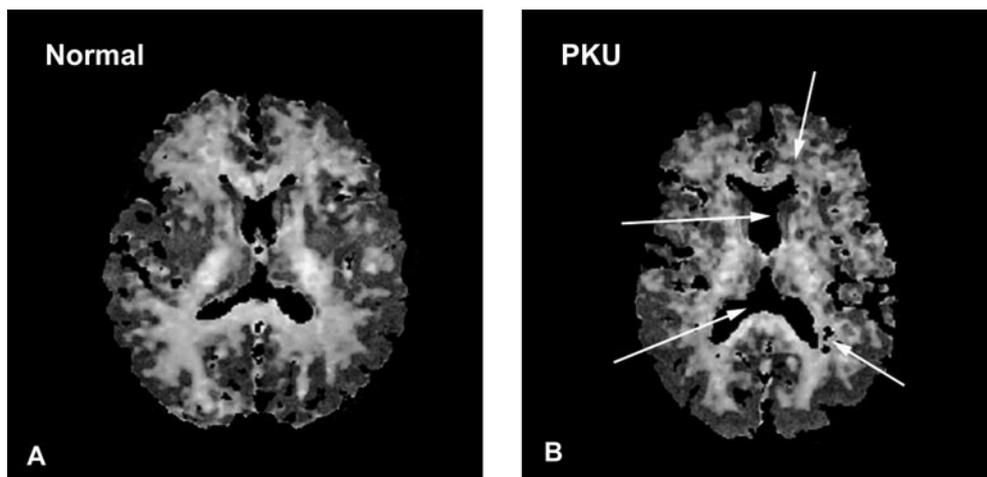


Abb. 11 Bildliche Darstellung der MWF-Verteilung einer axialen Schicht durch das Gehirn eines gesunden Probanden (A) und eines 23jährigen Phenylketonurie-Patienten (B). Die Pfeile symbolisieren pathologisch auffällige Erscheinungen, wie vergrößerte laterale Ventrikel als auch lokale partielle Demyelinierungserscheinungen in einigen Strukturen der weißen Substanz.

der  $T_2$ -Relaxation eine Verbreiterung und eine Verschiebung zu größeren  $T_2$ . Dies ist konform mit der Interpretation einer Lockerung zellulärer Verbände (weniger Wechselwirkung der Wasserprotonen mit Nicht-Wasserprotonen) und im Mittel weniger Myelinschichten.

Diese ersten Ergebnisse werden zur Zeit in einer umfangreichen Studie an der *University of British Columbia* mit 20 PKU-Patienten und 20 gesunden Vergleichspersonen verifiziert. Darüber hinaus werden neurologische und kognitive Tests einbezogen, die mit den MRT-Resultaten korreliert werden sollen, um eine mögliche Kopplung von Myelindefiziten und neurologischen Problemen aufzuzeigen.

### 3.4 Myelinge halt und Diffusionsanisotropie (Anwendung für Multiple Sklerose)

Die größte Beschränkung der beschriebenen  $T_2$ -Relaxationsmethode zur Bestimmung des Myelinge halt stellt ihre begrenzte Verfügbarkeit für Multischicht- oder Volumenanalysen dar (Magnetisierungstransferprozesse zwischen mehreren angeregten MRT-Schichten stören die  $T_2$ -Quantifizierung).

Besonders für die Anwendung bei Multipler Sklerose ist jedoch eine Einbeziehung des maximal zugänglichen Hirnvolumens ungeheuer wichtig, da das Auftreten von Läsionen häufig nicht auf eine bestimmte Schicht im Gehirn beschränkt ist, sondern im Gegenteil räumlich sehr verteilt auftreten kann. Um jedoch Studien verschiedener Personen oder aufeinanderfolgende Studien derselben Personen über einen langen Zeitraum vergleichbar und auswertbar zu gestalten, ist eine größtmögliche Überdeckung des gesamten Hirnvolumens notwendig. Diesbezüglich ließen die in den letzten Jahren verstärkt publizierten Daten über DTI-Anomalien in MS-Läsionen diese Technik als besonders vielversprechend erscheinen (GROSSMAN und MCGOWAN 1998, HORSFIELD et al. 1998, MILLER et al. 1998, BARKHOF und VAN WALDERVEEN 1999, CERCIGNANI et al. 1999, DROOGAN et al. 1999, WERRING et al. 1999, BAMMER et al. 2000,

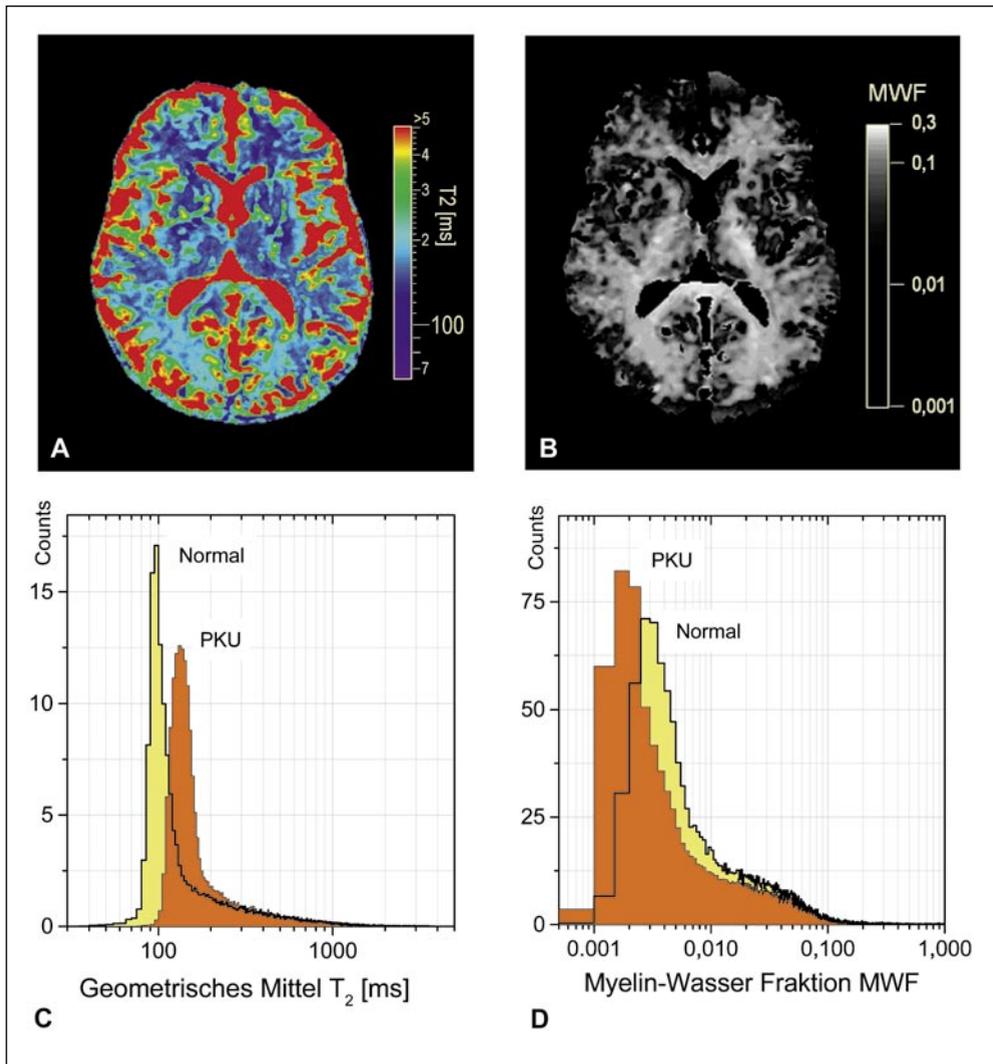


Abb. 12 Operatorunabhängige, pixelweise Auswertung der Bilddaten (A: GM-T<sub>2</sub>; B: MWF) mittels Histogrammanalyse (C, D). Die Histogramme stellen jeweils eine typische Verteilungsfunktion eines gesunden Probanden (gelb) und eines PKU-Patienten (orange) für den geometrischen Mittelwert T<sub>2</sub> und den Myelin-Wasseranteil dar.

FILIPPI et al. 2000, 2001, NUSBAUM et al. 2000, ROVARIS und FILIPPI 2000, ASSAF et al. 2002). Sie ist schnell und erlaubt ohne praktische Limitierungen eine vollständige volumenmäßige Erfassung des gesamten Hirnvolumens.

Frühere Diskussionen beruhten auf der simplen These einer direkten, linearen Korrelation von Diffusionsanisotropie (z. B. der Fraktionellen Anisotropie vgl. Gleichung [9]) mit dem Myelinisierungsgrad. Studien an Neugeborenen, die z. B. noch kaum myelinisierte Hirnstrukturen aufweisen (HUPPI und BARNES 1997, MORRIS et al. 1999, BYDDER und RUTHERFORD 2001, BYDDER et al. 2001, GELAL et al. 2001, HUPPI und Inder 2001, PAUS et al. 2001, WOLF et al.

2001, ENGELBRECHT et al. 2002), oder Tierversuche an extrahierten entmyelinisierten Axonen (BEAULIEU und ALLEN 1994) konnten jedoch eine, wenn auch reduzierte, Diffusionsanisotropie nachweisen. Die Fragestellung nach der prinzipiellen Anwendung der DTI bei der diagnostischen Verifizierung des Myelingehtes von Hirnstrukturen läßt sich somit auf die Frage reduzieren, inwieweit beide Parameter tatsächlich miteinander korreliert sind.

Die folgenden Ergebnisse einer Pilotstudie mit 10 gesunden Testpersonen sind als Motivation zur Klärung dieser Fragestellung zu verstehen. Ihre praktische Anwendbarkeit (z. B. für MS) wird zur Zeit in einer dreijährigen Langzeitstudie an der *University of British Columbia* getestet.

Abbildung 13 faßt die Ergebnisse einer ROI-basierten Gegenüberstellung von Myelin-Wasser-Fraktion (MWF) und Fraktioneller Anisotropie des Diffusionstensors (FA) zusammen. Größe, Anzahl und Lage der ROIs entsprechen weitgehend den in Abbildung 10 verwendeten für die PKU-Studie.

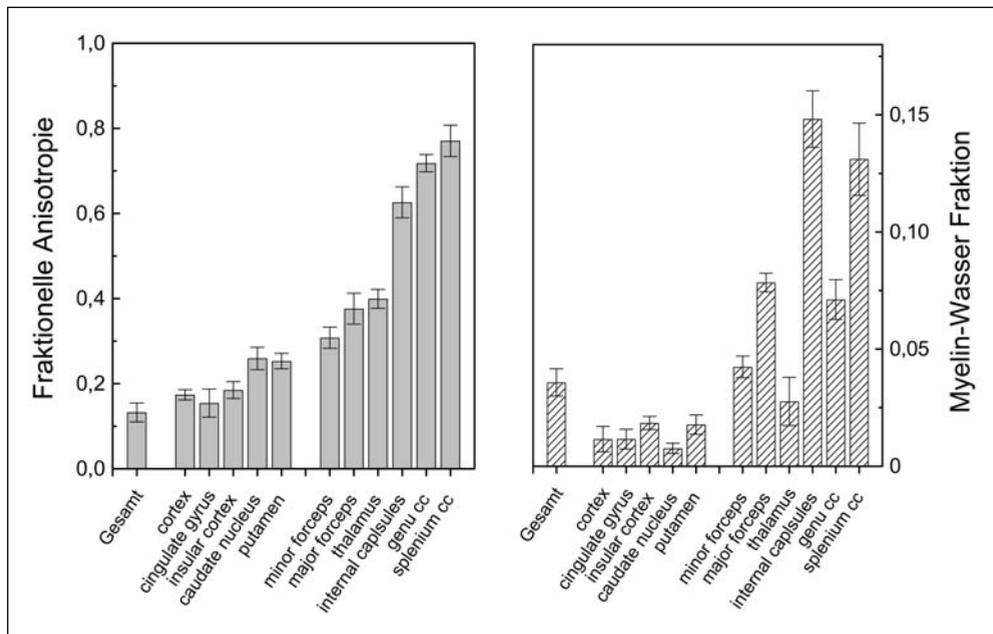


Abb. 13 Gegenüberstellung der ROI-basierten Mittelwertanalyse der Fraktionellen Anisotropie der Diffusion (FA – links) und der Myelin-Wasser-Fraktion (MWF – rechts) mit den entsprechenden Standardabweichungen für jeweils 10 normale Versuchspersonen. Die Gehirnstrukturen entsprechen im wesentlichen den in Abb. 10 bezeichneten.

Eine lineare Korrelation von FA und MWF ist aus beiden Diagrammen in Abbildung 9 nicht ohne weiteres ersichtlich. Da hier nur Mittelwerte dargestellt sind, war es naheliegend, die individuellen Daten für jede einzelne Person gegenüberzustellen, um zu klären, ob die Abweichungen von einem linearen Zusammenhang eventuell durch die Streuung der einzelnen Datensätze erklärt werden können. Eine lineare Regressionsanalyse der individuellen Datenpunkte ist in Abbildung 14 dargestellt. Ein Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0,742$  ( $p < 0,0001$ ) zeigt eine relative starke Korrelation zwischen FA und MWF. Darüber hinaus

ist aber festzustellen, daß einige Datenpunkte strukturspezifische Cluster bilden, die relativ weit entfernt von der linearen Korrelationsgeraden liegen (Abb. 14 z. B. *thalamus* und *genu*). Ein weiteres interessantes Resultat stellt der Sachverhalt dar, das der Intersektionspunkt der Regressionsgerade mit der Ordinate nicht bei FA = 0 sondern vielmehr bei FA = 0,18 liegt. Die Daten sind somit in Übereinstimmung mit einer nichtverschwindenden Anisotropie der Diffusion selbst bei Abwesenheit von Myelin. Die starke Varianz der Daten und gleichzeitige Clusterung der individuellen Datensets ließ einen systematischen Fehlen durch die subjektive Wahl der ROIs möglich erscheinen.

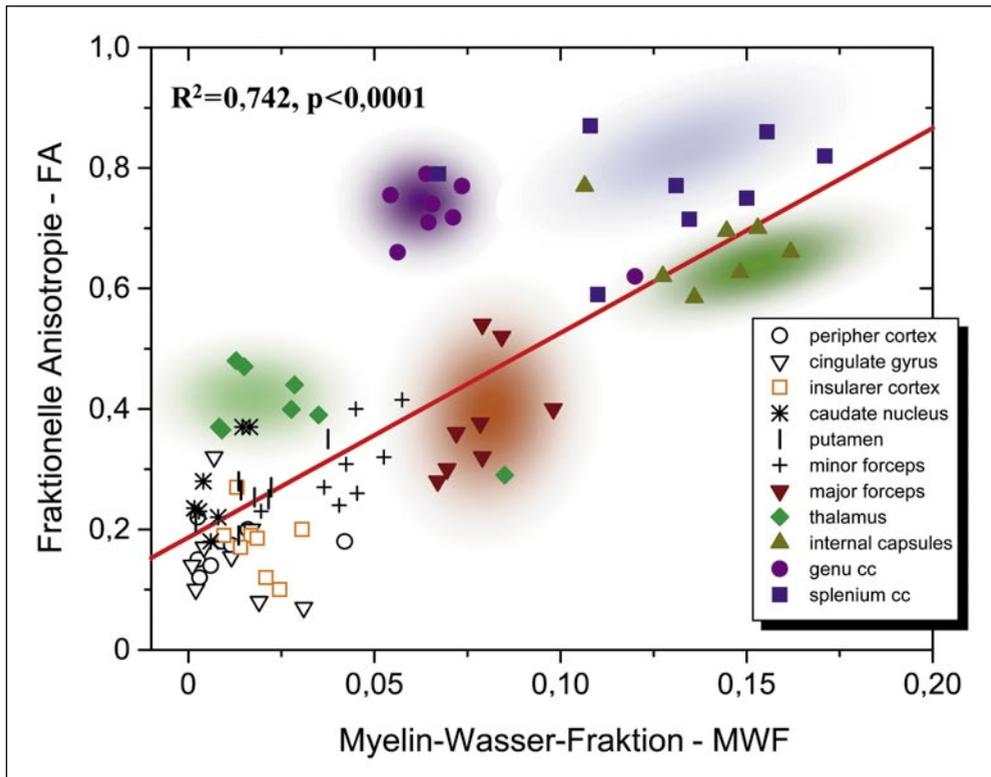


Abb.14 Darstellung der individuellen Daten von Abb. 13 mit Resultat der linearen Regressionsanalyse.

Wie im Falle der Analyse der PKU-Datensätze bestand auch hier das Ziel, diese subjektive Komponente eines systematischen Fehlereintrages weitestgehend zu eliminieren. Ein erster Schritt einer punktwweisen Korrelationsanalyse bestand also darin, die Daten der Diffusions- und Relaxationsmessung konform aufeinander abzubilden. Dies berührt die Thematik der Koregistrierung zweier Bilder. Dabei waren zwei wesentliche Hürden zu überwinden. *Erstens* können die Bildkontraste beider MRT-Experimente sehr unterschiedlich sein, *zweitens* entstehen durch Anwendung der Single-Shot-Echo-Planar-Imaging(EPI)-Technik starke nichtlineare Bildverzerrungen aufgrund von elektrischen Wirbelströmen, die durch die Anwendung starker Gradienten im MRT-Magneten induziert werden und somit das homogene Magnetfeld  $B_0$  stö-

ren. Die automatische Bildregistrierung von FA- auf MWF-Bildern mit dem Programm SPM (*Statistical Parametric Mapping*) war aus diesem Grunde nicht erfolgreich. Deshalb wurde ein Programm entwickelt, daß die Einbeziehung manuell definierter Referenzpunkte (in der Regel 20–30) in beiden Bilddarstellungen erlaubt. Diese Punkte werden in beiden Datensätzen vollständig miteinander zur Deckung gebracht. Sämtliche andere Bildpunkte werden durch eine zweidimensionale nichtlineare Bildtransformation mittels Translation, Drehung, Dehnung, Stauchung und Scherung transformiert, und zwar so, daß das Resultat (Abb. 15, oben) ein minimales normiertes Differenzbild ergibt.

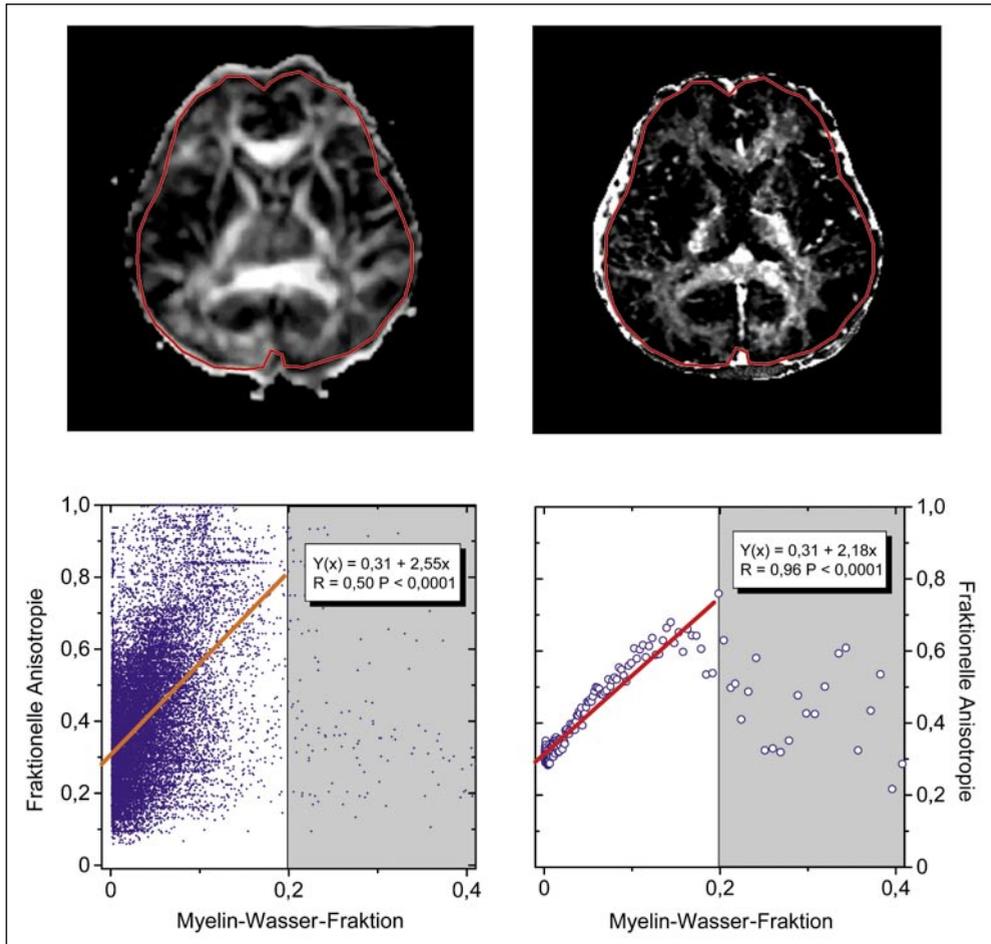


Abb. 15 Beispiel für Bildpixel-basierte Korrelationsanalyse von Fraktioneller Anisotropie (FA) und Myelin-Wasser-Fraktion (MWF). (A): FA-Bild aus DTI-Messung; (B): MWF-Kontrastbild aus 48-Echo-CPMG-Sequenz und Analyse der  $T_2$ -Verteilungsamplituden. Die roten Umrandungen zeigen jeweils den Bereich der für die Analyse berücksichtigten Bildpunkte (nach konformer Bildtransformation). (C): Korrelationsdarstellung aller berücksichtigten 23,692 individuellen Bildpunkte; (D): Korrelationsdarstellung nach Zusammenfassung aller FA-Bildpunkte gleicher MWF (Bin-Intervall 0,0001).

Bei entsprechend erfolgreicher Registrierung (nicht in allen Fällen möglich, z. B. beim Auftreten extremer EPI-Artefakte) können nun die einzelnen Bildpixel einer direkten, pixelweisen Korrelationsanalyse unterworfen werden. Die Einbeziehung aller 23,692 individuellen Bildpunkte (bei nominaler Bildauflösung von  $256 \times 256$  Punkten) ergibt die Darstellung in Abbildung 15 (*unten, links*).

Die hohe Streuung der Werte erklärt sich durch die große Standardabweichung im Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) der entsprechend rekonstruierten Bilddaten. Durch eine Zusammenfassung und Mittelung von Bildpunkten der FA mit gleicher MWF ergibt sich der Funktionsverlauf in Abbildung 15 (*rechts*). Durch die Mittelung sehr vieler Meßdaten (teilweise mehrere 100 Einzelmessungen/Pixel) kann die Standardabweichung extrem verkleinert werden, und es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen Fraktioneller Diffusionsanisotropie (FA) und der Myelinkonzentration (MWF) mit einem sehr hohen Korrelationsgrad ( $R^2 = 0,92$ ). Diese Analyseverfahren funktionieren vollständig operatorunabhängig, nachdem man eine gute Koregistrierung der Bilddaten erreicht hat.

Die Ergebnisse der ROI-Analyse werden zwar prinzipiell bestätigt, es zeigt sich aber, daß die unkorrelierte Clusterbildung nicht auftritt. Vielmehr ist ein im Rahmen statistischer Signifikanz streng linearer Zusammenhang zwischen Myelinierungsgrad und Diffusionsanisotropie festzustellen. Die in Abbildung 15 grau schraffierten Bereiche kennzeichnen die Grenzen der experimentellen Zugänglichkeit für die Bestimmung von Myelin-Wasser-Fractionen. MWF höher als 0,3 sind experimentell nicht zu verifizieren. Sie werden durch Artefakte verursacht sowie durch den Umstand erklärt, daß auch Fett eine sehr kurze  $T_2$ -Komponente ( $T_2 < 40$  ms) aufweist und daher bei der globalen Analyse (ohne weitere Filterung der Komponenten) zum Myelinanteil beitragen kann. Da das Vorhandensein von Fett lediglich auf die das Gehirn umgebende Schädeldecke begrenzt ist, kann dieser Faktor in den Myelincontrastbildern leicht eliminiert werden. Einen anderen Störfaktor, hauptsächlich im Bereich der lateralen Ventrikel, bilden Signalanteile von Gehirnflüssigkeit, die sich während der Messung bewegt. Dadurch entstehen Magnetisierungstransfers in die oder aus der angeregten axialen Bildschicht, welche zu einer Verfälschung des NMR-Signals führen. An einer Sequenz, die diesen Störeinfluß minimiert (kardio-getriggerte FLAIR-CPMG) wird gearbeitet.

Bemerkenswert ist die Bestätigung des Sachverhaltes, daß Diffusionsanisotropie nicht notwendigerweise an das Vorhandensein von Myelin gekoppelt sein muß (Intersektion der Korrelationsgeraden für  $MWF = 0$  bei  $FA = 0,31$ ). Dieses Resultat deckt sich mit den Beobachtungen in Embryos und Neugeborenen.

#### 4. Zusammenfassung

Anhand zweier klinisch relevanter Beispiele konnte die Leistungsfähigkeit der quantitativen  $T_2$ -Relaxationszeitmessung für die Myelinkonzentrationsbestimmung sowie der strukturellen Integritätsprüfung myelinierter Strukturen der weißen Substanz des ZNS demonstriert werden. Die interessanten Resultate zur Korrelation von Myelingeht und Diffusionsanisotropieverhalten bedürfen weiterer Experimente und Analysen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß diese Ergebnisse zum grundsätzlichen Lösen des Problems der Modellierung des menschlichen Gehirns sowie dem Verständnis der Kopplung von Struktur und Funktion beitragen.

Die Ergebnisse der klinischen PKU-Studie zeigen eindrucksvoll die Potenzen und Möglichkeiten dieser Methoden, die mittlerweile einen festen Platz in den klinischen MRT-Protokollen der UBC und des *Vancouver General Hospital* einnehmen.

Eine erste Fortsetzungsstudie mit 10 MS-Patienten und 10 gesunden Vergleichspersonen, die zwischen 2000 und 2002 an der UBC durchgeführt wurde, befindet sich noch im Stadium der Auswertung. Detaillierte Vergleiche verschiedener MR-Parameter, wie Magnetisierungstransfer,  $T_1$ -Relaxation, Stoffwechselkonzentrationen (NAA, Inositol, Choline) sowie die Bestimmung des mobilen Lipidanteils, konnten zwar signifikante Unterschiede zwischen MS-Läsionen und gesunden Bereichen im menschlichen Gehirn feststellen, eine Korrelation dieser Parameter mit der Myelinkonzentration als Charakterisationsparameter für den Schädigungsgrad der myelinisierten Axone konnte jedoch nicht statistisch zweifelsfrei nachgewiesen werden. Das bestätigt den relevanten Stellenwert der  $T_2$ -Relaxations- und Diffusionstensorverfahren gerade für quantitative Aussagen und läßt die Anwendung der multiexponentiellen  $T_2$ -Analyse im Zusammenspiel mit der Diffusionstensoranalyse besonders erfolgversprechend erscheinen.

### *Dank*

Mein herzlicher Dank gilt der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina für die großzügige dreijährige Förderung dieses Forschungsprojekts, der finanziellen Beteiligung an Reisekosten zur Teilnahme am »Annual Meeting of the International Society of Magnetic Resonance in Medicine« (ISMRM) 1999 in Baltimore, USA und die Ermöglichung meiner Teilnahme an der »7. NMR Summer School« 1999 in Waterloo, Kanada.

Ganz besonders herzlich möchte ich natürlich meinem Kooperationspartner und wissenschaftlichen Mentor Prof. Dr. Alex MacKAY (Department of Physics, University of British Columbia, Vancouver, Kanada) danken, der mir eine exzellente Arbeitsatmosphäre offerierte und immer Zeit für Ideen und neue experimentelle Umsetzungen fand. Dieses Lob möchte ich auf die Mitarbeiter der gesamten Arbeitsgruppe ausweiten, die es meiner Familie und mir besonders leicht gemacht haben, uns in Vancouver wie zu Hause zu fühlen. Besonders möchte ich hier erwähnen: Frank Linseisen, Cornelia Laule, Irene Vavasour, Elana Brief, Ken Whittall und Myer Bloom. Ein weiterer Dank gilt den Radiologieassistentinnen am MRT des UBC-Hospital für ihre Freundlichkeit, Kooperationsbereitschaft und Hilfe beim Umgang mit Patienten.

*Last but not least* gilt meine tiefe Dankbarkeit meiner Frau Ute und meinen Töchtern Sophia und Charlotte, die sich nicht gescheut haben, die für sie nicht einfache Entscheidung zu treffen, mich ins Ausland zu begleiten und mir in vielen Dingen den Rücken frei gehalten haben.

»There is nothing  
spins will not do for you,  
as long as you treat them as human beings!«  
Ernst Bloch

Literatur

- <http://www.m-ww.de/krankheiten/erbkrankheiten/phenylketonurie.html>
- ABRAGAM, A.: The Principles of Nuclear Magnetism: The International Series of Monographs on Physics. Oxford: Clarendon Press 1983
- ASSAF, Y., BEN-BASHAT, D., CHAPMAN, J., PELED, S., BITON, I. E., KAFRI, M., SEGEV, Y., HENDLER, T., KORCZYN, A. D., GRAIF, M., and COHEN, Y.: High b-value q-space analyzed diffusion-weighted MRI: application to multiple sclerosis. *Magn. Reson. Med.* 47, 115–126 (2002)
- BAHN, M. M.: Comparison of scalar measures used in magnetic resonance diffusion tensor imaging. *J. Magn. Reson.* 139, 1–7 (1999a)
- BAHN, M. M.: Invariant and orthonormal scalar measures derived from magnetic resonance diffusion tensor imaging. *J. Magn. Reson.* 141, 68–77 (1999b)
- BAMMER, R., AUGUSTIN, M., STRASSER-FUCHS, S., SEIFERT, T., KAPPELLER, P., STOLLBERGER, R., EBNER, F., HARTUNG, H. P., and FAZEKAS, F.: Magnetic resonance diffusion tensor imaging for characterizing diffuse and focal white matter abnormalities in multiple sclerosis. *Magn. Reson. Med.* 44, 583–591 (2000)
- BARKHOF, F., and VAN WALDERVEEN, M.: Characterization of tissue damage in multiple sclerosis by nuclear magnetic resonance. *Philos. Trans. R. Soc. (Lond.) B Biol. Sci.* 354, 1675–1686 (1999)
- BASSER, P. J.: Relationships between diffusion tensor and q-space MRI. *Magn. Reson. Med.* 47, 392–397 (2002)
- BASSER, P. J., MATTIELLO, J., and LEBIHAN, D.: Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *J. Magn. Reson. B.* 103, 247–254 (1994)
- BASSER, P. J., PAJEVIC, S., PIERPAOLI, C., DUDA, J., and ALDROUBI, A.: In vivo fiber tractography using DT-MRI data. *Magn. Reson. Med.* 44, 625–632 (2000)
- BASSER, P. J., and PIERPAOLI, C.: A simplified method to measure the diffusion tensor from seven MR images. *Magn. Reson. Med.* 39, 928–934 (1998)
- BEAULIEU, C., and ALLEN, P. S.: Water diffusion in the giant axon of the squid: implications for diffusion-weighted MRI of the nervous system. *Magn. Reson. Med.* 32, 579–583 (1994)
- BLOEMBERGEN, N., PURCELL, E. M., and POUND, R. V.: Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys. Rev.* 73, 679–712 (1948)
- BREGER, R. K., RIMM, A. A., FISCHER, M. E., PAPKE, R. A., and HAUGHTON, V. M.: T1 and T2 measurements on a 1.5-T commercial MR imager. *Radiology* 171, 273–276 (1989)
- BREGER, R. K., YETKIN, F. Z., FISCHER, M. E., PAPKE, R. A., HAUGHTON, V. M., and RIMM, A. A.: T1 and T2 in the cerebrum: correlation with age, gender, and demographic factors. *Radiology* 181, 545–547 (1991)
- BRENTON, D. P., and PIETZ, J.: Adult care in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia: the relevance of neurological abnormalities. *Eur. J. Pediatr.* 159, 114–120 (2000)
- BYDDER, G. M., and RUTHERFORD, M. A.: Diffusion-weighted imaging of the brain in neonates and infants. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Amer.* 9, 83–98, viii. (2001)
- BYDDER, G. M., RUTHERFORD, M. A., and COWAN, F. M.: Diffusion-weighted imaging in neonates. *Childs Nerv. Syst.* 17, 190–194 (2001)
- CALABRESI, P. A., FIELDS, N. S., FARNON, E. C., FRANK, J. A., BASH, C. N., KAWANASHI, T., MALONI, H., JACOBSON, S., and MCFARLAND, H. F.: Eli-spot of Th-1 cytokine secreting Pbmcs in multiple sclerosis – Correlation with Mri lesions. *J. Neuroimmunol.* 85, 212–219 (1998)
- CERCIGNANI, M., IANNUCCI, G., and FILIPPI, M.: Diffusion-weighted imaging in multiple sclerosis. *Ital. J. Neurol. Sci.* 20, 246–249 (1999)
- CERONE, R., SCHIAFFINO, M. C., DI STEFANO, S., and VENESELLI, E.: Phenylketonuria: diet for life or not? *Acta Paediatr.* 88, 664–666 (1999)
- CONTURO, T. E., MCKINSTRY, R. C., AKBUDAK, E., and ROBINSON, B. H.: Encoding of anisotropic diffusion with tetrahedral gradients: a general mathematical diffusion formalism and experimental results. *Magn. Reson. Med.* 35, 399–412 (1996)
- CURTIUS, H. C., BAERLOCHER, K., and VOLLMIN, J. A.: Pathogenesis of phenylketonuria: inhibition of DOPA and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta.* 42, 235–239 (1972)
- DAVIE, C. A., BARKER, G. J., and WEBB, S.: Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal-dominant cerebellar-ataxia is associated with axon loss. *Brain* 118, 1583–1592 (1995)
- DROOGAN, A. G., CLARK, C. A., WERRING, D. J., BARKER, G. J., McDONALD, W. I., and MILLER, D. H.: Comparison of multiple sclerosis clinical subgroups using navigated spin echo diffusion-weighted imaging. *Magn. Reson. Imaging* 17, 653–661 (1999)
- ENGL, H. W., HANKE, M., and NEUBAUER, A.: Regularization of Inverse Problems. Dordrecht: Kluwer 1996

- ENGELBRECHT, V., SCHERER, A., RASSEK, M., WITSACK, H. J., and MODDER, U.: Diffusion-weighted MR imaging in the brain in children: findings in the normal brain and in the brain with white matter diseases. *Radiology* 222, 410–418 (2002)
- FLANAGAN, D.: *The Brain – A Scientific American Book*. New York: Scientific American Inc. 1979
- FILIPPI, M., CERCIGNANI, M., INGLESE, M., HORSFIELD, M. A., and COMI, G.: Diffusion tensor magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Neurology* 56, 304–311 (2001)
- FILIPPI, M., IANNUCCI, G., CERCIGNANI, M., ASSUNTA ROCCA, M., PRATESI, A., and COMI, G.: A quantitative study of water diffusion in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter using echo-planar imaging. *Arch. Neurol.* 57, 1017–1021 (2000)
- FRANK, L. R.: Anisotropy in high angular resolution diffusion-weighted MRI. *Magn. Reson. Med.* 45, 935–939 (2001)
- GELAL, F. M., GRANT, P. E., FISCHBEIN, N. J., HENRY, R. G., VIGNERON, D. B., and BARKOVICH, A. J.: The role of isotropic diffusion MRI in children under 2 years of age. *Eur. Radiol.* 11, 1006–1014 (2001)
- GROSSMAN, R. I., GONZALES-SCARANO, F., and ATLAS, S. W.: Multiple Sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology* 161, 721–725 (1986)
- GROSSMAN, R. I., and MCGOWAN, J. C.: Perspectives on multiple sclerosis. *Amer. J. Neuroradiol.* 19, 1251–1265 (1998)
- HENKELMAN, R. M., HUANG, X., XIANG, Q. S., STANISZ, G. J., SWANSON, S. D., and BRONSKILL, M. J.: Quantitative interpretation of magnetization transfer. *Magn. Reson. Med.* 29, 759–766 (1993)
- HORSFIELD, M. A., LARSSON, H. B., JONES, D. K., and GASS, A.: Diffusion magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64, 80–84 (1998)
- HUBEL, D. H.: *Eye, Brain, and Vision*. New York: Scientific American Libr. 1988
- HUPPI, P. S., and BARNES, P. D.: Magnetic resonance techniques in the evaluation of the newborn brain. *Clin. Perinatol.* 24, 693–723 (1997)
- HUPPI, P. S., and INDER, T. E.: Magnetic resonance techniques in the evaluation of the perinatal brain: recent advances and future directions. *Semin. Neonatol.* 6, 195–210 (2001)
- HUTTENLOCHER, P. R.: The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur. J. Pediatr.* 159, 102–106 (2000)
- ISHIMARU, K., TAMASAWA, N., BABA, M., MATSUNAGA, M., and TAKEBE, K.: [Phenylketonuria with adult-onset neurological manifestation]. *Rinsho Shinkeigaku* 33, 961–965 (1993)
- KATZ, D., TAUBENBERGER, J. K., and CANNELLA, B.: Correlation between magnetic resonance imaging Findings and lesion development in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 34, 000–000 (1993)
- KOOPMANS, R. A., LI, D. K., GROCHOWSKI, E., CUTLER, P. J., and PATY, D. W.: Benign versus chronic progressive multiple sclerosis: magnetic resonance imaging feature. *Ann. Neurol.* 25, 74–81 (1989)
- KREIS, R.: Comments on in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 159, 126–128 (2000)
- KREIS, R., PIETZ, J., PENZIEN, J., HERSCHKOWITZ, N., and BOESCH, C.: Identification and quantitation of phenylalanine in the brain of patients with phenylketonuria by means of localized in vivo 1H magnetic-resonance spectroscopy. *J. Magn. Reson. B.* 107, 242–251 (1995)
- LEUZZI, V., BIANCHI, M. C., TOSETTI, M., CARDUCCI, C. L., CARDUCCI, C. A., and ANTONOZZI, I.: Clinical significance of brain phenylalanine concentration assessed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23, 563–570 (2000)
- LUMSDEN, C. E.: The neuropathology of multiple sclerosis. In: VINKEN, P. J., and BRUYN, G. W. (Eds.): *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 9, pp. 217–309. Amsterdam: North-Holland 1970
- MACKAY, A. L., LAULE, C., MÄDLER, B., VAVASOUR, I. M., and WHITTALL, K. P.: Magnetic resonance distinguishes different water reservoirs in brain. *Physics in Canada* 135–143 (2002)
- MACKAY, A. L., WHITTALL, K. P., ADLER, J., LI, D. K. B., PATY, D. W., and GRAEB, D.: *In vivo* visualization of myelin water in brain by magnetic resonance. *Magn. Reson. Med.* 31, 673–677 (1994)
- MARTIN, R., MCFARLAND, H. F., and MCFARLIN, D. E.: Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 153–187 (1992)
- MCDONALD, W. I., MILLER, D. H., and BARNES, D.: The pathological evolution of multiple sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 18, 319–334 (1992)
- MILLER, D. H., GROSSMAN, R. I., REINGOLD, S. C., and MCFARLAND, H. F.: The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 121, 3–24 (1998)
- MÖLLER, H. E., ULLRICH, K., and WEGELAGE, J.: In vivo proton magnetic resonance spectroscopy in phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 159, 121–125 (2000)
- MÖLLER, H. E., WEGELAGE, J., WIEDERMANN, D., VERMATHEN, P., BICK, U., and ULLRICH, K.: Kinetics of phenylalanine transport at the human blood-brain barrier investigated in vivo. *Brain Res.* 778, 329–337 (1997)

- MORRISON, C., and HENKELMAN, R. M.: A model for magnetization transfer in tissues. *Magn. Reson. Med.* 33, 475–482 (1995)
- MORRIS, M. C., ZIMMERMAN, R. A., BILANIUK, L. T., HUNTER, J. V., and HASELGROVE, J. C.: Changes in brain water diffusion during childhood. *Neuroradiology* 41, 929–934 (1999)
- NOVOTNY, E. J. Jr., AVISON, M. J., HERSCHKOWITZ, N., PETROFF, O. A., PRICHARD, J. W., SEASHORE, M. R., and ROTHMAN, D. L.: In vivo measurement of phenylalanine in human brain by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr. Res.* 37, 244–249 (1995)
- NUSBAUM, A. O., TANG, C. Y., WEI, T., BUCHSBAUM, M. S., and ATLAS, S. W.: Whole-brain diffusion MR histograms differ between MS subtypes. *Neurology* 54, 1421–1427 (2000)
- PAUS, T., COLLINS, D. L., EVANS, A. C., LEONARD, G., PIKE, B., and ZIJDENBOS, A.: Maturation of white matter in the human brain: a review of magnetic resonance studies. *Brain Res. Bull.* 54, 255–266 (2001)
- PIETZ, J.: Neurological aspects of adult phenylketonuria. *Curr. Opin. Neurol.* 11, 679–688 (1998)
- PIETZ, J., DUNCKELMANN, R., RUPP, A., RATING, D., MEINCK, H. M., SCHMIDT, H., and BREMER, H. J.: Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 157, 824–830 (1998)
- PIETZ, J., FATKENHEUER, B., BURGARD, P., ARMBRUSTER, M., ESSER, G., and SCHMIDT, H.: Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Pediatrics* 99, 345–350 (1997)
- PIETZ, J., KREIS, R., BOESCH, C., PENZIEN, J., RATING, D., and HERSCHKOWITZ, N.: The dynamics of brain concentrations of phenylalanine and its clinical significance in patients with phenylketonuria determined by in vivo 1H magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr. Res.* 38, 657–663 (1995)
- PIETZ, J., KREIS, R., SCHMIDT, H., MEYDING-LAMADE, U. K., RUPP, A., and BOESCH, C.: Phenylketonuria: findings at MR imaging and localized in vivo H-1 MR spectroscopy of the brain in patients with early treatment. *Radiology* 201, 413–420 (1996a)
- PIETZ, J., MEYDING-LAMADE, U. K., and SCHMIDT, H.: Magnetic resonance imaging of the brain in adolescents with phenylketonuria and in one case of 6-pyruvoyl tetrahydropteridine synthase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 155, 69–73 (1996b)
- POON, C. S., and HENKELMAN, R. M.: Practical T2 quantitation for clinical applications. *J. Magn. Reson. Imaging* 2, 541–553 (1992)
- RITTER, M.: *Wahrnehmung und visuelle Systeme*. Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft 1987
- ROVARIS, M., and FILIPPI, M.: The value of new magnetic resonance techniques in multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 13, 249–254 (2000)
- SHAW, D. W., MARAVILLA, K. R., WEINBERGER, E., GARRETSON, J., TRAHMS, C. M., and SCOTT, C. R.: MR imaging of phenylketonuria. *Amer. J. Neuroradiol.* 12, 403–406 (1991)
- STANISZ, G. J., KECOJEVIC, A., BRONSKILL, M. J., and HENKELMAN, R. M.: Characterizing white matter with magnetization transfer and T2. *Magn. Reson. Med.* 42, 1128–1136 (1999)
- STEINMAN, L.: A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of non specific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 2253–2256 (1996)
- STEJSKAL, E. O., and TANNER, J. E.: Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* 42, 288–292 (1965)
- SWEETMAN, L.: Newborn screening by tandem mass spectrometry (MS-MS). *Clin. Chem.* 42, 345–346 (1996)
- TAYLOR, C. J., MOORE, G., and DAVIDSON, D. C.: The effect of treatment on zinc, copper and calcium status in children with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 7, 160–164 (1984)
- THOMPSON, A. J., SMITH, I., BRENTON, D., YOUL, B. D., RYLANCE, G., DAVIDSON, D. C., KENDALL, B., and LEES, A. J.: Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *Lancet* 336, 602–605 (1990)
- THOMPSON, A. J., TILLOTSON, S., SMITH, I., KENDALL, B., MOORE, S. G., and BRENTON, D. P.: Brain MRI changes in phenylketonuria. Associations with dietary status. *Brain* 116, 811–821 (1993)
- TREFZ, F. K., CIPCIC-SCHMIDT, S., and KOCH, R.: Final intelligence in late treated patients with phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 159, 145–148 (2000)
- ULLRICH, K., MOLLER, H., WEGELAGE, J., SCHUIERER, G., BICK, U., LUDOLPH, A., HAHN-ULLRICH, H., FUNDERS, B., and KOCH, H. G.: White matter abnormalities in phenylketonuria: results of magnetic resonance measurements. *Acta Paediatr. Suppl.* 407, 78–82 (1994)
- ULUG, A. M., and VAN ZIJL, P. C.: Orientation-independent diffusion imaging without tensor diagonalization: anisotropy definitions based on physical attributes of the diffusion ellipsoid. *J. Magn. Reson. Imaging.* 9, 804–813 (1999)
- VAVASOUR, I. M., WHITTALL, K. P., LI, D. K., and MACKAY, A. L.: Different magnetization transfer effects exhibited by the short and long T2 components in human brain. *Magn. Reson. Med.* 44, 860–866 (2000)
- WEGELAGE, J., MOLLER, H. E., WIEDERMANN, D., CIPCIC-SCHMIDT, S., ZSCHOCKE, J., and ULLRICH, K.: In vivo NMR spectroscopy in patients with phenylketonuria: clinical significance of interindividual differences in brain phenylalanine concentrations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 21, 81–82 (1998)

- WEGELAGE, J., PIETSCH, M., FUNDERS, B., KOCH, H. G., and ULLRICH, K.: Neurological findings in early treated phenylketonuria. *Acta Paediatr.* 84, 411–415 (1995)
- WEGELAGE, J., ULLRICH, K., PIETSCH, M., FUNDERS, B., ZASS, R., and KOCH, H. G.: Untreated non-phenylketonuric-hyperphenylalaninaemia: intellectual and neurological outcome. *Eur. J. Pediatr.* 155, 26–28 (1996)
- WERRING, D. J., CLARK, C. A., BARKER, G. J., THOMPSON, A. J., and MILLER, D. H.: Diffusion tensor imaging of lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurology* 52, 1626–1632 (1999)
- WHITTALL, K. P., MACKAY, A. L., GRAEB, D. A., NUGENT, R. A., LI, D. K., and PATY, D. W.: In vivo measurement of T2 distributions and water contents in normal human brain. *Magn. Reson. Med.* 37, 34–43 (1997)
- WOLF, R. L., ZIMMERMAN, R. A., CLANCY, R., and HASELGROVE, J. H.: Quantitative apparent diffusion coefficient measurements in term neonates for early detection of hypoxic-ischemic brain injury: initial experience. *Radiology* 218, 825–833 (2001)
- WOLFF, S. D., and BALABAN, R. S.: Magnetization transfer imaging: practical aspects and clinical applications. *Radiology* 192, 593–599 (1994)

Dr. rer. nat. Burkhard MÄDLER  
University of British Columbia  
Department of Physics and Astronomy / Vancouver Hospital  
6224 Agricultural Road  
Vancouver, V6T1Z1  
Canada  
Tel.: + 604 822 7510  
Fax: + 604 822 5324  
E-Mail: [bmaedler@physics.ubc.ca](mailto:bmaedler@physics.ubc.ca)  
[burkhard.maedler@philips.com](mailto:burkhard.maedler@philips.com)

---

Dr. rer. nat. Antje OSTARECK-LEDERER

Geboren 1965 in Fürstenwalde (Spree). 1985–1990 Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Humboldt-Universität zu Berlin. 1992 und 1993 Forschungsaufenthalte am Institute of Biochemistry, University of Cambridge (Großbritannien) und 1994 am European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg. Promotion zum Dr. rer. nat. 1995 zur Regulation der Retikulozyten-15-Lipoxygenase während der Entwicklung erythroider Zellen. 1995–2001 Post-Doctoral Fellow am EMBL, 1999 Forschungsaufenthalt an der University of Washington, Seattle. 2001–2003 Senior Scientist/Principal Scientist und Forschungsgruppenleiterin bei Anadys Pharmaceuticals Europe, EMBL-Campus. Seit April 2003 Wissenschaftliche Assistentin an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg. Auszeichnung mit einem Forschungsstipendium der Humboldt-Universität 1991–1993, dem Boehringer-Ingelheim Fellowship 1993–1995, dem EMBO Short-Term und Long-Term Fellowship 1994, 1995–1997, dem Humboldt-Preis der Humboldt-Universität zu Berlin 1997 und dem Leopoldina-Förderpreis 1999–2001.

## Zelluläre Signale zur post-transkriptionalen Regulation der Retikulozyten 15-Lipoxygenase-(r15-LOX)-Expression während der Reifung erythroider Zellen

Antje OSTARECK-LEDERER und Dirk H. OSTARECK (Halle/Saale)

Mit 7 Abbildungen

### Zusammenfassung

Die Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX) ist für den Abbau der Mitochondrien während der Reifung des Retikulozyten zu einem funktionalen Erythrozyten verantwortlich. Die r15-LOX-Expression unterliegt einer post-transkriptionalen Regulation: r15-LOX-mRNA wird im Erythroblasten im Knochenmark transkribiert und durch Proteine in einen translationsinaktiven mRNP-Komplex überführt. Nach der Ausschleusung des Zellkerns und dem Übertritt des jungen Retikulozyten in die Blutbahn beginnt die Translation der r15-LOX-mRNA im reifen Retikulozyten, und der Mitochondrienabbau wird eingeleitet. Ziel meiner Studien ist ein genaues Verständnis der spezifischen Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation.

Wir identifizierten ein für die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation wichtiges Sequenzmotiv in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der r15-LOX-mRNA, das wir als »differentiation control element« (DICE) bezeichnen. An das DICE binden zwei Proteine, die wir als hnRNP K und hnRNP E1 identifizierten. Wir zeigten, daß hnRNP K und -E1 *in vitro* und *in vivo* die Translation der r15-LOX-mRNA inhibieren (OSTARECK-LEDERER et al. 1994, OSTARECK et al. 1997, OSTARECK-LEDERER et al. 1998).

Der hnRNP K/E1-DICE-Komplex inhibiert die Translation durch einen bisher unbekanntem Mechanismus: Wir wiesen nach, daß der auf den komplexen Prozeß der Translationsinitiation wirkende Inhibitionsmechanismus die Assoziation der 60S-Untereinheit mit der 40S-Untereinheit an der 5'UTR am Initiationskodon unterbindet (OSTARECK et al. 2001).

Weiterhin zeigten wir, daß hnRNP K, das im Zellkern lokalisiert ist, durch die Serin-Kinase Erk phosphoryliert wird. Infolge der Serin-Phosphorylierung von hnRNP K wird das Protein im Zytoplasma akkumuliert und dort als Translationsinhibitor wirksam (HABELHAH et al. 2001).

Wir untersuchten ebenfalls, wie die r15-LOX-mRNA-Translation aktiviert wird. Wir wiesen nach, daß hnRNP K ein bisher unbekannter Aktivator der Tyrosin-Kinase c-Src ist. hnRNP K wird durch c-Src *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert. Das bedingt die Aufhebung der Bindung von hnRNP K an das DICE und ist Ursache dafür, daß hnRNP K *in vivo* nicht mehr als Translationsinhibitor wirkt (OSTARECK-LEDERER et al. 2002).

### Abstract

Reticulocyte-15-Lipoxygenase (r15-LOX) is a key enzyme in erythropoiesis. It catalyses the dioxygenation of intact phospholipids in mitochondrial membranes and participates in their breakdown in mature reticulocytes, which is essential for the formation of functional erythrocytes.

The r15-LOX mRNA is transcribed in bone marrow erythroblasts, but it is kept in a translational silenced state in mRNP complexes until the enucleated reticulocytes are released in the peripheral blood and undergo the final stages of maturation. The main topic of the project is the posttranscriptional control of r15-LOX expression in erythroid cell maturation.

Silencing is achieved *via* a motif in the 3'UTR of r15-LOX mRNA, the Differentiation Control Element (DICE). We purified two proteins that bind to the DICE, hnRNPs K and E1, which silence r15-LOX mRNA translation *in vitro* and *in vivo* (OSTARECK-LEDERER et al. 1994, OSTARECK et al. 1997, OSTARECK-LEDERER et al. 1998). The control of r15-LOX mRNA translation is achieved by an unusual mechanism: The hnRNP K/E1-DICE complex formed at the LOX mRNA 3'UTR inhibits translation initiation at the mRNA 5'UTR. The final step of initiation, the joining of the 60 S ribosomal subunit to the pre-initiation complex at the initiation codon is blocked by the hnRNP K/E1-DICE complex (OSTARECK et al. 2001).

We also addressed the question of how the silenced mRNA can be translationally activated. We could show that hnRNP K and the tyrosine kinase c-Src specifically interact with each other, leading to c-Src activation and tyrosine-phosphorylation of hnRNP K *in vivo* and *in vitro*. c-Src catalyzed tyrosine-phosphorylation reversibly inhibits the binding of hnRNP K to the DICE *in vitro* and de-represses the translation of DICE-bearing mRNAs *in vivo* (OSTARECK-LEDERER et al. 2002). HnRNP K is a target of the serine kinase ERK as well. Serin-phosphorylation catalysed by ERK mediates cytoplasmic accumulation of hnRNP K. As a consequence translation of mRNAs bearing a DICE in the 3'UTR becomes inhibited (HABELHAH et al. 2001).

## 1. Die Kontrolle der r15-LOX-mRNA-Translation während der Erythropoiese

Die Reifung der roten Blutzellen zu funktionalen Erythrozyten beginnt im Knochenmark. Einzelne Reifungsstadien sind durch spezifische biochemische und zellbiologische Prozesse, die zu morphologischen Veränderungen führen, charakterisiert. Der Übergang vom Erythroblasten zum Normoblasten ist insbesondere durch die Ausstoßung des Zellkerns gekennzeichnet. Erst die kernlose Zelle wird als junger Retikulozyt in das periphere Blut ausgeschleust, wo er sich zum reifen Retikulozyten entwickelt. Im reifen Retikulozyten werden die übrigen Organellen abgebaut. Eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung des funktionalen Erythrozyten ist die Degradation der Mitochondrien (RAPOPORT und SCHEWE 1986).

Der Abbau der Mitochondrien wird durch die Aktivität eines spezifischen Enzyms, die Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX) initiiert. Die r15-LOX katalysiert die Dioxygenierung von Phospholipiden in der Mitochondrienmembran und leitet dadurch den Abbau der Mitochondrien ein. Der Erythrozyt deckt seinen Energiebedarf während seiner etwa 120 Tage andauernden Funktion durch Glykolyse. Aufgrund der spezifischen Funktion der r15-LOX mit ihren für den Energiestoffwechsel der roten Blutzelle dramatischen Konsequenzen muß die Aktivität dieses Enzyms einer strikten zeitlichen Kontrolle unterliegen.

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen (RAPOPORT et al. 1990) zeigten, daß die für r15-LOX kodierende mRNA bereits im Erythroblasten transkribiert wird, das Enzym jedoch erst im reifen Retikulozyten nachgewiesen werden kann. Die Regulation der r15-LOX-Expression während der Reifung der erythroiden Zellen erfolgt demzufolge nicht nur auf der Ebene der Transkription (O'PREY und HARRISON 1995), sondern auch post-transkriptional. Der diesem Prozeß zugrundeliegende Mechanismus reguliert effizient die Translation der r15-LOX-mRNA. Die r15-LOX-mRNA hat neben den Globin-mRNAs den größten Anteil an der Gesamt-mRNA, das gilt ebenfalls für den Anteil der r15-LOX am Gesamtprotein.

Der Nachweis der r15-LOX-mRNA in zytoplasmatischen Messenger-Ribonukleoprotein-Partikeln (mRNPs) lieferte einen ersten direkten Hinweis auf deren translationale Regulation. Die r15-LOX-mRNA kann aus den mRNPs isoliert und *in vitro* translatiert werden (HÖHNE et al. 1988). Die in den mRNPs enthaltenen Proteine »maskieren« die r15-LOX-mRNA reversibel (Abb. 1).

Mit der Klonierung der vollständigen, für die Retikulozyten-15-Lipoxygenase kodierenden cDNA (KÜHN et al. 1993) war die Möglichkeit gegeben, die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation sowohl biochemisch als auch molekularbiologisch zu untersuchen. Wir wollten die interessante Frage beantworten: Wie wird die Translation der r15-LOX-mRNA in den erythroiden Zellen bis zu dem Zeitpunkt inhibiert, zu dem die Synthese des Enzyms erforderlich ist (Abb. 2)?

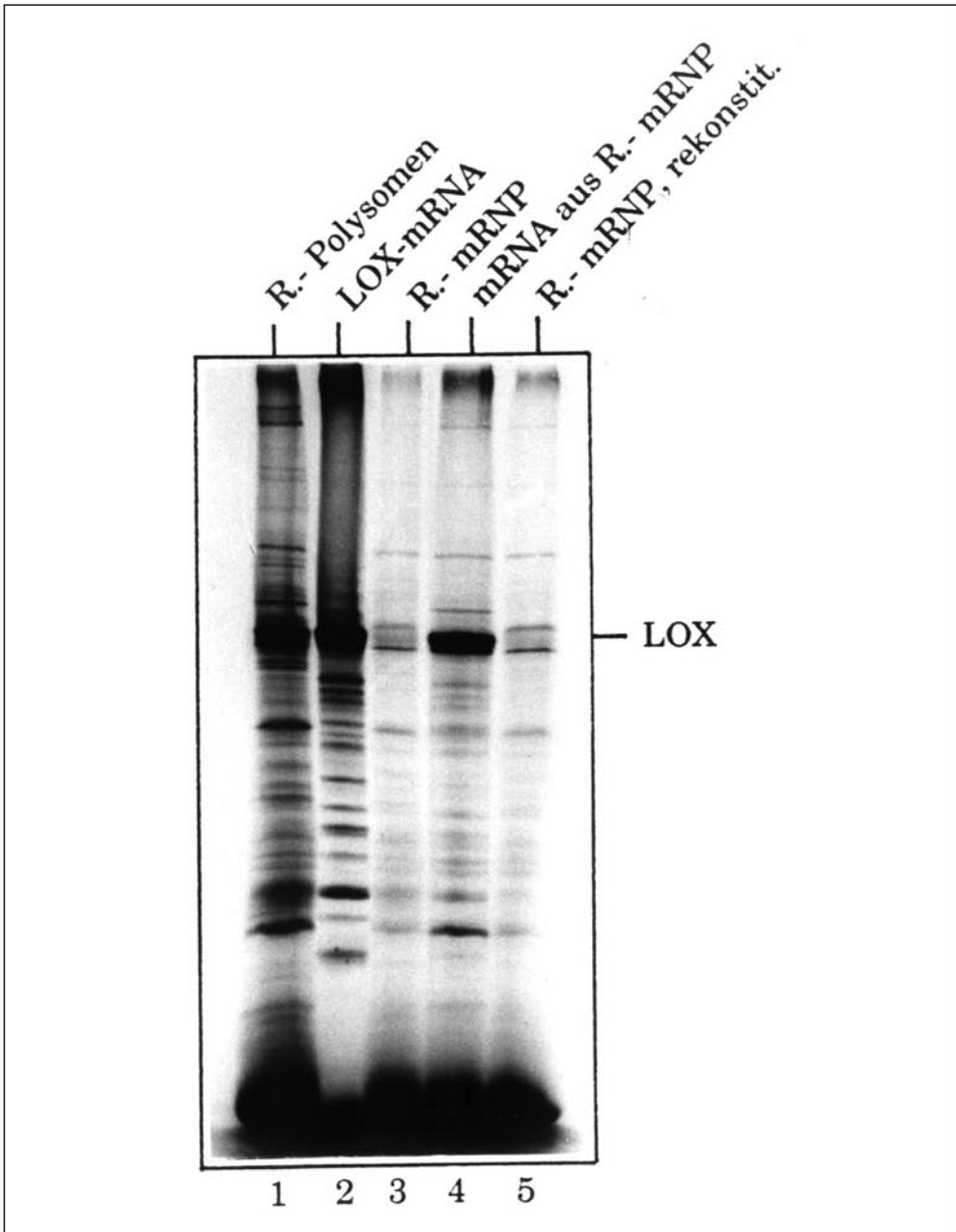


Abb. 1 Die Lokalisation der r15-LOX-mRNA in translationsinaktiven mRNP-Komplexen. Die r15-LOX-mRNA wurde aus verschiedenen Quellen isoliert und in einem homologen Kaninchen-Retikulozytenlysats-Translationssystem unter identischen Bedingungen translatiert. Bahn 1: 700 ng Polysomen aus Kaninchenretikulozyten, Bahn 2: 100 ng r15-LOX-mRNA-*in-vitro*-Transkript, Bahn 3: 500 ng mRNP aus Kaninchenretikulozyten, Bahn 4: 500 ng mRNA, isoliert aus Kaninchenretikulozyten mRNP, Bahn 5: aus 500 ng mRNP-mRNA und -Proteine, rekonstituierte mRNP aus Kaninchenretikulozyten. (R = Retikulozyt)

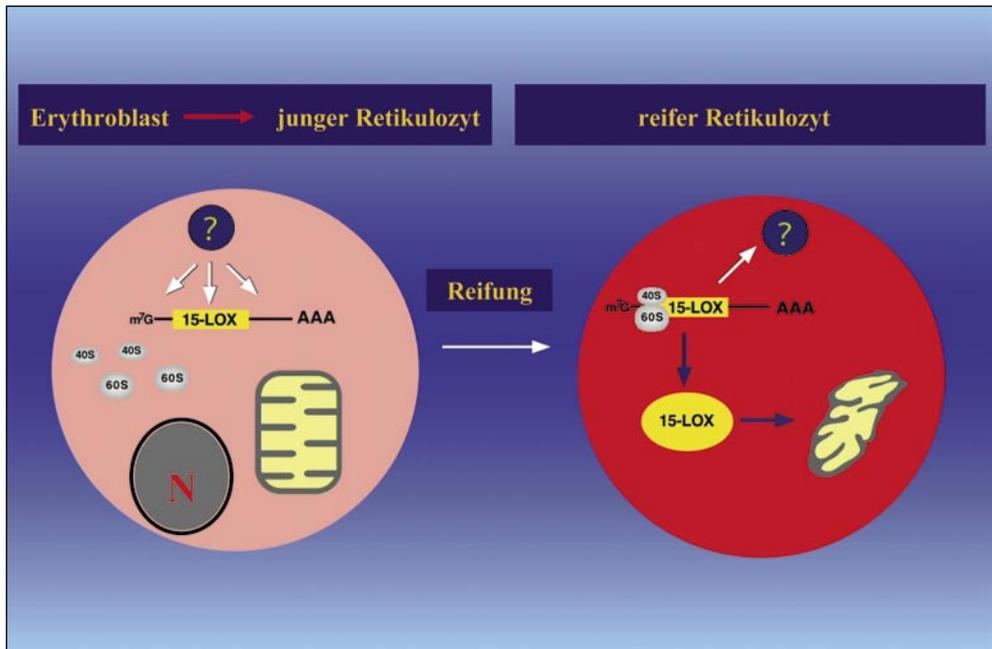


Abb. 2 Die Bedeutung der r15-LOX und ihre Expression während der Reifung erythroider Zellen. Die r15-LOX-mRNA wird in Erythroblasten transkribiert und, assoziiert mit Proteinen, in translationsinaktiver Form in mRNP-Komplexen gespeichert. Nach der Ausschleusung des Zellkerns während der Reifung des Erythroblasten zum Normoblasten erfolgt der Übertritt der kernlosen Zelle als junger Retikulozyt mit intakten Mitochondrien in das periphere Blut. Hier bildet sich der reife Retikulozyt aus, es kommt zur Aufhebung der Translationsinhibition der r15-LOX-mRNA in den mRNPs, zur Synthese der r15-LOX und der Einleitung des Mitochondrienabbaus als Voraussetzung für die Reifung des Retikulozyten zum funktionalen Erythrozyten. Die inhibierenden Proteine und ihre Bindungsstellen an der r15-LOX-mRNA waren unbekannt. Dies gilt ebenso für den Mechanismus der Translationsinhibition sowie der Aktivierung der r15-LOX-mRNA-Translation im reifen Retikulozyten.

## 2. Identifizierung des r15-LOX-mRNA-Bindungsmotivs und der inhibierenden Proteine

Unser Ziel war es, sowohl die für die Translationsrepression relevanten Sequenz(en) in der r15-LOX-mRNA als auch die inhibitorischen Protein(e) zu identifizieren und den Mechanismus der Translationsinhibition aufzuklären.

Wir analysierten zunächst Sequenzmotive in der r15-LOX-mRNA, an die spezifisch regulatorische Proteine binden. Ein 10fach direkt wiederholtes 19 nt langes, pyrimidinreiches Sequenzmotiv ist in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der r15-LOX-mRNA lokalisiert. Die spezifische Natur dieses Sequenzmotivs ließ eine Funktion bei der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation vermuten (FLEMING et al. 1989, HUNT 1989). Wir bezeichneten diese 190 nt lange Sequenz später als das »Differentiation Control Element« (DICE) (OSTARECK et al. 1997; Abb. 3).

Dem DICE der r15-LOX-mRNA ähnliche Sequenzmotive sind auch in der 3'UTR weiterer für Lipoxygenasen kodierender mRNAs lokalisiert. In der humanen 15-LOX-mRNA ist das 19 nt Sequenzmotiv 4fach wiederholt, in der Kaninchen-Leukozyten-12-LOX-mRNA 20fach.

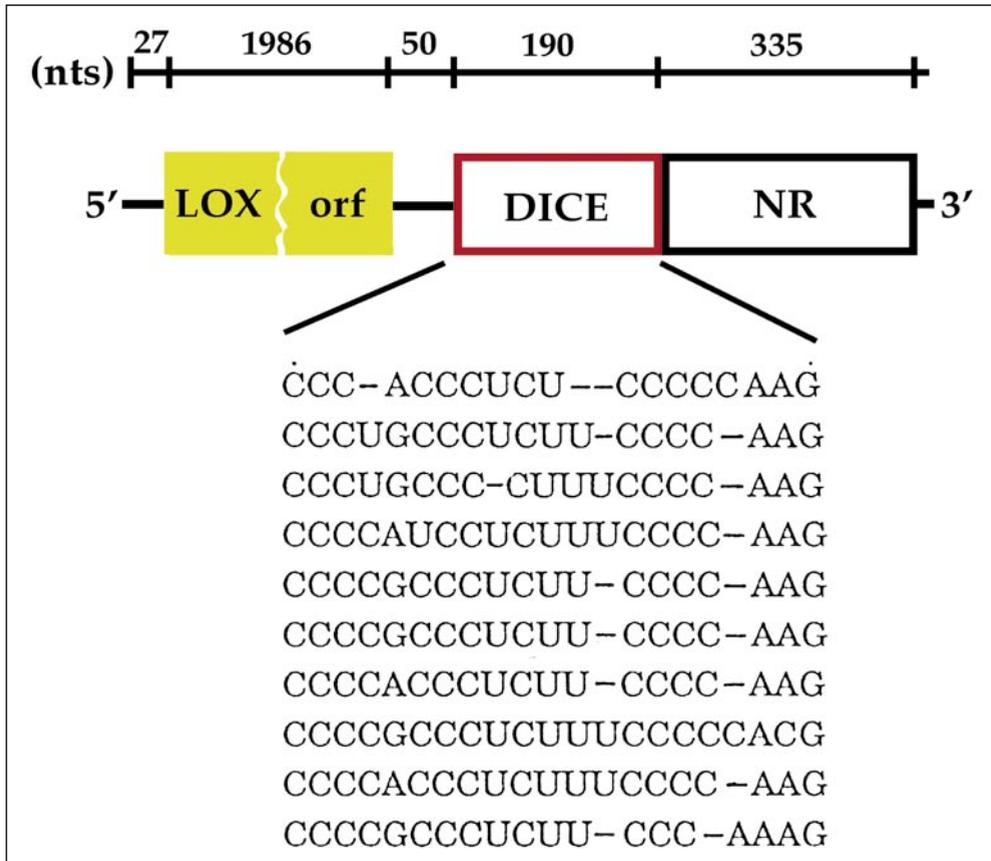


Abb. 3 Die Struktur der r15-LOX-mRNA. Die r15-LOX-mRNA setzt sich aus einer 27 nt langen 5'-untranslatierten Region (5'UTR), gefolgt von der für die 662 Aminosäuren kodierenden Sequenz (1986 nt) und einer 575 nt langen 3'UTR zusammen. Die 3'UTR weist 50 nt nach dem Stopkodon ein charakteristisches 10fach direkt wiederholtes Sequenzmotiv von 19 nt auf. Dieses 190 nt lange Sequenzmotiv bezeichnen wir als »Differentiation Control Element« (DICE). Auf das DICE folgt ein 335 nt langes nicht-repetitives Sequenzelement (NR).

Diese Varianten des DICE sind in beiden mRNAs Determinanten für die Translationsregulation (OSTARECK-LEDERER et al. 1994, THIELE et al. 1999).

Wir identifizierten in erythroiden Zellen früher Reifungsstadien (Erythroblasten und Retikulozyten) eine spezifische Proteinfraktion (LOX-BP), die spezifisch an das DICE bindet. LOX-BP isolierten wir durch RNA-Affinitätschromatographie aus Kaninchen-Retikulozytenlysats. Hierzu verwendeten wir als Affinitätsmatrix das DICE, das über Biotin-UTP an Streptavidin-Agarose gebunden wurde (KAMINSKI et al. 1998). Das affinitätsgereinigte LOX-BP inhibiert die Translation der r15-LOX-mRNA *in vitro*, sowohl im homologen Kaninchen-Retikulozytenlysats als auch im Weizenkeim-Lysat-Translationssystem (OSTARECK-LEDERER et al. 1994, OSTARECK et al. 1997). Die Translationsinhibition kann auch auf andere mRNAs übertragen werden, wenn in deren 3'UTR das DICE kloniert wird (OSTARECK-LEDERER et al. 1994, OSTARECK et al. 1997).

Die Analyse der in der LOX-BP-Fraktion enthaltenen Proteine durch Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie führte zur Identifizierung der heteronukleären Ribonukleoproteine (hnRNP), hnRNP K und hnRNP E1 (OSTARECK et al. 1997). Beide Proteine sind durch spezifische RNA-Bindungsdomänen, »hnRNP-K-Homologie Domänen« (KH-Domänen), charakterisiert, die an pyrimidinreiche Sequenzen binden. Sie haben im Zytoplasma und im Zellkern verschiedene Funktionen, für die ihre Interaktion sowohl mit DNA- als auch RNA-Sequenzmotiven erforderlich ist (OSTARECK-LEDERER et al. 1998, MAKEYEV und LIEBHABER 2002). Interessant für unsere Untersuchungen ist weiterhin, daß hnRNP K ein spezifisches »nuclear shuttling signal« (KNS) und drei Prolin-reiche Motive, über die es mit verschiedenen Kinasen interagieren kann, aufweist (Abb. 4).

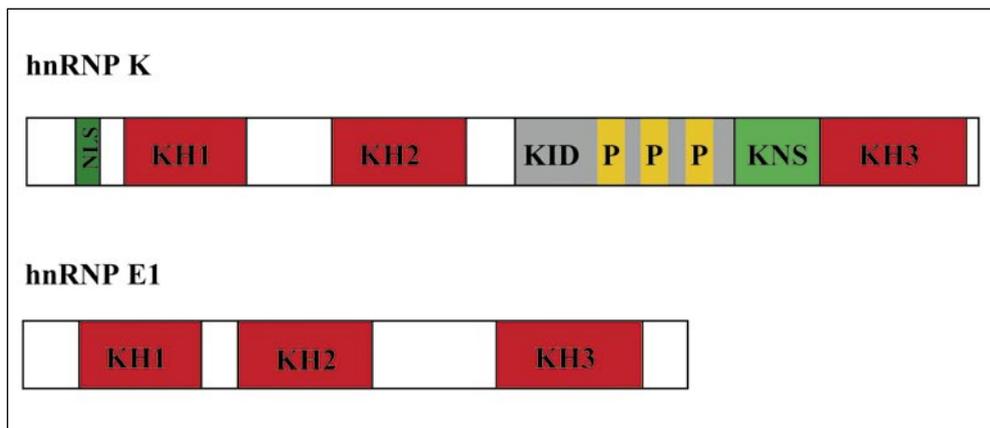


Abb. 4 Die Domänenstruktur der Proteine hnRNP K und hnRNP E1. Die Proteine hnRNP K und hnRNP E1 sind durch drei KH-Domänen, zwei lokalisiert am N-Terminus und eine am C-Terminus, charakterisiert, die an pyrimidinreiche RNA- und DNA-Sequenzen binden (siehe 2.). Neben den KH-Domänen weist hnRNP K ein »nuclear localisation signal« (NLS) und eine für dieses Protein spezifische »nuclear shuttling domain« (KNS) auf (MICHAEL et al. 1997) (siehe 5.). In der »kinase interaction domain« (KID), durch die hnRNP K mit Domänen verschiedener Kinasen und anderen Proteinen interagieren kann (VAN SEUNINGEN et al. 1995), befinden sich drei Prolin-reiche Motive, die insbesondere für die Bindung an SH3-Domänen von Bedeutung sind (siehe 4.).

Wir klonierten die cDNAs für beide Proteine und testeten ihren Einfluß auf die mRNA-Translation *in vitro* und *in vivo*. Die rekombinanten, in *E. coli* exprimierten Proteine hnRNP K und hnRNP E1 inhibieren einzeln und im Komplex die Translation von mRNAs, die ein DICE in der 3'UTR tragen. Wir konnten nachweisen, daß die Translationsinhibition bereits durch eine zweifache Wiederholung des 19nt-Sequenzmotivs, das im DICE 10fach wiederholt ist, vermittelt wird (OSTARECK et al. 1997, 2001). Das damit definierte »minimale« DICE steht in Übereinstimmung mit zwei weiteren Befunden:

- Die Inhibierung der Translation der humanen 15-LOX-mRNA, in deren 3'UTR das 19nt-Sequenzmotiv 4fach wiederholt ist (OSTARECK-LEDERER et al. 1994).
- Ein Molekül hnRNP E1 bindet an ein einzelnes 19nt-Sequenzmotiv, die Bindung weiterer hnRNPE1-Moleküle an längere Abfolgen des 19nt-Sequenzmotivs erfolgt additiv (REIMANN et al. 2002).

Auch *in vivo*, in HeLa-Zellen, die mit den für hnRNP K und hnRNP E1 kodierenden cDNAs transfiziert wurden, führt die Expression dieser Proteine zur Inhibition der Translation von Reporter-mRNAs, die ein DICE in der 3'UTR tragen (OSTARECK et al. 1997).

### **3. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Translationsinhibition**

Die Identifizierung der die r15-LOX-mRNA-Translation inhibierenden Proteine hnRNP K und hnRNP E1 und die Charakterisierung der Funktion des DICE in der r15-LOX-mRNA-3'UTR waren wichtige Voraussetzungen für die Untersuchung des Mechanismus der Translationsinhibition.

Wir stellten uns die Frage: Wie inhibiert der hnRNP K/E1-DICE-Komplex, der an der mRNA-3'UTR gebildet wird, die Initiation der Translation, die an der 5'UTR erfolgt? Zur Analyse des Mechanismus, der diesem Prozeß zugrunde liegt, nutzten wir verschiedene experimentelle Strategien. Die drei wichtigsten werden im Folgenden kurz erläutert:

- *Saccharose-Gradienten Fraktionierung von mRNA-assoziierten ribosomalen Komplexen:* Wir untersuchten *in vitro* unter Translationsbedingungen den Einfluß von hnRNP K und hnRNP E1 auf die Assoziation von ribosomalen Untereinheiten und translationsaktiven Ribosomen mit mRNAs, die ein DICE in der 3'UTR tragen. Die an der mRNA gebildeten ribosomalen Komplexe charakterisierten wir durch Fraktionierung in Saccharose-Gradienten.
- *Analyse alternativer Mechanismen der Translationsinitiation unter inhibitorischen Bedingungen:* Wir führten *In-vitro*-Translationsexperimente durch, um einen möglichen Einfluß des hnRNP-K/E1-DICE-Komplexes auf die Funktion einzelner Initiationsfaktoren zu testen: Dazu wurden spezifische Sequenzelemente viraler RNAs, die eine alternative Initiation der Translation viraler Proteine unabhängig von einer 5'cap(m<sup>7</sup>GpppG-cap)-Struktur, wie sie bei mRNAs, die für zelluläre Proteine kodieren, vorhanden ist, in die 5'UTR von Reporter-mRNAs inseriert. Diese viralen RNA-Elemente, sogenannte »internal ribosome entry sites« (IRES), weisen spezifische komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen auf. Sie ermöglichen die Assemblierung translationsaktiver 80S-Ribosomen unabhängig von einzelnen Initiationsfaktoren, die für die Translationsinitiation zellulärer mRNAs am 5'm<sup>7</sup>GpppG-cap erforderlich sind. Dadurch war es uns möglich, Effekte des Inhibitionsmechanismus auf einzelne Initiationsfaktoren und damit Initiationsschritte zu untersuchen.
- *Rekonstitution von Translations-Initiationskomplexen in vitro (»toe printing«):* Detaillierte Studien zur Funktion und Kontrolle von Initiationsmechanismen sind durch Rekonstitution von mRNA-Protein-Komplexen, die bei den verschiedenen Schritten der Translations-Initiation entstehen, möglich. Hierzu werden die einzelnen Komponenten, ribosomale Untereinheiten und Initiationsfaktoren (bis zu 12) aus Retikulozytenlysat oder zytosolischen Extrakten anderer Zellen, gereinigt bzw. in *E. coli* als rekombinante Proteine exprimiert. Mit weiteren, für den Initiationsprozeß erforderlichen Komponenten werden aus den ribosomalen Untereinheiten und Proteinen an spezifischen mRNAs *in vitro* Ribosomen-Vorstufen und funktionale Ribosomen assembliert. Die Zusammensetzung dieser Komplexe und ihre Lokalisation an der mRNA werden anschließend durch reverse Transkription und Separation der Produkte analysiert. Mit dieser Methode, die auch als »toe-printing« bezeichnet wird, ist ein detailliertes Studium der Translationsinitiation und deren Kontrolle unter inhibitorischen und aktivierenden Bedingungen möglich.

Unsere Experimente zeigen, daß der hnRNP-K/E1-DICE-Komplex nicht die Assemblierung des sogenannten Prä-Initiationskomplexes aus Initiationsfaktoren, der ribosomalen 40S-Untereinheit und der Methionyl-tRNA am 5' m<sup>7</sup>GpppG-cap der mRNA beeinflusst. Auch die von der ATP-Hydrolyse abhängige Bewegung des Prä-Initiationskomplexes zum Initiations-AUG wird nicht unterbunden.

Nachdem die ribosomale 40S-Untereinheit am AUG lokalisiert ist, erfolgt unter GTP-Hydrolyse die Dissoziation einzelner Initiationsfaktoren aus dem Prä-Initiationskomplex. Danach assoziiert die 60S-Untereinheit mit der 40S-Untereinheit zum translationsaktiven 80S-Ribosom. Dieser letzte Schritt der Translationsinitiation, der durch die Aktivität weiterer Initiationsfaktoren und erneute GTP-Hydrolyse vermittelt wird, ist Angriffspunkt des Mechanismus durch den der hnRNP K/E1-DICE-Komplex die Initiation der Translation an der mRNA 5'UTR inhibiert (OSTARECK et al. 2001).

#### 4. Die Aktivierung der r15-LOX-mRNA-Translation

Nachdem wir die an der Kontrolle der Inhibierung der Translation der r15-LOX-mRNA beteiligten Faktoren identifizierten und charakterisierten und den Mechanismus der Translationsinhibierung durch den hnRNP-K/E1-DICE-Komplex aufklärten, untersuchten wir die Aktivierung der Translation. Wir stellten uns die Frage: Wie wird die Translation der mRNA aktiviert und die Synthese der r15-LOX durch zelluläre Signale während der Reifung der erythroiden Zellen kontrolliert?

Für die r15-LOX-Synthese in den reifen Retikulozyten ist die Aktivierung der r15-LOX-mRNA-Translation erforderlich. Diese erfordert die Aufhebung der inhibitorischen Funktion des hnRNP-K/E1-DICE-Komplexes. Wir untersuchten zunächst, ob die Bindung von hnRNP K an das DICE durch eine Modifikation des Proteins beeinflusst werden kann.

Es war bekannt, daß hnRNP K *in vitro* mit der isolierten SH3-Domäne (»Src-Homologie Domäne 3«) interagiert. Die SH3-Domäne wurde in der Tyrosin-Kinase v-Src einem Genprodukt des Rous-Sarcoma-Virus, das zur Zelltransformation führt, identifiziert und in weiteren Kinasen nachgewiesen. Durch die SH3-Domäne binden verschiedene Onkogen-Produkte an Aminosäuresequenzen ihrer Substratmoleküle, die in einem bestimmten Kontext Proline enthalten. Die intramolekulare Wechselwirkung der SH3-Domäne mit Prolinen reguliert außerdem die Tyrosin-Kinase-Aktivität von Src.

Unsere ersten Experimente zeigten, daß hnRNP K *in vitro* und *in vivo*, in transfizierten HeLa-Zellen, mit der zellulären Tyrosin-Kinase c-Src interagiert. c-Src liegt intrazellulär in inaktiver Form vor. Die Kinase wird durch verschiedene intramolekulare Wechselwirkungen inaktiviert. Hierzu gehören die Bindung des phosphorylierten Tyrosins 527 (Y527) an die SH2-Domäne und die intramolekulare Bindung von Prolinen, die zwischen der SH2-Domäne und der Kinasedomäne lokalisiert sind, an die SH3-Domäne. Eine Aktivierung von c-Src kann durch Phosphorylierung des im »activation loop« lokalisierten Tyrosins 416 (Y416) erfolgen. Außerdem kann c-Src durch die Dephosphorylierung des Tyrosins 527 (Y527), das intramolekular mit der SH2-Domäne interagiert, aktiviert werden. Auch die Aufhebung der intramolekularen Interaktion der SH3-Domäne mit Prolinen durch Substratmoleküle, die prolinreiche Sequenzen enthalten, kann eine Aktivierung der Tyrosin-Kinase bewirken (BJORGE et al. 2000, HUBBARD 1999).

Durch die Bindung von hnRNP K wird c-Src *in vitro* und *in vivo* direkt aktiviert (OSTARECK-LEDERER et al. 2002). Dies war ein überraschender Befund, da bisher nur zwei Proteine, *Sin* und

Cas, bekannt waren, die c-Src aktivieren (ALEXANDROPOULOS und BALTIMORE 1996, BURNHAM et al. 2000). Die in unseren Experimenten nachgewiesene spezifische Aktivierung von c-Src durch hnRNP K führt außerdem zu einer durch c-Src katalysierten Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K.

Die Spezifität der Aktivierung von c-Src durch hnRNP K überprüften wir mit verschiedenen modifizierten Formen der Tyrosin-Kinase. In Src(KP) wurde das Prolin an Position 250 (P250), das intramolekular an die SH3-Domäne bindet, und ein Lysin (K249) ausgetauscht. Dadurch wird die intramolekulare Wechselwirkung aufgehoben und c-Src in eine aktive Form überführt. Eine weitere Variante, Src(Y416F), kann nicht aktiviert werden, da das für die Kinase-Aktivität erforderliche Tyrosin 416 in Phenylalanin (Y416F) umgewandelt wurde. Die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K führt zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des hnRNP K sowie zellulärer Proteine. Diese Phosphorylierung ist stärker als die durch die konstitutiv aktive Mutante Src(KP) katalysierte Tyrosin-Phosphorylierung. Die Mutante Src(Y416F) wird durch hnRNP K nicht aktiviert und phosphoryliert keine Substrat-Tyrosine. Weiterhin testeten wir den Einfluß von hnRNP K auf die Tyrosin-Kinase *Abl*, die eine der Kinase c-Src homologe Domänenstruktur aufweist. Die Tyrosin-Kinase *Abl* wird nicht durch hnRNP K aktiviert, das Protein ist auch kein Substrat von *Abl* (OSTARECK-LEDERER et al. 2002).

HnRNP E1 bindet, im Gegensatz zu hnRNP K, nicht an c-Src, dieses Protein ist kein Aktivator und auch kein Substrat von c-Src. Mit Deletionsmutanten von c-Src analysierten wir, durch welche Domänen die Wechselwirkung der Kinase mit hnRNP K erfolgt. Die SH3-Domäne in c-Src ist essentiell für die Bindung von hnRNP K, wird die SH3-Domäne aus c-Src entfernt, bindet die Tyrosin-Kinase hnRNP K nur noch sehr schwach, und die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K ist deutlich reduziert (OSTARECK-LEDERER et al. 2002).

Die Analyse der Aminosäuresequenzen in hnRNP K, die für die Interaktion mit c-Src von Bedeutung ist, ist Gegenstand unserer weiteren Untersuchungen. HnRNP K weist neben drei KH-Domänen, einem »nuclear localisation signal« (NLS) und einem spezifischen »nuclear shuttling signal« (KNS) auch eine »kinase interaction domain« (KID) auf (Abb. 4). In der KID sind drei Prolin-Motive lokalisiert, für die eine Interaktion mit SH3-Domänen beschrieben wurde (VAN SEUNINGEN et al. 1995).

Die Befunde zur Interaktion von hnRNP K und c-Src, zur spezifischen Aktivierung der Kinase durch hnRNP K und dessen Tyrosin-Phosphorylierung, bildeten die Grundlage für Experimente zur Beantwortung der interessanten Frage, wie die Funktion von hnRNP K als Inhibitor der r15-LOX-mRNA-Translation reguliert wird.

Wird durch die c-Src-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K die Bindung des Proteins an das DICE beeinflusst und führt die Aufhebung der DICE-Bindung möglicherweise zu einer Aktivierung der Translation inhibierter mRNAs?

Wir führten *In-vivo*-Experimente durch, um zu untersuchen, welche Wirkung die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K auf die DICE-Bindung des Proteins hat. Dazu transfizierten wir HeLa-Zellen mit den für hnRNP K und c-Src kodierenden Plasmiden. Die Analyse der Expression von hnRNP K und c-Src, der Aktivität von c-Src und der Tyrosin-Phosphorylierung beider Proteine wurde durch RNA-Protein-Bindungsstudien ergänzt. Die Bindung des DICE an hnRNP K untersuchten wir in »North-Western-Blot«-Experimenten. Dazu werden Proteine in einem Gelsystem separiert, auf einer Membran immobilisiert und danach renaturiert. Anschließend erfolgt die Bindung des <sup>32</sup>P-markierten DICE-Transkriptes. Es zeigte sich, daß die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K die Bindung des DICE an das Protein beeinflusst. Die Bindung des DICE an das phosphorylierte hnRNP K ist gegenüber dem nicht phosphorylierten

Protein signifikant reduziert (Abb. 5A–D). Im Gegensatz dazu bleibt die Bindung des DICE an hnRNP E1, das die Tyrosin-Kinase c-Src nicht aktiviert und nicht phosphoryliert wird, im North-Western-Blot unverändert erhalten (OSTARECK-LEDERER et al. 2002).

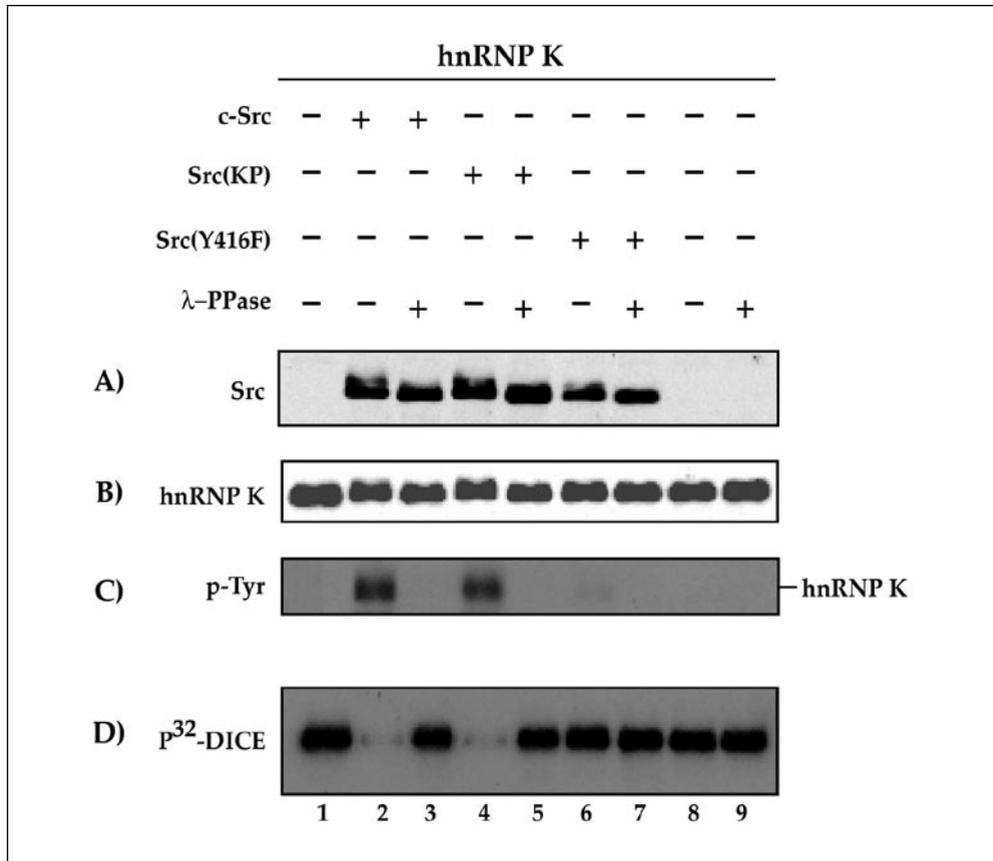


Abb. 5 Die Aufhebung der hnRNPK/DICE-Bindung durch Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K. Die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K beeinflusst die DICE-Bindungsaktivität des Proteins reversibel. His-hnRNP K (Bahn 1–9) wurde *in vitro* mit Src-Kinase, die aus transfizierten HeLa-Zellen immunologisch gereinigt wurde, phosphoryliert: c-Src (Bahn 2 und 3), Src(KP) (Bahn 4 und 5) oder Src(Y416F) (Bahn 6 und 7); nicht Src transfizierte HeLa-Zellen: Bahn 1, 8 und 9. Nach der Phosphorylierung wurde hnRNP K mit λ-Phosphatase (λ-PPase) de-phosphoryliert (Bahn 3, 5, 7, 9). Die Reaktionsprodukte wurden im Western-Blot analysiert: (A) Src-Antikörper, (B) His-Antikörper, (C) Anti-Phosphotyrosin Antikörper. Die DICE-Bindungsaktivität von hnRNP K wurde mit <sup>32</sup>P-DICE in einem North-Western-Blot untersucht (D).

Es ist weiterhin bemerkenswert, daß der Verlust der DICE-Bindungsaktivität reversibel ist. Durch Behandlung des Tyrosin-phosphorylierten hnRNP K mit λ-Phosphatase war es möglich, die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K aufzuheben. Durch die Dephosphorylierung von hnRNP K wurde, wie wir im North-Western-Blot nachweisen konnten, dessen DICE-Bindungsaktivität wieder hergestellt (Abb. 5C, D).

Die Aminosäuresequenz des Proteins hnRNP K enthält 17 Tyrosine. Zur Identifizierung der Tyrosine, die von c-Src phosphoryliert werden, isolierten wir *in vivo* phosphoryliertes hnRNP K. Nach proteolytischer Spaltung dieses Phosphoproteins erfolgte die Analyse der entstandenen Peptide durch »Nano-Elektrospray-Massenspektrometrie« (NEUBAUER und MANN 1999). Insgesamt sechs Tyrosine (Y 72, 225, 230, 234, 236, 380) konnten in verschiedenen experimentellen Ansätzen als Substrate der c-Src-Kinase identifiziert werden. Diese Tyrosine wandelten wir durch gerichtete Mutagenese in Phenylalanin um (Y 72, 225, 230, 234, 236, 380 F). Das resultierende modifizierte Protein (hnRNP K (Y6F)) bindet noch an c-Src und aktiviert die Kinase. Verglichen mit hnRNP K beträgt die Phosphorylierung 32%. Das deutet daraufhin, daß es weitere Tyrosine gibt, die Substrate der Kinase c-Src sind. Mit den vorhandenen massenspektrometrischen Verfahren war es jedoch nicht möglich, weitere Phosphotyrosine zu identifizieren. Die Daten zeigen, daß c-Src mehrere Tyrosine phosphoryliert und außer den in einer sogenannten c-Src-Konsensus-Sequenz liegenden primären Substrat-Tyrosinen (Y 230, 234, 236, 380) weitere Tyrosine mit geringerer Spezifität Substrate der Kinase sind. Welche Bedeutung die Phosphorylierung dieser Tyrosine für die Regulation der unterschiedlichen Funktionen von hnRNP K im Zytoplasma und im Zellkern hat, wird Gegenstand späterer Untersuchungen sein.

Mit unseren *In-vivo*-Experimenten wiesen wir nach, daß die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K seine Funktion als Translationsinhibitor moduliert. Um die Translationskontrolle durch hnRNP K in Abhängigkeit von dessen Tyrosin-Phosphorylierung zu studieren, exprimierten wir hnRNP K und c-Src in HeLa-Zellen, in Gegenwart verschiedener Luziferase (LUC)-Reporter-mRNAs (Abb. 6A, B) (OSTARECK-LEDERER et al. 2002).

Wird eine LUC-DICE-mRNA in Gegenwart von hnRNP K exprimiert, so ist die LUC-Aktivität auf 40% reduziert. Zur Ermittlung der Ausgangsaktivität transfizierten wir ein anderes RNA-bindendes Protein, U1A, das nicht mit dem DICE interagiert. Die gemeinsame Transfektion von c-Src, hnRNP K und LUC-DICE führt zur Aktivierung der Tyrosin-Kinase durch hnRNP K und zu dessen Tyrosin-Phosphorylierung. Die LUC-Aktivität erreicht nahezu den in Gegenwart von U1A ermittelten Ausgangswert. Die Experimente zeigen, daß der Verlust der DICE-Bindung durch Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K auch die Inhibition der Translation durch den mRNA-3'UTR-hnRNP K-DICE Komplex aufhebt. Der Ersatz des DICE durch die nichtregulatorische Sequenz (NR) in der LUC-mRNA-3'UTR hebt die Regulation auf, es kommt weder zu einer Inhibierung der LUC-NR-mRNA-Translation noch zu der Translationsaktivierung (Abb. 6A).

Ein spezifischer Inhibitor von c-Src, PP2, verhindert die Aufhebung der durch hnRNP K bedingten Inhibierung der LUC-DICE-mRNA-Translation durch die Tyrosin-Kinase-c-Src (Abb. 6B) (OSTARECK-LEDERER et al. 2002).

In Abbildung 7 ist der Mechanismus der Translationsinhibition der r15-LOX-mRNA durch den hnRNP-K/E1-DICE Komplex und der Translationsaktivierung durch die Tyrosin-Kinase c-Src, die hnRNP K phosphoryliert, zusammenfassend dargestellt.

## **5. Die zelluläre Lokalisation von hnRNP K**

Weitere Untersuchungen zur Modulation der Funktion von hnRNP K als Regulator der mRNA-Translation betrafen die Lokalisation des Proteins. Wie bereits dargelegt, weist hnRNP K ein KNS auf (Abb. 4). Im Zusammenhang mit der primär nukleären Lokalisation von hnRNP K

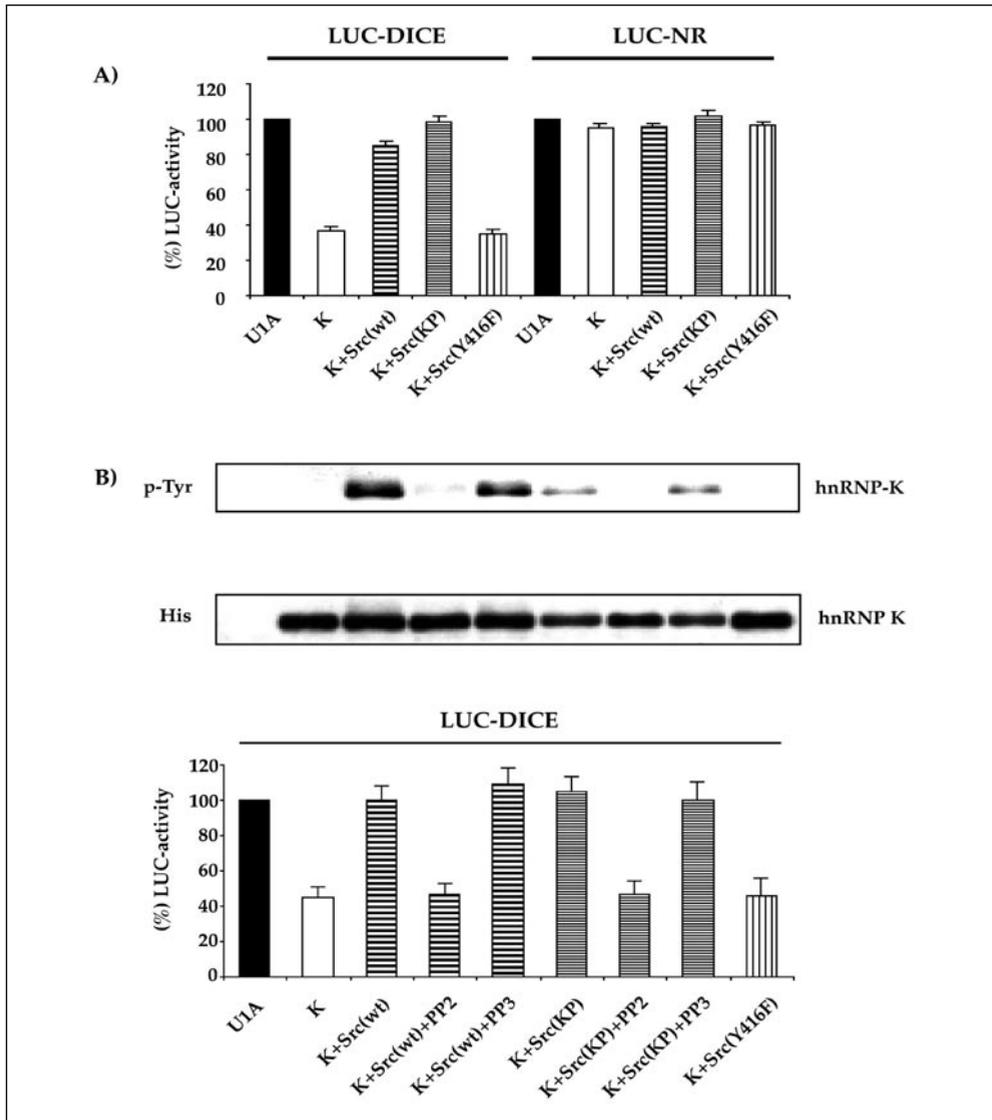


Abb. 6 Die Aktivierung der Translation einer durch hnRNP K inhibierten LUC-DICE-mRNA. (A) HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden, die für LUC-DICE oder LUC-NR (als Reporterproteine) kodieren, für hnRNP K oder U1A (als regulatorisches Protein und Spezifitätskontrolle), sowie die verschiedenen Formen der Src Tyrosin-Kinase, c-Src (Src(wt)), Src(KP) oder Src(Y416F) transient kotransfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz ermittelten wir die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach Kotransfektion von SV40- $\beta$ -Gal. Die enzymatische Aktivität der Luziferase wurde in den Extrakten der transfizierten HeLa-Zellen gemessen. (B) LUC-DICE- und His-hnRNP K-Expressionsvektoren wurden mit Plasmiden, die für c-Src, Src(KP) oder Src(Y416F) kodieren, kotransfiziert. Die Aktivität der exprimierten Src-Kinase wurde, wo angegeben, durch den spezifischen Inhibitor PP2, der inaktive Inhibitor PP3 diente als Spezifitätskontrolle. His-hnRNP K wurde mit einem His-Antikörper aus den HeLa-Zellextrakten immunpräzipitiert. Der Phosphorylierungsstatus wurde im Western-Blot mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper (p-Tyr) analysiert, die Menge des eingesetzten Proteins mit einem His-Antikörper (His) kontrolliert (B, oberer und mittlerer Teil). In den Extrakten wurde die enzymatische Aktivität der exprimierten Luziferase bestimmt (B, unterer Teil).

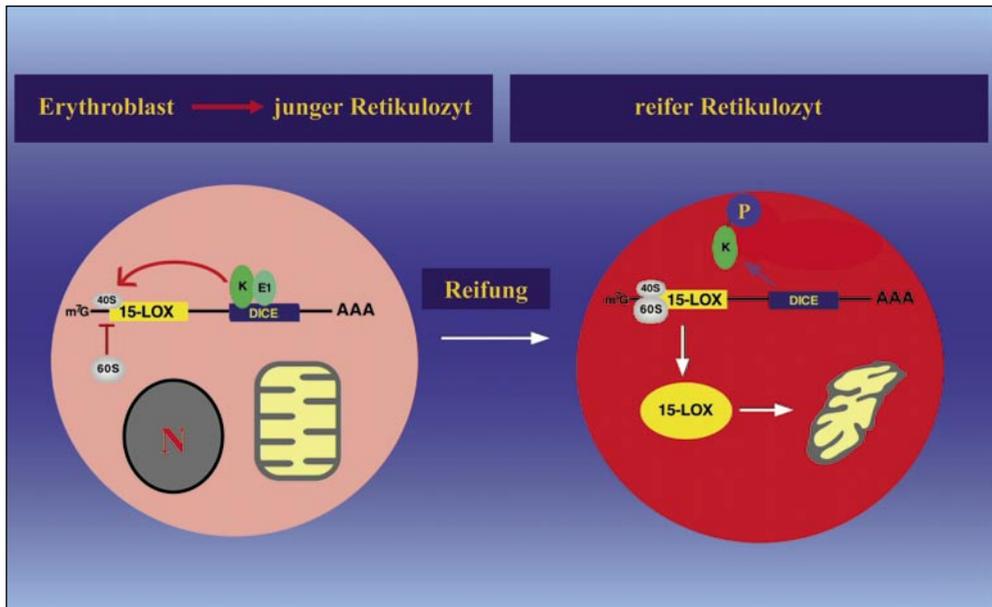


Abb. 7 Die Inhibition und Aktivierung der r15-LOX-mRNA-Translation. Die r15-LOX-mRNA-Translation wird nach der mRNA-Transkription durch den an der 3'UTR der mRNA gebildeten hnRNPK/E1-DICE-Komplex inhibiert. Der Mechanismus der Translationsinhibierung beruht auf der Blockierung der Assoziation der ribosomalen 60S-Untereinheit mit der am Initiations-AUG lokalisierten 40S-Untereinheit zu einem aktiven Ribosom. Die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K, katalysiert durch die Kinase c-Src, führt zur Aufhebung der Bindung von hnRNP K an das DICE in der r15-LOX-mRNA-3'UTR. Mit der Dissoziation des an der 3'UTR lokalisierten inhibitorischen Komplexes wird die mRNA-Translation und damit die Proteinexpression aktiviert.

ergab sich die Frage, ob durch spezifische zelluläre Signale eine Akkumulation von hnRNP K im Zytoplasma induziert werden kann. Eine derartige Regulation ist auch im Zusammenhang mit der Notwendigkeit der Inhibierung der r15-LOX-mRNA-Translation in Erythroblasten, vor der Ausstoßung des Zellkerns, interessant.

Die Inhibierung der r15-LOX-mRNA-Translation unmittelbar nach deren Prozessierung und ihrem Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma, erfordert die Bildung des inhibitorischen Komplexes am DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA vor dem Export aus dem Zellkern oder während des Translokationsprozesses. Beide Proteine, hnRNP K und hnRNP E1, binden unabhängig voneinander an das DICE und inhibieren die mRNA-Translation. Ausgehend davon, daß hnRNP K, nicht jedoch hnRNP E1, in beiden Kompartimenten lokalisiert ist und zwischen Zellkern und Zytoplasma transportiert wird (MICHAEL et al. 1997), erfüllt hnRNP K die Voraussetzungen, die erforderlich sind, um eine 3'UTR-DICE-tragende mRNA in Form eines translationsinaktiven mRNP-Komplexes aus dem Zellkern in das Zytoplasma zu transportieren.

Wir wiesen durch Immunpräzipitation von hnRNP K aus Retikulozytenlysat und die anschließende Isolation der mRNA aus dem resultierenden mRNP Komplex nach, daß r15-LOX-mRNA in den mRNPs direkt und spezifisch mit hnRNP K assoziiert ist (OSTARECK et al. 1997).

Untersuchungen, die wir gemeinsam mit Mitarbeitern aus dem Labor von Ze'ev RONAI am *Ruttenberg Cancer Center, Mount Sinai School of Medicine*, New York, durchführten,

ergaben, daß hnRNP K Substrat einer weiteren Kinase, der »mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase« (MAPK/ERK) ist. ERK wird nach Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli in den Zellkern transportiert. Die Serin-Kinase ERK phosphoryliert die Serine 284 und 353 (S284, 353) in hnRNP K. Die Serin-Phosphorylierung durch ERK führt zu einer Akkumulation von hnRNP K im Zytoplasma. Die zytoplasmatische Akkumulation von hnRNP K bewirkt eine deutliche Verstärkung der Inhibierung der Translation von Reporter-mRNAs, die ein 3'UTR-DICE tragen. Die Akkumulation von hnRNP K im Zytoplasma und die dadurch bedingte Translationsinhibierung wird sowohl durch den spezifischen Inhibitor der ERK-Kinase PD98059 als auch durch Mutation der Serine S284, 353 zu Asparaginsäure (S284, 353D) aufgehoben (HABELHAH et al. 2001).

Mit der ERK-abhängigen Serin-Phosphorylierung von hnRNP K haben wir eine weitere Modifikation identifiziert, welche die Funktion von hnRNP K als Regulator der mRNA-Translation moduliert.

Zwei unterschiedliche Signalmechanismen führen zur spezifischen post-translationalen Modifikation von hnRNP K. Die verschiedenen Wege der Phosphorylierung bewirken eine positive und negative Kontrolle der Funktion von hnRNP K als post-transkriptionaler Regulator. Die durch Src katalysierte Tyrosin-Phosphorylierung hebt die Bindung an das DICE auf und inaktiviert dadurch hnRNP K als Inhibitor der mRNA-Translation. Die Serin-Phosphorylierung durch ERK reduziert nicht die DICE-Bindung. Sie führt jedoch zur Akkumulation von hnRNP K im Zytoplasma und verstärkt die Inhibierung der Translation 3'UTR-DICE-tragender mRNAs.

Die Ergebnisse unserer Studien in homologen und heterologen Zellen und Zellextrakten unterstützen die These, daß im Zellkern der Erythroblasten hnRNP K ko- oder post-transkriptional an die r15-LOX-mRNA-3'UTR bindet. Der Export des r15-LOX-mRNA/hnRNPK-Komplexes führt zu einer Inhibierung der r15-LOX-mRNA-Translation im Zytoplasma. Dadurch kann eine Synthese der r15-LOX in frühen Stadien der Reifung erythroider Zellen und eine durch die katalytische Aktivität der r15-LOX initiierte frühzeitige Degradation der Mitochondrien unterbunden werden. Die Bindung von hnRNP E1 an das DICE kann zusätzlich zu dem bereits assoziierten hnRNP K erfolgen und dadurch die Translationsinhibierung sichern, sie kann aber auch im Austausch gegen hnRNP K die Translationskontrolle gewährleisten. hnRNP K steht dann für weitere mRNA-Bindungs- und Exportzyklen oder andere Funktionen zur Verfügung. Die Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src stellt einen Weg zur Aktivierung der r15-LOX-mRNA-Translation im reifen Retikulozyten dar.

## **6. Ausblick**

Die vorgestellten Arbeiten führten zu einem detaillierten Verständnis der molekularen Mechanismen der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation. Wesentliche Aspekte, sowohl der Inhibierung der Translation durch den 3'UTR-hnRNPK/E1-DICE-Komplex als auch der Aktivierung der Translation durch die von c-Src katalysierte Tyrosin-Phosphorylierung des hnRNP K, die zum Verlust der DICE-Bindung führt, konnten aufgeklärt werden.

Zentraler Gegenstand unserer weiteren Forschungstätigkeit werden Untersuchungen zur Einordnung der beschriebenen Mechanismen in den Gesamtprozeß der Reifung erythroider Zellen sein. Dazu werden wir uns zunächst mit der Identifizierung funktionaler Domänen im hnRNPK/E1-DICE-Komplex befassen und die strukturellen Grundlagen der Bindung von hnRNP K an das DICE sowie der Interaktion zwischen hnRNP K und hnRNP E1 studieren.

Ein weiterer Aspekt, der uns interessiert, ist die Regulation der Funktion von hnRNP K und hnRNP E1 durch zelluläre Signale. Wir wollen die Phospho-Tyrosine identifizieren, welche die Funktion von hnRNP K modulieren und die Domänen in hnRNP K und c-Src charakterisieren, die für die Interaktion beider Proteine und die Aktivierung der Kinase von Bedeutung sind. Hierzu gehört auch die Untersuchung möglicher funktionaler Modifikationen von hnRNP E1.

Die Expression von hnRNP K und hnRNP E1 sowie der für die Regulation ihrer Funktion relevanter Kinasen in erythroiden Zellen stellt einen weiteren Schwerpunkt dar. Wir führen diesbezügliche Studien zunächst in isolierten erythroiden Zellen verschiedener Reifungsstadien durch. Die Etablierung eines erythroiden Zellsystems, das den Reifungsprozeß rekapituliert und Untersuchungen zur Signaltransduktion erlaubt, ist ein weiteres wesentliches Ziel. Die Regulation der r15-LOX-Expression kann derzeit nicht in einem homologen Zellsystem studiert werden, da kein geeignetes erythroides Kaninchen-Zellmodell zur Verfügung steht. Das Hauptproblem bei der Verwendung alternativer erythroider Maus-Zellmodelle besteht in der Notwendigkeit, eine Zellkernausschleusung zu induzieren und den Prozeß des Mitochondrienabbaus zu verfolgen.

Das weitere Studium der für die Reifung erythroider Zellen wesentlichen Prozesse wird wichtige Informationen zu den molekularen, biochemischen und zellbiologischen Grundlagen der terminalen Differenzierung bis zum Erythrozyten liefern. Hierbei besteht auch die Möglichkeit, Unterschiede zwischen der Reifung erythroider Zellen zu funktionalen Erythrozyten und gestörten Reifungsprozessen, die zu Anämien führen, zu analysieren. Dies trifft insbesondere auf Fehlregulationen zu, die Anämien als Folge von Störungen des Energiestoffwechsels oder des Verlustes von Organellen in frühen Reifungsstadien bedingen.

### *Dank*

Die Arbeiten von Antje OSTARECK-LEDERER wurden wesentlich durch die Zuerkennung des Leopoldina-Förderpreises der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle (Saale), gefördert. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Roland RIEDEL für die gewährte geduldige Unterstützung. Die Forschungsarbeit von Antje OSTARECK-LEDERER wurde außerdem durch Stipendien des Boehringer-Ingelheim-Fonds und der European Molecular Biology Organisation unterstützt. Auch die Deutsche Forschungsgemeinschaft förderte unsere Arbeiten.

Unser Dank gilt allen Wissenschaftlern, die wichtige Beiträge zur erfolgreichen Bearbeitung der Thematik geleistet haben. Wir danken den Leitern der Arbeitsgruppen (auch stellvertretend für deren Mitglieder), die uns eine erfolgreiche gemeinsame Forschung ermöglichten: Dr. Matthias W. HENTZE und Dr. Iain W. MATTAJ (EMBL, Heidelberg), Dr. Bernd J. THIELE (Humboldt-Universität zu Berlin), Dr. Richard J. JACKSON und Dr. Nancy STANDART (University of Cambridge, UK), Dr. Karol BOMSZYK (University of Washington, Seattle, USA). Prof. S. M. RAPOPORT, der in diesem Jahr leider verstorben ist, möchten wir insbesondere dafür danken, daß er uns zur Bearbeitung der interessanten Thematik motivierte und über all die Jahre stetes Interesse an ihrem Fortgang zeigte.

### *Literatur*

- ALEXANDROPOULOS, K., and BALTIMORE, D.: Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein. *Sin. Genes Dev.* 10(11), 1341–1355 (1996)
- BJORGE, J. D., JAKYMIW, A., and FUJITA, D. J.: Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19, 5620–5635 (2000)
- BURNHAM, M. R., BRUCE-STASKAL, P. J., HARTE, M. T., WEIDOW, C. L., WEED, S. A., and BOUTON, A. H.: Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS. *Mol Cell Biol.* 20(16), 5865–5878 (2000)
- FLEMING, J., THIELE, B. J., CHESTER, J., O'PREY, J., JANETZKY, S., AITKEN, A., ANTON, I. A., RAPOPORT, S. M., and HARRISON, P.: The complete sequence of the rabbit erythroid-specific 15-lipoxygenase mRNA: comparison of the predicted amino acid sequence of the erythrocyte lipoxygenase with other lipoxygenases. *Gene* 79, 181–188 (1989)
- GEBAUER, F., OSTARECK, D. H., OSTARECK-LEDERER, A., GRKOVIC, M., and HENTZE, M. W.: Translational control of 15-lipoxygenase and msl-2 mRNAs: single regulators or co-repressor assemblies. In: *The Ribosome. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. LXVII*, pp. 329–336. CSH Laboratory Press 2002

- HABELHAH, H., SHOKAT, K., HUANG, L., OSTARECK-LEDERER, A., BURLINGAME, A. L., HENTZE, M. W., and RONAI, Z.: Erk phosphorylation is required for nuclear export of hnRNP K and subsequent inhibition of mRNA translation. *Nature Cell Biol.* 3, 325–330 (2001)
- HÖHNE, M., THIELE, B. J., PREHN, S., GIESSMANN, E., NACK, B., and RAPOPORT, S. M.: Activation of translationally inactive lipoxigenase mRNP particles. *Biomed. Biochim. Acta* 47, 75–78 (1988)
- HUBBARD, S. R.: Src autoinhibition: Let us count the ways. *Nature Struct. Biol.* 6, 711–714 (1999)
- HUNT, T.: On the translational control of suicide in red cell development. *Trends Biochem. Sci.* 14, 393–394 (1989)
- KAMINSKI, A., OSTARECK, D. H., STANDART, N., and JACKSON, R. J.: Affinity methods for isolating RNA binding proteins. In: SMITH, C. W. J. (Ed.): *RNA Protein Interactions*; pp. 137–160. Oxford: IRL Press 1998
- KÜHN, H., THIELE, B.-J., OSTARECK-LEDERER, A., STENDER, H., SUZUKI, H., YOSHIMOTO, T., and YAMAMOTO, S.: Bacterial expression, purification and partial characterization of recombinant rabbit reticulocyte 15-lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1168, 73–78 (1993)
- MAKEYEV, A. V., and LIEBHABER, S. A.: The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA* 8(3), 265–278 (2002)
- MICHAEL, W., EDER, P., and DREYFUSS, G.: The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* 16(12), 3587–3598 (1997)
- NEUBAUER, G., and MANN, M.: Mapping of phosphorylation sites on gel isolated proteins by nano-electrospray mass spectrometry: potentials and limitations. *Anal. Chem.* 17, 235–242 (1999)
- O'PREY, J., and HARRISON, P. R.: Tissue-specific regulation of the rabbit 15-lipoxygenase gene in erythroid cells by a transcriptional silencer. *Nucleic Acids Res.* 23(18), 3664–3672 (1995)
- OSTARECK, D. H., OSTARECK-LEDERER, A., SHATSKY, I. N., and HENTZE, M. W.: Lipoxigenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104, 281–290 (2001)
- OSTARECK, D. H., OSTARECK-LEDERER, A., WILM, M., THIELE, B.-J., MANN, M., and HENTZE, M. W.: mRNA silencing during erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate lipoxigenase translation from the 3' end. *Cell* 89, 597–606 (1997)
- OSTARECK-LEDERER, A., OSTARECK, D. H., CANS, C., BOMSZTYK, K., SUPERTI-FURGA, G., and HENTZE, M. W.: Signal-dependent translational activation of silenced 15-Lipoxygenase mRNA by the Src tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4535–4543 (2002)
- OSTARECK-LEDERER, A., OSTARECK, D. H., and HENTZE, M. W.: Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNP-K and E1/E2. *Trends Biochem. Sci.* 23, 409–411 (1998)
- OSTARECK-LEDERER, A., OSTARECK, D. H., STANDART, N., and THIELE, B.-J.: Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J.* 13(6), 1476–1478 (1994)
- RAPOPORT, S. M., and SCHEWE, T.: The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 864, 471–495 (1986)
- RAPOPORT, S. M., SCHEWE, T., and THIELE, B. J.: Maturational breakdown of mitochondria and other organelles in reticulocytes. In: HARRIS, J. R. (Ed.): *Blood Cell Biochemistry*. Vol. 1, pp. 151–194. New York: Plenum Press 1990
- REIMANN, I., HUTH, A., THIELE, H., and THIELE, B. J.: Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'-UTR control element DICE. *J. Mol. Biol.* 315(5), 965–974 (2002)
- THIELE, B.-J., BERGER, M., SCHWARZ, K., BORNGRÄBER, S., OSTARECK-LEDERER, A., and THIELE, H.: Expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447, 45–61 (1999)
- VAN SEUNINGEN, I., OSTROWSKI, J., BUSTELO, X. R., SLEATH, P. R., and BOMSZTYK, K.: The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3 binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J. Biol. Chem.* 270, 26976–26985 (1995)

Dr. Antje OSTARECK-LEDERER  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie  
Institut für Biochemie  
Kurt-Mothes-Straße 3  
06120 Halle (Saale)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5524949  
Fax: +49 345 5527014  
E-Mail: aostareck@biochemtech.uni-halle.de

# **Physiologie und Pharmakologie/Toxikologie**

---

Dr. rer. nat. Antje BÜRGER

Geboren 1968 in Darmstadt. 1987 bis 1992 Biologiestudium an der Philipps-Universität in Marburg. Anschließendes Promotionsstudium an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg, als Stipendiatin des Graduierten Kollegs für Experimentelle Nieren- und Kreislaufforschung. Promotion 1996 zum Dr. rer. nat. über Extrazelluläre Matrixproteine humaner Nierenzellen: Regulation der Synthese und Untersuchung zur Zell-Matrix-Interaktion. Nach einer zweieinhalbjährigen Lehr- und Forschungstätigkeit am Carl-Ludwig-Institut für Physiologie in Leipzig, von 1999 bis 2001 Forschungsaufenthalt am BIDMC, Harvard Medical School in Boston als Stipendiatin der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina. 2002–2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover; seit 2003 wissenschaftliche Angestellte am Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

## Untersuchungen zur Funktion des Homöobox-Gens *Csx/Nkx2.5* und zur Expression der Cre-Rekombinase im Herzen der Maus

Antje BÜRGER<sup>1,2</sup>, Patrick Y. JAY<sup>3</sup>, Megan C. SHERWOOD<sup>3</sup>, Joel A. LAWITTS<sup>4</sup>,  
und Seigo IZUMO<sup>1</sup>

Mit 2 Abbildungen und 2 Tabellen

### Zusammenfassung

*Csx/Nkx2.5* ist ein Transkriptionsfaktor, der während der gesamten Herzentwicklung, aber auch im adulten Herzen exprimiert wird. Homozygot mutante Mäuse für *Csx/Nkx2.5* sind aufgrund der nicht abgeschlossenen Herzentwicklung embryonal letal. Um *Csx/Nkx2.5* näher zu charakterisieren, sollten Mäuse generiert werden, denen das Gen erst nach der Geburt im Herzen verloren geht. Dazu mußten sogenannte gefloxt Mäuse hergestellt werden, die *Csx/Nkx2.5* flankiert von zwei *loxP-sites* tragen. Nach Kreuzung dieser Maus mit transgenen Mäusen, die das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines herzspezifischen Promotors ( $\alpha$ -myosin-heavy-chain( $\alpha$ MHC)-Promotor) tragen, kommt es zu einer Deletion von *Csx/Nkx2.5*. Es konnten Mäuse generiert werden, die das *Csx/Nkx2.5*-Gen flankiert von *loxP-sites* besitzen, die aber zusätzlich noch eine *loxP-site* vor dem Gen für die Neomycin-Resistenz tragen. Diese homozygoten Mäuse sind ebenfalls embryonal letal und zeigen den gleichen Phänotyp wie die Null-Mäuse: Sie sind im Wachstum zurückgeblieben, haben einen Perikarderguß, und die Herzentwicklung ist an einem Punkt stehengeblieben. Die elektrophysiologische Untersuchung zeigte, daß die heterozygoten Mäuse einen AV-Block ersten Grades aufweisen.

Es wurden außerdem transgene Mäuse hergestellt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotors tragen. Die Mäuse einer transgenen Linie entwickelten eine ausgeprägte Dilatative Kardiomyopathie, mit einer Lebenserwartung von nur drei Monaten. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine hohe Expression von Cre zu schweren Organstörungen führen kann.

### Abstract

*Csx/Nkx2.5* is a transcription factor that is not only expressed during the entire heart development but also in the adult heart. Homozygous mutant mice for *Csx/Nkx2.5* are embryonic lethal because of an arrest of heart development. To characterize the function of *Csx/Nkx2.5* in more detail, the approach was to generate a mouse that get a deletion of *Csx/Nkx2.5* only after birth. To conditionally inactivate the *Csx/Nkx2.5* gene in the heart, two different mouse strains had to be generated. One mouse strain has to harbor a floxed *Csx/Nkx2.5* gene, the other one has to be a transgenic mouse line that express the Cre-recombinase under a heart specific promoter ( $\alpha$ -myosin-heavy-chain ( $\alpha$ MHC) promoter). We generated mice that harbor a floxed neomycin resistance gene and a third *loxP-site* in the 3' untranslated region of exon 2 of *Csx/Nkx2.5* gene. However, these homozygous mice are also embryonic lethal and have the same phenotype like the null mice: they are growth retarded, they have a pericardial effusion and they show an arrest of heart development. Electrophysiological examinations showed that heterozygous mice have a first-degree AV block.

---

1 Cardiovascular Division, Beth Israel Deaconess Medical Center and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

2 Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland.

3 Department of Cardiology, Children's Hospital, and Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

4 Transgenic Facility, Beth Israel Deaconess Medical Center and Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

We generated transgenic strains in which Cre was driven by the  $\alpha$ MHC-promoter. Mice from one of these lines developed a severe dilated cardiomyopathy and all animals die at an age of three months. These data demonstrate that Cre-recombinase, when expressed at high levels can cause organ dysfunction.

## 1. Einleitung

Csx/Nkx2.5 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Klasse der Homöobox-Proteine. Csx/Nkx2.5 wird bereits 7,5 Tage *post coitum* im Vorläufer-Herzen exprimiert und wird dann sowohl während der gesamten Herzentwicklung als auch in den Vorhöfen und den Ventrikeln des adulten Herzens exprimiert. Homozygot mutante Mäuse für Csx/Nkx2.5 sind aufgrund der nicht abgeschlossenen Herzentwicklung embryonal letal (LYONS et al. 1995, TANAKA et al. 1999). Heterozygote Mutationen des menschlichen Csx/Nkx2.5-Gens wurden in Patienten mit syndromischen kongenitalen Herzfehlern entdeckt. Als häufigster Fall trat ein AV-Block, entweder isoliert oder in Assoziation mit einem Vorhof-Septum-Defekt (ASD) oder Ventrikel-Septum-Defekt (VSD), auf (BENSON et al. 1999).

Um Csx/Nkx2.5 näher zu charakterisieren, sollten Mäuse generiert werden, denen das Gen erst nach der Geburt im Herzen verloren geht. Dazu mußten einerseits sogenannte gefloxt Mäuse hergestellt werden, die Csx/Nkx2.5 flankiert von zwei loxP-sites tragen, als auch transgene Mäuse, die das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines herzspezifischen Promotors ( $\alpha$ MHC) besitzen. Nach Kreuzung dieser beiden Mausstämmen würde es durch eine Cre vermittelte Rekombination zu einer Deletion von Csx/Nkx2.5 kommen.

## 2. Ergebnisse

Mit Hilfe des »gene targeting« wurden Mäuse hergestellt, die das Neomycin-Gen flankiert von loxP-sites besitzen und eine dritte loxP-site im 3'-untranslatierten Bereich von Csx/Nkx2.5 tragen (Abb. 1). Es zeigte sich, daß diese homozygoten Mäuse embryonal letal sind. Sie sterben am Tag 10,5 *post coitum*. Eine genauere Analyse des Phänotyps ergab, daß die Mäuse ebenfalls, wie die kompletten Null-Mäuse für Csx/Nkx2.5, im Wachstum zurückgeblieben sind, einen Perikarderguß und nur einen Ventrikel haben (LYONS et al. 1995, TANAKA et al. 1999). Diese Daten weisen darauf hin, daß diese Mutation ebenfalls eine funktionelle Null-Mutation für Csx/Nkx2.5 darstellt. Es wurde mit Hilfe von Northern-Blots untersucht, ob die Transkription von Csx/Nkx2.5 in den heterozygoten gefloxten Tieren beeinflusst ist. Es zeigte sich, daß nur 50 % der Csx/Nkx2.5 mRNA vorhanden ist. Die heterozygoten gefloxten Csx/Nkx2.5-Mäuse sind lebensfähig. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, daß sie einen AV-Block ersten Grades haben. Wie das Oberflächen-EKG (Tab. 1) zeigt, kommt es zu einer Verlängerung des PR-Intervalls (Zeit zwischen Beginn der Vorhof-Depolarisation [P-Welle] und der Ventrikel-Depolarisation [QRS-Komplex]) und des QRS-Intervalls.

Für die Herstellung der  $\alpha$ MHC-Cre-transgenen Maus wurde das Gen für die Cre Rekombinase (GU et al. 1993) hinter den  $\alpha$ MHC-Promotor kloniert (Abb. 2A) (GULICK et al. 1991). Von 26 Founder-Tieren trugen 8 das Transgen. Sieben dieser Founder-Tiere starben allerdings im Alter von 4–5 Wochen (4 Tiere) oder von 4 Monaten (3 Tiere) an Herzversagen. Sie wiesen jeweils im linken Vorhof einen schon alten Thrombus auf, und es wurde eine kardiale Stauungsleber festgestellt. Drei transgene Linien konnten etabliert werden, wovon zwei näher untersucht wurden. Eine Linie (Linie 12) stammt von dem noch lebenden Founder-Tier, die

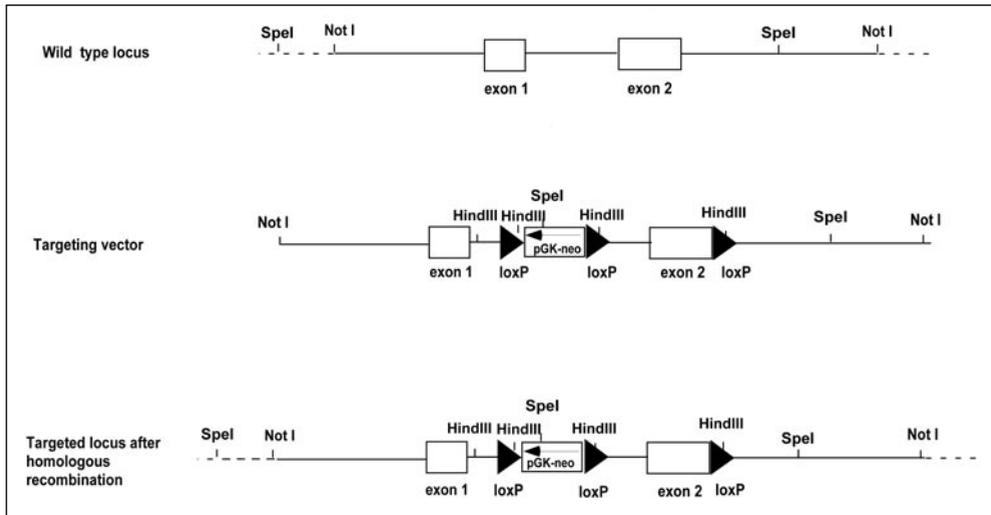


Abb. 1 »Gene targeting« von *Csx/Nkx2.5*. Schematisch ist die Organisation des *Csx/Nkx2.5*-Gens (»wild type locus«), der verwendete Vektor (»targeting vector«) und der genomische Locus nach einer homologen Rekombination dargestellt.

Tab. 1 EKG-Untersuchungen an heterozygoten geflochten *Csx/Nkx2.5*-Mäusen

SCL: kürzeste Zykluslänge (»shortest cycle length«); HR: Herzfrequenz; PR: Intervall zwischen Beginn der Vorhof-Depolarisation (P-Welle) und der Ventrikel-Depolarisation (QRS-Komplex); QRS: Ventrikel-Depolarisation; QT: Zeit zwischen Beginn der Depolarisation der Ventrikel und deren Repolarisation; ms: Millisekunden; bpm: Herzschläge pro Minute (»beats per minute«); [1]  $p < 0,05$

	Weibchen		Männchen	
	<i>Csx</i> wt (n = 10)	<i>Csx</i> +/- (n = 11)	<i>Csx</i> wt (n = 6)	<i>Csx</i> +/- (n = 15)
SCL(ms)	150,7 ± 16,7	153,7 ± 17,7	154,1 ± 20,1	152,2 ± 16,9
HR (bpm)	402,5 ± 42,9	395,3 ± 47,8	394,6 ± 47,0	399,0 ± 45,1
PR (ms)	43,2 ± 4,4	48,6 ± 4,7 <sup>[1]</sup>	38,1 ± 3,9	44,8 ± 5,2 <sup>[1]</sup>
QRS (ms)	13,7 ± 0,9	16,6 ± 2,2 <sup>[1]</sup>	13,1 ± 2,0	15,4 ± 1,6 <sup>[1]</sup>
QT (ms)	33,2 ± 1,7	34,0 ± 4,2	32,6 ± 2,3	32,7 ± 2,6

andere von einem Founder, der nach 4 Monaten gestorben ist (Linie 9). Erstaunlicherweise entwickeln alle Tiere der Linie 9 ein Herzversagen und sterben nahezu im gleichen Alter von 11–13 Wochen (Kaplan-Meier-Überlebenskurve, Abb. 2B). Die Haut dieser Mäuse ist kalt, was auf eine schlechte systemische Durchblutung schließen läßt. Die Atmung ist schnell, und sie entwickeln periphere Ödeme. Pathologische Untersuchungen ergaben eine Dilatation der Ventrikel mit einer dünnen Myokardwand. Alle Tiere hatten jeweils im linken Vorhof einen schon alten Thrombus (Abb. 2C), was ein Zeichen für eine linksventrikuläre Dysfunktion ist. Die Mäuse hatten ebenfalls Pleuraergüsse und Aszites, was auf eine Dysfunktion des rechten Herzens schließen läßt. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen konnte eine stärkere Expression der Cre-Rekombinase in den Herzen der transgenen Linie 9 verglichen mit der Linie 12 nach-

gewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung der Dilatativen Kardiomyopathie wurden Echokardiographien an diesen Mäusen durchgeführt. Im Alter von 60 Tagen war die linksventrikuläre kontraktile Funktion der Cre-transgenen Tiere bereits erheblich beeinträchtigt, was anhand des Parameters der Verkürzungsfraktion (»fractionell shortening«, FS) festgestellt wurde (47,8% FS in TG versus 57,7% in NTG). Mit zunehmendem Alter verschlechterte sich diese Funktion weiter (54% FS in TG versus 25% in NTG) (Tab. 2).

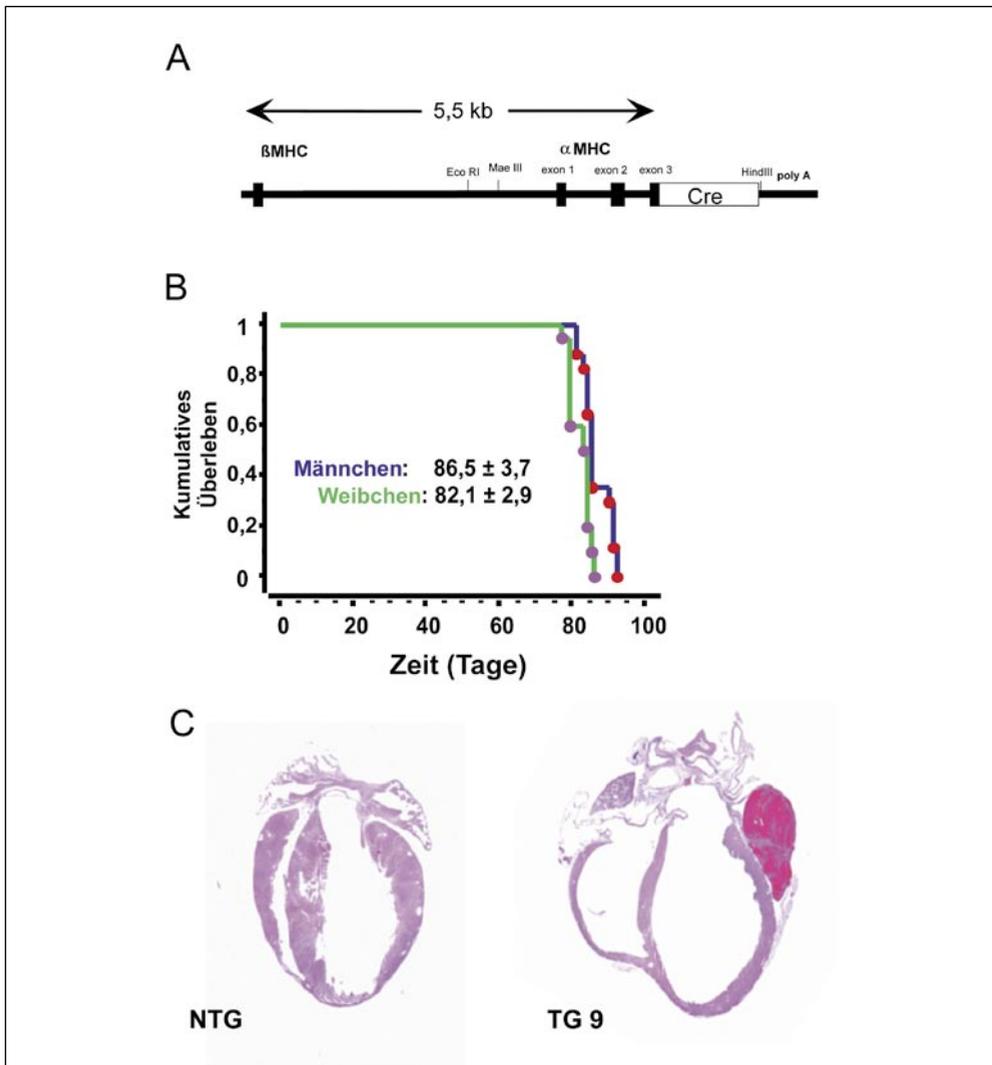


Abb. 2 (A) Konstrukt des für die Herstellung der  $\alpha$ MHC-Cre transgenen Maus verwendeten Vektors, der das Gen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des  $\alpha$ MHC-Promotor enthält. (B) Kaplan-Mayer-Überlebenskurve der Cre-transgenen Linie 9. (C) Transversale Schnitte von Herzen einer nicht-transgenen (NTG) und einer transgenen (TG) Maus, die mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt wurden. Sie zeigen eine Dilatation des rechten und linken Ventrikels und einen Thrombus im linken Vorhof. Der Maßstab entspricht 1 mm.

Tab. 2 Echokardiographie Untersuchungen an männlichen Cre-transgenen Mäusen (TG9)

	60 Tage		67 Tage		73 Tage	
	NTG	TG	NTG	TG	NTG	TG
EDD (mm)	2,6 ± 0,3	2,9 ± 0,1	2,1 ± 0,3	3,1 ± 0,5 <sup>[2]</sup>	2,7 ± 0,2	4,5 ± 0,3 <sup>[2]</sup>
ESD (mm)	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,4	0,8 ± 0,2	2,1 ± 0,4 <sup>[2]</sup>	1,2 ± 0,1	3,4 ± 0,2 <sup>[2]</sup>
FS (%)	57,7 ± 8,1	47,8 ± 11,2	58 ± 8	32 ± 5,9 <sup>[2]</sup>	54 ± 1	25 ± 1,4 <sup>[2]</sup>
LVPW (mm)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1 <sup>[1]</sup>

NTG: nicht transgene Mäuse ( $n = 3$ ); TG: Cre-transgene Mäuse ( $n = 4$ ); EDD: enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels (»end diastolic dimension«); ESD: endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels (»end systolic dimension«); FS: Verkürzungsfraction (»fractional shortening«); LVPW: linksventrikuläre Hinterwand (»left ventricular posterior wall thickness«); [1] ( $n = 2$ ), 2 Mäuse bereits verstorben ( $n = 2$ ), [2]  $p < 0,05$

### 3. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß

- homozygote gefloخته *Csx/Nkx2.5*-Mäuse embryonal letal sind,
- heterozygote gefloخته *Csx/Nkx2.5*-Mäuse einen ähnlichen Phänotyp zeigen, wie er auch für Menschen beschrieben wurde,
- für *Csx/Nkx2.5* eine »Haploinsufficiency« vorliegt und
- daß *Csx/Nkx2.5* eine wichtige Rolle bei der Ausprägung und der Funktion des Reizleitungssystems spielt.

Die Letalität der homozygoten gefloختen *Csx/Nkx2.5*-Tiere war nicht zu erwarten, da sich lediglich im Intron des *Csx/Nkx2.5*-Gens das gefloخته Gen für die Neomycin-Resistenz und im untranslatierten 3'-Bereich eine loxP-*site* befindet. Der Grund hierfür könnte die hohe Expression des unter einem starken Promotor (PGK) liegenden Gens für die Neomycin-Resistenz sein. Mutationen im *Csx/Nkx2.5*-Gen des Menschen können einen AV-Block verursachen, der entweder isoliert vorkommt oder in Assoziation mit einem Vorhof-Septum-Defekt oder anderen Formen kongenitaler Herzerkrankungen (BENSON et al. 1999). Obwohl bei Menschen auch AV-Blöcke zweiten und dritten Grades beschrieben wurden, ist die hier gefundene Ähnlichkeit des Phänotyps sehr beeindruckend.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Cre-transgenen Mäuse ergaben, daß eine hohe Expression von Cre zu schweren Organstörungen führen kann. Es konnte gezeigt werden, daß eine starke herzspezifische Expression von Cre zu einer ausgeprägten Dilatativen Kardiomyopathie führt. Es ist bekannt, daß eine hohe Expression von Fremdproteinen, wie z. B. die des »green fluoreszenz protein« (GFPs), im Herzen einen sehr negativen Effekt auf die Herzfunktion haben kann (HUANG et al. 2000). Die Expression von Cre im Gehirn führt dort ebenfalls zu erheblichen Schäden (PFEIFER et al. 2001). All diese Daten weisen daraufhin, daß die Verwendung von Cre-transgenen Tieren zur konditionellen Deletion bestimmter Gene immer entsprechende Kontrollen benötigt. Die hier vorgestellte Maus mit einer ausgeprägten Dilatativen Kardiomyopathie bietet aber ein sehr gutes Modell zur Untersuchung der Herzinsuffizienz.

Literatur

- BENSON, D. W., SILBERBACH, G. M., KAVANAUGH-McHUGH, A., COTTRILL, C., ZHANG, Y., RIGGS, S., SMALLS, O., JOHNSON, M. C., WATSON, M. S., SEIDMAN, C. E., PLOWDEN, J., and KUGLER, J. D.: Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J. Clin. Invest.* 104, 1567–1573 (1999)
- GU, H., ZOU, Y.-R., and RAJEWSKY, K.: Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155–1164 (1993)
- GULICK, J., SUBRAMANIAM, A., NEUMANN, J., and ROBBINS, J.: Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J. Biol. Chem.* 266, 9180–9185 (1991)
- HUANG, W.-Y., ARAMBURU, J., DOUGLAS, P. S. and IZUMO, S.: Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nature Med.* 6, 482–483 (2000)
- LYONS, I., PARSONS, L. M., HARTLEY, L., LI, R., ANDREWS, J. E., ROBB, L., and HARVEY, R. P.: Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev.* 9, 1654–1666 (1995)
- PFEIFER, A., BRANDON, E. P., KOOTSTRA, N., GAGE, F. H., and VERMA, I. M.: Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11450–11455 (2001)
- TANAKA, K., CHEN, Z., BARTUNKOVA, S., YAMASAKI, N., and IZUMO S.: The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 126, 1269–1280 (1999)

Dr. Antje BÜRGER  
Institut für Molekularbiologie  
OE 5251  
Carl-Neuberg-Straße 1  
30625 Hannover  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel: +49 511 5325961  
Fax: +49 511 5324283  
E-Mail: Buerger.Antje@mh-hannover.de

# **Toxikologie**

---

Dr. med. Oliver DISTLER

Geboren 1968 in Nürnberg. 1989 bis 1996 Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen. 1996–1997 Arzt im Praktikum/Stationsarzt in der Abteilung Innere Medizin, Klinikum Bamberg. Promotion 1997 über »Induction with Phenobarbital prevents sodium-retention in partial portal vein ligated rats« an der Universität Erlangen. 1997–1998 Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, Universität Regensburg und Stationsarzt für allgemeine Innere Medizin. 1998–2002 Postdoc-Stipendiat am Zentrum für Experimentelle Rheumatologie, Universitätsklinikum Zürich; anschließend drei Monate Assistenzarzt in der Abteilung für Rheumatologie. 2003 Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, Sektion Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Zürich. Seit 2004 Assistenzarzt und Forschungsgruppenleiter in der Rheumaklinik des Universitätsspitals Zürich.

## **Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in der Pathogenese der systemischen Sklerose**

Oliver DISTLER<sup>1,2</sup>, Jörg DISTLER<sup>1</sup>, Astrid HIRTH<sup>1</sup>, Renate E. GAY<sup>1</sup>,  
and Steffen GAY<sup>1</sup>

### *Zusammenfassung*

Die systemische Sklerose (Sklerodermie, SSc) ist eine Erkrankung des Bindegewebes, bei der es zu einer Akkumulation von Proteinen der Extrazellulärmatrix in der Haut und in inneren Organen kommt. Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht geklärt, in frühen Phasen der Pathogenese scheinen aber perivaskuläre Entzündungsinfiltrate und eine gestörte Angiogenese mit Endothelzellveränderungen eine Rolle zu spielen. Das *CC-Chemokin Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1, CCL-2) könnte bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündungsinfiltrate eine wichtige Rolle spielen. MCP-1 wird in der Haut von Patienten mit SSc im Vergleich zu gesunden Kontrollen überexprimiert. Überstände von kultivierten SSc-Fibroblasten induzieren MCP-1-vermittelt eine Migration mononukleärer Entzündungszellen. Ob MCP-1 darüber hinaus auch pro-fibrotische Effekte über eine direkte Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche von Fibroblasten entwickelt, wird derzeit kontrovers diskutiert. Trotz der gestörten Angiogenese in der SSc findet sich eine starke Überexpression des potenten angiogenen Moleküls *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) in der Haut von Patienten mit SSc. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen waren auch die Serumspiegel von VEGF bei SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. Interessanterweise zeigten Patienten mit schwereren Verlaufsformen der Erkrankung und Patienten ohne Fingerkuppenulzera höhere VEGF-Werte als ihre jeweiligen Vergleichspopulationen. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß VEGF präventiv auf die Manifestation ischämischer Symptome wirken könnte.

### *Abstract*

Systemic sclerosis (scleroderma/SSc) is a connective tissue disease of unknown etiology. Perivascular inflammatory infiltrates and alterations of endothelial cells with an impaired angiogenesis are observed in early stages of the disease, whereas later stages are characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix proteins in the skin and various internal organs. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1, CCL-2) might be involved the initiation and the maintenance of inflammatory infiltrates, since MCP-1 expression is upregulated in the skin of SSc patients compared to healthy controls. MCP-1 is secreted by cultured SSc fibroblasts into the supernatant and induces migration of mononuclear cells. Whether MCP-1 can induce the synthesis of extracellular matrix proteins *via* direct effects on dermal fibroblasts is discussed controversially. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a potent angiogenic molecule, is overexpressed in the skin of patients with SSc despite insufficient angiogenesis. Consistent with this finding, the serum levels of VEGF in SSc patients are also increased compared to healthy controls. Interestingly, patients suffering from diffuse SSc and patients without finger tip ulcers showed higher VEGF levels compared to age- and sex-matched controls. These results indicate that VEGF might help to protect against the manifestation of ischemic conditions.

---

1 Center of Experimental Rheumatology and WHO Collaborating Center for Molecular Biology and Novel Therapeutic Strategies for Rheumatic Diseases, Department of Rheumatology, University Hospital Zurich, Switzerland.

2 Departement of Internal Medicine, Section of Clinical Immunology, University Hospital Zurich, Switzerland.

## 1. Einleitung

Die systemische Sklerose (SSc, Sklerodermie) ist eine generalisierte Erkrankung des Bindegewebes, welche die Haut und verschiedene innere Organe wie die Lunge, die Niere, das Herz und den Ösophagus betrifft. Das histopathologische Hauptkennzeichen der SSc ist eine exzessive Akkumulation von Proteinen der Extrazellulärmatrix, wodurch es zu einer Zerstörung der physiologischen Architektur des Gewebes und schließlich zur Dysfunktion der betroffenen Organe kommt. Produziert werden die Extrazellulärmatrixproteine von aktivierten Fibroblasten, die sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* erhöhte Mengen von Glykosaminoglykanen, Decorin, Fibronectin und verschiedenen Kollagenbestandteilen produzieren (JIMENEZ et al. 1996). Allerdings sind die Mechanismen, die zur Aktivierung der Fibroblasten und zur entkoppelten Überproduktion von Extrazellulärmatrixproteinen führen, nach wie vor unbekannt.

Weitere histopathologische Kennzeichen der SSc sind perivaskuläre Entzündungsinfiltrate und Endothelzellveränderungen, die in einer Reduktion der Kapillardichte resultieren. Interessanterweise treten diese Veränderungen insbesondere in frühen Krankheitsstadien auf, bevor die Fibrose der Haut und der inneren Organe detektierbar ist. Die Entzündungsinfiltrate sind T-Zell-dominiert und synthetisieren eine Reihe von profibrotischen Zytokinen wie TGF- $\beta$ , PDGF und IL-4 (WHITE 1996). Während in späteren Krankheitsstadien Entzündungsinfiltrate in den betroffenen Organen wie der Haut kaum mehr detektierbar sind, ist eine anhaltende Überexpression von verschiedenen Zytokinen zu beobachten. In Tiermodellen der SSc wie auch an Hautbiopsien von Patienten mit SSc in frühen Erkrankungsstadien konnte gezeigt werden, daß eine Apoptose von Endothelzellen zu den ersten pathologischen Veränderungen der SSc zählt. Im weiteren klinischen Verlauf kommt es zu einer zunehmenden Verminderung der Kapillardichte und somit zu einer verminderten Durchblutung des Gewebes (LEROY 1996). Dementsprechend gehören ischämische Symptome wie Fingerkuppenulzera zu den häufigen klinischen Veränderungen der SSc. Obwohl direkte Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang mit der verstärkten Synthese von Extrazellulärmatrixproteinen durch Fibroblasten fehlen, werden Entzündungsinfiltrate und vaskuläre Veränderungen aufgrund der zeitlichen Abfolge in der Pathogenese als mögliche Auslöser der Fibroblasten-Aktivierung diskutiert (FURST 1999).

## 2. Das Chemokin MCP-1 (CCL-2) in der Pathogenese der SSc

Ungeklärt ist bis heute, welche Mechanismen zur Akkumulation der Entzündungsinfiltrate in der Haut von SSc-Patienten führen. Chemokine sind eine Familie von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 8–12 kDa (DISTLER et al. 2003). Entsprechend der Anordnung von Cysteinen am N-Terminus werden die Chemokine in verschiedene Gruppen unterteilt. MCP-1 (CCL-2) gehört zur Gruppe der CC-Chemokine, bei denen die Cysteine unmittelbar nebeneinander lokalisiert sind. Die bekannteste Eigenschaft von Chemokinen ist Steuerung der Migration von Leukozyten im Rahmen eines Entzündungsgeschehens (DISTLER et al. 1999). Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß Chemokine darüber hinaus noch an einer Reihe weiterer biologischer Prozesse beteiligt sind (KUNKEL 1999). Beispielsweise haben Chemokine mit einem Glu-Leu-Arg(ERL)-Aminosäure-Motiv positive Effekte auf die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese), während Chemokine ohne dieses Motiv die Angiogenese hemmen. Weitere Studien zeigen, daß MCP-1 über Bindung an seinen Hauptrezeptor CCR-2 auch an

der Regulation von Extrazellulärmatrixproteinen beteiligt sein könnte. In einem Mausmodell der »crescentic Nephritis« ist die Entstehung des Entzündungsinfiltrates sowie der Fibrose von einer Expression von MCP-1 begleitet. Eine Blockierung der MCP-1-Funktion führt zu einer Verminderung des Entzündungsinfiltrates und nachfolgend zu einer verminderten Synthese von Kollagen Typ I im Rahmen der Fibrose (LOYD et al. 1997).

Eine Reihe von Untersuchungen weist darauf hin, daß MCP-1 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese der SSc spielt. Wir konnten zeigen, daß MCP-1 in der Haut von Patienten mit SSc u. a. von Fibroblasten, Keratinozyten, Leukozyten und Endothelzellen auf mRNA und Proteinebene exprimiert wird, während es bei gesunden Personen nicht detektierbar ist (DISTLER et al. 2001). Interessanterweise wurde MCP-1 auch in Hautarealen exprimiert, in denen die Fibrose klinisch noch nicht detektierbar war, was auf eine Rolle in der frühen Pathogenese der Erkrankung hinweist. *In vitro* fand sich bei dermalen Fibroblasten ebenfalls eine Sekretion von MCP-1, die im *Boyden Chamber Assay* eine Migration von PBMC verursachte. Vorbehandlung der Überstände der kultivierten Fibroblasten mit MCP-1-blockierenden Antikörpern führte zu einer signifikanten Verminderung der Migration der PBMC. Dermale Fibroblasten könnten daher über eine Expression von MCP-1 und dessen chemotaktische Eigenschaften für Leukozyten in frühen Krankheitsstadien die Entstehung des entzündlichen Infiltrates in der Haut der SSc-Patienten initiieren. Inwieweit MCP-1 auch an weiteren pathologischen Prozessen bei der SSc beteiligt ist, wird derzeit kontrovers diskutiert. Inkubation von dermalen Fibroblasten mit rekombinantem MCP-1 führte bei unseren Experimenten zu keiner direkten Steigerung der Prokollagen-Synthese, weder auf mRNA noch auf Proteinebene. Eine andere Arbeitsgruppe konnte dagegen in einem vergleichbaren Versuchsaufbau direkte Effekte von MCP-1 auf die Synthese von Prokollagen zeigen (YAMAMOTO et al. 2000). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse liegt in den verwendeten (primären) Fibroblastenkulturen, die aufgrund der Heterogenität der SSc zum Teil größere Unterschiede in ihren biologischen Eigenschaften aufweisen können.

### **3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und die dysregulierte Angiogenese der SSc**

Ein weiteres ungeklärtes Phänomen in der Pathogenese der SSc ist die Tatsache, daß es in Arealen mit verminderter Kapillardichte nicht zu einer suffizienten Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) kommt (LEROY 1996). Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Angiogenese ein äußerst komplexer Vorgang ist, bei dem etliche proangiogene und angiostatische Faktoren in einer eng abgesteckten zeitlichen und räumlichen Reihenfolge exprimiert werden (DISTLER et al. 2002b). Die Angiogenese beginnt mit einer Vasodilatation und einer Permeabilitätserhöhung der »Muttergefäße«, gefolgt von einem Austritt makromolekularer Plasmaproteine in den perivaskulären Raum. Einer der wichtigsten Prozesse in der Angiogenese ist die Proliferation und Migration von Endothelzellen aus dem Muttergefäß entlang der ausgetretenen Plasmaproteine, die als Gerüst für die Migration benutzt werden, hin zu den Arealen mit einer verminderten Gefäßversorgung. Parallel erfolgt die Auflockerung der Extrazellulären Matrix durch eine Reihe verschiedener matrix-degradierender Enzyme. Die Proliferation und Migration der Endothelzellen steht unter einer engmaschigen Kontrolle von angiogenen und angiostatischen Faktoren. Unter physiologischen Bedingungen überwiegen die Effekte der angiostatischen Faktoren, eine Angiogenese findet demzufolge nicht statt. Durch

Auslöser der Angiogenese, wie beispielsweise Hypoxie oder verschiedene proinflammatorische Zytokine, kommt es zu einer verstärkten Expression von angiogenen Faktoren, wodurch die angiostatischen Effekte neutralisiert werden und die Proliferation der Endothelzellen induziert wird. Zum Abschluß der Angiogenese erfolgt schließlich die Lumenbildung aus dem neugeformten Endothelzellstrang sowie die Stabilisierung des neuen Gefäßes durch die Anlagerung von Perizyten und Gefäßmuskelzellen (DISTLER et al. 2002b).

Einer der wichtigsten Moleküle in der Regulation der Angiogenese ist der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). VEGF ist an der Angiogenese auf mehreren Ebenen beteiligt. Beispielsweise induziert es die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ist der entscheidende Faktor bei Erhöhung der Gefäßpermeabilität und reguliert die Lumenbildung zum Abschluß der Angiogenese. Bereits geringe Unterschiede in der Konzentration von VEGF haben entscheidenden Einfluß auf die Angiogenese. Dies wird durch *Knock-out*-Experimente in Mäusen verdeutlicht, in denen eine 50%ige Reduktion der Expression von VEGF-A zu schweren Fehlbildungen der Gefäße und in der Folge zur embryonalen Letalität führt (FERRARA et al. 1996).

Um zu untersuchen, ob die gestörte Angiogenese durch eine Verminderung von (weiteren) angiogenen Faktoren oder durch eine Erhöhung von angiostatischen Faktoren verursacht wird, untersuchten wir die angiogenen Faktoren bFGF, VEGF und den angiostatischen Faktor Endostatin bei Patienten mit SSc. Aufgrund der verminderten Angiogenese in der SSc wäre zunächst eine ebenso verminderte Expression des potenten pro-angiogenen Faktors VEGF zu vermuten. Entgegen dieser Annahme konnten wir zeigen, daß VEGF in der Haut von Patienten mit SSc deutlich überexprimiert ist, während gesunde Kontrollen nur eine (geringe) konstitutive Expression von VEGF in der Epidermis zeigten (DISTLER et al. 2002c). Bei den VEGF-exprimierenden Zellen in der SSc-Haut handelte es sich um Fibroblasten, Entzündungszellen, Endothelzellen sowie Keratinozyten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen waren die Serum-Spiegel von VEGF bei Patienten mit SSc signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht (DISTLER et al. 2002a). Die Spiegel von VEGF lagen hierbei in einem Bereich, der ansonsten nur bei einigen Tumorerkrankungen gemessen wird. Basic FGF konnte dagegen nur bei wenigen Patienten und Kontrollen detektiert werden, und der angiostatische Faktor Endostatin zeigte keine Unterschiede zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollen. Um einen möglichen Zusammenhang mit klinischen Manifestationen der SSc zu untersuchen, führten wir in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern eine ausführliche klinische Charakterisierung der Patienten durch. Hierbei zeigte sich, daß Patienten mit einer schwereren Verlaufsform der SSc (diffuse SSc) signifikant höhere VEGF-Spiegel aufwiesen als Patienten mit der blanderen Verlaufsform (limitierte SSc). Da sich auch bei Patienten in frühen Krankheitsstadien (Krankheitsdauer < 1 Jahr) erhöhte VEGF-Spiegel fanden, scheint VEGF bereits in diesen Phasen an der Pathogenese beteiligt zu sein. Die meisten Patienten mit einem »Autoimmun-Raynaud-Phänomen« (Raynaud-Phänomen, positive Autoantikörper, Veränderungen in der Kapillarmikroskopie, noch keine Hautfibrose) wiesen ebenfalls erhöhte VEGF-Spiegel auf. Interessanterweise entwickelten diejenigen Patienten mit Autoimmun-Raynaud-Phänomen, die zum Untersuchungszeitpunkt erhöhte VEGF-Spiegel aufwiesen, innerhalb eines Jahres auch fibrotische Veränderungen der Haut, während dies bei der Mehrzahl der Patienten mit normalen VEGF-Spiegeln nicht der Fall war. Der wohl wichtigste Zusammenhang konnte mit dem Auftreten von Fingerkuppenulzera gefunden werden (DISTLER et al. 2002a). Patienten mit Fingerkuppenulzera zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen bereits erhöhte VEGF-Spiegel, während bei Patienten ohne Fingerkuppenulzera

diese Spiegel nochmals deutlich erhöht waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch bei Patienten mit ischämischen Veränderungen wie Fingerkuppenulzera der Körper bereits mit einer erhöhten Produktion von VEGF reagiert. Um aber die klinische Manifestation der ischämischen Veränderungen zu verhindern, müssen die VEGF-Spiegel offensichtlich einen individuellen Schwellenwert überschreiten.

#### **4. Ausblick**

*Chemokine:* Zusammen mit den Resultaten anderer Gruppen weisen die oben dargestellten Ergebnisse daraufhin, daß MCP-1 ein interessantes Zielmolekül für therapeutische Interventionen darstellen könnte. MCP-1 bindet an seinen Hauptrezeptor CCR2 an der Oberfläche von Zielzellen, aber auch an nicht-klassische Chemokin-Rezeptoren wie DARC, D6, US-28 und in höheren Konzentrationen an eine Reihe anderer klassischer Chemokin-Rezeptoren. Die entscheidende Rolle von CCR2 in der Entwicklung fibrotischer Erkrankungen wird durch Untersuchungen an *Knock-out*-Mäusen unterstrichen. Eine Applikation von Bleomycin führte bei CCR2 *Knock-out*-Mäusen zu einer wesentlich geringeren Entwicklung einer Lungenfibrose als bei Kontrolltieren. Derzeit sind Antagonisten gegen verschiedene Chemokin-Rezeptoren in Entwicklung, die für entzündliche Erkrankungen in Phase-I/II-Studien getestet werden. Um MCP-1-vermittelte biologische Effekte wie Chemotaxis für entzündliche Zellen oder die direkte oder indirekte Induktion der Synthese von Extrazellulärmatrix-Proteinen zu inhibieren, ist daher eine Charakterisierung des Chemokin-Rezeptor-Status bei Patienten mit SSc unerlässlich. Vorläufige Ergebnisse deuten überraschenderweise darauf hin, daß in der SSc das *Signalling* von MCP-1 weniger über CCR2 als vielmehr über nicht-klassische Chemokin-Rezeptoren vermittelt werden könnte.

*Angiogenese/VEGF:* Trotz der erhöhten VEGF-Expression in der SSc findet eine suffiziente Angiogenese, bei der die gefäßunterversorgten Gebiete mit neuen funktionellen Gefäßen versorgt werden, nicht statt. Erst eine massive Aufregulation von VEGF, die man ansonsten nur bei Tumorerkrankungen beobachtet, scheint eine prophylaktische Wirkung auf die Manifestation klinisch ischämischer Symptome wie Fingerkuppenulzera zu haben. Eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtung wäre eine parallele Aufregulation eines oder mehrerer angiostatischer Faktoren. Des weiteren ist bis heute ungeklärt, ob neben VEGF auch noch weitere angiogene Faktoren erhöht sind und so mit einer unkoordinierten räumlichen und zeitlichen Expression zu der gestörten Angiogenese beitragen. Das Expressionsprofil von angiogenen und angiostatischen Faktoren wird derzeit anhand eines Angiogenese-spezifischen Arrays untersucht. Erste Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Expression weiterer angiogener Faktoren hin.

#### *Literatur*

- DISTLER, O., DEL ROSSO, A., GIACOMELLI, R., CIPRIANI, P., CONFORTI, M. L., GUIDUCCI, S., GAY, R. E., MICHEL, B. A., BRÜHLMANN, P., MÜLLER-LADNER, U., GAY, S., and MATUCCI-CERINIC, M.: Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: Increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res.* 4, R 11 (2002a)
- DISTLER, O., DISTLER, J., KOWAL-BIELECKA, O., GAY, R. E., MÜLLER-LADNER, U., and GAY, S.: Chemokines and chemokine receptors in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Mod. Rheumatol.* 12, 107–112 (2003)

- DISTLER, O., NEIDHART, M., GAY, R. E., and GAY, S.: The molecular control of angiogenesis. *Int. Rev. Immunol.* *21*, 33–49 (2002b)
- DISTLER, O., PAP, T., KOWAL-BIELECKA, O., MEYRINGER, R., GUIDUCCI, S., LANDTHALER, M., SCHOLMERICH, J., MICHEL, B. A., GAY, R. E., MATUCCI-CERINIC, M., GAY, S., and MULLER-LADNER, U.: Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis Rheum.* *44*, 2665–2678 (2001)
- DISTLER, O., RINKES, B., HOHENLEUTNER, U., SCHÖLMECH, J., LANDTHALER, M., LANG, B., GAY, S., and MULLER-LADNER, U.: Expression of RANTES in biopsies of skin and upper gastrointestinal tract from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology Int.* *19*, 39–46 (1999)
- DISTLER, O., SCHEID, A., RETHAGE, J., DEL ROSSO, A., GUIDUCCI, S., GAY, R. E., MICHEL, B., MÜLLER-LADNER, U., MATUCCI-CERINIC, M., GASSMANN, M., and GAY, S.: Hypoxia-induced overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in systemic sclerosis (SSc) fails to induce angiogenesis in vivo. *Arthritis Rheum.* *44*, 113 (2002c)
- FERRARA, N., CARVER-MOORE, K., CHEN, H., DOWD, M., LU, L., O'SHEA, K. S., POWELL-BRAXTON, L., HILLAN, K. J., and MOORE, M. W.: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* *380*, 439–442 (1996)
- FURST, D. E.: The endothelium in the pathogenesis of systemic sclerosis: is it primary or secondary? *J. Mal. Vasc.* *24*, 95–98 (1999)
- JIMENEZ, S. A., HITRAYA, E., and VARGA, J.: Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheum. Dis. Clin. North Amer.* *22*, 647–674 (1996)
- KUNKEL, S. L.: Through the looking glass: the diverse in vivo activities of chemokines. *J. Clin. Invest.* *104*, 1333–1334 (1999)
- LEROY, E. C.: Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis. Clin. North Amer.* *22*, 675–694 (1996)
- LOYD, C. M., MINTO, A. W., DORF, M. E., PROUDFOOT, A., WELLS, T. N., SALANT, D. J., and GUTIERREZ-RAMOS, J. C.: RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* *185*, 1371–1380 (1997)
- WHITE, B.: Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum. Dis. Clin. North Amer.* *22*, 695–708 (1996)
- YAMAMOTO, T., ECKES, B., MAUCH, C., HARTMANN, K., and KRIEG, T.: Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J. Immunol.* *164*, 6174–6179 (2000)

Oliver DISTLER, MD  
Center of Experimental Rheumatology  
University Hospital Zurich  
Gloriastrasse 25  
CH-8091 Zurich  
Switzerland  
Tel.: +41 1 2558622  
Fax: +41 1 2554170  
E-Mail: Oliver.Distler@usz.ch

# **Chirurgie, Orthopädie und Anästhesiologie**

---

Dr. med. Werner HARTWIG

Geboren 1970 in München, dort Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität von 1989 bis 1996. Famulaturen in Großbritannien und Indonesien. Promotion an der LMU im Jahre 1996. Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg, Approbation im Jahre 1998. Ab Herbst 1997 Research Fellow am Massachusetts General Hospital der Harvard Medical School in Boston. 1998 Auszeichnung mit dem Young Investigator's Award der International Association of Pancreatology. Ab 1998 Förderung durch die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina für ein Jahr. Seit 1999 in chirurgischer Facharztausbildung in der Abteilung für Allgemeine, Viszerale und Unfallchirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg. 2004 Facharzt für Chirurgie, im Juni 2004 Eröffnung des Habilitationsverfahrens.

## **Pankreasproteasen – ihre Rolle in der Pathogenese der lokalen und systemischen Organschädigung bei akuter Pankreatitis**

Werner HARTWIG (Heidelberg)<sup>1</sup>

Mit 11 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

Die akute schwere Pankreatitis ist durch die Ausbildung von Pankreasnekrosen und von systemischen Organschäden gekennzeichnet, wobei das Lungenversagen die häufigste und oft letal endende Komplikation darstellt. Unser Ziel war es zu untersuchen, welche Rolle die Serinprotease Trypsin in der Pathogenese der Pankreas- und Lungenschädigung bei akuter Pankreatitis spielt.

Im Rattenmodell wurde primär die zelluläre Lokalisation der Trypsinogenaktivierung in bezug auf die Entstehung der Pankreasnekrose untersucht. Über die Messung von Trypsinogen und dessen Aktivierungspeptid TAP in der abdominalen Lympheflüssigkeit konnte die Aktivierung des interstitiell lokalisierten Trypsinogens als entscheidend für die Progression der ödematösen zur nekrotisierenden Pankreatitis identifiziert werden. Durch Isolierung der Trypsinwirkung war es zudem möglich, auch die Entstehung der Lungenschädigung mit Trypsin direkt zu assoziieren. Diese Kausalität bestätigend wurde eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Pankreatitis, der systemischen Trypsinkonzentration und dem Ausmaß der Lungenschädigung nachgewiesen. Granulozyten konnten als Mediatoren der Trypsin-assoziierten Lungenschädigung identifiziert werden. Bei Stimulationsreihen von Leukozyten und Endothelzellen mit Trypsin wurde wiederum eine Hochregulation sowohl des granulozytären Adhäsionsmoleküls Mac-1 als auch seines endothelialen Liganden ICAM-1 nachgewiesen. Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle korrelierte mit der Trypsinkonzentration und entsprach den Veränderungen, welche bei nekrotisierender Pankreatitis zu finden waren.

Somit konnte gezeigt werden, daß Trypsin durch seine interstitielle Aktivierung und seine frühzeitige systemische Freisetzung mit nachfolgender Leukozyten- und Endothelzellaktivierung eine entscheidende Stellung in der Pathogenese der Pankreas- und Lungenschädigung bei akuter Pankreatitis einnimmt.

### *Abstract*

Pancreatic necrosis and systemic organ injury are characteristic findings in severe acute pancreatitis, with respiratory failure as the most common complication. The aim of our study was to investigate the role of the serine protease trypsin in the pathogenesis of pancreatic and pulmonary injury in acute pancreatitis.

First we investigated the cellular location of trypsinogen activation and its effect in the development of organ injury. By measurement of trypsinogen and its activation peptide TAP in abdominal lymph fluid, the activation of trypsinogen located in the interstitium was found to be critical in the progression from edematous to necrotizing pancreatitis. Isolating the role of trypsin from other unknown agents, also the development of lung injury could be associated with the effect of trypsin. Confirming this finding, a correlation between the severity of acute pancreatitis, concentration of systemic trypsin, and the extent of pancreatitis-associated lung injury was demonstrated. In this setting granulocytes were identified as mediators of the trypsin-associated lung injury. Finally, leukocytes and endothelial cells incubated with trypsin showed an upregulation of the adhesion molecule Mac-1 on neutrophils and its endothelial ligand ICAM-1 on endothelial cells. The expression of these adhesion molecules increased with the amount of trypsin used for incubations and correlated with the changes found in necrotizing pancreatitis.

---

<sup>1</sup> Gastinstitut: Department of Surgery, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA.

Therefore, the interstitial activation of trypsin and its early release into the systemic circulation with subsequent activation of leukocytes and endothelial cells makes trypsin a key mediator in the pathogenesis of pancreatic and pulmonary injury in acute pancreatitis.

## 1. Einleitung

Die akute Pankreatitis ist ein Krankheitsbild, welches sich klinisch in zwei Verlaufsformen manifestiert: Bei einem Großteil der Patienten findet sich eine milde ödematöse Pankreatitis, die meist ohne wesentliche Folgen problemlos ausheilt. Die schwere nekrotisierende Pankreatitis (15–20% der Patienten) ist durch das Auftreten von lokalen und systemischen Komplikationen gekennzeichnet und geht mit Mortalitätsraten von 10–30% einher (BÜCHLER et al. 2000, HARTWIG et al. 2002b, JOHNSON et al. 2001). Lokal findet sich bei diesen Patienten eine Pankreasnekrose, welche im Krankheitsverlauf oftmals durch Mikroorganismen superinfiziert wird und den Ausgangspunkt einer Sepsis darstellt. Durch eine operative Intervention kann diese lokale Schädigung aber in fast allen Fällen gut kontrolliert werden (UHL et al. 2002). Im Gegensatz hierzu stellen die systemischen Organkomplikationen die entscheidenden Prognosefaktoren für das Patientenüberleben dar (KARIMGANI et al. 1992). Die häufigste und das Outcome oft bestimmende Komplikation ist die Pankreatitis-assoziierte Lungenschädigung. Diese manifestiert sich in 40–70% der Patienten mit schwerer Pankreatitis, bei ungefähr einem Drittel dieser Patienten ist die Lungenschädigung progredient und mündet in ein akutes Lungenversagen, teils mit dem Vollbild eines *Acute Respiratory Distress Syndroms* (ARDS) (IMRIE et al. 1977, TENNER et al. 1997b).

Im Verlauf der akuten Pankreatitis werden eine Vielzahl von proinflammatorischen Mediatoren aus dem Pankreas in den systemischen Kreislauf freigesetzt und triggern eine systemische Entzündungsreaktion. Für Pankreasproteasen, Zytokine, Sauerstoffradikale, Proteine des Komplementsystems, Arachidonsäurederivate und eine Vielzahl weiterer Faktoren konnte eine Beteiligung an der Pathogenese der lokalen und systemischen Organschädigung experimentell nachgewiesen werden (BÜCHLER et al. 1989, HOLM et al. 1991, LUNGARELLA et al. 1985, STEER und MELDOLESI 1988, TAHAMONT et al. 1982). Eine nahezu unbestrittene zentrale Rolle in der Pathogenese der Lungenschädigung und des ARDS spielen die polymorphkernigen Leukozyten (BHATIA et al. 1998, WEILAND et al. 1986). Sie werden im Rahmen des *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) oder der Sepsis im systemischen Kreislauf aktiviert und migrieren in großen Mengen in das Lungengewebe. Ihre sekretorischen Produkte, wie z. B. Elastase und Sauerstoffradikale, konnten in der broncho-alveolären Lavage von Patienten mit ARDS vermehrt nachgewiesen werden (REPINE und BEEHLER 1991).

Mit der Hypothese, daß Pankreasproteasen entscheidend an der Initiierung und Progression der akuten Pankreatitis beteiligt sind, untersuchten wir an Tiermodellen der ödematösen und nekrotisierenden Pankreatitis den Zusammenhang zwischen Proteasenaktivierung, deren systemischer Freisetzung und der Manifestation von Pankreas- und Lungenschädigung. Das Ziel unserer Studie war die Identifizierung von zugrundeliegenden Pathomechanismen, um im weiteren potentielle Therapieansätze zu entwickeln.

Die vorliegende Publikation stellt eine Übersichtsarbeit von Studien dar, die zu diesem Themenkomplex im Rahmen des Forschungsstipendiums durchgeführt wurden. Aufgrund der Platzlimitierung werden die Untersuchungen nur grundlegend dargestellt und diskutiert. Detailinformationen zu den Studien und eine ausführliche Diskussion der Pathomechanismen

können jedoch in bereits publizierten Arbeiten nachgelesen werden (HARTWIG et al. 1999a, b, c, 2001, 2002a).

## **2. Pankreasschädigung: intrazelluläre versus extrazelluläre Trypsinogenaktivierung**

Bereits 1896 wurde die Selbstverdauung des Pankreas durch vorzeitig aktivierte Pankreasproteasen als Ursache der akuten Pankreatitis vermutet (CHIARI 1896). Unter physiologischen Umständen werden die meisten der Pankreasenzyme in inaktiver Form vom Pankreas sezerniert und erst im Duodenum durch eine Enteropeptidase (Enterokinase) aktiviert. Im Gegensatz hierzu führt eine vorzeitige extraluminale Aktivierung der Enzymvorstufen zu einer Freisetzung proteolytischer Aktivität im Pankreas. Dies resultiert in einer Gewebsschädigung und gegebenenfalls einer akuten Pankreatitis (GORELICK und MATOVCIK 1995). Obwohl die extraluminale Aktivierung von Pankreasenzymen beim Menschen (GEOKAS und RINDERKNECHT 1974) und im Tiermodell nachgewiesen werden konnte (HOFBAUER et al. 1998, LÜTHEN et al. 1995), wird deren Relevanz in der Entstehung der akuten Pankreatitis kontrovers diskutiert.

Die vorzeitige Aktivierung der Pankreasenzyme wurde in verschiedenen experimentellen Modellen der milden akuten Pankreatitis als ein intrazellulärer Vorgang beschrieben (STEER 1998). Die Trypsinogenaktivierung wird hierbei möglicherweise durch eine Kolo-kalisation von Zymogenen (Vorstufen der Verdauungsenzyme) und von lysosomalen Hydrolasen im Inneren der Azinuszelle getriggert (WATANABE et al. 1984). Aufgrund eines apikalen Sekretionsblocks kommt es bei dieser Form der akuten Pankreatitis zu einer fehlgerichteten basolateralen Freisetzung der Proenzyme in den interstitiellen Raum des Pankreas (KLOPPPEL et al. 1986). Unsere Hypothese war, daß die Aktivierung dieses extrazellulären Pools von Proenzymen maßgeblich für die Selbstverdauung des Pankreas bei akuter Pankreatitis verantwortlich ist.

### *2.1 Methodik*

Trypsin und dessen inaktive Vorstufe Trypsinogen wurden im Blut und in der abdominellen Lymphflüssigkeit von Ratten mit akuter ödematöser Pankreatitis bestimmt. Trypsin wurde indirekt über sein Trypsinogen-Aktivierungspeptid (TAP) quantifiziert, welches in äquimolaren Mengen zu Trypsin bei der Trypsinogenaktivierung entsteht (Abb. 1). Eine ödematöse Pankreatitis wurde durch die intravenöse Infusion von supraphysiologischen Dosen des Cholezystokinin-Analogons Cerulein (5 µg/kg/h über 6 h) induziert. Die abdominelle Lymphflüssigkeit wurde über einen Silikonkatheter gewonnen, welcher den Ratten vor Induktion der Pankreatitis in den Ductus thoracicus knapp oberhalb der Cysterna chyli eingebracht wurde. In einem zweiten Ansatz wurde den Tieren dann Enterokinase (30 U/kg/h und 60 U/kg/h) zur Aktivierung des interstitiellen Trypsinogens intravenös infundiert. In separaten Tieren wurde diese Aktivierung mittels Infusion von Antiproteasen (*Soybean Trypsin Inhibitor*, *Gabexate mesilate*, jeweils 5 mg/kg/h) inhibiert. Die Pankreasschädigung wurde in allen Tieren histologisch quantifiziert.

### *2.2 Ergebnisse*

Die Konzentrationen von Trypsinogen und TAP stiegen sowohl in der Lymphflüssigkeit als auch im Blut der Tiere nach Induktion einer ödematösen Pankreatitis stetig an (Abb. 2). Als Zeichen der interstitiellen Akkumulation waren die Konzentrationen von Trypsinogen und

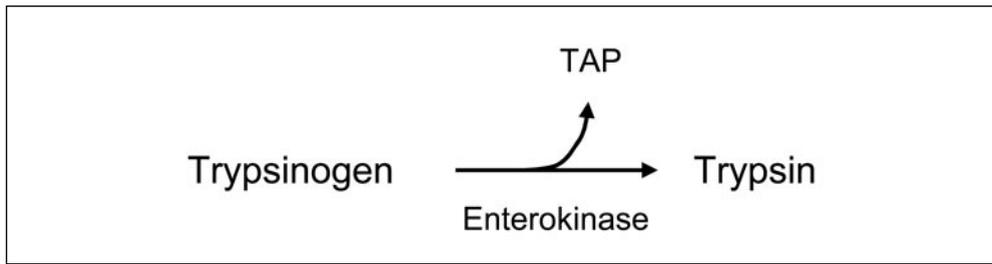


Abb. 1 Bei der Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin entsteht in äquimolaren Mengen das Trypsinogen-Aktivierungspeptid (TAP). Dieses wurde im EDTA-Plasma mittels ELISA quantifiziert. Trypsinogen kann ebenso über TAP mittels ELISA bestimmt werden, nachdem es durch Enterokinase komplett aktiviert wurde (MITHÖFER et al. 1995).

TAP in der Lymphe höher als im arteriellen Blut. Auch zeigten sich in der Lymphe höhere Konzentrationen als im portalvenösen Blut. Trypsinogen- und TAP-Spiegel blieben bei Kontrolltieren unverändert.

Die Aktivierung des extrazellulären Trypsinogens bei Tieren mit ödematöser Pankreatitis durch intravenöse Infusion von Enterokinase führte zu einer schweren nekro-hämorrhagischen Pankreatitis (Abb. 3). Die Trypsinogenaktivierung spiegelte sich durch signifikant erhöhte TAP-Konzentrationen in Lymphe und Blut wieder, wohingegen die Trypsinogenspiegel auf ein nicht mehr meßbares Niveau vermindert waren (Abb. 4). Diese Veränderungen waren bei Infusion großer Mengen von Enterokinase stärker ausgeprägt als bei gering dosierter Enterokinaseinfusion. Durch die gleichzeitige Infusion der Proteaseinhibitoren *Soybean Trypsin Inhibitor* oder *Gabexate mesilate* wurde sowohl die Ausbildung des Pankreasschadens als auch die TAP-Generierung gleichermaßen vermindert (Daten nicht gezeigt).

### 2.3 Diskussion

Die Cerulein-induzierte Pankreatitis ist durch die Ausbildung eines Pankreasödems mit geringer Leukozyteninfiltration und nahezu fehlenden Azinuszellnekrosen gekennzeichnet und stellt ein gut etabliertes Modell einer milden humanen Pankreatitis dar (LAMPPEL und KERN 1977). In diesem Modell ist die Menge des generierten TAPs gering und spiegelt somit eine nur geringe Trypsinogenaktivierung wider. In unserer Studie wird dies durch die ca. 20–50mal höheren Trypsinogen- als TAP-Konzentrationen in Blut und Lympheflüssigkeit verdeutlicht. Frühere Studien haben jedoch bereits vermuten lassen, daß sich eine große Menge von nicht-aktiviertem Trypsinogen im interstitiellen Raum ansammelt (FERNANDEZ-DEL CASTILLO et al. 1994, MITHÖFER et al. 1998). Wir konnten dies durch den Nachweis hoher Konzentrationen von Trypsinogen in der abdominalen Lympheflüssigkeit bestätigen. Die in Azinuszellen fehlgerichtete Sekretion von Zymogengranula über die basolaterale Plasmamembran bei blockierter apikaler Sekretion ins Pankreasgangsystem ist hierfür die Ursache (ADLER et al. 1982). Die hohen Trypsinogenkonzentrationen im Pfortaderblut und in der Lympheflüssigkeit des Ductus thoracicus deuten darauf hin, daß bei ödematöser Pankreatitis der interstitielle Trypsinogenpool rasch aus dem Pankreas drainiert wird, ohne größeren Schaden anzurichten. Die moderate intrazelluläre Trypsinogenaktivierung in diesem Modell führt lediglich zu einem geringen ödematösen Pankreasschaden, für eine Selbstverdauung des Pankreas mit ausgedehnten Azinuszellnekrosen ist dies jedoch nicht ausreichend.

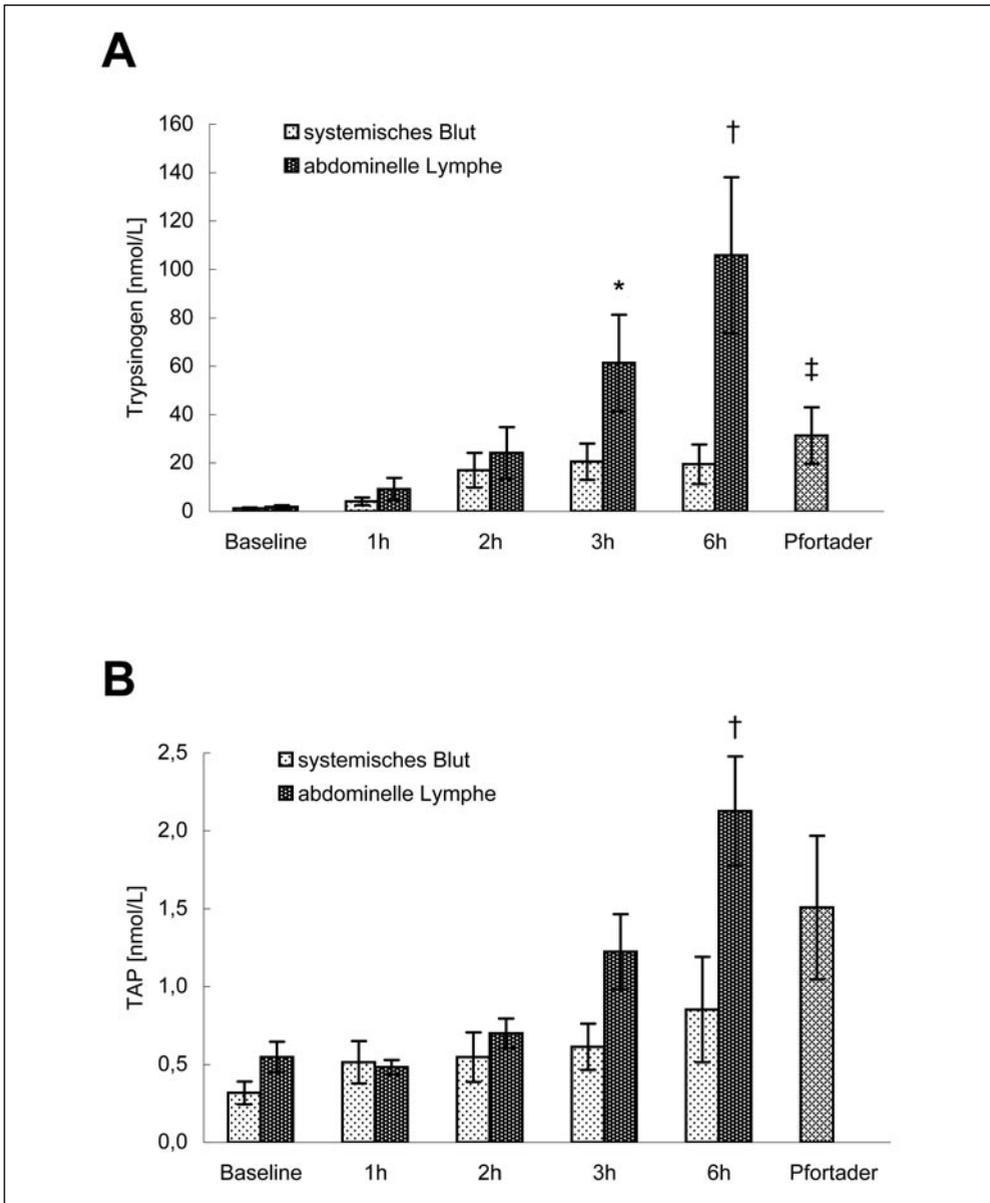


Abb. 2 (A) Trypsinogen und (B) TAP in Lymphe und Blut von Tieren mit Cerulein-induzierter ödematöser Pankreatitis. Blut aus der Pfortader wurde 6 h nach Induktion der Pankreatitis analysiert. \* $P \leq 0,05$  und † $P < 0,01$  vs. arterielles Blut, ‡ $P < 0,04$  vs. Lymphe.

Enterokinase flutet bei intravenöser Applikation vor allem im interstitiellen Raum an, da seine Größe (Molekulargewicht 316000) keine Diffusion durch die Zellmembran der Azinuszelle ermöglicht. Wird jedoch das interstitielle Trypsinogen durch Enterokinase aktiviert, entwickelt sich

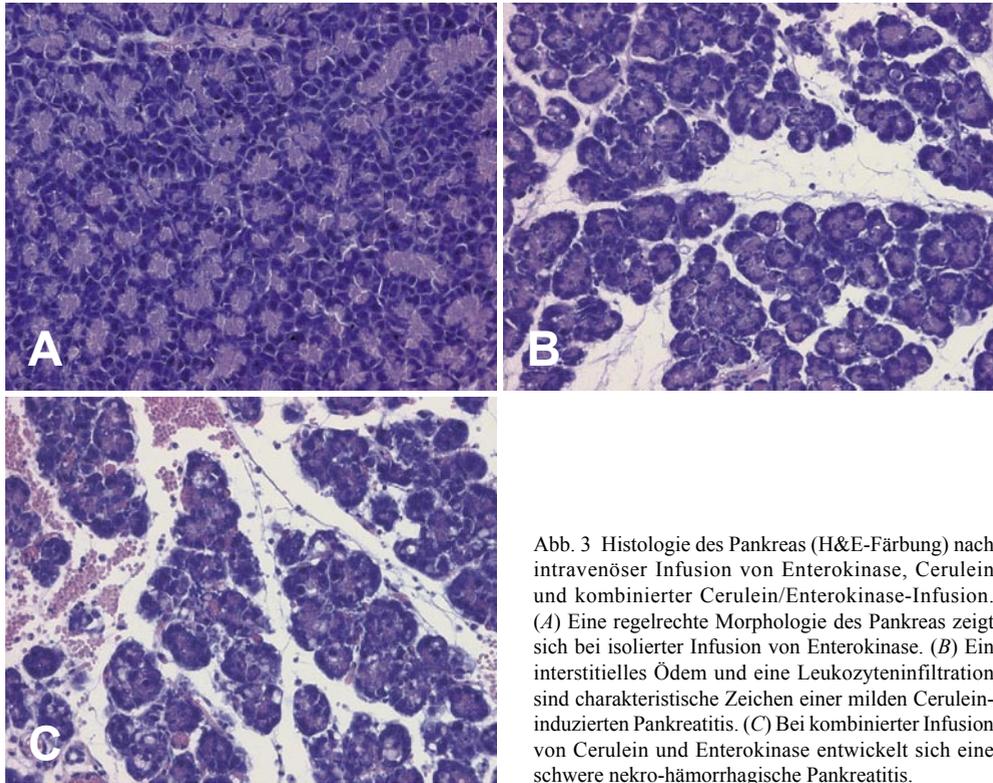


Abb. 3 Histologie des Pankreas (H&E-Färbung) nach intravenöser Infusion von Enterokinase, Cerulein und kombinierter Cerulein/Enterokinase-Infusion. (A) Eine regelrechte Morphologie des Pankreas zeigt sich bei isolierter Infusion von Enterokinase. (B) Ein interstitielles Ödem und eine Leukozyteninfiltration sind charakteristische Zeichen einer milden Cerulein-induzierten Pankreatitis. (C) Bei kombinierter Infusion von Cerulein und Enterokinase entwickelt sich eine schwere nekro-hämorrhagische Pankreatitis.

das Bild einer schweren Pankreatitis. Histologisch ist diese durch Azinuszellnekrosen und eine ausgesprochene Hämorrhagie im Pankreas charakterisiert. Ebenso weist die Verminderung der Pankreasschädigung durch die beiden Proteaseinhibitoren *Soybean Trypsin Inhibitor* und *Gabexate mesilate* auf eine interstitielle Trypsinogenaktivierung hin. Während *Gabexate mesilate* aufgrund seiner Membranpermeabilität die intra- und extrazelluläre Trypsinogenaktivierung inhibiert, kann der *Soybean Trypsin Inhibitor* aufgrund seines Molekulargewichts nur außerhalb der Azinuszelle wirken. Der gleichermaßen ausgeprägte Effekt der beiden Inhibitoren in unserer Studie weist auf den extrazellulären Raum als das maßgebliche Kompartiment hin.

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse dieser Studie einen eindeutigen Beleg dafür dar, daß die interstitielle Trypsinogenaktivierung der entscheidende Faktor in der Progression der ödematösen zur nekrotisierenden Pankreatitis ist.

### 3. Lungenschädigung: Effekt von Trypsin

Pankreasproteasen sind nicht nur maßgeblich an der Ausbildung des Pankreasschadens bei akuter Pankreatitis beteiligt, sondern spielen möglicherweise auch in der Pathogenese der systemischen Organschädigung eine wichtige Rolle. Das Lungenversagen stellt die häufigste und

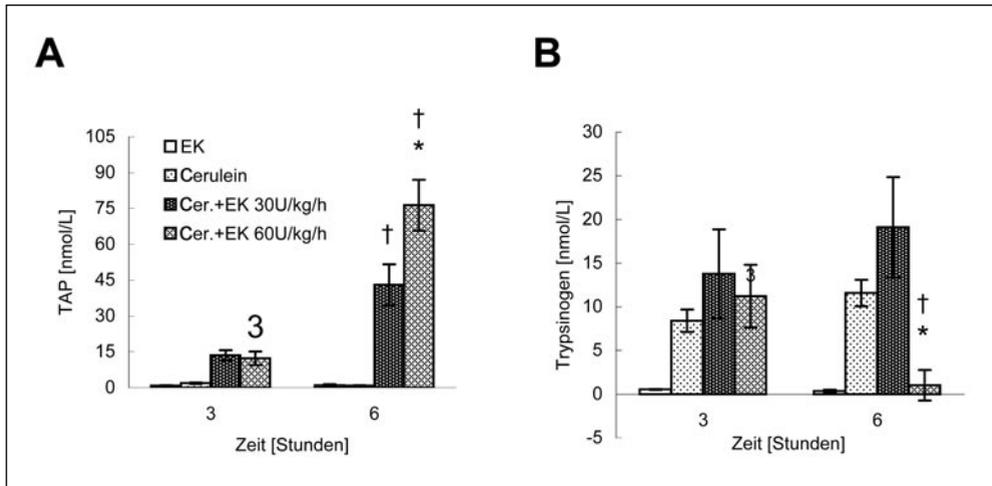


Abb. 4 (A) TAP und (B) Trypsinogen im systemischen Blut von Tieren mit Infusion von Cerulein und/oder Enterokinase. Um das extrazelluläre Trypsinogen bei milder Cerulein-induzierter Pankreatitis zu aktivieren, wurden den Ratten 30 oder 60 U/kg/h Enterokinase (EK) infundiert. Da Enterokinase aufgrund seiner Größe (Molekulargewicht 316000) nicht durch die Zellmembran der Azinuszelle diffundieren kann, stellt der extrazelluläre Raum die primäre Lokalisation der Trypsinogenaktivierung dar.

oft schwerste Komplikation bei der schweren Pankreatitis dar (IMRIE et al. 1977, KARIMGANI et al. 1992). Pankreasproteasen können möglicherweise über eine Komplementaktivierung und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zur Lungenschädigung beitragen (HORN et al. 1980), ihre genaue Funktion ist jedoch unklar. Das Ziel unserer Studie war zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der Freisetzung von Trypsinogen und Trypsin mit dem Schweregrad der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung besteht und ob diese an der Ausbildung des Lungenversagens beteiligt sind.

### 3.1 Methodik

Bei Ratten mit ödematöser oder nekrotisierender Pankreatitis wurden sowohl Trypsinogen und TAP im Blut als auch die Lungenschädigung quantifiziert. Eine ödematöse Pankreatitis wurde durch intravenöse Infusion von Cerulein (5 µg/kg/h) über 6 h induziert, eine nekrotisierende Verlaufsform durch eine Volumen- (1,2 ml/kg), Zeit- (10 min) und Druck- (30 mmHg) kontrollierte retrograde intraduktale Infusion von Glykodeoxycholsäure (GDOC, 10 mmol/l) plus intravenöse Infusion von Cerulein (5 µg/kg/h) über 6 h. Trypsinogen und TAP wurden über einen Zeitraum von 24 h mittels ELISA bestimmt. Parallel hierzu wurde die Pankreas- und Lungenschädigung mittels Histologie, Naß-/Trockengewicht und Myeloperoxidaseaktivität (ein Marker für die Leukozytensequestrierung) quantifiziert. Um die Rolle der Pankreasproteasen in der Pathogenese der Lungenschädigung zu isolieren, wurde in weiteren Tieren Trypsin (0,75, 1,5 und 3,0 mg/kg/h über 6 h oder bis zum Tod) intravenös infundiert. Zusätzlich wurde bei Tieren mit milder Pankreatitis das im interstitiellen Raum und systemisch zirkulierende Trypsinogen mittels Infusion von Enterokinase aktiviert. Pankreas- und Lungenschädigung wurden wie bereits oben beschrieben untersucht.

### 3.2 Ergebnisse

Die Konzentrationen von Trypsinogen und TAP waren bei ödematöser und nekrotisierender Pankreatitis bereits frühzeitig im systemischen Blut erhöht und erreichten ihre Maximalwerte nach 3–6 h (Abb. 5A, B). Sowohl Trypsinogen als auch TAP waren bei nekrotisierender Pankreatitis signifikant höher als bei der ödematösen Form. Während die histologischen Zeichen einer Pankreatitis schon 3 h nach Induktion nachzuweisen waren, etablierte sich die Lungenschädigung erst später. Sowohl für das Lungenödem als auch für die pulmonale Leukozytensequestrierung zeigten sich Maximalwerte erst nach 9–12 h (Abb. 6A, B). Zudem war die Lungenschädigung bei nekrotisierender Pankreatitis deutlich ausgeprägter als bei der ödematösen Verlaufsform. Histologisch konnte bei nekrotisierender Pankreatitis ein ausgeprägtes perivaskuläres Ödem, eine interstitielle Leukozyteninfiltration und proteinhaltiges Exsudat im Alveolarraum der Lunge nachgewiesen werden (Abb. 7B).

Tiere, denen Trypsin intravenös infundiert wurde, bildeten eine Lungenschädigung aus, die der bei nekrotisierender Pankreatitis vergleichbar war (Abb. 7C). Das Ausmaß der Lungenschädigung korrelierte mit der Menge des infundierten Trypsins. Bei höheren Konzentrationen von Trypsin imponierte zusätzlich eine ausgeprägte interstitielle und intraalveoläre Hämorrhagie. Gleichermäßen zeigte sich bei Tieren, in denen das interstitielle und systemisch zirkulierende Trypsinogen durch Enterokinase aktiviert wurde, eine histologisch vergleichbar schwere Lungenschädigung (Abb. 7D).

### 3.3 Diskussion

Pankreasproteasen spielen nicht nur eine zentrale Rolle in der Ausbildung der lokalen Organschädigung bei akuter Pankreatitis, sondern tragen auch maßgeblich zur Pathogenese systemischer Komplikationen, insbesondere der Lungenschädigung bei. Trypsinogen und Trypsin werden bereits sehr frühzeitig im Verlauf der akuten Pankreatitis in den systemischen Kreislauf sezerniert, und deren Serumkonzentrationen korrelieren mit dem Schweregrad der Pankreatitis und der assoziierten Lungenschädigung. Während bei der Cerulein-induzierten milden Pankreatitis nur minimale histologische Veränderungen in der Lunge auftraten, konnten bei nekrotisierender Pankreatitis ein perivaskulär deutlich ausgeprägtes Lungenödem und ARDS-typische Veränderungen im Sinne von Leukozyteninfiltration und proteinhaltiges Exsudat im Alveolarraum gezeigt werden.

Um herauszufinden, ob zwischen sezernierten Pankreasproteasen und der Lungenschädigung bei nekrotisierender Pankreatitis ein kausaler Zusammenhang besteht, isolierten wir die Wirkung von Trypsin von anderen proinflammatorischen Mediatoren, indem wir den Tieren Trypsin infundierten bzw. das systemisch zirkulierende Trypsinogen bei milder Pankreatitis durch Infusion von Enterokinase aktivierten. Trypsin verursachte eine Lungenschädigung, deren Schwere von der Menge des infundierten Trypsins abhängig war. Eine vergleichbar schwere Lungenschädigung wurde auch durch die Aktivierung des systemischen Trypsinogens bei Cerulein-Pankreatitis verursacht. Diese Ergebnisse weisen ganz klar auf einen direkten Zusammenhang zwischen zirkulierenden Proteasen und Lungenschädigung bei schwerer Pankreatitis hin. Bestätigt wird dies durch Studien anderer Arbeitsgruppen (TAHAMONT et al. 1982).

Obwohl multiple proinflammatorische Mediatoren in ähnlicher Weise an der Pathogenese der Lungenschädigung bei akuter Pankreatitis beteiligt sein könnten, sind möglicherweise

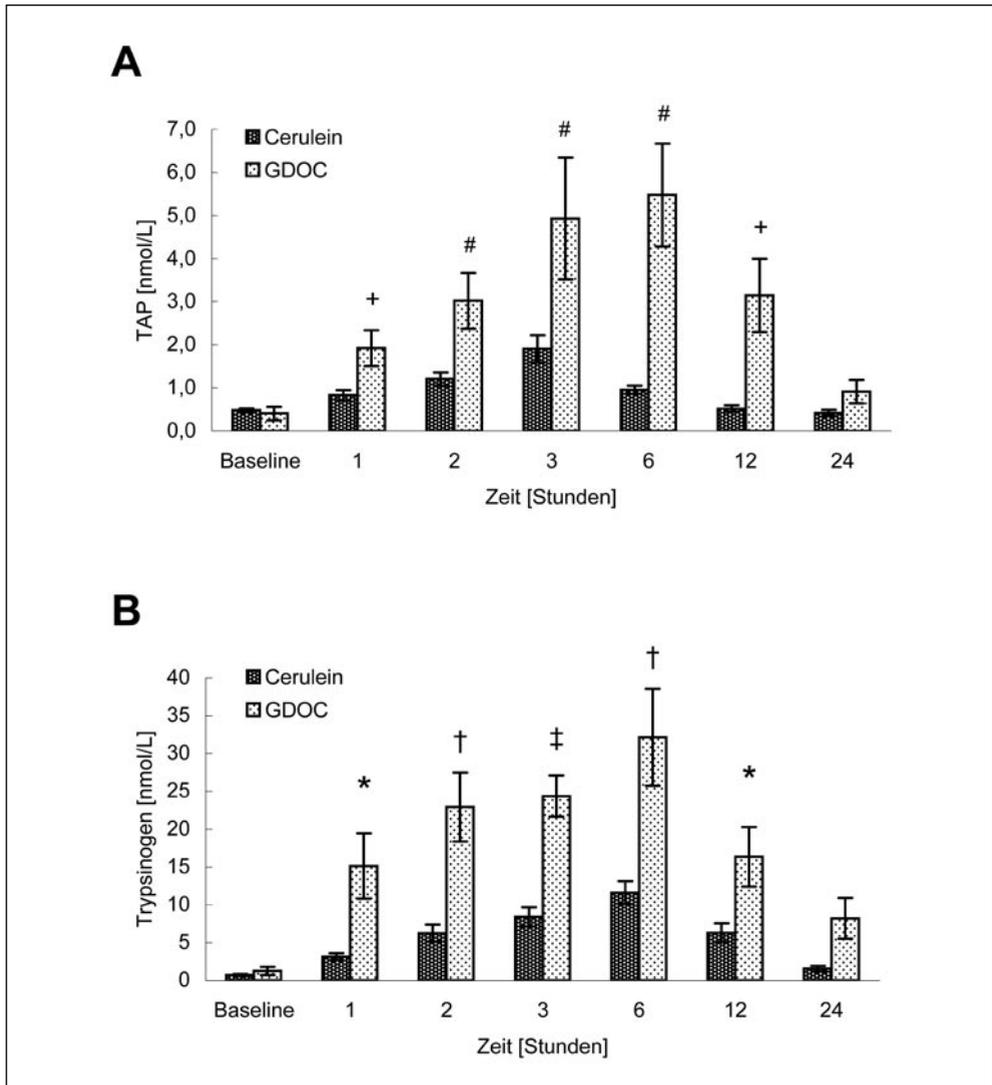


Abb. 5 (A) Trypsinogen und (B) TAP im systemischen Blut von Tieren mit ödematöser (Cerulein) und nekrotisierender (GDOC) Pankreatitis. \*P < 0,05, †P < 0,01 und ‡P < 0,001 vs. ödematöse Pankreatitis.

gerade die Pankreasproteasen für die hohe Inzidenz des respiratorischen Versagens bei akuter Pankreatitis verantwortlich.

#### 4. Interaktion von Pankreasproteasen, Leukozyten und Endothelzellen

Ins Blut sezernierte Proteasen werden sehr schnell durch systemische Proteaseinhibitoren (z. B.  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin) neutralisiert. Eine direkte Schädigung der Lunge durch vom Pankreas sezernierte Proteasen erscheint somit unwahrscheinlich. Jedoch konnte

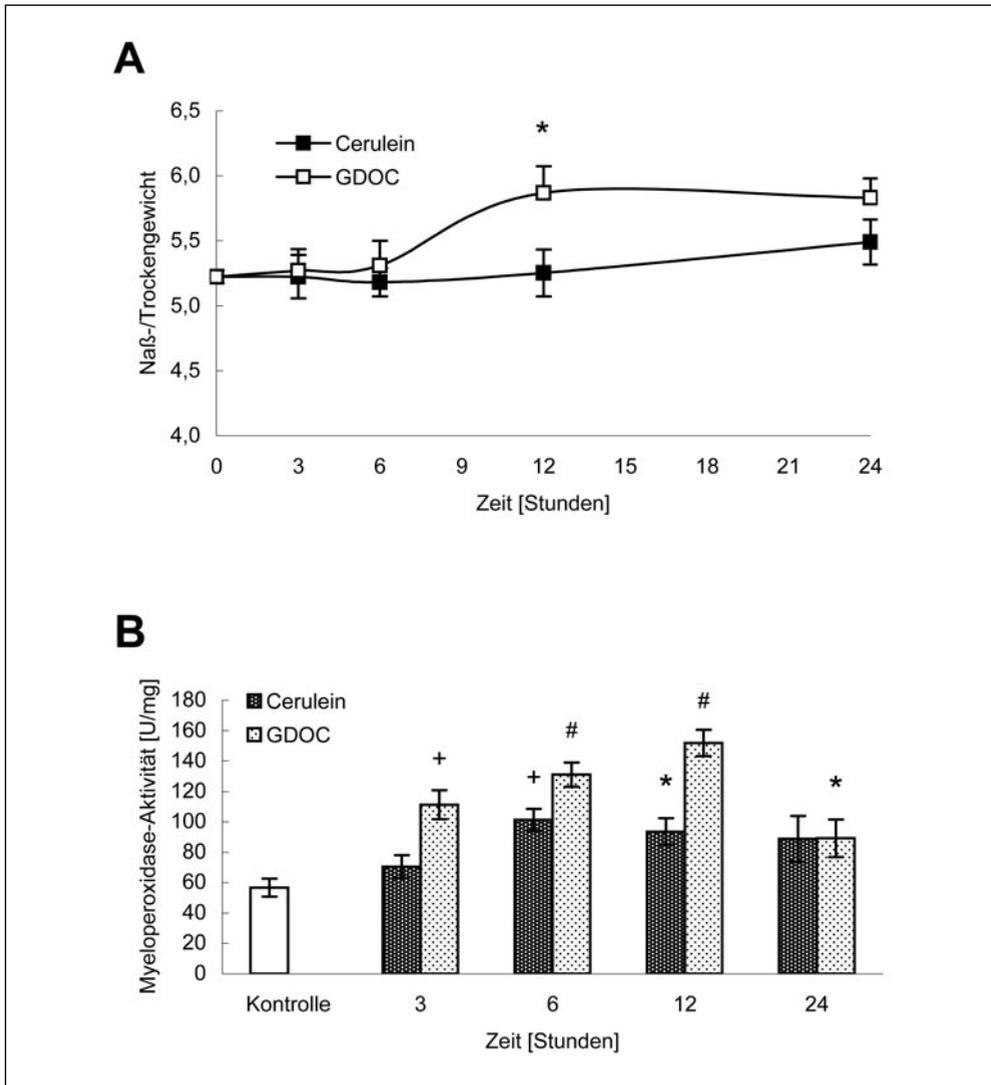


Abb. 6 (A) Lungenödem und (B) pulmonale Leukozyteninfiltration bei ödematöser Cerulein-induzierter und nekrotisierender GDOC-induzierter Pankreatitis. Das Lungenödem wurde mittels Naß-/Trockengewicht quantifiziert, die Leukozyteninfiltration mittels Myeloperoxidase-Aktivität. \*P < 0,05, †P < 0,01 und ‡P < 0,001 vs. Kontrolle.

bereits durch *In-vitro*-Studien gezeigt werden, daß die Serinprotease Trypsin die Fähigkeit besitzt, Proteine des Komplementsystems und Leukozyten zu aktivieren (WETSEL und KOLB 1982). Leukozyten nehmen wiederum eine unbestritten zentrale Rolle in der Pathogenese des Lungenversagens bei anderen Krankheitsbildern ein. Ihre sekretorischen Produkte, wie z. B. Elastase und Sauerstoffradikale, konnten in der broncho-alveolären Lavage von Patienten mit ARDS vermehrt nachgewiesen werden (REPINE und BEEHLER 1991). Auch bei akuter Pankreatitis

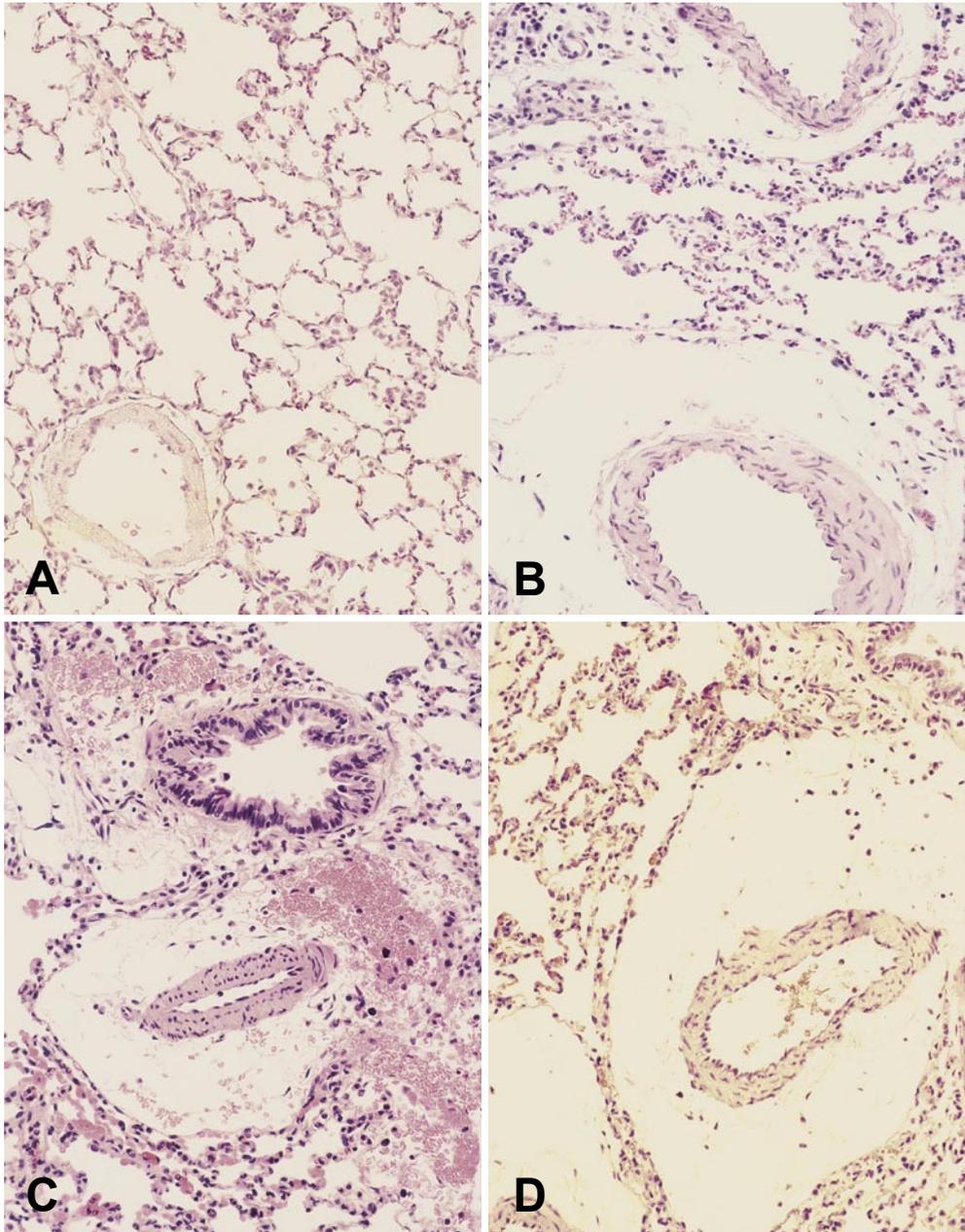


Abb. 7 Histologie (H&E-Färbung) der Lunge von Kontrolltieren, nekrotisierender Pankreatitis (GDOC), bei Infusion von Trypsin und bei kombinierter Cerulein/Enterokinase-Infusion. Eine regelrechte Morphologie der Lunge zeigt sich bei Kontrolltieren (A). Ein perivaskuläres Ödem und interstitiell lokalisierte Neutrophilen finden sich bei nekrotisierender Pankreatitis (B) und in Tieren, bei denen das freigesetzte Trypsinogen mittels Enterokinase aktiviert wurde (D). Ein ähnliches Bild mit zudem stark ausgeprägter Hämorrhagie resultierte nach intravenöser Infusion von Trypsin (C).

infiltrieren Leukozyten das Pankreas und die Lunge und tragen zur Entstehung von Pankreas- und Lungenschaden bei (HARTWIG et al. 1999a, 2002a, WERNER et al. 1998).

Adhäsionsmoleküle, welche auf Leukozyten und Endothelzellen exprimiert werden, sind für die Leukozytenmigration ins Gewebe verantwortlich (SPRINGER 1995). Eine vermehrte endotheliale Expression von *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1, CD54) konnte in neueren Studien mit der Entstehung der Pankreas- und Lungenschädigung bei akuter Pankreatitis assoziiert werden. Zudem reduzierte ein genetisch induziertes ICAM-1-Defizit (FROSSARD et al. 1999) oder die Applikation von ICAM-1-Antikörpern (WERNER et al. 1999) sowohl die Leukozyteninfiltration als auch die Organschädigung bei nekrotisierender Pankreatitis. Die auf Granulozyten exprimierte Gegenstruktur zum endothelialen ICAM-1 ist das Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). Durch die Bindung von Mac-1 an ICAM-1 wird das feste Anhaften von Neutrophilen am Gefäßendothel (= Leukozyten-*Sticking*) mediiert, eine Voraussetzung für die transendotheliale Migration dieser Entzündungszellen ins Gewebe (MILLER et al. 1987). Selektine, eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, mediiern die frühe Phase der transienten Leukozyten-Endothel-Interaktion (= Leukozyten-*Rolling*). L-Selektin wird hierzu konstitutiv auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert und leitet die Zellen zum Entzündungsherd (KANSAS 1996). Erst bei starker Zellaktivierung kommt es zu einer proteolytischen Abtrennung des L-Selektins von der Zelloberfläche. Dies ermöglicht dann den späteren Vorgang der Leukozytenmigration ins Gewebe (WALCHECK et al. 1996).

Untersucht werden sollte nun, inwieweit Trypsin die Expression von Mac-1 und L-Selektin auf Leukozyten und von ICAM-1 auf Endothelzellen induzieren kann. Der Trypsin-induzierte Effekt sollte mit dem Expressionsmuster dieser Adhäsionsmoleküle bei akuter Pankreatitis verglichen werden.

#### 4.1 Methodik

Serum von Ratten mit nekrotisierender GDOC-induzierter Pankreatitis und trypsinisiertes Serum wurde mit isolierten Leukozyten oder humanen Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) inkubiert. Trypsiniertes Serum wurde durch Serum-Inkubation mit bovinem Trypsin (Endkonzentration  $10^{-10}$  bis  $10^{-4}$  mol/L) unter gleichzeitiger Zugabe von *Soybean Trypsin Inhibitor* erzeugt. Im Gegensatz zur einfachen Inkubation von Serum mit Trypsin konnte bei dieser »limitierten Trypsinierung« eine Aktivierung von Komplementproteinen im Serum nachgewiesen werden (ROXVALL et al. 1991). Als Kontrollen wurden Leukozyten mit den stark zellaktivierend wirkenden Substanzen Phorbol-Myristate-Acetat (PMA) und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) inkubiert. Die leukozytäre Expression von L-Selektin (CD62L) und Mac-1 (CD11b) wurde mittels FACScan-Flow-Zytometrie quantifiziert (HARTWIG et al. 2001). ICAM-1 (CD54) wurde auf HUVECs mittels zellulärem ELISA bestimmt (KVALE et al. 1992), in der Lunge von Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis mittels Western-Blot.

#### 4.2 Ergebnisse

Die Expression von Mac-1 auf Neutrophilen, welche mit Serum von Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis inkubiert wurden, war im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht, während L-Selektin erniedrigt war (Abb. 8). Parallel hierzu zeigten Neutrophile welche mit trypsinisiertem Serum inkubiert wurden ebenso eine vermehrte Expression von Mac-1 und eine verminderte

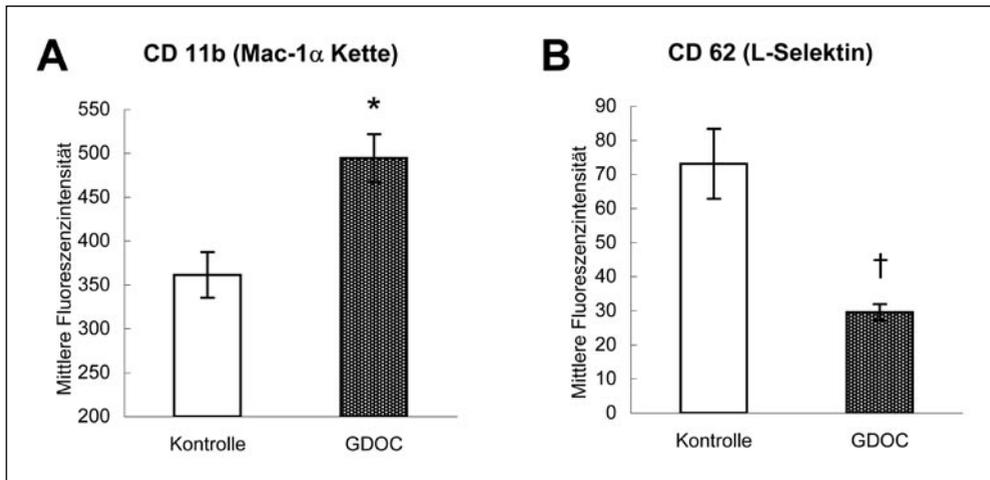


Abb. 8 Isolierte Leukozyten wurden mit Kontrollserum und Serum von Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis inkubiert. Die Expression von L-Selektin (CD62L) und Mac-1 (CD11b, Mac-1 $\alpha$ -Kette) auf Neutrophilen wurde mittels FACScan flow-zytometrisch quantifiziert (HARTWIG et al. 2001).

Expression von L-Selektin (Abb. 9). Diese Veränderungen waren mit hohen Konzentrationen von Trypsin stärker ausgeprägt. Die mit PMA und FMLP im Sinne von Positivkontrollen inkubierten Neutrophilen zeigten ein vergleichbares Expressionsmuster von Mac-1 und L-Selektin.

Mit trypsiniertem Serum inkubierte HUVECs exprimierten deutlich stärker ICAM-1 als mit Kontrollserum inkubierte Zellen (Abb. 10). Das Ausmaß der Expression von ICAM-1 war erneut abhängig von der Konzentration des zur Seruminkubation verwendeten Trypsins. Die als Positivkontrolle mit TNF- $\alpha$  inkubierten HUVECs zeigten eine vergleichbar ausgeprägte ICAM-1-Expression wie die mit trypsiniertem Serum inkubierten Zellen. Die *In-vitro*-Versuche bestätigend, war die Expression von ICAM-1 auch in der Lunge von Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis im Vergleich zu Kontrolltieren verstärkt (Abb. 11).

### 4.3 Diskussion

Nachdem wir in den vorherigen Studien die Ausbildung der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung mit der Sekretion von Pankreasproteasen korrelieren konnten, zeigten wir nun molekulare Mechanismen auf, welche die Basis für die Leukozyteninfiltration und die nachfolgende systemische Organschädigung darstellen. Eine große Zahl von Leukozyten infiltrieren bei akuter Pankreatitis die Lunge und tragen über die Freisetzung von Elastase und Sauerstoffradikalen maßgeblich zur deren Schädigung bei (HARTWIG et al. 2002a, REPINE und BEEHLER 1991). Adhäsionsmoleküle, welche auf der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert werden, medieren in einem komplexen Zusammenspiel die Leukozytenmigration ins Gewebe. Wir konnten nachweisen, daß die Expression des leukozytären Mac-1 und dessen endothelialer Ligand ICAM-1 bei akuter Pankreatitis hochreguliert ist. Als Folge einer Stimulation von Neutrophilen wird Mac-1 rasch aus intrazellulären Granula auf deren Zelloberfläche transloziert (HUGHES et al. 1992) und kann anschließend an seinen

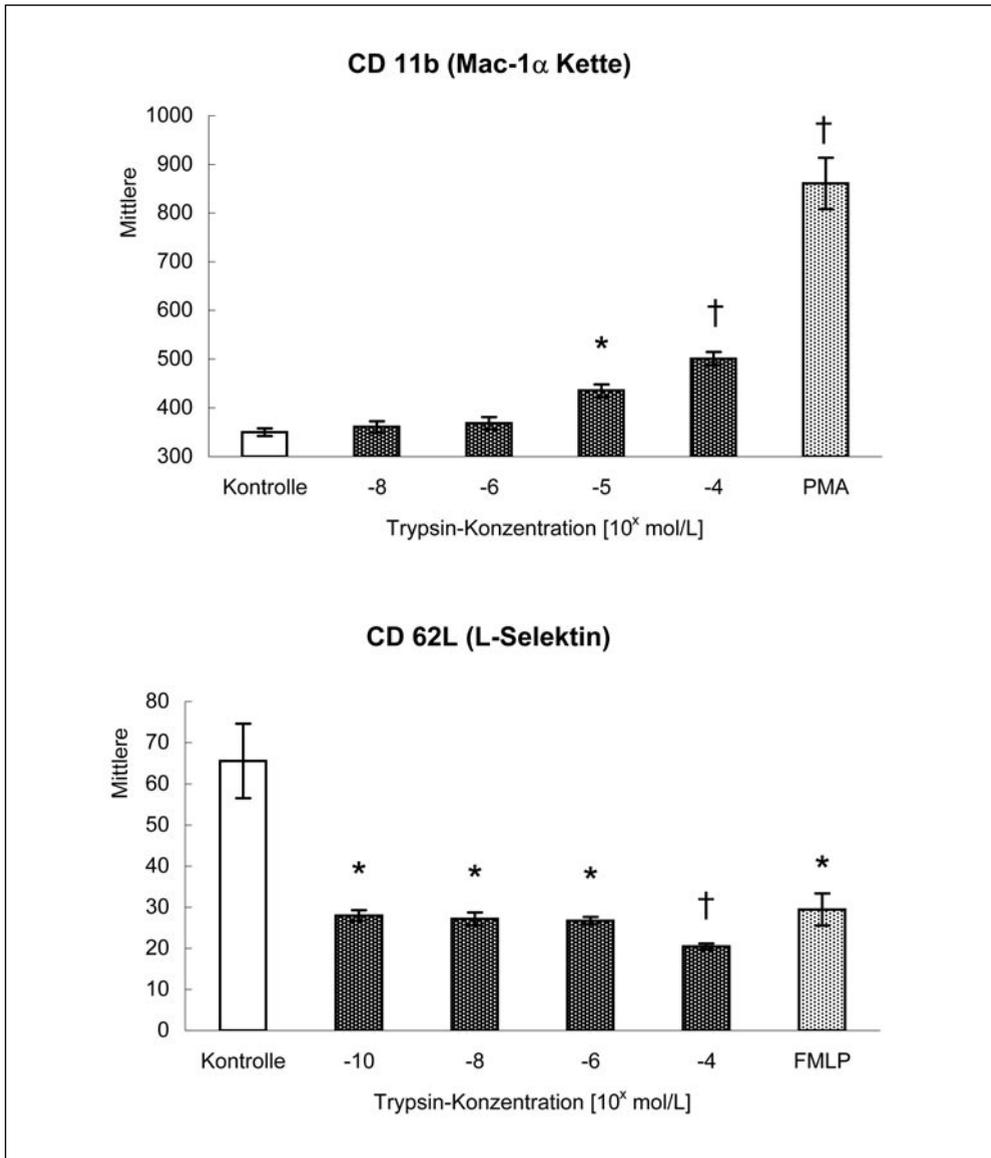


Abb. 9 Expression von L-Selektin (CD62L) und Mac-1 (CD11b, Mac-1 $\alpha$ -Kette) auf Neutrophilen, welche mit trypsinisiertem Serum inkubiert wurden. Mit Phorbol-Myristate-Acetat (PMA) und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) inkubierte Leukozyten dienen als Positivkontrolle.

endothelialen Liganden ICAM-1 binden. Diese Bindung vermittelt das feste Anhaften der Leukozyten am Gefäßendothel und deren nachfolgende Migration ins Gewebe. Das parallel stattfindende Shedding des L-Selektins von der Leukozytenoberfläche wird als Voraussetzung für die transendotheliale Leukozytenmigration gesehen (WALCHECK et al. 1996). L-Selektin ist lediglich an der initialen und transienten Leukozyten-Endothel Interaktion beteiligt.

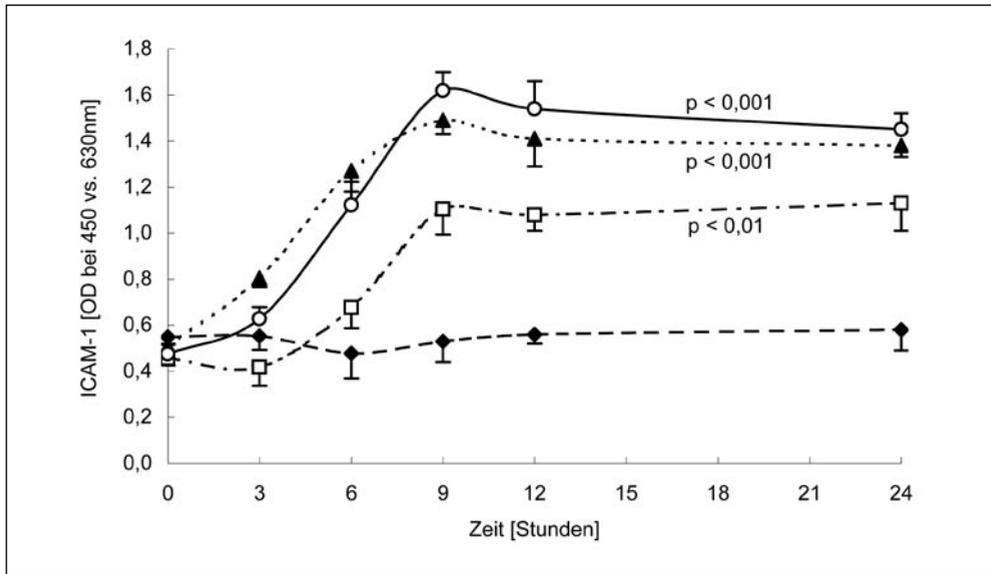


Abb. 10 Die Expression von ICAM-1 auf HUVECs wurde mittels zellulärem ELISA bestimmt (KVALE et al. 1992). HUVECs wurden mit Kontrollserum, trypsinisiertem Serum und TNF- $\alpha$  inkubiert. Die Expression von ICAM-1 wurde als Absorptionsdifferenz bei den Wellenlängen 450 nm zu 630 nm gemessen.

Eine Vielzahl von Mediatoren sind an der Leukozytenaktivierung bei entzündlichen Erkrankungen beteiligt. Unsere Ergebnisse zeigen, daß trypsinisiertes Serum eine Leukozytenaktivierung vermitteln kann, welche wie bei nekrotisierender Pankreatitis durch eine vermehrte Expression von Mac-1 und ein Shedding von L-Selektin gekennzeichnet ist. Zudem bewirkt trypsinisiertes Serum eine Aktivierung von Endothelzellen. Diese geht mit einer Hochregulation von ICAM-1 einher, wie es auch bei nekrotisierender Pankreatitis zu finden ist. Welche Mediatoren im Einzelnen durch das freigesetzte Trypsin im Serum oder Blut aktiviert werden und für die Leukozyten- und Endothelzellaktivierung verantwortlich sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

## 5. Zusammenfassung und klinischer Ausblick

Ausgedehnte Nekrosen des Pankreas und die Entwicklung von systemischen Organkomplikationen sind charakteristische Merkmale einer schweren Pankreatitis, die auch heute noch mit Mortalitätsraten von 10–20% einhergeht. Die Ursachen für das häufige und oftmals fulminante Auftreten eines Lungenversagens bei schwerer Pankreatitis sind weitgehend unklar. Unsere experimentellen Arbeiten konnten eindeutige Hinweise dafür erbringen, daß Pankreasproteasen an der Ausbildung sowohl der lokalen als auch der systemischen Komplikationen bei akuter Pankreatitis beteiligt sind (HARTWIG et al. 1999b, c). Nach einer vor allem interstitiellen Aktivierung ihrer Proenzyme wirken Serinproteasen wahrscheinlich direkt proteolytisch auf das Pankreasgewebe. Hierbei nimmt die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin eine Schlüsselrolle ein. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der systemischen Wirkung der Pankreasproteasen eher um einen indirekten Effekt, da Proteasen durch systemische Proteaseinhibitoren kompetitiv gehemmt werden. Wie von uns nachgewiesen kann jedoch trypsinisiertes Serum unter

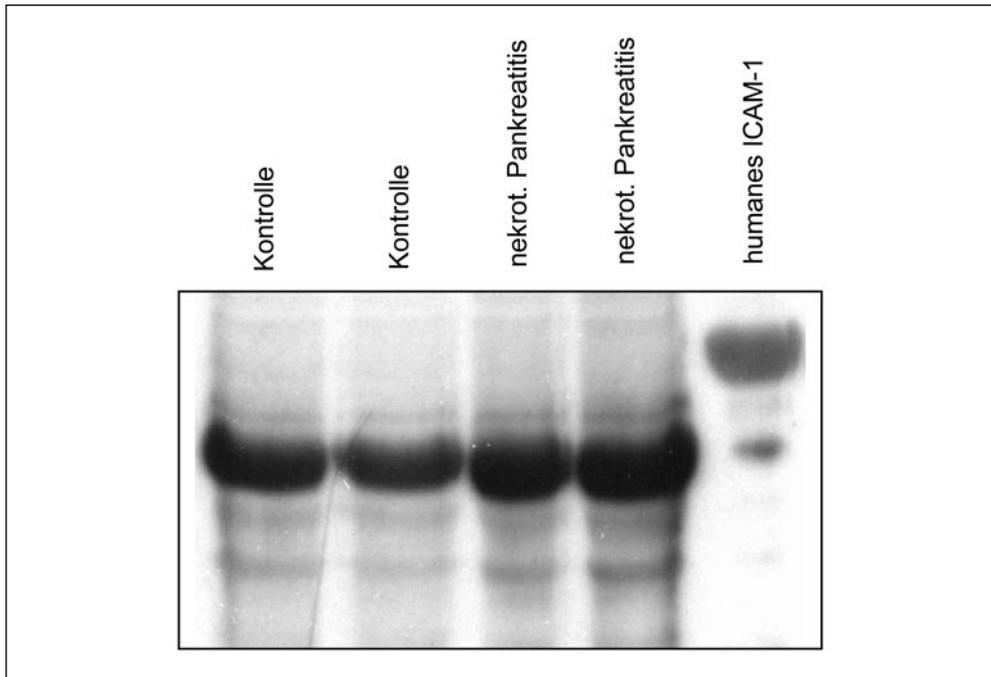


Abb. 11 Expression von ICAM-1 in der Lunge von Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis und von Kontrolltieren. Bereits 6 h nach Induktion der Pankreatitis kann eine vermehrte ICAM-1-Expression nachgewiesen werden. Der verwendete Antikörper zeigt eine Cross-Reaktivität mit rekombinantem humanem ICAM-1, welches als Standard verwendet wurde.

Anwesenheit von Proteaseinhibitoren eine Leukozyten- und Endothelaktivierung mit entsprechender Expression von Adhäsionsmolekülen bewirken, die eine nachfolgende Migration der Entzündungszellen ins Gewebe ermöglichen (HARTWIG et al. 2001, 2004). In der Pathogenese der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung ist eine intrapulmonale Akkumulation von metabolisch aktiven Granulozyten von besonderer Bedeutung (HARTWIG et al. 2002a).

Die dargestellten Pathomechanismen finden auch im klinischen Krankheitsbild der akuten Pankreatitis ihr Korrelat. Als Ausdruck der Proteasenaktivierung und deren Sekretion in den systemischen Kreislauf konnte in mehreren größeren Studien sowohl Trypsinogen als auch dessen Aktivierungspeptid TAP im Serum und Urin von Patienten mit akuter Pankreatitis nachgewiesen werden. Eine Korrelation der Serum- und Urinspiegel mit dem Schweregrad des Krankheitsbildes wurde aufgezeigt (GUDGEON et al. 1990, NEOPTOLEMOS et al. 2000, TENNER et al. 1997a). Daß Proteasen tatsächlich zur Genese der Pankreatitis beitragen, konnte durch die Applikation von *Gabexate mesilate*, einem potenten Proteaseinhibitor, vor Durchführung einer endoskopisch retrograden Cholangio-Pancreatographie (ERCP) bestätigt werden. Die prophylaktische Gabe des Proteaseinhibitors konnte die Inzidenz einer ERCP-assoziierten Pankreatitis signifikant senken (CAVALLINI et al. 1996).

Im offensichtlichen Gegensatz hierzu steht jedoch der fehlende therapeutische Nutzen von *Gabexate mesilate* bei der Behandlung der schweren akuten Pankreatitis (BÜCHLER et al. 1993). Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in dem verzögerten Therapiebeginn im klinischen Alltag,

welcher sich unausweichlich aus der Zeitspanne zwischen Beginn der Beschwerdesymptomatik und der Vorstellung des Patienten beim Arzt ergibt. In dieser frühen Phase kommt es bereits zu einer Aktivierung und Freisetzung von Pankreasproteasen, welche oftmals eine Manifestation von Organschäden bereits bei Klinikaufnahme des Patienten initiiert bzw. getriggert hat. So hatten in einer neueren Multicenter-Studie bereits 44 % der Patienten mit akuter Pankreatitis bei Klinikaufnahme ein Organversagen (JOHNSON et al. 2001). Die effektive Therapie der Pankreatitis mit Proteaseinhibitoren scheint an diesem Umstand zu scheitern. Ziel weiterer Studien muß es deshalb sein, Ansätze zu finden, welche spätere Mediatoren oder Regelmechanismen in der Pathogenese der Organschädigung bei schwerer Pankreatitis blockieren. In ersten klinischen Phase-I-II-Studien haben verschiedene Therapiekonzepte bereits hoffnungsvolle Ergebnisse erbracht (KINGSNORTH et al. 1995, KLAR et al. 1993), teilweise konnten diese jedoch bei ihrer randomisierten Evaluation nicht bestätigt werden (JOHNSON et al. 2001, UHL et al. 1999).

### *Dank*

Mein Dank gilt an erster Stelle der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina für das gewährte Forschungsstipendium und die mehrfachen nachfolgenden Kongreßunterstützungen. Herrn Professor Christian HERFARTH, emeritierter Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg, danke ich für die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes und die primäre Finanzierung. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Andrew L. WARSHAW, der mich in seinem Labor am *Massachusetts General Hospital* in Boston freundlichst aufgenommen und meine Projekte stets zielgerichtet unterstützt hat. Danken möchte ich ebenfalls Herrn Professor Ernst KLAR, ehemals Leiter der Forschungsgruppe Pankreas der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg, der die Kooperation mit Professor WARSHAW vor vielen Jahren initiiert und seitdem stetig unterstützt hat.

### *Literatur*

- ADLER, G., ROHR, G., and KERN, H. F.: Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 27, 993–1002 (1982)
- BHATIA, M., SALUJA, A. K., HOFBAUER, B., LEE, H. S., FROSSARD, J. L., and STEER, M. L.: The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. *Int. J. Pancreatol.* 24, 77–83 (1998)
- BÜCHLER, M. W., GLOOR, B., MÜLLER, C. A., FRIESS, H., SEILER, C. A., and UHL, W.: Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann. Surg.* 232, 619–626 (2000)
- BÜCHLER, M., MALFERTHEINER, P., SCHADLICH, H., NEVALAINEN, T. J., FRIESS, H., and BEGER, H. G.: Role of phospholipase A2 in human acute pancreatitis. *Gastroenterology* 97, 1521–1526 (1989)
- BÜCHLER, M., MALFERTHEINER, P., UHL, W., SCHÖLMEICH, J., STOCKMANN, F., ADLER, G., GAUS, W., ROLLE, K., and BEGER, H. G.: Gabexate mesilate in human acute pancreatitis. German Pancreatitis Study Group. *Gastroenterology* 104, 1165–1170 (1993)
- CAVALLINI, G., TITTOBELLO, A., FRULLONI, L., MASCI, E., MARIANA, A., and DI FRANCESCO, V.: Gabexate for the prevention of pancreatic damage related to endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Gabexate in digestive endoscopy – Italian Group. *New Engl. J. Med.* 335, 919–923 (1996)
- CHIARI, H.: Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Z. Heilkunde* 17, 69–95 (1896)
- FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., SCHMIDT, J., WARSHAW, A. L., and RATTNER, D. W.: Interstitial protease activation is the central event in progression to necrotizing pancreatitis. *Surgery* 116, 497–504 (1994)
- FROSSARD, J. L., SALUJA, A., BHAGAT, L., LEE, H. S., BHATIA, M., HOFBAUER, B., and STEER, M. L.: The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 116, 694–701 (1999)
- GEOKAS, M. C., and RINDERKNECHT, H.: Free proteolytic enzymes in pancreatic juice of patients with acute pancreatitis. *Amer. J. Dig. Dis.* 19, 591–598 (1974)
- GORELICK, F. S., and MATOVICK, L. M.: Lysosomal enzymes and pancreatitis. *Gastroenterology* 109, 620–625 (1995)
- GUDGEON, A. M., HEATH, D. I., HURLEY, P., JEHANLI, A., PATEL, G., WILSON, C., SHENKIN, A., AUSTEN, B. M., IMRIE, C. W., and HERMON-TAYLOR, J.: Trypsinogen activation peptides assay in the early prediction of severity of acute pancreatitis. *Lancet* 335, 4–8 (1990)

- HARTWIG, W., CARTER, E. A., JIMENEZ, R. E., JONES, R., FISCHMAN, A. J., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., and WARSHAW, A. L.: Neutrophil metabolic activity but not neutrophil sequestration reflects the development of pancreatitis-associated lung injury. *Crit. Care Med.* 30, 2075–2082 (2002a)
- HARTWIG, W., CARTER, E. A., JIMENEZ, R. E., WERNER, J., FISCHMAN, A. J., CASTILLO, C. F., and WARSHAW, A. L.: Chemotactic peptide uptake in acute pancreatitis: correlation with tissue accumulation of leukocytes. *J. Appl. Physiol.* 87, 743–749 (1999a)
- HARTWIG, W., JIMENEZ, R. E., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., KELLIHER, A., JONES, R., and WARSHAW, A. L.: Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Ann. Surg.* 233, 371–378 (2001)
- HARTWIG, W., JIMENEZ, R. E., WERNER, J., LEWANDROWSKI, K., WARSHAW, A. L., and FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C.: Interstitial trypsinogen release and its relevance to the transformation of mild into necrotizing pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 117, 717–725 (1999b)
- HARTWIG, W., WERNER, J., JIMENEZ, R. E., Z'GRAGGEN, K., WEIMANN, J., LEWANDROWSKI, K. B., WARSHAW, A. L., and FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C.: Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury. *Amer. J. Physiol.* 277, G1008–G1016 (1999c)
- HARTWIG, W., WERNER, J., MÜLLER, C. A., UHL, W., and BÜCHLER, M. W.: Surgical management of severe pancreatitis including sterile necrosis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 9, 429–435 (2002b)
- HARTWIG, W., WERNER, J., WARSHAW, A. L., ANTONIU, B., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., GEBHARD, M. M., UHL, W., and BÜCHLER, M. W.: Membrane-bound ICAM-1 is upregulated by trypsin and contributes to leukocyte migration in acute pancreatitis. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (in press)
- HOFBAUER, B., SALUJA, A. K., LERCH, M. M., BHAGAT, L., BHATIA, M., LEE, H. S., FROSSARD, J. L., ADLER, G., and STEER, M. L.: Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Amer. J. Physiol.* 275, G352–G362 (1998)
- HOLM, B. A., KEICHER, L., LIU, M. Y., SOKOLOWSKI, J., and ENHORNING, G.: Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J. Appl. Physiol.* 71, 317–321 (1991)
- HORN, J. K., RANSON, J. H., GOLDSTEIN, I. M., WEISSLER, J., CURATOLA, D., TAYLOR, R., and PEREZ, H. D.: Evidence of complement catabolism in experimental acute pancreatitis. *Amer. J. Pathol.* 101, 205–216 (1980)
- HUGHES, B. J., HOLLERS, J. C., CROCKETT-TORABI, E., and SMITH, C. W.: Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J. Clin. Invest.* 90, 1687–1696 (1992)
- IMRIE, C. W., FERGUSON, J. C., MURPHY, D., and BLUMGART, L. H.: Arterial hypoxia in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 64, 185–188 (1977)
- JOHNSON, C. D., KINGSNORTH, A. N., IMRIE, C. W., McMAHON, M. J., NEOPTOLEMOS, J. P., MCKAY, C., TOH, S. K., SKAIFE, P., LEEDER, P. C., WILSON, P., LARVIN, M., and CURTIS, L. D.: Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut* 48, 62–69 (2001)
- KANSAS, G. S.: Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88, 3259–3287 (1996)
- KARIMGANI, I., PORTER, K. A., LANGEVIN, R. E., and BANKS, P. A.: Prognostic factors in sterile pancreatic necrosis. *Gastroenterology* 103, 1636–1640 (1992)
- KINGSNORTH, A. N., GALLOWAY, S. W., and FORMELA, L. J.: Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 82, 1414–1420 (1995)
- KLAR, E., FOITZIK, T., BUHR, H., MESSMER, K., and HERFARTH, C.: Isovolemic hemodilution with dextran 60 as treatment of pancreatic ischemia in acute pancreatitis. Clinical practicability of an experimental concept. *Ann. Surg.* 217, 369–374 (1993)
- KLOPPPEL, G., DREYER, T., WILLEMER, S., KERN, H. F., and ADLER, G.: Human acute pancreatitis: its pathogenesis in the light of immunocytochemical and ultrastructural findings in acinar cells. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histo-pathol.* 409, 791–803 (1986)
- KVALE, D., KRAJCI, P., and BRANDTZAEG, P.: Expression and regulation of adhesion molecules ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58) in human intestinal epithelial cell lines. *Scand. J. Immunol.* 35, 669–676 (1992)
- LAMPEL, M., and KERN, H. F.: Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.* 373, 97–117 (1977)
- LUNGARELLA, G., GARDI, C., DE SANTI, M. M., and LUZI, P.: Pulmonary vascular injury in pancreatitis: evidence for a major role played by pancreatic elastase. *Exp. Mol. Pathol.* 42, 44–59 (1985)
- LÜTHEN, R., NIEDERAU, C., and GREDEL, J. H.: Intrapancreatic zymogen activation and levels of ATP and glutathione during caerulein pancreatitis in rats. *Amer. J. Physiol.* 268, G592–G604 (1995)
- MILLER, L. J., BAINTON, D. F., BORREGAARD, N., and SPRINGER, T. A.: Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J. Clin. Invest.* 80, 535–544 (1987)

- MITHÖFER, K., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., MANDAVILLI, U., RATTNER, D. W., and WARSHAW, A. L.: Quantitative assay of trypsinogen by measurement of cleaved activation peptide after activation with enterokinase. *Anal. Biochem.* 230, 348–350 (1995)
- MITHÖFER, K., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., RATTNER, D., and WARSHAW, A. L.: Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. *Amer. J. Physiol.* 274, G71–G79 (1998)
- NEOPTOLEMOS, J. P., KEMPPAINEN, E. A., MAYER, J. M., FITZPATRICK, J. M., RARATY, M. G., SLAVIN, J., BEGER, H. G., HIETARANTA, A. J., and PUOLAKKAINEN, P. A.: Early prediction of severity in acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide: a multicenter study. *Lancet* 355, 1955–1960 (2000)
- REPINE, J. E., and BEEHLER, C. J.: Neutrophils and adult respiratory distress syndrome: two interlocking perspectives in 1991. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 144, 251–252 (1991)
- ROXVALL, L., BENGTSON, A., SENNERBY, L., and HEIDEMAN, M.: Activation of the complement cascade by trypsin. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 273–278 (1991)
- SPRINGER, T. A.: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 827–872 (1995)
- STEER, M. L.: Frank Brooks memorial Lecture: The early intraacinar cell events which occur during acute pancreatitis. *Pancreas* 17, 31–37 (1998)
- STEER, M. L., and MELDOLESI, J.: Pathogenesis of acute pancreatitis. *Annu. Rev. Med.* 39, 95–105 (1988)
- TAHAMONT, M. V., BARIE, P. S., BLUMENSTOCK, F. A., HUSSAIN, M. H., and MALIK, A. B.: Increased lung vascular permeability after pancreatitis and trypsin infusion. *Amer. J. Pathol.* 109, 15–26 (1982)
- TENNER, S., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., STEINBERG, W., HERMON-TAYLOR, J., VALENZUELA, J. E., HARIRI, M., HUGHES, M., and BANKS, P. A.: Urinary trypsinogen activation peptide (TAP) predicts severity in patients with acute pancreatitis. *Int. J. Pancreatol.* 21, 105–110 (1997a)
- TENNER, S., SICA, G., HUGHES, M., NOORDHOEK, E., FENG, S., ZINNER, M., and BANKS, P. A.: Relationship of necrosis to organ failure in severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 113, 899–903 (1997b)
- UHL, W., BÜCHLER, M. W., MALFERTHEINER, P., BEGER, H. G., ADLER, G., and GAUS, W.: A randomised, double blind, multicentre trial of octreotide in moderate to severe acute pancreatitis. *Gut* 45, 97–104 (1999)
- UHL, W., WARSHAW, A., IMRIE, C., BASSI, C., MCKAY, C. J., LANKISCH, P. G., CARTER, R., DI MAGNO, E., BANKS, P. A., WHITCOMB, D. C., DERVENIS, C., ULRICH, C. D., SATAKE, K., GHANEH, P., HARTWIG, W., WERNER, J., MCENTEE, G., NEOPTOLEMOS, J. P., and BÜCHLER, M. W.: IAP guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2, 565–573 (2002)
- WALCHECK, B., KAHN, J., FISHER, J. M., WANG, B. B., FISK, R. S., PAYAN, D. G., FEEHAN, C., BETAGERI, R., DARLAK, K., SPATOLA, A. F., and KISHIMOTO, T. K.: Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 380, 720–723 (1996)
- WATANABE, O., BACCINO, F. M., STEER, M. L., and MELDOLESI, J.: Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. *Amer. J. Physiol.* 246, G457–G467 (1984)
- WEILAND, J. E., DAVIS, W. B., HOLTER, J. F., MOHAMMED, J. R., DORINSKY, P. M., and GADEK, J. E.: Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiological significance. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 133, 218–225 (1986)
- WERNER, J., DRAGOTAKES, S. C., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., RIVERA, J. A., OU, J., RATTNER, D. W., FISCHMAN, A. J., and WARSHAW, A. L.: Technetium-99m-labeled white blood cells: a new method to define the local and systemic role of leukocytes in acute experimental pancreatitis. *Ann. Surg.* 227, 86–94 (1998)
- WERNER, J., Z'GRAGGEN, K., FERNANDEZ DEL CASTILLO, C., LEWANDROWSKI, K. B., COMPTON, C. C., and WARSHAW, A. L.: Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann. Surg.* 229, 834–840 (1999)
- WETSEL, R. A., and KOLB, W. P.: Complement-independent activation of the fifth component (C5) of human complement: limited trypsin digestion resulting in the expression of biological activity. *J. Immunol.* 128, 2209–2216 (1982)

Dr. Werner HARTWIG  
Abteilung für Allgemeine, Viszerale und Unfallchirurgie  
Chirurgische Universitätsklinik Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 110  
69120 Heidelberg  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel: +49 6221 5636233  
Fax: +49 6221 565450  
E-Mail: werner\_hartwig@med.uni-heidelberg.de

## **Academia 350**

### **Die Leopoldina-Feiern in Schweinfurt und Halle 2002**

Vorträge der Festveranstaltungen aus Anlaß des 350jährigen  
Gründungsjubiläums der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina am  
17. und 18. Januar 2002 in Schweinfurt und vom 18. bis 20. Juni 2002 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 87, Nr. 325

Herausgegeben von Benno PARTHIER (Halle/Saale)

(2003, 248 Seiten, 19 Abbildungen, 2 Tabellen, 24,80 Euro, ISBN 3-8047-2000-5)

Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina feierte im Jahre 2002 ihre Gründung vor 350 Jahren mit zwei Festveranstaltungen. Im Januar in der Gründungsstadt Schweinfurt standen die historischen Wurzeln der Akademiegründung im 17. Jahrhundert im Mittelpunkt. Nach der Begrüßung durch Akademiepräsident Benno PARTHIER untersuchte Lorraine DASTON (Berlin) das Thema »Die Akademien und die Neuerfindung der Erfahrung im 17. Jahrhundert«. Richard TOELLNER (Rottenburg) nannte seine Ausführungen zu den Quellen der Akademiegründung »Im Hain des Akademos auf die Natur wißbegierig sein: Vier Ärzte der Freien Reichsstadt Schweinfurt begründen vor 350 Jahren eine Naturforscherunternehmung«. Der Schweinfurter Festakt brachte nach der Begrüßung durch Frau Oberbürgermeisterin Gudrun GRIESER und einer Folge von Grußadressen (u. a. vom bayerischen Ministerpräsidenten Edmund STOIBER) abschließend eine Standortbestimmung der ältesten deutschen Akademie in der Gegenwart von Präsident PARTHIER (»Die Leopoldina heute«). Außerdem wird die im Rahmen der Feierlichkeiten erfolgte diesjährige Verleihung des Carus-Preises der Stadt Schweinfurt dokumentiert. Die Juniveranstaltung in Halle (Saale) widmete sich nach Grußworten des Bundespräsidenten Johannes RAU und des sachsen-anhaltinischen Ministerpräsidenten Wolfgang BÖHMER den internationalen Aspekten des Leopoldina-Wirkens mit einem Symposium »Science und Society«, das gemeinsam von Vertretern der ältesten europäischen Akademien, der Royal Society (Lord Robert MAY, London), der Académie des Sciences (Jean-Pierre KAHANE, Paris), der Accademia Nazionale dei Lincei (Sergio CARRÀ, Rom) und der Leopoldina (Hans MOHR, Freiburg i. Br.), getragen wurde. Die Beiträge behandeln das gesamte Spannungsfeld von Wissenschaft, Politik, Gesellschaft und Demokratie. Darüber hinaus dokumentiert der Band den von der Jungen Akademie, einer Tochterinstitution von Leopoldina und Berlin-Brandenburgischer Akademie, im Rahmen der Leopoldina-Jubelfeier veranstalteten Workshop »Science und Society: Science Goes Pop?«, der versuchte, der Popularisierung von Wissenschaft und dem Bild des Wissenschaftlers in der Öffentlichkeit nachzugehen.

*In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*

## **Gynäkologie und Pädiatrie**

---

PD Dr. med. habil. Matthias SCHWAB

1963 in Halle an der Saale geboren. Dort von 1983 bis 1989 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität. Ab 1989 wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pathologische Physiologie der Universität Jena. 1994 Arzt für Pathophysiologie. Promotion zum Dr. med. an der Friedrich-Schiller-Universität im Jahr 1995. Zuerkennung des Leopoldina-Förderpreises und 1995 jeweils dreimonatiger Aufenthalt am Perinatology Research Laboratory der University of Florida, Gainesville, und am Laboratory for Pregnancy and Newborn Research, Cornell University, Ithaca, New York. 1997 weiterer sechsmonatiger Aufenthalt am Laboratory for Pregnancy and Newborn Research mit teilweiser Unterstützung der Leopoldina. Seit 1997 Zweitfacharztausbildung an der Klinik für Neurologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena. 2001 DFG-begutachtetes Max-Kade-Stipendium und fünfzehnmonatiger Aufenthalt am Department of Biomedical Sciences, Cornell University, Ithaca, New York. 2002 Habilitation zum Thema »Die Beeinflussung der fetalen Hirnfunktion durch Glukokortikoide sowie vibroakustische und thermische Stimulationen«. 2003 Arzt für Neurologie.

## **Geräusche und Stresshormone im Mutterleib – Was nimmt der Fetus wahr und was prägt ihn für den Rest des Lebens?**

Matthias SCHWAB (Jena)

Mit 12 Abbildungen und 2 Tabellen

### *Zusammenfassung*

Glukokortikoide als Stresshormone und Geräusche scheinen einen Einfluß auf die Entwicklung des Feten im Mutterleib zu haben. Trotz des klinischen Einsatzes von vibroakustischen Reizen zur Einschätzung des fetalen Vitalzustandes herrschte Unklarheit über deren Verarbeitung durch das fetale Gehirn sowie die Abhängigkeit der Reizwahrnehmung vom Stimulus. Glukokortikoide werden zur Beschleunigung der Lungenreifung routinemäßig in der Perinatalmedizin eingesetzt. Da die mit einem erniedrigten Körpergewicht einhergehenden erhöhten endogenen Glukokortikoidspiegel (Cortisol) zu Wachstumsretardierungen und einer Disposition für kardiovaskuläre Krankheiten im späteren Leben führen, traten Bedenken über die Nebenwirkungen dieser Therapie auf. Trotz der Kenntnis von neurotoxischen Effekten im adulten Gehirn gab es kaum Daten zu zerebralen Effekten beim Feten.

Unsere Untersuchungen am chronisch instrumentierten Schaffeten zeigten, daß vibroakustische Reize frequenzabhängig zu einer schwellenartigen kortikalen Aktivierung über den Hörnerv und das aufsteigende retikuläre aktivierende System führen, die unabhängig vom aktuellen Schlafstadium des Feten war. So sind die Voraussetzungen für eine »bewußte« Wahrnehmung externer vibroakustischer Reize durch den Feten im letzten Drittel der Schwangerschaft gegeben.

Feten mit einem niedrigen Körpergewicht wiesen bereits im Mutterleib erhöhte Cortisolplasmaspiegel, die mit einem erhöhten arteriellen Blutdruck einhergingen, auf. Nach deren Normalisierung war noch eine gestörte Blutdruckregulation nachweisbar. Das synthetische Glukokortikoid Betamethason führte in der klinisch genutzten Dosis ebenfalls zu einer akuten Blutdruckerhöhung und zu erheblichen zerebralen Effekten in Form einer Abnahme der fetalen Hirndurchblutung um etwa 40% und einer Störung der komplexen kortikalen neuronalen Interaktionen sowie einer funktionellen Störung der präsynaptischen Terminals und des neuronalen Zytoskeletts. Die kardiovaskulären und zerebralen Effekte einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie unterstreichen die Notwendigkeit einer exakten Indikationsstellung, insbesondere solange die Langzeitbedeutung der nachgewiesenen Effekte nicht besser untersucht ist.

### *Abstract*

Noises and stress hormones, i.e. glucocorticoids, seem to have a major impact on the developing fetus. Noises are proposed to stimulate central nervous development, but, in spite of clinical use of vibroacoustic stimulations to assess fetal health, there was ambiguity of the cerebral processing of the stimulus. The endogenous glucocorticoid cortisol is thought to be the mediator between low birth weight and the disposition of cardiovascular diseases in later life. Synthetic glucocorticoids are used clinically in mother threatened by premature labor to enhance fetal lung maturation. As we have also knowledge of neurotoxic glucocorticoid effects in the adult brain, there was increasing concern of the side effects of antenatal glucocorticoids.

Using the chronically instrumented fetal sheep, we found vibroacoustic stimulation arouses the cerebral cortex via the acoustic nerve and the arising reticular activating system. The cortical arousal depends on the frequency of the stimulus but not on the sleep state. Thus, the fetus is capable for a »conscious« perception of vibroacoustic stimuli in the last trimester.

Already in utero, low fetal weight was associated to elevated cortisol plasma concentration and increased blood pressure. Later in fetal life, cortisol was normalized but low weight fetuses showed still an altered blood pressure regulation. Exogenous glucocorticoids at the dose used clinically raised fetal blood pressure and had pronounced cerebral effects. They decreased cerebral blood flow by 40% and had a functional impact on complex neuronal interactions, presynaptic terminals and neuronal cytoskeleton. Because of the cardiovascular and cerebral effects, it is critically important to weigh adverse effects of antenatal glucocorticoid therapy against their life saving-benefit.

## 1. Die Bedeutung von Geräuschen und Streß im Mutterleib

Der Fetus *in utero* kann – obwohl noch nicht geboren – nicht isoliert von der Umwelt betrachtet werden. Zum einen ist er ständig physikalischen Reizen in Form von Schwingungen und Geräuschen ausgesetzt, wobei unklar ist, inwiefern diese durch den Feten *in utero* wahrgenommen werden und zu einer Aktivierung des fetalen Gehirns führen. Zum anderen steht der Fetus über die Plazenta mit der Mutter in Kontakt und wird damit von im mütterlichen Blut befindlichen Substanzen im positiven und im negativen Sinne beeinflusst. Hier sind in den letzten Jahren insbesondere die Glukokortikoide, die auch klinisch zur Beschleunigung der Lungenreifung bei von Frühgeburt bedrohten Feten angewendet werden, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Natürlich vorkommende Glukokortikoide haben als Streßhormone eine wesentliche Bedeutung für die Aufrechterhaltung der intrauterinen Homöostase und die Entwicklung des Feten. Andererseits scheinen sie eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen auf das Kreislauf- und Zentralnervensystem zu haben, so daß ein stark wachsendes Interesse an experimentellen und klinischen Daten für eine bessere Indikationsstellung zur vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie besteht.

Wie schon die Erfahrung jeder Mutter zeigt, schläft der Fetus *in utero* nicht nur ruhig, sondern Phasen des ruhigen Schlafs wechseln mit Phasen der körperlichen Aktivität. Darüber hinaus ist der Kontakt mit der Umwelt nicht aufgehoben. Heftige mütterliche Bewegungen oder äußere Geräusche werden mit ausgeprägten Körperbewegungen, aber auch mit Änderungen der Herzfrequenz, Augen- und Atembewegungen beantwortet. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit der Ableitung der Hirnströme beim menschlichen Feten in Form des Enzephalogramms (EEG) sind die Verhaltensänderungen, die über Ultraschall und Kardiotokographie (Messung der fetalen Herzfrequenz) zugänglich sind, ein wichtiges klinisches Kriterium für die Beurteilung der Hirnfunktion und des fetalen Vitalzustandes *in utero*. Insbesondere im angelsächsischen Sprachraum wird sich die Fähigkeit des Feten, auf externe Geräusche mit Verhaltensänderungen zu reagieren, zunutze gemacht. So werden externe vibroakustische Stimuli mit einem künstlichen Larynx (*electronic artificial larynx* [EAL]) zur Einschätzung der Gesundheit der Feten eingesetzt. Trotzdem herrschte Unklarheit über die Genese der induzierten Verhaltensänderungen, über deren kortikale Verarbeitung als Voraussetzungen für eine »bewußte« Wahrnehmung sowie die Abhängigkeit der Reizwahrnehmung vom aktuellen Verhaltensstadium und von den Charakteristika des Stimulus.

## 2. Das fetale Schaf als Tiermodell

Wesentliche Erkenntnisse zu dieser Thematik wurden am chronisch instrumentierten Schaffeten gewonnen. Bei diesem Tiermodell wird der Schaffetus über einen Kaiserschnitt unter sterilen Bedingungen entwickelt und mit arteriellen und venösen Kathetern, z. B. für eine Substanzapplikation, die Gewinnung von Blutproben und die Blutdruck- und Hirndurchblutungsmessung, versorgt. Außerdem können Elektroden implantiert werden, z. B. zum Monitoring des fetalen Elektrokortikogramms (ECoG – Ableitung der Hirnströme direkt von der Oberfläche des zerebralen Kortex und nicht wie beim EEG vom Schädelknochen) und zum Monitoring der Augenbewegungen, der Nacken- und Uterusmuskelaktivität und des EKG's, um die Verhaltensstadien zu charakterisieren. Anschließend wird der Fetus in das mütterliche Abdomen zurückgegeben, und die Katheter und Elektrodenkabel werden zur seitlichen Bauchwand des

Muttertieres herausgeführt. Nach einer Erholungszeit von 5 Tagen können am unbeeinträchtigten und nichtsedierten Muttertier mit dem instrumentierten Feten im Mutterleib Untersuchungen durchgeführt werden. So wurde auch die vorgeburtliche Glukokortikoidtherapie, die bisher Tausenden Kindern das Leben gerettet hat, Anfang der siebziger Jahre in Neuseeland am chronisch instrumentierten Schaffeten entwickelt (LIGGINS und HOWIE 1972). Von Vorteil ist weiterhin, daß der zeitliche Ablauf der intrauterinen Entwicklung des Zentralnervensystems und insbesondere auch der Hörbahn der des menschlichen Feten ähnelt, wenn auch das Schafgehirn zur Geburt reifer als das menschliche Gehirn ist (DOBBING und SANDS 1979). Auch die Übertragung vibroakustischer Reize durch die mütterliche Bauchwand in den Uterus ist zwischen Mensch und Schaf vergleichbar (RICHARDS et al. 1992).

### 3. Die Bedeutung von Geräuschen für den Feten im Mutterleib

#### 3.1 Die Reaktionen des Feten auf Geräusche und Vibrationen

Die normale intrauterine Geräuschumgebung des Feten

Der Fetus ist *in utero* einer Vielzahl von Geräuschen ausgesetzt. Die Hintergrundgeräusche stammen weniger von Umweltgeräuschen als von den Atem-, Darm- und Kreislaufgeräuschen der Mutter. Naturgemäß stammen die meisten experimentellen Daten zur intrauterinen Geräuschumgebung und zu den Schallübertragungseigenschaften des mütterlichen Abdomens vom Schaf, wobei die Dämpfungseigenschaften hauptsächlich mit einem Unterwassermikrofon im äußeren Gehörgang des Feten gemessen wurden. Die intrauterinen Hintergrundgeräusche erreichen unterhalb von 100 Hz einen Schalldruckpegel von 90 dB, bei 100 Hz 60 dB und oberhalb von 500 Hz 40 dB (GERHARDT et al. 1990). Diese Schalldrücke sind durchaus mit Verkehrslärm vergleichbar. Prinzipiell kann der Fetus *in utero* nur externe Geräusche wahrnehmen, wenn sie den Geräuschpegel der Hintergrundgeräusche überschreiten.

Übertragung externer vibroakustischer Stimuli in den Uterus und die fetale Schallwahrnehmung

Mindestens drei Faktoren beeinflussen die Intensität externer Geräusche am inneren Ohr des Feten: die Dämpfung des Schalls durch das mütterliche Gewebe, die intraabdominelle Flüssigkeit und die Amnionflüssigkeit sowie die Dämpfung durch die verminderte Schalleitfähigkeit des Gehörapparates, da der äußere Gehörgang und das Mittelohr noch flüssigkeitsgefüllt sind. Schall externer Quellen wird durch die mütterliche Bauchwand und die Amnionflüssigkeit als inverse Funktion von Stimulationsfrequenz und Stimulationspegel bei Mensch (RICHARDS et al. 1992) und Schaf (GERHARDT et al. 1990) in sehr ähnlicher Weise gedämpft. Sehr niedrige Frequenzen (10–100 Hz) scheinen das mütterliche Abdomen insgesamt in Schwingungen zu versetzen und werden deshalb ungedämpft übertragen. Niedrigfrequenter Schall bis etwa 250 Hz durchdringt die Bauchwand, das uterine Gewebe und die Amnionflüssigkeit nicht nur nahezu ungedämpft, sondern wird intrauterin um 2–5 dB verstärkt, d. h., der Schalldruck kann in diesem Frequenzbereich innerhalb des Abdomens größer sein als außerhalb. Im mittleren Frequenzbereich (200–4000 Hz) werden Schwingungen um etwa 6 dB pro Oktave bis zu maximal 20 dB oberhalb 4000 Hz gedämpft. Als inverse Funktion des Stimulationspegels wird der Schall zusätzlich im Niedrig- (50–125 Hz) und Hochfrequenzbereich (7000–20000 Hz) gedämpft. Je lauter der Stimulus, desto relativ geringer ist der Schalldruck, der das fetale Ohr erreicht.

Da die akustische Impedanz des Wassers wesentlich höher als die der Luft ist, wird der Schall aufgrund des flüssigkeitsgefüllten äußeren Gehörgangs und Mittelohrs ähnlich wie beim Hören unter Wasser hauptsächlich über Knochenleitung weitergeleitet (GERHARDT und ABRAMS 1996). Dazu trägt auch bei, daß die Gehörknöchelchen des Mittelohres beim menschlichen Feten bis zum achten Schwangerschaftsmonat in Mesenchym eingebettet sind. Die Gehörknöchelchenkette kann dadurch kaum effizient wirken.

Um die Dämpfung des Schalls durch das flüssigkeitsgefüllte Mittelohr und den Reifungszustand des Innenohrs bei der fetalen Schallwahrnehmung berücksichtigen zu können, wurden beim fetalen Schaf zusätzlich an der Cochlea Mikrofonpotentiale abgeleitet. Dabei wurde insgesamt ein Schallverlust durch die Übertragungsverluste der mütterlichen Bauchwand und des flüssigkeitsgefüllten Ohres von 35–45 dB bei 500–2000 Hz und von 10–20 dB bei niedrigeren Frequenzen berechnet (GERHARDT und ABRAMS 1996). Zusätzlich ist der Fetus aufgrund der Unreife der Cochlea sensitiver für niedrige Frequenzen. Insgesamt liegt die Hörschwelle damit *in utero* um 30 bis 40 dB höher als postnatal, wobei eine zusätzliche Schallisolation des Feten vor allem bei höheren Frequenzen auftritt.

Somit kann der Fetus *in utero* Sprache und Musik wahrnehmen, allerdings hauptsächlich die niederfrequenten Komponenten unter 500 Hz und nur, wenn das Schallsignal über den intrauterinen Hintergrundgeräuschen liegt, also mindestens 60–70 dB beträgt. Interessanterweise können damit vom Feten bevorzugt männliche (niedrigfrequente) Stimmen wahrgenommen werden (GERHARDT und ABRAMS 1996). Menschliche Feten sollten jedoch aufgrund der Knochenleitung in der Lage sein, die mütterliche Stimme zu erkennen und akustische Erinnerungen zu bilden (FIFER und MOON 1995).

#### Klinische Bedeutung der Beeinflussung fetaler Verhaltensstadien

Bei menschlichen Feten beginnen umschriebene Verhaltensstadien zwischen der 28. und 31. SSW sichtbar zu werden. Anhand der Aktivität der fetalen Körper-, Atem- und Augenbewegungen sowie der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität als Ausdruck der Aktivität des autonomen Nervensystems können die Stadien 1F (korrespondierend zum postnatalen NREM-Schlaf – »no rapid eye movements«, ruhiger Schlaf), 2F (korrespondierend zum postnatalen REM-Schlaf – »rapid eye movements«, aktiver Schlaf), 3F (»quiet alertness«) und 4F (häufig als Wachsein interpretiert) unterschieden werden. Ein Fetus in der 38. SSW verbringt etwa 75% der Zeit in den Stadien 1F und 2F. Die fetalen Verhaltenszustände, die im Hirnstamm generiert werden, sind Ausdruck umschriebener Funktionszustände des Gehirns. Da das direkte Monitoring der Hirnströme beim menschlichen Feten nicht möglich ist, fehlt die eindeutige Zuordnung der fetalen Verhaltensstadien zu klar definierten Mustern im EEG. Hier hat das fetale Schaf als Tiermodell für die menschliche Fetalperiode Bedeutung erlangt. Beim fetalen Schaf lassen sich die Verhaltenszustände durch die Möglichkeit der chronischen Instrumentierung und der damit verbundenen Zugänglichkeit der fetalen elektrokortikalen Hirnaktivität direkt bestimmten Schlafstadien zuordnen. Es können zwei wesentliche Schlafstadien unterschieden werden, die den NREM- und REM-Schlafphasen, die bei menschlichen Neugeborenen gefunden werden, ähneln.

Der gesunde menschliche Fetus beantwortet vibroakustische Stimulationen in Abhängigkeit von der funktionellen Reifung der Hörbahn und des Zentralnervensystems im Stadium 1F, jedoch scheinbar nicht im Stadium 2F und 3F mit Änderungen des Verhaltens von der 24.–25. SSW an. Schaffeten, bei denen die zeitliche Abfolge der Entwicklung des auditorischen Systems der des menschlichen Feten ähnelt, reagieren auf vibroakustische Stimulationen mit ebenfalls

wesentlich ausgeprägteren Verhaltensänderungen im NREM-Schlaf als im REM-Schlaf (ABRAMS et al. 1989). Die Verhaltensänderungen wurden dabei als Weckreaktion (Arousal) interpretiert. Die Analyse der fetalen elektrokortikalen Aktivität als Nachweis für eine solche Annahme ist beim menschlichen Feten nicht möglich und wurde beim Schaffeten – abgesehen von der Betrachtung der ECoG-Amplitude, die keine eindeutigen Ergebnisse erbrachte (PARKES et al. 1991) – bisher nicht durchgeführt.

Kortikale Aktivierungen im Rahmen der Wahrnehmung externer Geräusche und Vibrationen haben wahrscheinlich auch eine physiologische Bedeutung für die funktionelle Hirnentwicklung. Schon den intrauterinen Hintergrundgeräuschen wird eine Bedeutung als basaler Stimulus für die Differenzierung des auditorischen Systems und die funktionelle Entwicklung der Hörbahn zugeschrieben (LECANUET et al. 1992). So führt die Zerstörung des Innenohrs beim reifen fetalen Schaf zu einer globalen Senkung des zerebralen Glukosemetabolismus und nicht nur zu einer Abnahme im Bereich der Hörbahn (ABRAMS et al. 1987). Dies könnte ein Hinweis auf die Ursache einer allgemeinen Beeinträchtigung höherer zentralnervöser Funktionen bei taubgeborenen Kindern sein.

### *3.2 Eigene Untersuchungen: Zerebrale Effekte und zentralnervöse Verarbeitung von vibroakustischen Stimulationen*

#### Untersuchungsziele und -methoden

Obwohl wir inzwischen ziemlich genaue Vorstellungen darüber haben, welcher Schalldruck am fetalen Kopf einwirkt und wieviel Schall aktuell das fetale Innenohr erreicht, ist viel weniger klar, welche Reize wirklich den Aktivitätszustand des fetalen Gehirns ändern und ob die Perception vibroakustischer Stimuli, insbesondere bei niedrigen Frequenzen, ausschließlich über das auditorische System oder aber auch über Vibrationsrezeptoren in der Haut und in anderen Geweben erfolgt. Die bessere Kenntnis der Wahrnehmung und zerebralen Verarbeitung von vibroakustischen Stimulationen trägt zur besseren Interpretation der Änderung fetaler Verhaltensstadien, wie sie unter klinischen Bedingungen beobachtet werden, bei. Diese Untersuchungen erscheinen um so wichtiger, da unser Verständnis der Einflüsse von Geräuschen auf die fetale Entwicklung ebenso wie die mögliche Beeinträchtigung des Feten durch intensive Schalleinwirkungen und Vibrationen nur marginal sind. Vibroakustische Stimulationen können, obwohl routinemäßig nur in kurzer Zeitdauer (< 5 s) angewendet, exzessive fetale Reaktionen in Form abnormer Verhaltensmuster wie prolongierter Tachykardien und exzessiver fetaler Bewegungen provozieren, die noch mehr als eine Stunde nach dem Stimulus nachweisbar sind (VISSER et al. 1989). Diese Reaktionen können Ausdruck von Verhaltensstadienwechseln oder subkortikaler Arousal-Reaktionen sein. Letztere können auch postnatal im Schlaf durch akustische Stimuli induziert werden (HALASZ 1993), man reagiert auf ein Geräusch im Schlaf mit Körperbewegungen, ohne wach zu werden. Ziele eines Teils meiner bisherigen Studien waren deshalb

- die Entwicklung eines zeitvarianten nichtlinearen Parameters zur Quantifizierung von Änderungen des zerebralen Funktionszustandes anhand des ECoG's,
- die Untersuchung, ob die in vorangegangenen Studien beobachteten Änderungen der fetalen Verhaltensparameter mit einem kortikalen Arousal einhergehen,
- die Untersuchung des Einflusses des aktuellen fetalen Schlafstadiums auf die kortikale Aktivierung,

- die systematische Untersuchung der Effektivität von vibroakustischen Stimulationen bei der Erzeugung fetaler Weckreaktionen,
- die Charakterisierung der kortikalen Verarbeitung vibroakustischer Stimulationen,
- die Untersuchung der Perzeptionswege vibroakustischer Stimulationen.

Zur Klärung der Fragestellungen instrumentierten wir Schaffeten – wie oben beschrieben – in einem Alter, das etwa der 30.–36. SSW entspricht und in dem beim fetalen Schaf die Verhaltensstadien entwickelt und das auditorische System funktionell aktiv ist. Neben den Elektroden zur Ableitung des ECoG's und der Verhaltensstadien wurde teilweise ein Unterwassermikrofon zur Aufzeichnung des durch die vibroakustischen Stimulationen erzeugten intrauterinen Schalldruckes in den äußeren Gehörgang implantiert.

Wir quantifizierten erstmals die Veränderungen des Frequenzspektrums des ECoG-Signals während vibroakustischer Stimulationen mittels Leistungsspektralanalyse zum Nachweis eines kortikalen Arousals und führten innovative nichtlineare ECoG-Analyseverfahren zur Untersuchung der zentralnervösen Verarbeitung von vibroakustischen Stimulationen ein, um so eine umfassende Analyse des Prozesses der kortikalen Aktivierung zu ermöglichen. Während die Leistungsspektralanalyse der »goldene Standard« der linearen ECoG-Analyse ist, basierten die von uns genutzten nichtlinearen ECoG-Analyseverfahren auf dem Konzept, daß das ECoG ein hochkomplexes Signal ist (PALUS 1996, THEILER und RAPP 1996), das Informationen enthält, die nicht mit linearen Methoden beschrieben werden können. Die höheren Funktionen des zerebralen Kortex resultieren aus der koordinierten Aktivität von etwa  $10^{10}$  Neuronen, die zu einem komplexen Netzwerk verbunden sind. Das globale und dynamische Verhalten solch eines Netzwerkes ist extrem schwierig zu beschreiben, da wahrscheinlich sowohl die multiplen Interaktionen zwischen Neuronengruppen als auch das Entladungsmuster der Einzelneurone die nichtlinearen Eigenschaften des ECoG's verursachen. Als Voraussetzung für die Anwendung nichtlinearer Verfahren testeten wir das fetale ECoG auf Nichtlinearität. Es zeigte sich erwartungsgemäß, daß das fetale ECoG weder die Überlagerung eines linearen Prozesses mit Nichtstationaritäten noch ein rein stochastischer Prozeß ist (SCHWAB et al. 2000b). Das fetale ECoG enthält vielmehr deterministische und nichtlineare Anteile, so daß eine adäquate Untersuchung nichtlineare Methoden erfordert. Insbesondere das ECoG im REM-Schlaf zeichnete sich durch einen hohen Anteil an nichtlinearen Strukturen aus.

Da gängige nichtlineare Verfahren zur Analyse von Zeitreihen Stationarität voraussetzen, war es notwendig, einen zeitvarianten nichtlinearen Parameter zu definieren, um die nichtlinearen Eigenschaften einer nichtstationären Zeitreihe, wie es das ECoG während einer Weckreaktion ist, zu quantifizieren. Unter maßgeblicher Mitarbeit von Frau Diplom-Mathematikerin Karin SCHMIDT, damals Institut für Pathophysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und Förderpreisträgerin der Leopoldina 1996, entwickelten wir einen Algorithmus, der als ein innovativer nichtlinearer Ansatz einen theoretischen Punktvorhersagefehler für nichtstationäre Zeitreihen berechnet (SCHMIDT et al. 1997, 1999). Der Algorithmus beruht auf dem Wolf-Algorithmus für die Schätzung des führenden Lyapunov-Exponenten. Dabei wird die lokale exponentielle Divergenz benachbarter Trajektorien im Phasenraum geschätzt. Die lokale exponentielle Divergenz ist ein Maß für die theoretische Vorhersagbarkeit und damit Kausalität der zu untersuchenden Zeitreihe.

Die Effekte vibroakustischer Stimulationen auf das ECoG wurden mit einem vibratorischen Reiz, einem akustischen Reiz (Breitbandgeräusch) sowie mit drei vibroakustischen Stimuli getestet: einem dynamischen Stimulator, der ein komplex gepulstes, amplituden- und frequenz-

modulierten Signal erzeugte, und zwei Stimulatoren, die ein statisches Signal erzeugten (der klinisch eingesetzte EAL und ein Laborschüttler – Vortex). Die Reize wurden so gewählt, daß sie ein breites Frequenzspektrum bei unterschiedlichen Fundamentalfrequenzen abdeckten und die erzeugten Schalldruckpegel mindestens 20 dB über den intrauterinen Hintergrundgeräuschen lagen (Tab. 1). Dynamische Stimuli scheinen den statischen Stimuli bei der Provokation fetaler Verhaltensänderungen bei Mensch und Schaf überlegen zu sein (PARKES et al. 1991, VISSER et al. 1989). Da der Fetus *in utero* auch ständig reinen akustischen Reizen und Vibrationen ausgesetzt ist, sollte deren Effektivität bei der Auslösung eines ECoG-Arousals ebenfalls untersucht werden. Vibrationen sind ein häufiger Umwelteinfluß in unserem Leben und im allgemeinen harmlos. Unter bestimmten Bedingungen können sie jedoch Resonanzen im Körper erzeugen, die als unangenehm empfunden werden und sogar zu gesundheitlichen Störungen führen können. Werdende Mütter können solchen Vibrationen beruflich, z. B. als Stewardess oder bei maschinellen Arbeiten, aber auch im Haushalt ausgesetzt sein. Ihre (pa-tho)-physiologische Bedeutung für den Feten ist praktisch unerforscht.

Tab. 1 Charakteristika der untersuchten Stimuli

Art der Stimulation	Stimulator	Stimulationsdauer	Fundamental Frequenz/Obertöne	intrauteriner Schalldruck	Schalldruckpegel über Hintergrund
Vibration	Vibrationsgürtel	30 min 35–200 Hz	19 Hz	131–142 dB	55–65 dB
VAS (statisch)	EAL	30 s 250–750 Hz	125 Hz	120–130 dB	50–60 dB
VAS (statisch)	Laborschüttler	30 s 125–350 Hz	50–125 (60) Hz	110–130 dB	35–60 dB
VAS (dynamisch)	DYN	3 min	50–125 Hz 3–10 kHz	110–118 dB	> 20 dB
Akustisch	Breitbandgeräusch	3 h	40–22000 Hz	80–100 dB	20–40 dB

### Die fetale Hirnfunktion im unbeeinflussten REM- und NREM-Schlaf

Der NREM-Schlaf war durch ein hochamplitudiges, niedrigfrequentes ECoG-Muster, das Fehlen schneller Augenbewegungen und das Auftreten von Skelettmuskelaktivität gekennzeichnet. Der REM-Schlaf war durch ein niedrigamplitudiges, hochfrequentes ECoG-Muster und das Auftreten schneller Augenbewegungen bei fehlender Skelettmuskelaktivität gekennzeichnet. Nicht zuordbare Stadien wurden als »indeterminate« klassifiziert. Bei Stimulation im NREM, aber nicht im REM-Schlaf war im allgemeinen bereits mit visueller Analyse eine Unterbrechung der natürlichen Schlafstadien anhand einer Verminderung der ECoG-Amplitude, einer Zunahme der Augenbewegungen und einer Zunahme der Nackenmuskelaktivität zu erkennen (Abb. 1).

Der als nichtlineares Maß für die Vorhersagbarkeit des ECoG's berechnete Vorhersagefehler war in beiden Versuchsgruppen im REM-Schlaf signifikant größer als im NREM-Schlaf (Abb. 2). Während der spontanen Schlafstadienübergänge trat eine abrupte Änderung der Vorhersagbarkeit auf. Dabei war der Anstieg des Punktvorhersagefehlers während des Überganges

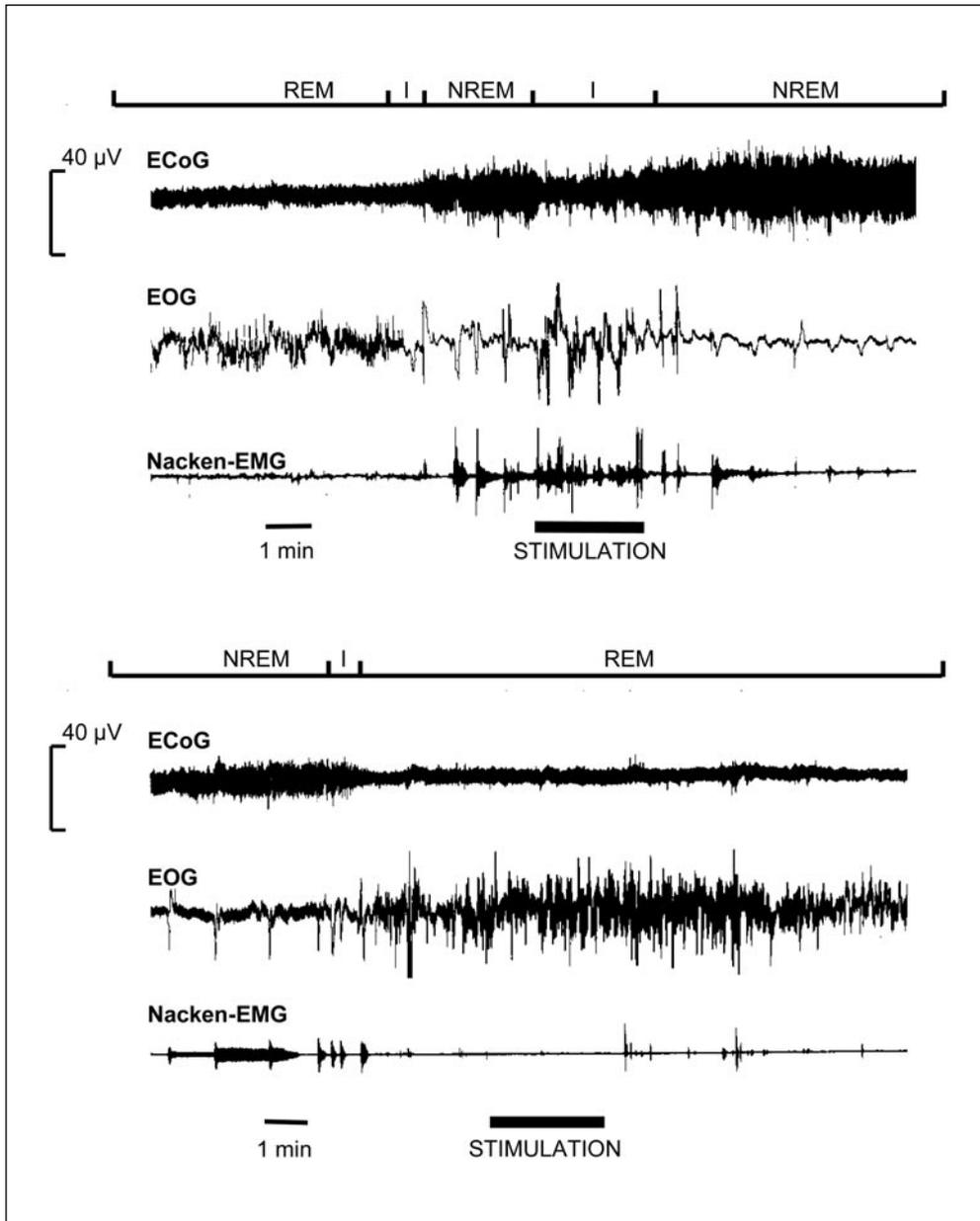


Abb. 1 Typische Beispiele der Aufzeichnung der fetalen Verhaltenparameter (ECoG, EOG, Nacken-EMG) während einer vibroakustischen Stimulation mit einem dynamischen Reiz über 3 min im NREM (*oben*) und REM-Schlaf (*unten*). *Oben:* Im NREM-Schlaf ist das ECoG-Arousal während der Stimulation anhand der verminderten ECoG-Amplitude deutlich sichtbar. Außerdem ist eine Zunahme der Augenbewegungen und der Nackenmuskelaktivität zu erkennen. *Unten:* Im REM-Schlaf ist kein Stimulationseffekt sichtbar. I = Indeterminate – keinem Schlafstadium zuzuordnen.

vom NREM- zum REM-Schlaf steiler als der Abfall des Punktvorhersagefehlers während des Überganges vom REM zum NREM-Schlaf.

Die hohe Vorhersagbarkeit und damit hohe Kausalität des ECoG's im NREM-Schlaf ist zu der synchronisierten, von thalamischen Schrittmachern erzeugten Hirnaktivität assoziiert. Sie zeigt, daß die in dem Signal enthaltenen Oszillationen auf einer sehr regelmäßigen Basis generiert werden. Die geringere Vorhersagbarkeit des ECoG's im REM-Schlaf ist zu einem Zustand kortikaler Aktivierung assoziiert. Im REM-Schlaf generieren komplexe, im Hirnstamm gelegene, cholinerge Neuronenkreise exzitatorische Impulse, die über aufsteigende Bahnen zum thalamokortikalen System übertragen werden. Diese Impulse wirken inhibitorisch auf die thalamischen Schrittmacherneurone, die die neokortikalen Neurone zu den für den NREM-Schlaf typischen rhythmischen Entladungen zwingen. Die Inhibierung der thalamischen Schrittmacherneurone bewirkt einen Wechsel von rhythmischen zu tonischen Entladungen des thalamokortikalen Netzwerkes, die in einer Aktivierung der elektrokortikalen Aktivität sichtbar wird. Die Ergebnisse der nichtlinearen Analyse stimmen mit der über den Lyapunov-Exponenten bestimmten niedrigeren theoretischen Vorhersagbarkeit (MOLNAR und SKINNER 1991) und mit der über die Korrelationsdimension bestimmten höheren Komplexität (FELL et al. 1993) des menschlichen EEG's im REM-Schlaf überein.

Damit kann als Aussage 1 zusammengefaßt werden: Der Punktvorhersagefehler erwies sich als ein geeignetes Maß für den kortikalen Aktivierungszustand und seine Änderungen im zeitlichen Verlauf.

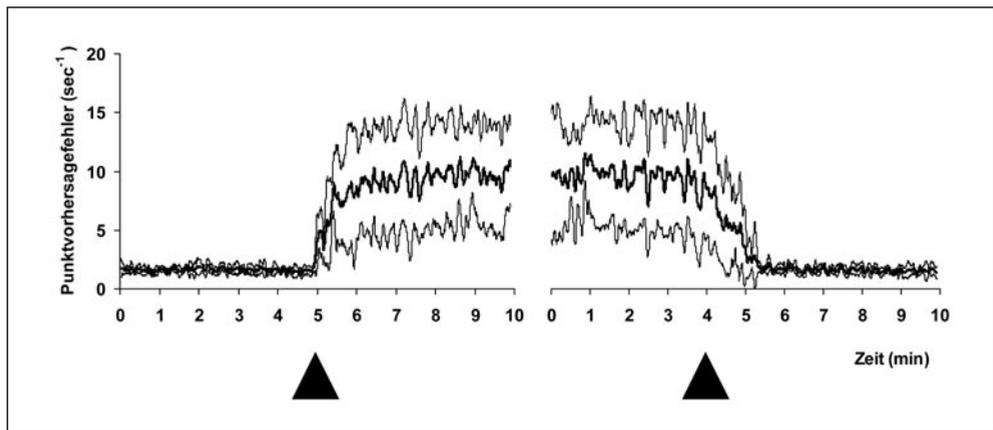


Abb. 2 Zeitlicher Verlauf der Änderungen des Punktvorhersagefehlers des ECoG's während spontaner Schlafstadienübergänge vom NREM zum REM-Schlaf (*links*) und vom REM zum NREM-Schlaf (*rechts*). Die Pfeile zeigen den Beginn des Übergangs. MW  $\pm$  SD, 5 Übergänge in einem Fetus gemittelt. Die höhere Standardabweichung des Vorhersagefehlers im REM-Schlaf ist auf Schwankungen innerhalb der untersuchten Zeitabschnitte zurückzuführen und ebenfalls Ausdruck einer geringeren Vorhersagbarkeit des ECoG's im REM-Schlaf.

### Zerebrale Effekte vibroakustischer Stimulationen

Trotz der fehlenden visuell sichtbaren ECoG-Veränderungen im REM-Schlaf (Abb. 1) zeigte die Leistungsspektralanalyse sowohl im NREM- als auch im REM-Schlaf bei den statischen (EAL, Vortex) und dynamischen vibroakustischen Stimulationen (DYN) eine Verschiebung

des Frequenzspektrums hin zu höheren Frequenzen als Ausdruck eines ECoG-Arousals entsprechend der Definition der *American Sleep Disorders Association* (Tab. 2, ABRAMS et al. 1996, BAUER et al. 1997).

Damit kommen wir zu *Aussage 2*: Vibroakustische Stimulationen führen zu einer kortikalen Aktivierung als Ausdruck eines Arousals.

Tab. 2 Effektivität der vibroakustischen Stimuli bei der Auslösung eines Arousals in Abhängigkeit vom Schlafstadium

	Statischer Reiz		Labor-schüttler	Dynamischer Reiz		
	EAL	REM		DYN	REM	REM
	NREM	REM	NREM	REM	NREM	REM
Zahl der Tiere	7	6	5	5	7	7
Zahl der Stimulationen	43	45	28	25	20	19
Zahl der Reaktionen	32	23	14	10	20	19
davon						
EcoG-Arousal	28	22	13	10	21	21
Schlafstadienwechsel	4	1	1	0	0	0
Insgesamt (% Reaktionen)	74 <sup>[1]</sup>	51 <sup>[2],[4]</sup>	50 <sup>[1],[3]</sup>	40 <sup>[2]</sup>	100	100

[1]  $p < 0,01$ ; [2]  $p < 0,001$  im Vergleich zum DYN; [3]  $p < 0,05$  im Vergleich zum EAL; [4]  $p < 0,05$  im Vergleich zum NREM-Schlaf.

### Effektivität verschiedener vibroakustischer Stimuli bei der Induktion eines Arousals

Die untersuchten vibroakustischen Stimulatoren waren bei der Auslösung eines ECoG-Arousals sehr effektiv, wobei die dynamischen vibroakustischen Stimuli mit einer hundertprozentigen Induktion eines ECoG-Arousals effektiver als die statischen Stimuli waren (Tab. 2). Die höhere Effektivität der dynamischen Stimuli ist wahrscheinlich ein physiologisches Phänomen der besseren Reizwahrnehmung von variierenden Stimuli. Nur in sehr wenigen Fällen provozierten die vibroakustischen Stimulationen Schlafstadienwechsel (Tab. 2). Die regelmäßig nachweisbaren Verhaltensänderungen bei menschlichen Feten sind damit wahrscheinlich Ausdruck subkortikaler Arousal-Reaktionen, die ein kortikales Arousal begleiten können. Die Theorie eines »Hirnstammarousalzentrums« (MORUZZI 1954), in dem autonome und zerebrale Rhythmen koordiniert werden (LANGHORST et al. 1975), ist schon alt. Auch die Hörbahn hat Projektionen zu den retikulären Neuronenkernen des Hirnstammes. Damit konnte die Vermutung aus früheren Untersuchungen, daß vibroakustische Stimulationen primär keine Schlafstadienwechsel, sondern ein Arousal hervorrufen, bestätigt werden.

Entgegen früherer Annahmen waren alle Stimuli bis auf den EAL im REM-Schlaf genauso effektiv wie im NREM-Schlaf (Tab. 2). Der statische Stimulus Vortex war mit immerhin noch 50% Reizbeantwortung im NREM bzw. 40% im REM-Schlaf am wenigsten effektiv. Das ECoG-Arousal war bis zu 2 min nach dem Ende der Stimulationen nachweisbar. Obwohl der von uns genutzte vibratorische Stimulus keine nachweisbare kortikale Aktivierung bewirkte, konnte während und nach dem dreißigminütigen Stimulus eine Störung des Ablaufes der Verhaltensstadien nachgewiesen werden (PETERS et al. 1993). Bis hier die Diskrepanz zwischen der fehlenden kortikalen Aktivierung und der Störung des Ablaufes der Verhaltensstadien weiter

untersucht wurde, sollten Vibrationen während der Schwangerschaft vermieden werden. Der durch das Breitbandgeräusch induzierte akustische Stimulus führte ebenfalls zu keinem ECoG-Arousal. Möglicherweise sind hier die induzierten niedrigeren intrauterinen Schalldruckpegel die Ursache für das Fehlen einer kortikalen Aktivierung.

Damit können wir als *Aussage 3* schlußfolgern: Vom Standpunkt unserer Untersuchungen ist es zumindest wahrscheinlich, daß die durch die vibroakustischen Stimulationen hervorgerufenen Änderungen der Aktivität der menschlichen Feten eine Arousalreaktion darstellen. Die kortikale Aktivierung hängt nur marginal vom Verhaltensstadium und von der Art des vibroakustischen Stimulus ab, wobei dynamische Stimuli effektiver wirken als statische. Die kortikale Aktivierung ist allerdings frequenzabhängig. Sehr tiefe Frequenzen (Vibrationen) und Breitbandgeräusche mit einem großen Anteil hoher Frequenzen provozieren kein kortikales Arousal.

### Kortikale Verarbeitung vibroakustischer Stimulationen

Die Stimulationen induzierten im NREM-Schlaf einen Anstieg des nichtlinearen Vorhersagefehlers (Abb. 3). Im REM-Schlaf hingegen kam es bei den statischen Stimuli – nicht jedoch bei dem dynamischen Stimulus – zu einem Abfall des Vorhersagefehlers als Ausdruck einer kortikalen Aktivierung (Abb. 3). Da eine kortikale Aktivierung aufgrund einer Weckreaktion zu einer koordinierten Reizverarbeitung mit dem Ziel einer adäquaten Reaktion (z. B. Flucht) führen sollte, erscheint es verständlich, daß das ECoG während eines Arousals mehr koordinierte Eigenschaften als die enthemmte kortikale Aktivität im REM-Schlaf aufweist. Die kortikalen Aktivierungsmuster während der Stimulationen glichen sich unabhängig vom Schlafstadium, in dem die Stimulation durchgeführt wurde, obwohl sich das Leistungsspektrum während der Stimulationen im NREM (Abnahme der spektralen Leistung im Deltaband) von dem der Stimulationen im REM-Schlaf unterschied (Zunahme der spektralen Leistung im Betaband). Dies und die fehlende Änderung der Vorhersagbarkeit des ECoG's im REM-Schlaf bei den dynamischen vibroakustischen Stimulationen (trotz einer Aktivierung im Betaband in der Leistungsspektralanalyse) machen deutlich, daß mit dem nichtlinearen Vorhersagefehler andere Eigenschaften des ECoG's als mit der Leistungsspektralanalyse erfaßt werden.

Es gab keine Assoziation des Niveaus des Punktvorhersagefehlers und damit des kortikalen Aktivierungsmusters zur Effektivität der Stimuli (Tab. 2). Bei den vibratorischen und akustischen Stimuli kam es in Übereinstimmung zu den fehlenden Änderungen im Leistungsspektrum weder im NREM- noch im REM-Schlaf zu einer Änderung des Vorhersagefehlers (Abb. 3).

Diese Ergebnisse lassen sich in *Aussage 4* zusammenfassen: Der kortikale Aktivierungszustand während der Stimulationen unterschied sich deutlich vom kortikalen Aktivierungszustand im unbeeinflussten REM-Schlaf. Er war unabhängig vom Schlafstadium, in dem die Stimulation durchgeführt wurde.

Im Gegensatz zur Leistungsspektralanalyse, die aus methodischen Erwägungen nicht auf die Analyse des zeitlichen Verlaufs der kortikalen Aktivierungen und Deaktivierungen anwendbar ist, waren die Prozesse der kortikalen Aktivierung und Deaktivierung während der spontanen Schlafstadienwechsel sowie der vibroakustischen Stimulationen mit dem Punktvorhersagefehler in ihrem Zeitverlauf deutlich zu erkennen (Abb. 4). Es wird deutlich, daß während der kortikalen Aktivierung durch die vibroakustischen Stimulationen das Niveau des Vorhersagefehlers im unbeeinflussten REM-Schlaf nicht erreicht wird.

Der zeitliche Verlauf des plötzlichen Anstieges des Punktvorhersagefehlers mit Beginn der vibroakustischen Stimulationen war dem der spontanen Schlafstadienwechsel vom NREM-zum REM-Schlaf und der langsame Abfall am Ende der vibroakustischen Stimulationen dem

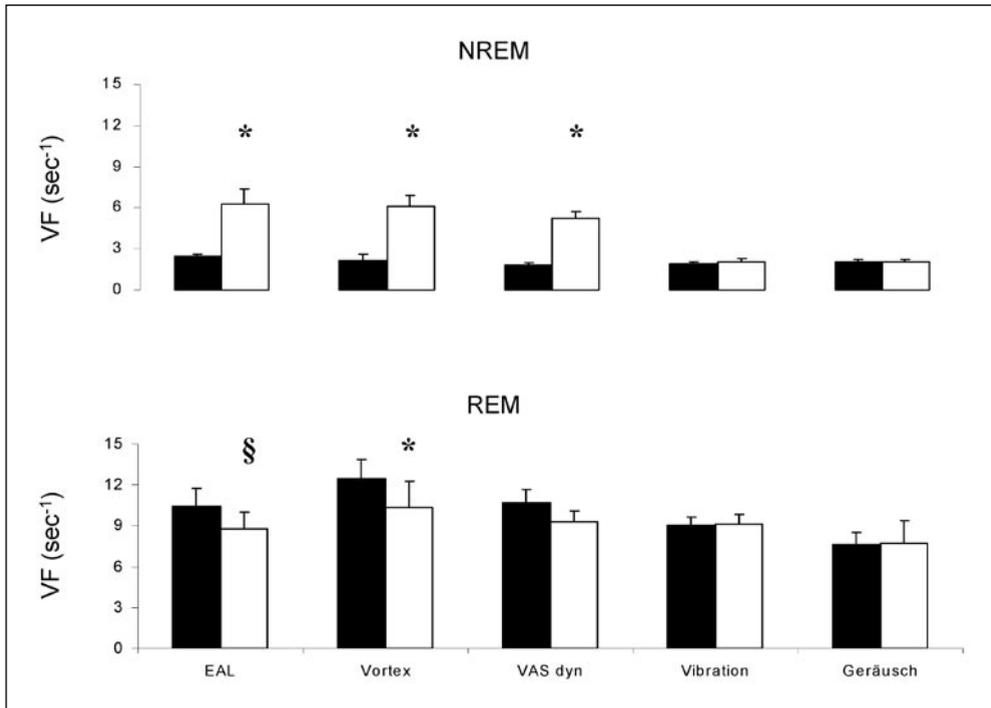


Abb. 3 Der Vorhersagefehler (VF) des fetalen ECoG's während vibroakustischer Stimulationen. Eine fetale Reaktion ist im NREM-Schlaf während vibroakustischer Stimulationen mit statischen (EAL, Vortex) und dynamischen (VAS dyn) Stimuli und im REM-Schlaf nur während vibroakustischer Stimulationen mit statischen Stimuli (EAL, Vortex) erkennbar. Schwarz – Ausgangswert, weiß – während Stimulation. EAL  $n = 7$  Tiere, Vortex  $n = 5$  Tiere, VAS dyn  $n = 7$  Tiere, Vibration  $n = 7$  Tiere, Geräusch  $n = 5$  Tiere; MW + SEM; \* $p < 0,05$ , (§)  $p < 0,07$  im Vergleich zum Ausgangswert.

der spontanen Schlafstadienwechsel vom REM- zum NREM-Schlaf sehr ähnlich (Abb. 4). Mit Stimulationsbeginn stieg der Punktvorhersagefehler bei den verschiedenen vibroakustischen Stimulationen und den spontanen Schlafstadienwechseln vom NREM- zum REM-Schlaf abrupt über 32 ms an, um dann ein Niveau zu erreichen (Abb. 5). Der ähnliche Zeitverlauf der kortikalen Aktivierung während der Stimulationen im NREM-Schlaf und der spontanen Schlafstadienwechsel vom NREM- zum REM-Schlaf legt die Vermutung nahe, daß die kortikale Aktivierung im Rahmen der Stimulationen genauso wie die Initiierung des REM-Schlafes über das aufsteigende retikuläre aktivierende System erfolgt. Das aufsteigende retikuläre aktivierende System ist ein unspezifisches Bahnsystem, welches im Hirnstamm und Thalamus lokalisiert ist und u. a. für die Aufrechterhaltung von Bewußtsein und Wachheit notwendig ist. Die Aktivierungszeit von etwa 32 ms entspricht etwa der Zeit, in der die unspezifische kortikale Aktivierung nach Stimulation von zum aufsteigenden retikulären aktivierenden System gehörenden Thalamuskernen erfolgt (GUYTON 1987). Für die unspezifische kortikale Aktivierung über das aufsteigende retikuläre aktivierende System ist auch die lange Dauer der Aktivierung über mehrere Sekunden sowie die Aktivierung größerer kortikaler Areale typisch, während die spezifische Aktivierung des auditorischen Kortex über die Hörbahn bei Neugeborenen wesentlich länger braucht und nur wenige Millisekunden anhält (GUYTON 1987).

Eine parallele Aktivierung des auditorischen Kortex ist damit jedoch nicht ausgeschlossen. Sie war in unseren Untersuchungen allerdings nicht meßbar, da die resultierenden geringen ECoG-Amplituden Elektroden über dem auditorischen Kortex oder die Mittelung von evozierter Aktivität erfordert hätten.

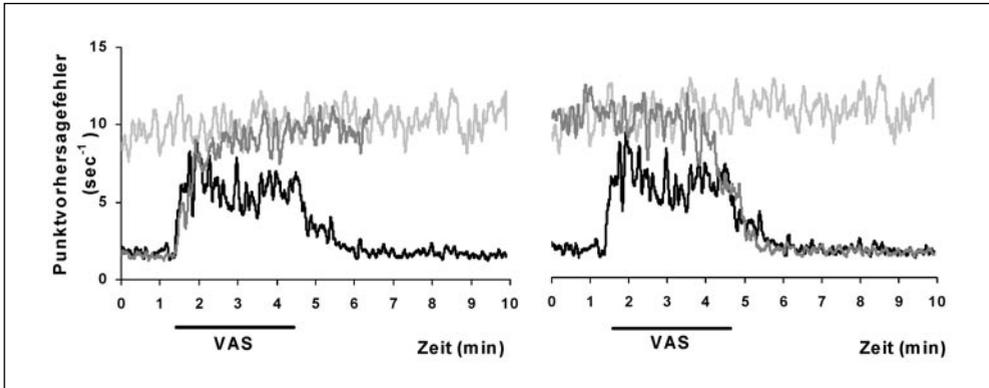


Abb. 4 Vergleich des zeitlichen Verlaufes der Änderungen des Punktvorhersagefehlers während spontaner Schlafstadienwechsel und vibroakustischer Stimulationen (VAS). *Links*: Änderungen des Punktvorhersagefehlers während spontaner Schlafstadienwechsel vom NREM zum REM-Schlaf (dunkelgrau) und Änderungen des Punktvorhersagefehlers während der VAS im NREM-Schlaf (schwarz). Das Niveau des unbeeinflussten REM-Schlafes (hellgrau) wird während der VAS nicht erreicht. *Rechts*: Änderungen des Punktvorhersagefehlers während spontaner Schlafstadienwechsel vom REM zum NREM-Schlaf (dunkelgrau) und Änderungen des Punktvorhersagefehlers am Ende der VAS im NREM-Schlaf (schwarz). Mittelwert von 5 spontanen Schlafstadienwechseln und 5 Stimulationen in einem Fetus.

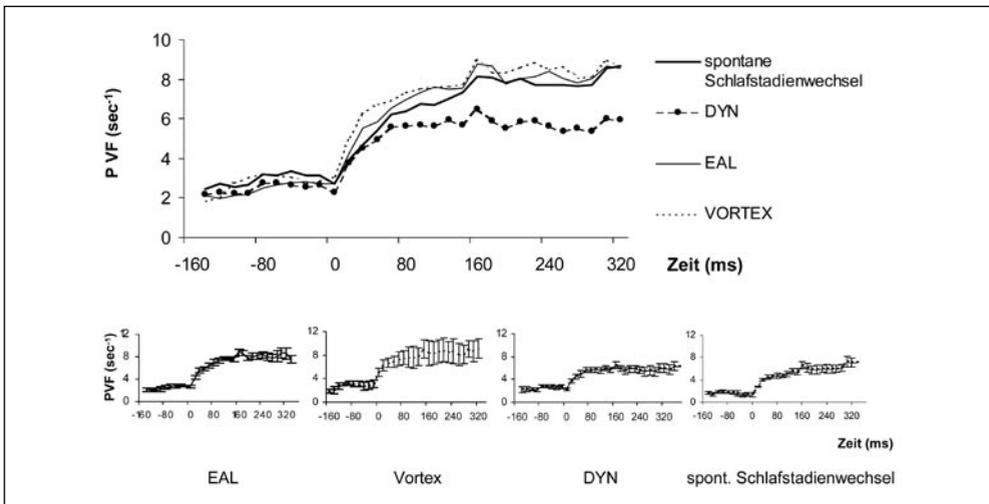


Abb. 5 Zeitlicher Verlauf des Anstieges des Punktvorhersagefehlers (PVF) nach Beginn der Stimulation im NREM-Schlaf mit den statischen (EAL, Vortex) und dynamischen Stimuli (DYN). EAL  $n = 7$  Tiere, Vortex  $n = 5$  Tiere, DYN  $n = 7$  Tiere; MW  $\pm$  SEM. Zur übersichtlicheren Darstellung des SEM wurden die Kurven in den kleineren Diagrammen unten für jeden Stimulus noch einmal extra dargestellt.

Im REM-Schlaf war die Änderung des Punktvorhersagefehlers während der vibroakustischen Stimulationen deutlich langsamer und weniger ausgeprägt als der Anstieg bei Stimulation im NREM-Schlaf (nicht dargestellt). Dies deutet nicht unbedingt auf einen grundsätzlich anderen Mechanismus der kortikalen Aktivierung hin, sondern ist auf den bereits aktivierten Zustand des Hirnstamms und des aufsteigenden retikulären aktivierenden System im REM-Schlaf und der damit verbundenen geänderten Verarbeitung von Weckreizen zurückzuführen. Einzelzellableitungen haben gezeigt, daß die Aktivierbarkeit des aufsteigenden retikulären aktivierenden Systems gegenüber somatosensiblen bzw. nozizeptiven Reizen im REM-Schlaf herabgesetzt ist (FOURMENT et al. 1988, SOJA et al. 1993). Darüber hinaus kommt es während auditorischer Stimulation von Erwachsenen zu einer Synchronisierung der intrakortikalen Aktivität im hochfrequenten Beta- und Gammaband (HAENSCHERL et al. 2000). Die Synchronisation der höherfrequenten Hirnaktivität trägt möglicherweise zur Abnahme des Punktvorhersagefehlers bei Stimulation im REM-Schlaf bei. Für die Änderung des Punktvorhersagefehlers bei Stimulation im NREM-Schlaf spielen diese hochfrequenten Synchronisationen eine geringe Rolle, da hier hauptsächlich das Verschwinden der Oszillationen im Deltaband zur Abnahme der Vorhersagbarkeit des ECoG's und damit zum Anstieg des Punktvorhersagefehlers beiträgt.

Zusammenfassend läßt sich als *Aussage 5* konstatieren: Die Aktivierung des fetalen Gehirns während der spontanen Schlafstadienwechsel vom NREM- zum REM-Schlaf und während der vibroakustischen Stimulationen im NREM-Schlaf erfolgte innerhalb von 32 ms. Im REM-Schlaf war die kortikale Aktivierung bei allen Stimulationsformen deutlich langsamer. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die kortikale Aktivierung im Rahmen der Stimulationen über das aufsteigende retikuläre aktivierende System erfolgt und ein schwellenartiger Prozeß ist. Die Zusammenführung von Ergebnissen der linearen Signalanalyse mit Ergebnissen der nichtlinearen Dynamik ermöglichte eine neue Sicht auf den kortikalen Aktivierungszustand des fetalen Gehirns. Die Schätzung des Punktvorhersagefehlers erwies sich in der Erfassung diskreter Änderungen komplexer neuronaler Interaktionen als sinnvolle Ergänzung zur Spektralanalyse.

#### Perzeptionswege vibroakustischer Reize

Um die Beteiligung des propriozeptiven Systems bei der Perzeption der VAS zu untersuchen, wurde bei einer Gruppe von Feten der Hörapparat inklusive der Nervenendigungen des 8. Hirnnerven beidseits vollständig entfernt. Gleichzeitig wurden bei diesen Tieren thermische Stimulationen mit einem Kältereiz (6 °C) über einen in die Haut des äußeren Ohrganges implantierten Wärmeaustauscher durchgeführt (ABRAMS et al. 1998), um möglichst von der peripheren Hörbahn unabhängige generelle Störungen der zentralnervösen Reizbeantwortung bei diesen Feten auszuschließen.

Nach Entfernung des Hörapparates war während der vibroakustischen Stimulationen weder im NREM- noch im REM-Schlaf eine Aktivierung des fetalen Gehirns nachweisbar, während die zur Stimulation dieser Feten verwendeten Stimulatoren EAL und Vortex bei normalen Schaffeten in 75 % bzw. 50 % der Stimulationen im NREM-Schlaf und in 50 % bzw. 40 % der Stimulationen im REM-Schlaf zu einer kortikalen Aktivierung führten. Damit sind die Afferenzen des Hörnervs und nicht das (unbeeinträchtigte) propriozeptive System wesentlich für die Aktivierung des fetalen Gehirns im Rahmen von vibroakustischen Stimulationen. Auf die thermischen Stimuli reagierten die ertaubten Feten im NREM-Schlaf in 67 % der Stimulationen und im REM-Schlaf in 50 % der Stimulationen mit einer kortikalen Aktivierung. Dies zeigt, daß das aufsteigende retikuläre aktivierende System unbeeinträchtigt war, denn sowohl

die Hörbahn als auch die somatosensiblen Afferenzen senden Projektionen zu den retikulären Neuronenkernen des Hirnstammes.

Damit läßt sich als *Aussage 6* zusammenfassen, daß die zu einer kortikalen Aktivierung führenden vibroakustischen Stimulationen über den Hörnerv und nicht das propriozeptive System wahrgenommen werden.

#### 4. Die Bedeutung von Glukokortikoiden für den Feten im Mutterleib

##### 4.1 Effekte von Glukokortikoiden auf den Feten

Klinische Bedeutung einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie

Wie bereits erwähnt, haben Glukokortikoide einen beschleunigenden Effekt auf die Lungenreifung und werden zu diesem Zweck routinemäßig in der Perinatalmedizin eingesetzt. Aufgrund von 1994 herausgegebenen Therapieempfehlungen des US-amerikanischen *National Institute of Health* (1995) zur Routinemedikation von schwangeren Frauen mit Glukokortikoiden bei drohender Frühgeburt vor der 32. SSW ist zwischen 1995 und 1998 in den USA die Zahl der Mütter von Frühgeborenen, die mit Glukokortikoiden behandelt wurden, von 12–18% auf ca. 60% gestiegen (ELIMIAN et al. 1999). Mit der Erkenntnis, daß selbst die vorgeburtliche Glukokortikoidgabe im Tierversuch postnatal zu kardiovaskulären Fehlfunktionen (DODIC et al. 1998), neurotoxischen Effekten (UNO et al. 1994) sowie Wachstumsretardierungen (JOBE et al. 1998) führen kann, traten Bedenken über die Nebenwirkungen einer solchen Therapie auf. Wir konnten beim fetalen Schaf (0,73 der Gestationsdauer) zeigen, daß bereits im Mutterleib ein spontan auftretendes niedriges Fetalgewicht, welches ungünstige Entwicklungsbedingungen für den Feten widerspiegelt, mit einer arteriellen Blutdrucksteigerung als Ausdruck einer Störung der kardiovaskulären Homöostase einhergeht (Abb. 6). Die Ursache für das niedrige Körpergewicht (z. B. mütterliche Unter- oder proteinarme Fehlernährung, Plazentainsuffizienz) ist dabei von untergeordneter Bedeutung. Mittler zwischen dem niedrigen Fetalgewicht und dem erhöhten arteriellen Blutdruck sind erhöhte Cortisolplasmaspiegel als Ausdruck einer Streßreaktion aufgrund der ungünstigen Entwicklungsbedingungen, die unter anderem eine periphere Vasokonstriktion und damit eine arterielle Blutdruckerhöhung bewirken (Abb. 7). Trotz der Normalisierung des arteriellen Blutdruckes und des Cortisolplasmaspiegels im Laufe der fetalen Entwicklung (Abb. 6) war bei niedriggewichtigen reifen Feten (0,85 der Gestationsdauer) noch eine gestörte Blutdruckregulation anhand eines gestörten Baroreflexes nachweisbar (Abb. 8). Der Baroreflex ist ein bedeutender Mechanismus zur Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase. Einer Blutdruckerhöhung wird dabei mit einer Senkung der Herzfrequenz und damit des Herzminutenvolumens begegnet und umgekehrt. Die erhöhten fetalen Cortisolplasmaspiegel scheinen über eine dauerhafte Verstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Streßachse gestörte Streßantworten zu bewirken, die bei Mensch und Tier zur Disposition von kardiovaskulären Krankheiten wie eines arteriellen Bluthochdruckes (BARKER et al. 1998, GARDNER et al. 1997) und von Verhaltensauffälligkeiten und psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen (BARKER et al. 1998, WEINSTOCK 2001) im späteren Leben beitragen.

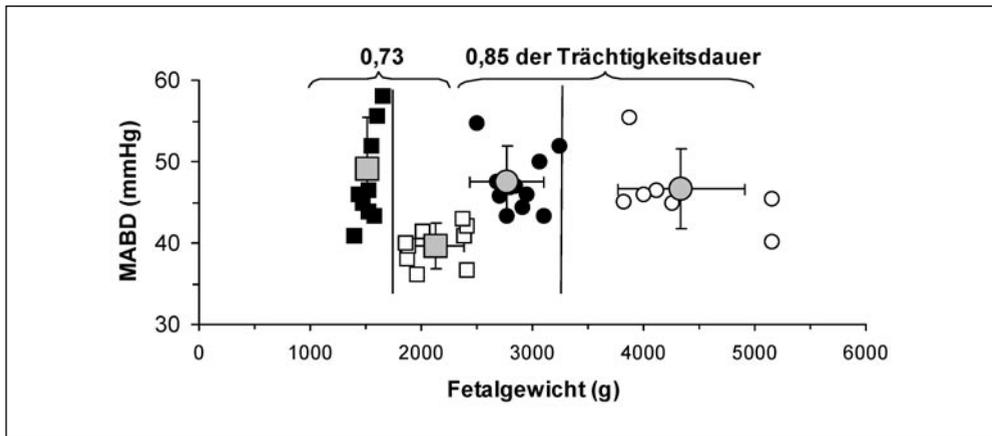


Abb. 6 Assoziation von fetalem Körpergewicht und mittlerem arteriellen Blutdruck. Diese ist bei unreifen (0,73 der Gestationsdauer, Quadrate), aber nicht bei reifen (0,85 der Gestationsdauer, Kreise) fetalen Schafen nachweisbar. Jeder Punkt stellt einen Feten unterhalb (schwarz) oder oberhalb (weiß) des mittleren Körpergewichtes dar. Die grauen Symbole sind der Mittelwert jeder Gewichtsgruppe  $\pm$  Standardabweichung.

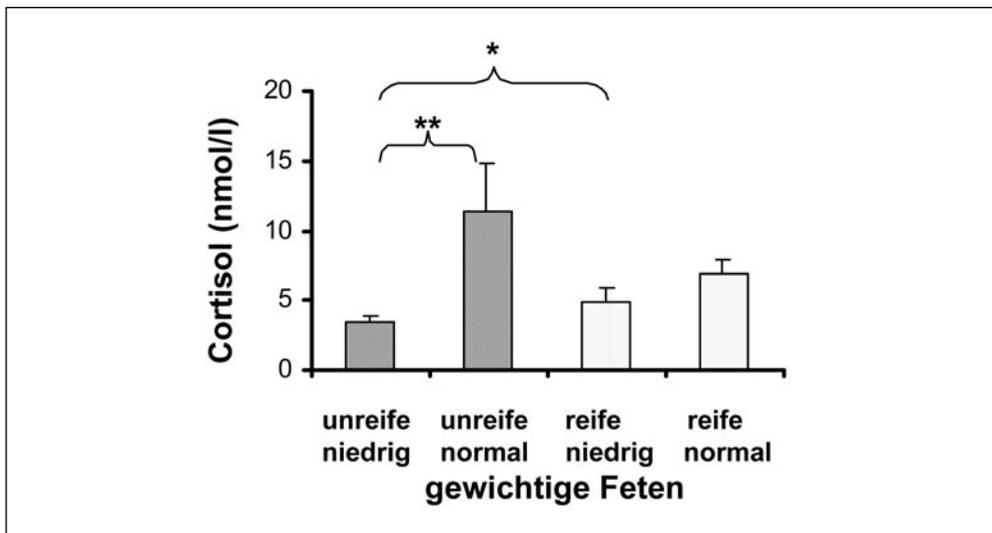


Abb. 7 Fetale Cortisolplasmaspiegel in Abhängigkeit vom Körpergewicht bei unreifen (0,73 der Gestationsdauer) und reifen (0,85 der Gestationsdauer) fetalen Schafen. MW + Standardabweichung,  $n = 9$  in jeder Gruppe. \*\*  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ . Der Cortisolanstieg zwischen den unreifen und reifen Schafföten ist entwicklungsbedingt.

### Effekte einer vorgeburtlichen Glukokortikoidbehandlung auf den Gefäßtonus

Glukokortikoide in der klinisch verwendeten Dosierung führen speziesübergreifend bei fetalen Schafen (DERKS et al. 1997), fetalen nichtmenschlichen Primaten (KOENEN et al. 2003) und bei frühgeborenen Babies (DEMARINI et al. 1999) zu einer unmittelbaren arteriellen Blutdruck-

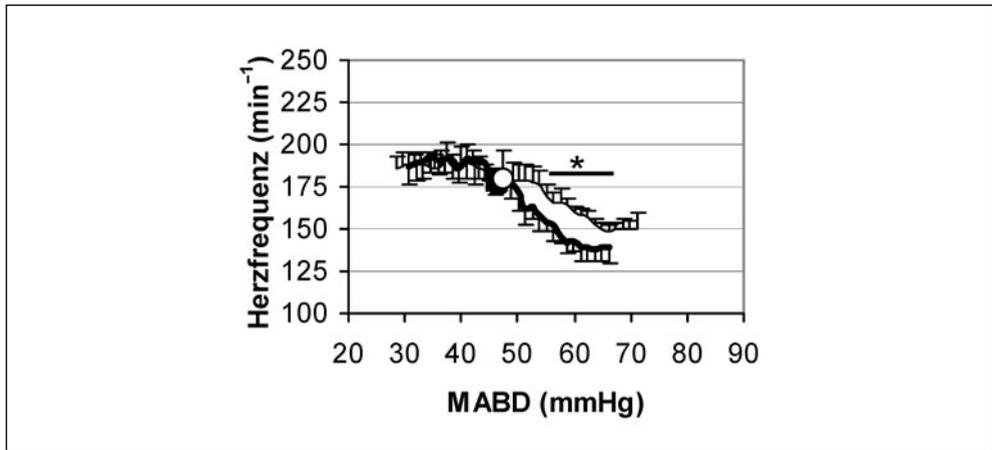


Abb. 8 Baroreflexantwort nach einer Blutdrucksenkung mit Natriumnitroprussid und einer Blutdrucksteigerung mit Phenylephrin bei niedrig- (dünne Linie) und normalgewichtigen (dicke Linie) Schaffeten (0,85 der Gestationsdauer). MABD – mittlerer arterieller Blutdruck. Der Ausgangsblutdruck ist durch den Kreis markiert. \*  $p < 0,05$ . Der geringere Abfall der Herzfrequenz während der Blutdrucksteigerung bei den niedriggewichtigen Feten ist Ausdruck einer verminderten Baroreflexantwort.

steigerung. Die Hauptursache für die arterielle Blutdrucksteigerung scheint eine periphere Vasokonstriktion zu sein (DERKS et al. 1997). Ursächlich werden im adulten Organismus eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, eine Erhöhung der Zahl der Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptoren, ein »permissiver« Effekt für die vasokonstriktorische Noradrenalinwirkung sowie eine Hemmung vasodilatatorischer Mechanismen (Kallikrein-Kinin-System, Prostaglandinsystem) diskutiert (SARUTA 1996).

Zu Glukokortikoideffekten auf den zerebralen Gefäßtonus gibt es beim Feten keine und beim adulten Gehirn nur wenige widersprüchliche Untersuchungen. Nach einer Adrenalektomie bei adulten Ratten – also bei einer Senkung des Glukokortikoidplasmaspiegels – konnte eine Zunahme der hippokampalen und kortikalen Durchblutung nachgewiesen werden (ENDO et al. 1994). Bei beatmeten Frühgeborenen wurde nach einer Behandlung mit dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason in den großen Zerebralarterien keine Änderung (OHLSSON et al. 1994) oder eine Zunahme der Flußgeschwindigkeit (CABANAS et al. 1997) mittels transkranieller Dopplersonografie nachgewiesen. Die einzige uns bekannte Studie bei menschlichen Feten zeigt ebenfalls keine Änderung der Flußgeschwindigkeit (COHLEN et al. 1996). Diese Ergebnisse sind jedoch nur sehr eingeschränkt verwertbar, da mit der Farbdopplersonografie nur Flußgeschwindigkeiten der großen Zerebralarterien und nicht direkt die autoregulierte globale oder regionale Hirndurchblutung gemessen wird. Außerdem unterscheidet sich die Kreislaufregulation beatmeter Frühgeborener erheblich von der nicht sedierter Feten.

#### Glukokortikoideffekte auf die Hirnfunktion

Im adulten Tiermodell und beim Menschen gibt es zahlreiche Untersuchungen, die Glukokortikoideffekte auf Kognition, Vigilanz, Gedächtnis und Emotionen belegen, wofür eine Beeinflussung des limbischen Systems verantwortlich gemacht wird (LUPIEN und MCEWEN 1997). Nach mütterlicher Betamethason- oder Dexamethasongabe wurden bei menschlichen

Feten akute Verhaltensänderungen wie die Abnahme von Körperbewegungen, der Atemaktivität und der Herzfrequenzvariabilität beobachtet (MULDER et al. 1997). Fast alle Kenntnisse zu den Glukokortikoideffekten auf die neuronale Erregbarkeit stammen aus *In-vitro*-Untersuchungen am Hippokampus. Die neuronale Erregbarkeit wird hauptsächlich durch Änderungen der  $K^+$ -Leitfähigkeit der Zellmembran, die Beeinflussung verschiedener Transmittersysteme und über eine Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen moduliert (JOELS und DE KLOET 1992, 1994). Effektoren sind neben schnell wirksamen Membranrezeptoren (SCHUMACHER 1990) intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren (KARST et al. 1993). Der Glukokortikoideffekt hängt sowohl vom aktivierten Rezeptortyp als auch vom Ausgangszustand des Membranpotentials (Hyper-/Depolarisation) ab (JOELS und DE KLOET 1992, 1994). Obwohl die physiologische Signifikanz der Glukokortikoideffekte noch unklar ist, scheinen sie im Hippokampus zu einer koordinierten Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit zu führen. Die Typ-II-Glukokortikoidrezeptoren, die ubiquitär im gesamten Gehirn vorhanden sind und über die die in der Geburtshilfe verwendeten synthetischen Glukokortikoide ausschließlich wirken, interagieren mit dem inhibitorisch wirksamen noradrenergen System und setzen die neuronale Erregbarkeit herab (JOELS und DE KLOET 1992, 1994).

#### Neurotoxische Glukokortikoideffekte

Cortisol ist essentiell für die normale Reifung des ZNS. Cortisolmangel aber auch hohe Cortisolgaben führten im sich entwickelnden Gehirn der Ratte zu einem Verlust an Granulazellen im Hippokampus (GOULD et al. 1991, UNO et al. 1994), der zum limbischen System gehört und für die Ausbildung von Emotionen und das Gedächtnis unabdingbar ist. Neurotoxische Effekte wurden im Hippokampus auch nach einer Dexamethasonbehandlung mit sehr hohen Dosen bei fetalen nichtmenschlichen Primaten (UNO et al. 1994) und in Form einer verminderten Neurogenese, Gliagenese und Myelinisierung im sich entwickelnden Ratten- und Schafgehirn nachgewiesen (DE KLOET et al. 1988, DUNLOP et al. 1997). Ein wesentlicher Schritt bei dem durch Glukokortikoide induzierten programmierten Zelltod im adulten Rattengehirn ist die Degeneration von Fortsätzen der Nervenzellen, der Dendriten, mit dem sie mit anderen Nervenzellen in Verbindung stehen (WOOLLEY et al. 1990). Die Dendritendegeneration ist wiederum von einem Verlust an Mikrotubulus-assoziierten Proteinen (MAP) begleitet (BYWOOD und JOHNSON 2000). Selbst wenn eine Glukokortikoidexposition keinen direkten neurotoxischen Effekt haben sollte, so führt sie zumindest zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber metabolischen oder toxischen Insulten (SAPOLSKY 1985). Glukokortikoide vermindern die lokale zerebrale Glukoseutilisation im adulten (DOYLE et al. 1994) und sich entwickelnden Gehirn (TUOR et al. 1997). Ursächlich könnte eine Hemmung des Glukosetransportes in die Neurone (HORNER et al. 1990) oder ein glukokortikoidbedingter erniedrigter Energiebedarf sein.

Es scheint, daß die neurotoxischen Glukokortikoideffekte wie die Effekte auf die Hirnfunktion vom aktivierten Rezeptortyp abhängen. Die Aktivierung von Typ-I-Rezeptoren hat wahrscheinlich neuroprotektive Effekte (HASSAN et al. 1996). Dagegen werden die neurotoxischen und Apoptose-induzierenden Effekte (HASSAN et al. 1996) wie auch die katabolen Effekte (HORNER et al. 1990) Typ-II-Rezeptor vermittelt. Weil die Sättigungsgrenze von Typ-I-Rezeptoren viel niedriger als die von Typ-II-Rezeptoren ist, führen niedrige Cortisolspiegel im Bereich der Sättigung der Typ-I-Rezeptoren zu neuroprotektiven Effekten. Höhere Cortisolspiegel, wie sie schon bei Streß auftreten, führen mit der verstärkten Aktivierung von Typ-II-Rezeptoren zu neurotoxischen Effekten (HASSAN et al. 1996). Damit erklärt sich auch das neurotoxische Potential von synthetischen Glukokortikoiden, wie das des in der Frühgeborenenmedizin eingesetzten Dexa- oder Betamethasons, mit ihrer hohen Typ-II-Rezeptorspezifität.

#### 4.2 Eigene Untersuchungen: Akute zerebrale Effekte einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie

##### Untersuchungsziele und -methoden

Ziel eines weiteren Teils meiner Studien war die Untersuchung der akuten kardio- und zerebrovaskulären sowie zerebralen Nebenwirkungen einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie in der Dosierung, wie sie klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung angewendet wird. Es sollte geklärt werden, ob die vorgeburtliche Glukokortikoidtherapie morphologische und funktionelle Störungen bewirkt, die u. a. zu den bei menschlichen Feten beobachteten akuten Verhaltensänderungen führen. Die Untersuchungen wurden am chronisch instrumentierten, nichtsedierten Schaffeten in einem Alter, das etwa der 32. SSW beim menschlichen Feten und damit einem Gestationsalter, in dem klinisch häufig Glukokortikoide angewendet werden, entspricht. Wir untersuchten das Typ-II-Rezeptor-spezifische Betamethason, da es neben Dexamethason zu den beiden vom amerikanischen NIH (*NIH* 1995, 2000) empfohlenen und auch in Deutschland klinisch genutzten, synthetischen Glukokortikoiden zur Routinemedikation von schwangeren Frauen bei drohender Frühgeburt vor der 32. SSW gehört. Es wurde entsprechend den NIH-Empfehlungen über 48 h gegeben, jedoch nicht dem Muttertier appliziert, sondern direkt in die fetale V. jugularis infundiert (10 µg/h), um mögliche Effekte einer unterschiedlichen Passage von Betamethason über die Schaf- und die humane Plazenta zu vermeiden. Die Infusionsrate wurde mit 10 µg/h so gewählt, daß sie zu einer fetalen Plasmakonzentration an Betamethason führte, die der in der humanen Nabelschnur 24 h nach einer mütterlichen Betamethasonbehandlung gemessenen Konzentration glich (DERKS et al. 1997). Spezifische Ziele waren die Untersuchung

- der Mechanismen, die zu der für die fetale Blutdrucksteigerung verantwortlichen Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes führen;
- ob die klinisch genutzte Glukokortikoiddosis parallel zur Erhöhung des peripheren Gefäßtonus auch eine Erhöhung des zerebralen Gefäßtonus und damit eine Senkung der Hirndurchblutung bewirkt;
- ob die klinisch genutzte Glukokortikoiddosis die Entwicklung und Funktion des fetalen Gehirns beeinflusst.

Im ersten Teil der Untersuchungen bestimmten wir mittels Myografie die Vasoreagibilität von isolierten Arteriolen aus dem Versorgungsgebiet der A. femoralis gegenüber den wichtigsten vasokonstriktorisch und vasodilatativ wirkenden Mediatoren, die für die Kontrolle des peripheren Gefäßtonus bedeutend sind. Außerdem untersuchten wir, ob Betamethason die Blutviskosität erhöht.

Im zweiten Teil der Untersuchungen haben wir die regionale Hirndurchblutung mit der Farbmikrosphärenmethode gemessen. Dazu wurden Polystyrenkügelchen von 15 µm im Durchmesser, die damit etwas größer als Erythrozyten sind, in den fetalen Kreislauf über einen Katheter in eine große Vene unmittelbar vor dem Herzen injiziert. Die Mikrosphären bleiben in den Kapillaren stecken. Da gleichzeitig zur Injektion Blut aus einer großen, unmittelbar nach dem Herzen gelegenen Arterie abgezogen wird, kann aus der Zahl der Mikrosphären in der Blutprobe und der Geschwindigkeit, mit der das Blut abgezogen wurde, sowie der Zahl der *post mortem* in den zu untersuchenden Gewebsregionen gefundenen Mikrosphären die Durchblutung in den zu untersuchenden Gewebsregionen über einen Dreisatz bestimmt werden.

Mit Hilfe des arteriellen Blutdruckes kann dann auch der Gefäßwiderstand in den jeweiligen Regionen nach dem Ohmschen Gesetz berechnet werden.

Zum Nachweis eines Glukokortikoideffektes auf die fetale Hirnfunktion quantifizierten wir im dritten Teil der Untersuchungen die Veränderungen des Frequenzspektrums des ECoG-Signals mittels Leistungsspektralanalyse und der nichtlinearen Schätzung des Punktvorhersagefehlers (siehe 3.2) während der Betamethasongabe. Effekte synthetischer Glukokortikoide auf die kortikale Hirnfunktion sind möglicherweise das Bindeglied zwischen der *in vitro* gefundenen Typ-II-Rezeptor-vermittelten Abnahme der neuronalen Erregbarkeit und den nach einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie klinisch beobachteten akuten fetalen Verhaltensänderungen. Da es unklar war, ob eine vorgeburtliche Glukokortikoidtherapie mit der klinisch genutzten Dosis die fetale Hirnentwicklung positiv im Sinne einer glukokortikoidbedingten Reifungsbeschleunigung, wie sie bei der Lungenfunktion auftritt, beeinflusst oder zu akuten neurotoxischen Effekten führt, sollten die Glukokortikoideffekte auf für die Funktion und Entwicklung des fetalen Gehirns wesentliche zelluläre und subzelluläre Hirnstrukturen untersucht werden. Zum Nachweis einer irreversiblen neuronalen Schädigung wurde die neuronale Nekrose mit Hämatoxylin-Eosin und die neuronale Apoptose mit der TUNEL-Färbung als Marker für eine DNA-Fragmentierung untersucht, da Glukokortikoide zu einer irreversiblen Zellschädigung führen und Apoptose induzieren können (HASSAN et al. 1996). Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP) und Synaptophysin wurden als subzelluläre Hirnstrukturen untersucht, da diese Marker für den Stand der zerebralen Reifung und wesentliche Indikatoren für die neuronale Funktion sind. Synaptophysin, welches als struktureller Bestandteil der präsynaptischen Vesikel zur Synaptogenese korreliert, ist ein Marker für die Dichte funktionsfähiger Synapsen. MAP's sind eine Familie von Zytoskelettproteinen, die in Zellen aller Vertebraten vorkommen.

Die Expression der verschiedenen MAP's ist stark zu bestimmten Phasen der Ontogenese assoziiert. Die »low-molecular-weight«-Isoformen MAP1B und MAP2c treten bei der Ratte mit Beginn der neuronalen Differenzierung auf und sind in der Fetalperiode für die Plastizität der neuronalen Fortsätze während der neuronalen Aussprossung von Bedeutung. Am Ende der Fetalperiode wird MAP2c im Rattengehirn durch das »high-molecular-weight« (HMW) MAP2a ersetzt. MAP2b als die zweite HMW-Isoform von MAP2 erscheint ähnlich wie MAP2c früh in der Embryonalentwicklung der Ratte, verschwindet aber im Gegensatz zu MAP2c nicht mit dem Ende der neuronalen Aussprossung. Die adulten Isoformen MAP2a und MAP2b sind für die Organisation und Integrität des neuronalen Zytoskeletts bedeutend, indem sie die Fortsätze der Nervenzellen stabilisieren und den intrazellulären Transport durch die Mikrotubuli regulieren. Die Schädigung von MAP's gilt als frühe intrazelluläre strukturelle Störung infolge einer neuronalen Schädigung verschiedenster Ursache wie z. B. durch neurotoxische Substanzen (BYWOOD und JOHNSON 2000), traumatische Ereignisse (FOLKERTS et al. 1998) oder ischämische Ereignisse im adulten (SCHWAB et al. 1998) und im sich entwickelnden Gehirn (OTA et al. 1997). Die Schädigung des Zytoskeletts ist ein wichtiger Schritt bei der Induktion von Nekrose und Apoptose.

#### Mechanismen, die zu der Erhöhung des peripheren Gefäßtonus führten

Die Betamethasoninfusion bewirkte eine Steigerung des mittleren arteriellen Blutdrucks von  $53 \pm 1$  auf  $66 \pm 3$  mmHg innerhalb von 6 h nach Beginn der Behandlung (SCHWAB et al. 2001a). Die myografischen Untersuchungen zeigten, daß die klinisch genutzte Glukokortikoiddosis zu einer erhöhten Sensitivität der Gefäße gegenüber depolarisierenden  $K^+$ -Ionen führte (ANWAR

et al. 1999). Weiterhin bewirkte die Betamethasonbehandlung eine verminderte Relaxation der Widerstandsgefäße gegenüber den Vasodilatoren Forskolin und Bradykinin. Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase, welche cAMP bildet, das wiederum ein bedeutender »second messenger« bei der Regulierung des Gefäßtonus ist. Bradykinin führt über die Aktivierung der Adenylatzyklase und das Prostaglandinsystem zu einer Vasodilatation. Damit scheint Betamethason über verschiedene endothel- und gefäßmuskulaturabhängige Mechanismen zu einer Steigerung des peripheren Gefäßwiderstandes zu führen.

Zu der arteriellen Blutdrucksteigerung trug außerdem eine Erhöhung der Blutviskosität und damit des Flußwiderstandes in der Mikrozirkulation aufgrund einer glukokortikoidinduzierten Erhöhung des Gesamtproteins sowie der Erythrozyten- und Leukozytenzahl bei (ANWAR et al. 1999).

#### Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Gefäßtonus

Parallel zum Anstieges des peripheren Gefäßwiderstandes führte die Betamethasonbehandlung innerhalb von 24 h zu einem Anstieg des zerebralen Gefäßwiderstandes, der mit einer Abnahme der fetalen Hirndurchblutung in allen Hirnregionen außer dem Hippokampus assoziiert war (SCHWAB et al. 2000a). Die Hirndurchblutungssenkung war mit 45–50% am stärksten in den subkortikalen Regionen (Striatum, Thalamus) und im Hirnstamm und mit 35–40% geringer im zerebralen Kortex ausgeprägt (Abb. 9). Die Abnahme der Hirndurchblutung resultierte in einer Verminderung des zerebralen O<sub>2</sub>-Angebotes um durchschnittlich 30–45%. 48 h nach Beginn der Betamethasonbehandlung war die Abnahme der Hirndurchblutung mit 25–30% wieder rückläufig. Der Anstieg des zerebralen Gefäßwiderstandes führte außerdem zu einer Einschränkung der zerebralen Vasodilatationskapazität gegenüber vasodilatorischen Reizen.

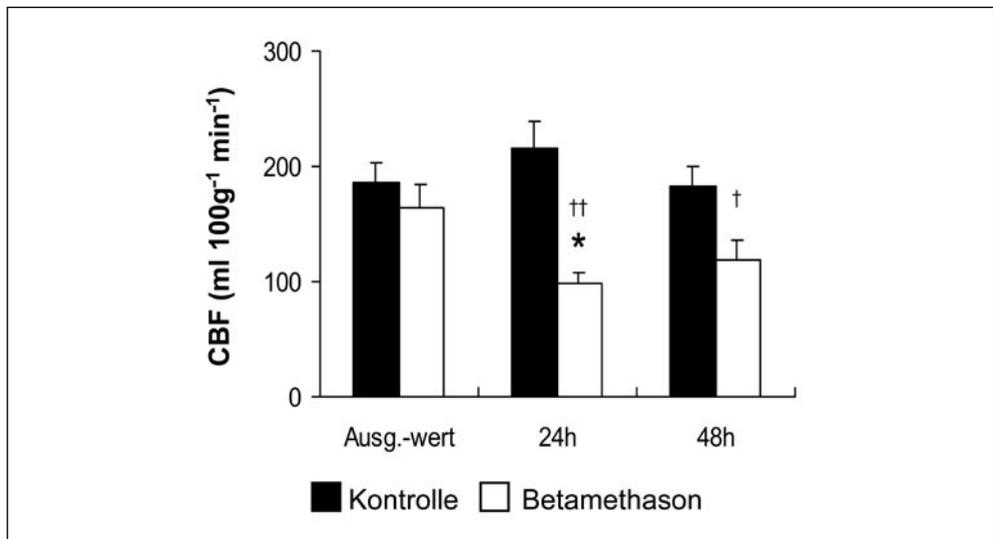


Abb. 9 Änderungen der regionalen Hirndurchblutung (CBF) während einer vorgeburtlichen Betamethasonbehandlung. Dargestellt ist die mittlere Hirndurchblutung vor, 24 h und 48 h nach Beginn der Kontroll- bzw. Betamethasonbehandlung.  $n = 8$  in beiden Gruppen; MW + SEM; \* $p < 0,05$  im Vergleich zu den Ausgangswerten; ††  $p < 0,01$ , †  $p < 0,05$  im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Für die Hirndurchblutungssenkung sind verschiedene Mechanismen denkbar. Die Erhöhung des zerebrovaskulären Gefäßwiderstandes läßt zunächst einen ähnlichen vasokonstriktorischen Effekt auf das zerebrale Gefäßbett wie bei den peripheren Widerstandsgefäßen vermuten. Die Untersuchung der Mechanismen, die zu der glukokortikoidbedingten zerebralen Vasokonstriktion führen, ist das Thema derzeit durchgeführter Studien. Erste Ergebnisse zeigen, daß hierbei eine Hemmung der Cyclooxygenase-2 und damit der Prostaglandinsynthese wahrscheinlich eine wesentliche Rolle spielt. Prostaglandine sind beim Feten im Gegensatz zum neugeborenen oder adulten Gehirn der wichtigste hormonelle Mediator bei der Regulierung des zerebrovaskulären Tonus. Darüber hinaus könnte die Hirndurchblutungssenkung genau wie die Veränderungen der elektrokortikalen Aktivität (siehe unten) sekundär aus einem direkten katabolen Effekt von Betamethason auf die Neurone resultieren, da die zerebrale Perfusion eng an den zerebralen Stoffwechselbedarf gekoppelt ist. So wurde an adulten Ratten gezeigt, daß Glukokortikoide die lokale zerebrale Glukoseutilisation senken (DOYLE et al. 1994) und umgekehrt eine Abnahme der endogenen Cortisolspiegel die zerebrale Glukoseutilisation steigert (KADEKARO et al. 1988).

Die zukünftige Untersuchung der Ursachen für die Hirndurchblutungssenkung ist bedeutend, da eine primäre Senkung der Hirndurchblutung zu einem Mißverhältnis von zerebralen Glukosebedarf und -angebot führt. Andererseits wäre eine sekundäre Senkung der Hirndurchblutung als Ausdruck eines verminderten Bedarfs (Kopplung Metabolismus-Durchblutung) eine physiologische adaptive Reaktion.

#### Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirnfunktion

Die Abnahme der Hirndurchblutung 24 h nach Beginn der Betamethasonbehandlung hatte weder im REM- noch im NREM-Schlaf einen Effekt auf die Verteilung der spektralen Leistung im fetalen ECoG (SCHWAB et al. 2001b). Sie ging jedoch mit einer Abnahme des Vorhersagefehlers und damit mit einer Zunahme der Kausalität des ECoG's im metabolisch aktiven REM-Schlaf einher (Abb. 10). Diese war nicht zu Veränderungen der Inzidenz und des Auftretens von REM- oder NREM-Schlaf assoziiert. Die ECoG-Veränderungen waren 48 h nach Behandlungsbeginn nicht mehr nachweisbar.

Der fehlende Nachweis von ECoG-Veränderungen mit der Leistungsspektralanalyse sowie das isolierte Auftreten der Veränderungen im REM-Schlaf weisen darauf hin, daß Betamethason komplexe kortikale neuronale Interaktionen beeinflusst. Die kortikale Aktivierung im REM-Schlaf erfordert einen Anstieg des zerebralen oxidativen Stoffwechsels und ist auch beim Feten zu einer Steigerung der Hirndurchblutung assoziiert (ABRAMS et al. 1990). Die gestörte Hirndurchblutung verhindert möglicherweise, daß die Neurone den Energiebedarf während der kortikalen Aktivierung im REM-Schlaf vollständig abdecken können. Der Hirnstamm, in dem die Hirndurchblutungssenkung am stärksten ausgeprägt war, spielt eine wesentliche Rolle bei der Generierung und Aufrechterhaltung des REM-Schlafes. Änderungen der Hirnstamm- oder kortikalen Aktivität sind wahrscheinlich auch für die bei menschlichen Feten unter einer vorgeburtlichen Glukokortikoidbehandlung gefundenen Änderungen des fetalen Verhaltens mitverantwortlich.

Andererseits kann die Zunahme der Vorhersagbarkeit des ECoG's auch aus einem direkten katabolen Effekt von Betamethason auf die Neurone resultieren. Wie am Beispiel der neonatalen Ratte gezeigt werden konnte, führt eine Glukokortikoidbehandlung auch beim sich entwickelnden Gehirn zu einer Senkung der lokalen zerebralen Glukoseutilisation (TUOR et al. 1997).

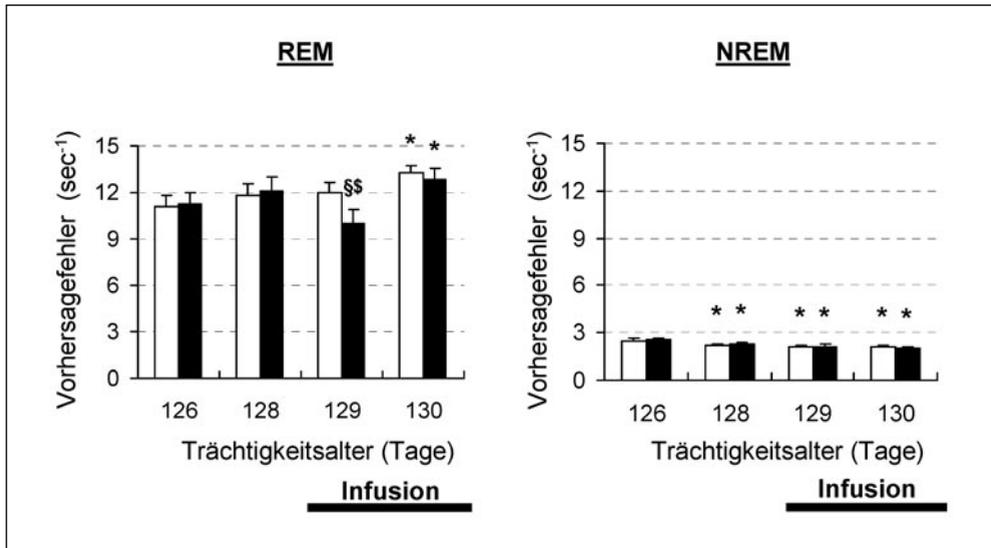


Abb. 10 Die spektrale Eckfrequenz als sensibler Parameter der Spektralanalyse sowie der nichtlineare Vorhersagefehler des ECoG's im REM und NREM-Schlaf vor und während der Infusion von 0,9% NaCl oder Betamethason über 48 h (schwarzer Balken). Deutlich ist der transiente Abfall des Vorhersagefehlers im REM-Schlaf unter der Betamethasonbehandlung zu erkennen. Kontrollgruppe: weiß,  $n = 7$ ; mit Betamethason behandelten Gruppe: schwarz,  $n = 6$ . MW + SEM; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zum 126. Trächtigkeitstag als Ausdruck der normalen Reifung des Gehirns; §  $p < 0,05$  im Vergleich zum Vortag; §  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe als Ausdruck eines Betamethasoneffektes.

Obwohl es nur sehr wenige Untersuchungen über Glukokortikoideffekte auf die Membraneigenschaften der Neurone außerhalb des Hippokampus gibt (CHEN et al. 1991), ist es wahrscheinlich, daß auch direkte rezeptorunabhängige Glukokortikoideffekte auf die Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran (SCHUMACHER 1990) oder auf die Aktivität von Transmittersystemen (JOELS und DE KLOET 1992, 1994) die Abnahme der Komplexität des ECoG's im REM-Schlaf bewirken. Die Normalisierung der elektrokortikalen Hirnaktivität 48 h nach dem Beginn der Betamethasonbehandlung könnte sowohl auf eine zunehmenden Sättigung der Glukokortikoidrezeptoren und ihre beginnende Desensibilisierung als auch auf den Wiederanstieg der Hirndurchblutung zurückgeführt werden.

#### Glukokortikoideffekte auf zelluläre und subzelluläre Hirnstrukturen

Mit Hilfe moderner immunhistochemischer Methoden konnten wir erstmals am fetalen Gehirn die für die zerebrale Synapto- und Morphogenese wichtigen Zytoskelettproteine MAP1B und die MAP2-Isoformen MAP2a, MAP2b und MAP2c sowie Synaptophysin nachweisen (SCHWAB et al. 2001a). Das primäre Auftreten der juvenilen Formen MAP1B und MAP2c (90,2% aller MAP2-Isoformen) im Stadium der Hirnentwicklung, das hier untersucht wurde, deutet daraufhin, daß die neuronale Aussprossung und Synaptogenese im fetalen Schafsgehirn zum Zeitpunkt 0,85 der Gestationsdauer noch nicht abgeschlossen ist, obwohl sich das Schafsgehirn hauptsächlich pränatal entwickelt. Im menschlichen Hippokampus werden die adulten Muster der neuronalen MAP2-Expression erst im 2. Lebensjahr erreicht (ARNOLD und TROJANOWSKI 1996).

Die Betamethasonbehandlung resultierte in einem Verlust der juvenilen MAP1B und MAP2c, aber nicht der MAP2a,b-Immunreaktivität in nahezu allen untersuchten Hirnregionen (SCHWAB et al. 2001a, Abb. 11). Lediglich für MAP1B war im Hippokampus keine signifikante Änderung der Immunreaktivität nachweisbar. Die neuronalen Fortsätze verloren jedoch ihre gute Demarkierung zugunsten einer diffusen Immunmarkierung des Neuropils (Abb. 12). Dies scheint ein wichtiger Schritt beim Verlust der MAP's zu sein, da die diffuse Immunmarkierung auch in den Hirnregionen auftrat, wo ein Verlust der Immunmarkierung von MAP1B und MAP2 nachweisbar war. Die genauen Mechanismen, die zu einem MAP-Verlust führen, sind nicht bekannt. Denkbar ist eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, der zu einem proteolytischen MAP-Abbau oder zumindest zu Änderungen des Phosphorylierungsstatus durch calciumaktivierte Proteasen wie Calpain führt (PETTIGREW et al. 1996). Änderungen des Phosphorylierungsstatus sind für die Regulierung der Funktion des neuronalen Zytoskeletts und der neuronalen Plastizität wichtig, begleiten synaptische Modifikationen und spielen eine kritische Rolle bei der kognitiven Verarbeitung und der Funktion des neuronalen Netzwerkes (SANCHEZ et al. 2000). In der Änderung des Phosphorylierungsstatus könnte ebenfalls eine Ursache für die Änderungen in der Komplexität des ECoG's liegen. Die genutzten Antikörper sind jedoch nicht auf die Erkennung des Phosphorylierungsstatus hin charakterisiert. Aus den Untersuchungen ist damit nicht abzuleiten, ob die Abnahme eine Änderung des Phosphorylierungsstatus, eine Zerstörung oder ein verminderte Expression bzw. Synthese der MAP's darstellt.

Bei den mit Betamethason behandelten Feten zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Immunreaktivität für Synaptophysin in allen untersuchten Hirnregionen (ANTONOW-SCHLORKE et al. 2001), die auf eine zumindest funktionelle Schädigung der präsynaptischen Afferenzen hindeutet (Abb. 11 und 12). Hierbei können Proteinkonformationsänderungen, eine Beeinflussung des Verhältnisses von Biosynthese und enzymatischem Abbau von Synaptophysin, eine Abnahme der Zahl der synaptischen Vesikel pro Synapse oder der strukturelle Verlust von präsynaptischen Terminals eine Rolle spielen.

Bei einem fehlenden Nachweis einer zu der Abnahme der MAP-Immunreaktivität assoziierten Dendritendegeneration oder einer irreversiblen neuronalen Schädigung ist der Verlust an MAP und Synaptophysin zunächst Ausdruck einer funktionellen Störung der Neurone. Die Störung des neuronalen Zytoskeletts und der Synapsenfunktion trägt möglicherweise wie die Hirndurchblutungssenkung zu der nachgewiesenen Abnahme der Komplexität der fetalen elektrokortikalen Aktivität bei. Ob es einen Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Funktionsstörungen und der Senkung der Hirndurchblutung wirklich gibt oder ob dies unabhängige Effekte sind und inwieweit die nachgewiesenen Funktionsstörungen transient sind, wird durch unsere Arbeitsgruppe derzeit untersucht. Es zeichnet sich dabei ab, daß zumindest der MAP-Verlust reversibel ist, was jedoch nicht Langzeiteffekte auf die Hirnfunktion ausschließt (siehe unten).

## 5. Klinische Bedeutung der Untersuchungen

Unter Anwendung der linearen und nichtlinearen ECoG-Analyseverfahren waren wir in der Lage, kortikale Aktivierungen und Deaktivierungen während vibroakustischer Stimulationen beim fetalen Schaf *in utero* in ihrem Zeitverlauf zu detektieren und die zentralnervöse Verarbeitung dieser Stimulationen nicht nur im NREM, sondern auch im REM-Schlaf nachzuweisen.

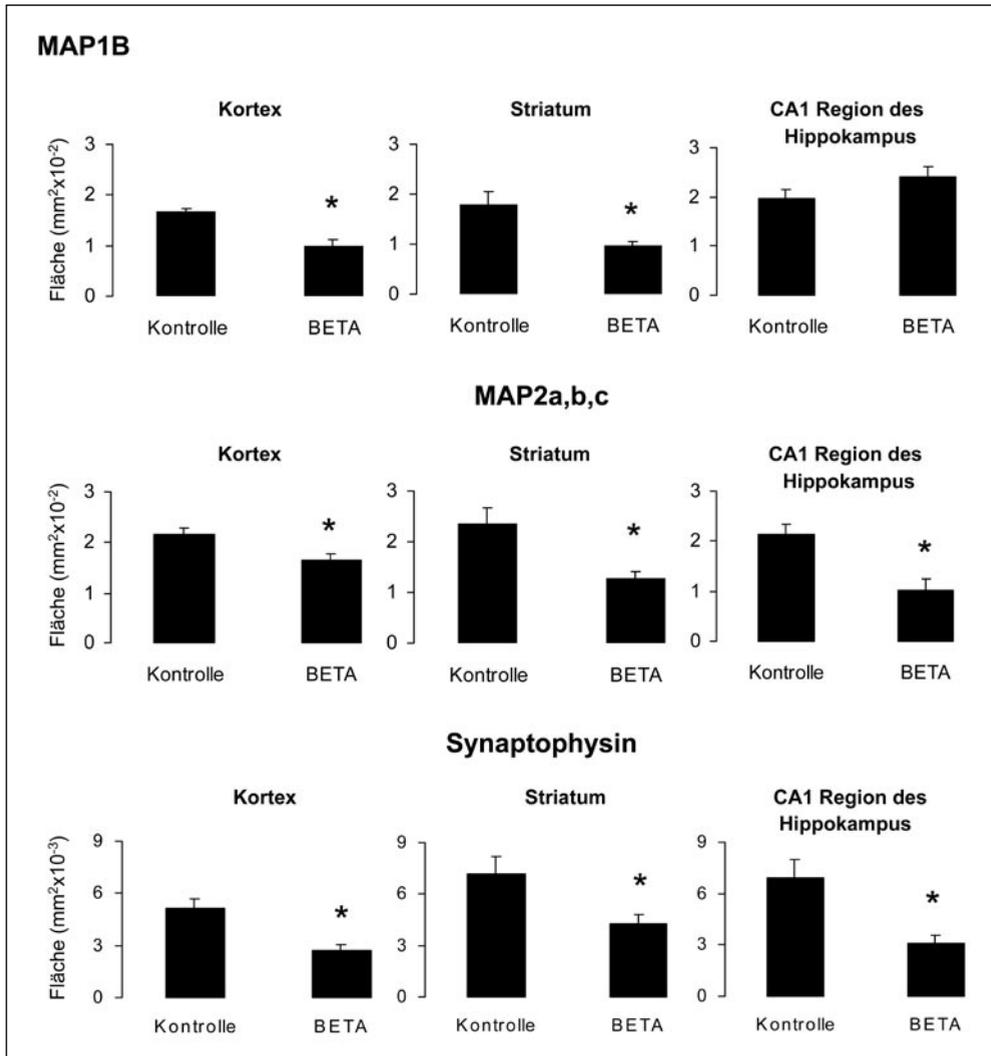


Abb. 11 Betamethasoneffekte (BETA) auf die MAP1B und MAP2a,b,c sowie Synaptophysin-Immunreaktivität im fetalen Gehirn. MW + SEM;  $n = 7$  in beiden Gruppen; \*  $p < 0,05$ .

So sind die Voraussetzungen für eine »bewußte« Wahrnehmung externer vibroakustischer Reize durch den Feten im letzten Drittel der Schwangerschaft gegeben.

Mit den vorgelegten Untersuchungen wurden zum ersten Male die Effekte von Glukokortikoiden auf die regionale Hirndurchblutung und die zerebrale Hirnfunktion beim Feten irgendeiner Spezies untersucht. Da wir eine durch Betamethason induzierte Störung der prä-synaptischen Terminals und des neuronalen Zytoskeletts auch bei fetalen nichtmenschlichen Primaten nachweisen konnten (ANTONOW-SCHLORKE et al. 2003), scheinen diese Veränderungen ein speziesübergreifendes Phänomen zu sein, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit auch im menschlichen Gehirn eine Rolle spielt. Die gestörte elektrokortikale Hirnaktivität ist wahr-

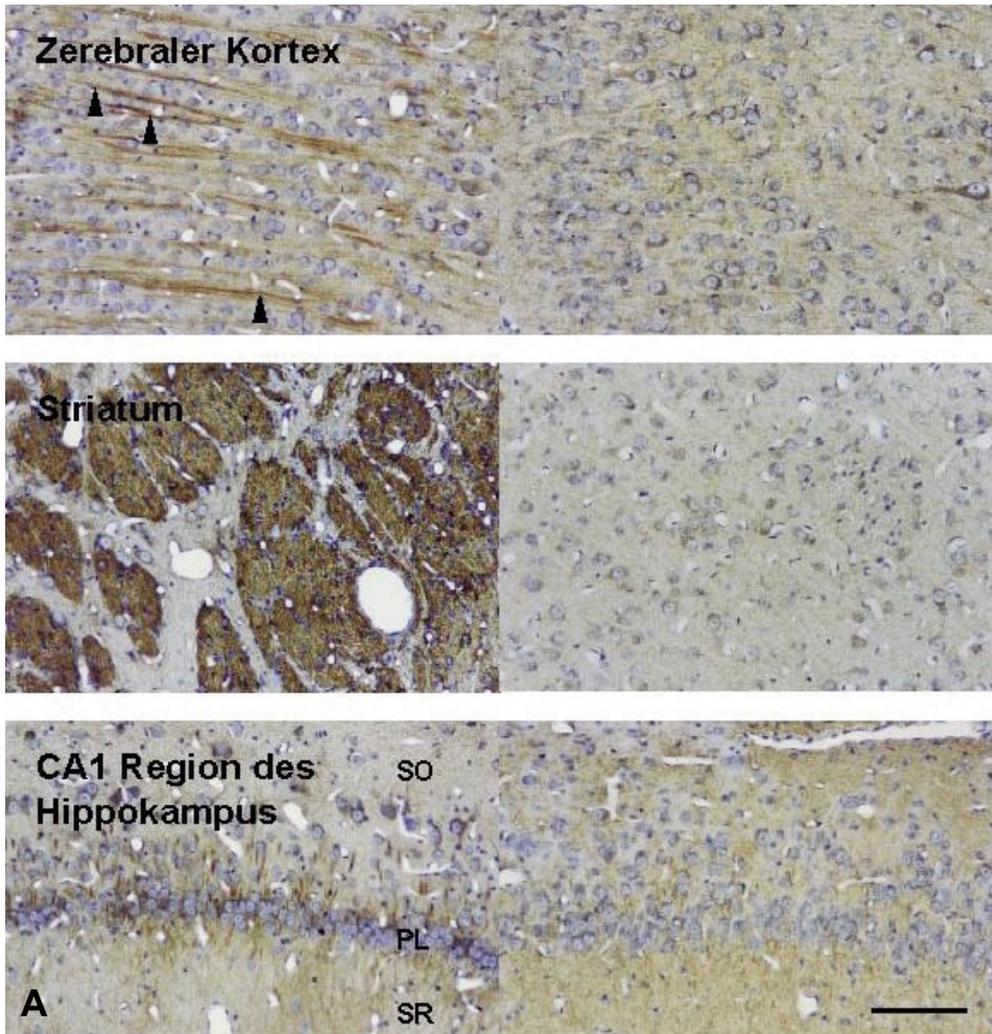
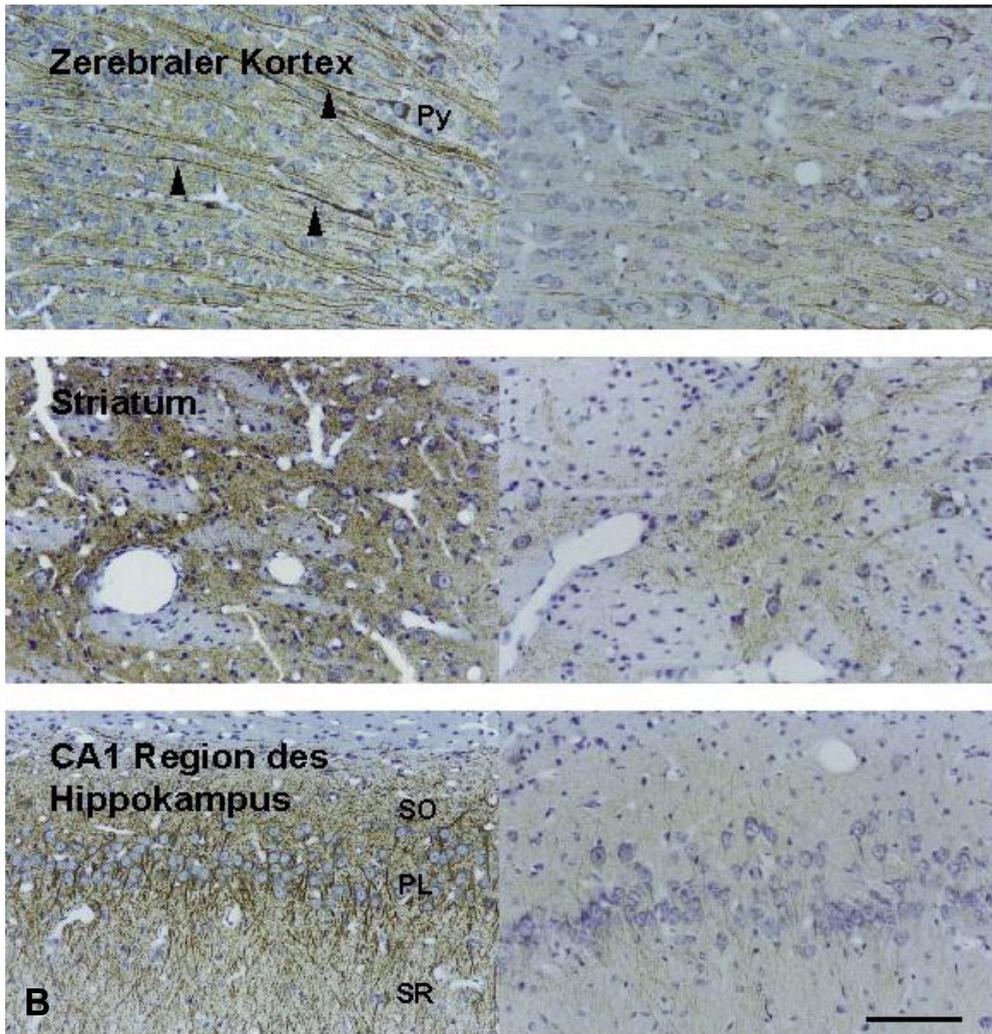


Abb. 12 (A) MAP1B-Immunmarkierung, (B) MAP2a,b,c-Immunmarkierung und (C) Synaptophysin-Immunmarkierung (braunes Präzipitat) des frontalen zerebralen Kortex (*oben*), Striatum (*Mitte*) und Hippokampus (*unten*). Der Kontrollfetus ist links, der mit Betamethason behandelte Fetus rechts. Eine MAP1B- und MAP2a,b,c-Immunreaktivität ist deutlich in den Zellkörpern und Fortsätzen der Neurone nachweisbar. In den mittleren kortikalen Schichten zeigen die apikalen Dendriten (Pfeilspitzen) ihre typische parallele Orientierung. Im Striatum werden die Neurone im Gegensatz zu den Faserbündeln der weißen Substanz durch die Antikörper markiert. In der CA1-Region des Hippokampus sind die Pyramidenzellschicht (PL), das Stratum radiatum (SR) und das Stratum oriens (SO) durch die Antikörper markiert. Der Verlust an MAP1B- (A) und MAP2a,b,c (B)-Immunreaktivität bei den mit Betamethason

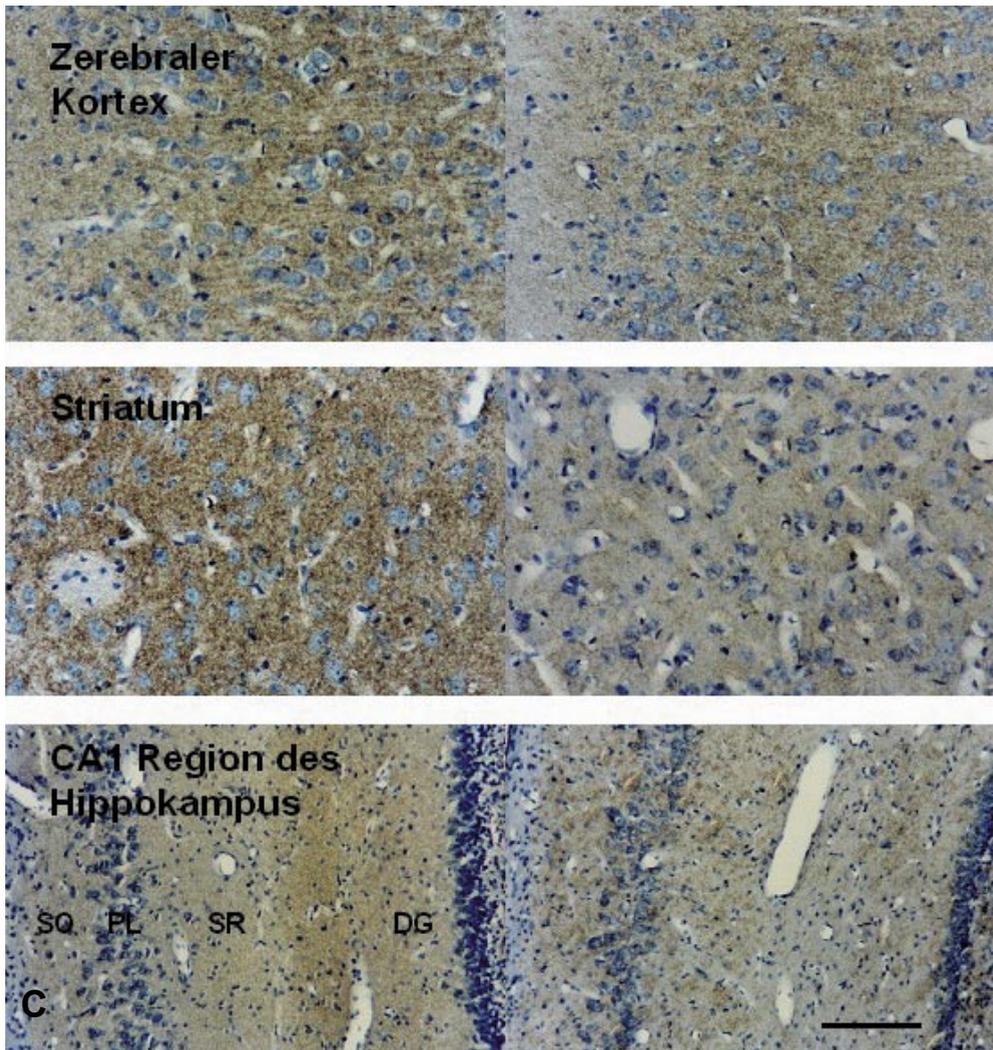
scheinlich genau wie die klinisch beobachtete akute Störung der fetalen Verhaltensstadien (MULDER et al. 1997) Ausdruck einer Störung der fetalen Hirnfunktion und damit Hinweis für eine generelle Beeinflussung des zerebralen Funktionszustandes.

Der Nachweis der zerebralen Nebeneffekte wirft eine ganze Reihe von Fragen auf. So ist an erster Stelle in chronischen Untersuchungen zu klären, inwieweit die nachgewiesenen



behandelten Feten ist deutlich sichtbar. Ein signifikanter Betamethasoneffekt auf die MAPIB-Immunreaktivität fehlt im Hippokampus. Es trat jedoch ein Verlust der scharfen Demarkierung der neuronalen Prozesse im Stratum radiatum (SR) und Stratum oriens (SO) auf. Die Synaptophysin-Immunreaktivität (C) repräsentiert Cluster von synaptischen Vesikeln, die lichtmikroskopisch als granuläres Muster erscheinen und die synaptischen Terminals darstellen. Bei den mit Betamethason behandelten Feten trat wiederum ein Verlust der Synaptophysin-Immunreaktivität in allen untersuchten Hirnregionen auf. Die Hämatoxylingegenfärbung der Perikarya (blau) zeigt keine irreversible neuronale Schädigung. Skalierungsbalken = 100 µm.

Akuteffekte einer vorgeburtlichen Glukokortikoidbehandlung eine Langzeitbedeutung haben. Die ausgeprägte Beeinflussung des zerebralen Funktionszustandes nach einer einmaligen Glukokortikoidtherapie legt den Verdacht nahe, daß eine im wöchentlichen Abstand wiederholte Glukokortikoidgabe, wie sie an manchen Kliniken bei fortbestehender Gefahr einer Frühgeburt üblich war, die nachgewiesenen zerebralen Effekte verstärkt. Tatsächlich führte die wiederholte



Fortsetzung Abb. 12

vorgeburtliche Glukokortikoidgabe beim fetalen Schaf zu einer verstärkten Reduktion des Geburts- und Gehirngewichtes (JOBE et al. 1998) sowie einer verzögerten Myelinisierung des N. opticus (DUNLOP et al. 1997). Obwohl ältere Langzeit-Follow-up-Studien bei Kindern bis 12 Jahren keine negativen Auswirkungen einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie auf das physische Wachstum und die psychomotorische und kognitive Entwicklung nachweisen konnten, zeigen neue retrospektive Untersuchungen, daß insbesondere die wiederholte Glukokortikoidgabe zu symmetrischen Wachstumsretardierungen zum Geburtszeitpunkt führt und möglicherweise mit langfristigen kognitiven und psychomotorischen Defiziten assoziiert ist (ESPLIN et al. 2000). Schon ein niedriges Geburtsgewicht, welches mit erhöhten Cortisolspiegeln einhergeht, scheint zu kognitiven und psychomotorischen Defiziten im Schulalter assoziiert

zu sein (HACK et al. 1992). Aufgrund der zunehmenden Kenntnis der Nebenwirkungen einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie, und da neuere Untersuchungen keinen zusätzlichen Effekt einer wiederholten Glukokortikoidgabe auf die Lungenfunktion zeigen konnten (BANKS et al. 1999), wurde 2001 eine neue Therapieempfehlung des NIH herausgegeben, die nur noch die einmalige Glukokortikoidgabe bei drohender Frühgeburt vorsieht.

Die Einschränkung der zerebralen Vasodilatationskapazität und die zu der Vasokonstriktion assoziierte Abnahme des O<sub>2</sub>-Angebotes lassen vermuten, daß vorgeburtlich verabreichte Glukokortikoide potentiell negative Effekte auf das Gehirn während einer intrauterinen perinatalen Asphyxie haben. Gerade Frühgeborene, die häufig einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie zur Förderung der Lungenreife unterzogen wurden, haben ein erhöhtes Risiko eine perinatale Asphyxie zu erleiden. Andererseits haben Glukokortikoide bei bisher ungeklärtem Mechanismus einen protektiven Effekt gegenüber einer hypoxisch-ischämischen Belastung bei neonatalen Ratten (TUOR 1997). Der erhöhte zerebrale Gefäßtonus erklärt möglicherweise auch den protektiven Glukokortikoideffekt gegenüber hypoxiebedingten intraventrikulären Blutungen (ELIMIAN et al. 1999), die nach einer posthypoxischen zerebralen Vasodilatation auftreten. Die Untersuchung von Glukokortikoideffekten auf eine perinatale Asphyxie erscheint mir sehr wichtig, da Kinder, die vom Risiko einer Frühgeburt bedroht sind, ein höheres Risiko haben, eine perinatale Hypoxie zu erleiden (VANNUCCI 1995).

Die nachgewiesenen zerebralen Effekte einer vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie unterstreichen die Notwendigkeit einer exakten Indikationsstellung zur vorgeburtlichen Glukokortikoidtherapie in jedem individuellen Fall. Es ist von immenser Bedeutung, die potentiell negativen Effekte gegen die lebensrettenden Effekte abzuwägen, insbesondere solange nicht weitere Untersuchungen zur Langzeitbedeutung der nachgewiesenen Effekte erfolgt sind.

### Dank

Ich möchte mich bei der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina für die großzügige Unterstützung und insbesondere bei Herrn Dr. RIEDEL für seine ständige Ansprechbarkeit bedanken. Experimentelle medizinische Forschungsprojekte sind ohne die Zusammenarbeit einer Vielzahl wissenschaftlicher Kollegen, technischer Assistenten und Doktoranden undenkbar. Ihre Namen werden in den dieser Übersicht zugrundeliegenden und zitierten Originalarbeiten ersichtlich.

### Literatur

- ABRAMS, R. M., HUTCHISON, A. A., and GERHARDT, K. J.: Effect of high-intensity sound on local cerebral glucose utilization in fetal sheep. *Dev. Brain Res.* 48, 1–10 (1989)
- ABRAMS, R. M., HUTCHISON, A. A., McTIERNAN, M. J., and MERWIN, G. E.: Effects of cochlear ablation on local cerebral glucose utilization in fetal sheep. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 157, 1438–1442 (1987)
- ABRAMS, R. M., POST, J. C., BURCHFIELD, D. J., GOMEZ, K. J., HUTCHISON, A. A., and CONLON, M.: Local cerebral blood flow is increased in rapid-eye-movement sleep in fetal sheep. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 162, 278–281 (1990)
- ABRAMS, R. M., SCHWAB, M., GERHARDT, K. J., BAUER, R., and ANTONELLI, P.: Caloric stimulation of the inner ear in fetal sheep. Effect on eye movements and electrocorticogram. *Int. J. Ped. Otorhinolaryngol.* 45, 59–68 (1998)
- ABRAMS, R. M., SCHWAB, M., GERHARDT, K. J., BAUER, R., and PETERS, A. J. M.: Vibroacoustic stimulation with a complex signal: Effect on behavioral state in fetal sheep. *Biol. Neonate* 70, 155–164 (1996)
- ANTONOW-SCHLORKE, I., KÜHN, B., MÜLLER, T., SCHUBERT, H., SLIWKA, U., NATHANIELSZ, P. W., and SCHWAB, M.: Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci. Lett.* 297, 147–150 (2001)
- ANTONOW-SCHLORKE, I., SCHWAB, M., LI, C., and NATHANIELSZ, P. W.: Supraphysiological glucocorticoid exposure alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J. Physiol. (Lond.)* 547, 117–123 (2003)

- ANWAR, M. A., SCHWAB, M., POSTON, L., and NATHANIELSZ, P. W.: Betamethasone mediated vascular dysfunction and changes in hematological profile in the ovine fetus. *Amer. J. Physiol.* *276*, H1137–1143 (1999)
- ARNOLD, S. E., and TROJANOWSKI, J. Q.: Human fetal hippocampal development, II. The neuronal cytoskeleton. *J. Comp. Neurol.* *367*, 293–307 (1996)
- BARKER, D. J. P.: *Mothers, Babies and Disease in Later Life*. London: BJM Publishing Group 1998
- BANKS, B. A., CNAAN, A., MORGAN, M. A., PARER, J. T., MERRILL, J. D., BALLARD, P. L., and BALLARD, R. A.: Multiple courses of antenatal corticosteroids and outcome of premature neonates. North American Thyrotropin-Releasing Hormone Study Group. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *181*, 709–717 (1999)
- BAUER, R., SCHWAB, M., ABRAMS, R. M., STEIN, J., and GERHARDT, K. J.: Electrocardiac and heart rate response during vibroacoustic stimulation in fetal sheep. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *177*, 66–71 (1997)
- BYWOOD, P. T., and JOHNSON, S. M.: Dendrite loss is a characteristic early indicator of toxin-induced neurodegeneration in rat midbrain slices. *Exp. Neurol.* *161*, 306–316 (2000)
- CABANAS, F., PELLICER, A., GARCIA-ALIX, A., QUERO, J., and STIRIS, T. A.: Effect of dexamethasone therapy on cerebral and ocular blood flow velocity in premature infants studied by colour Doppler flow imaging. *Eur. J. Pediatr.* *156*, 41–46 (1997)
- CHEN, Y. Z., HUA, S. Y., WANG, C. A., WU, L. G., GU, Q., and XING, B. R.: An electrophysiological study on the membrane receptor-mediated action of glucocorticoids in mammalian neurons. *Neuroendocrinology* *53* Suppl 1, 25–30 (1991)
- COHLEN, B. J., STIGTER, R. H., DERKS, J. B., MULDER, E. J., and VISSER, G. H.: Absence of significant hemodynamic changes in the fetus following maternal betamethasone administration. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* *8*, 252–255 (1996)
- DEMARINI, S., DOLLBERG, S., HOATH, S. B., HO, M., and DONOVAN, E. F.: Effects of antenatal corticosteroids on blood pressure in very low birth weight infants during the first 24 hours of life. *J. Perinatol.* *19*, 419–425 (1999)
- DERKS, J. B., GIUSSANI, D. A., JENKINS, S. L., WENTWORTH, R. A., VISSER, G. H., PADBURY, J. F., and NATHANIELSZ, P. W.: A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J. Physiol. (Lond.)* *499*, 217–226 (1997)
- DOBBS, J., and SANDS, J.: Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* *3*, 79–83 (1979)
- DODIC, M., MAY, C. N., WINTOUR, E. M., and COGLAN, J. P.: An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin. Sci.* *94*, 149–155 (1998)
- DOYLE, P., GUILLAUME-GENTIL, C., ROHNER-JEANRENAUD, F., and JEANRENAUD, B.: Effects of corticosterone administration on local cerebral glucose utilization of rats. *Brain Res.* *645*, 225–230 (1994)
- DUNLOP, S. A., ARCHER, M. A., QUINLIVAN, J. A., BEAZLEY, L. D., and NEWNHAM, J. P.: Repeated prenatal corticosteroids delay myelination in the ovine central nervous system. *J. Matern. Fetal Med.* *6*, 309–313 (1997)
- ELIMIAN, A., VERMA, U., CANTERINO, J., SHAH, J., VISINTAINER, P., and TEJANI, N.: Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet. Gynecol.* *93*, 174–179 (1999)
- ENDO, Y., NISHIMURA, J., and KIMURA, F.: Adrenalectomy increases local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Pflügers Arch.* *426*, 183–188 (1994)
- ESPLIN, M. S., FAUSETT, M. B., SMITH, S., OSHIRO, B. T., PORTER, T. F., BRANCH, D. W., and VARNER, M. W.: Multiple courses of antenatal steroids are associated with a delay in long-term psychomotor development in children with birth weights < 1,500 grams. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *182*, 24 (2000)
- FELL, J., RÖSCHKE, J., and BECKMANN, P.: Deterministic chaos and the first positive Lyapunov exponent, a nonlinear analysis of the human electroencephalogram during sleep. *Biol. Cybern.* *69*, 139–146 (1993)
- FIFER, W., and MOON, C.: The effects of fetal experience with sound. In: LECANUET, J., FIFER, W., KRASNEGOR, N., and SMOTHERMAN, W. (Eds.): *Teal Development, A Psychobiological Perspective*; pp. 351–368. New York, Lawrence Erlbaum Associates 1995
- FOLKERTS, M. M., BERMAN, R. F., MUIZELAAR, J. P., and RAFOLS, J. A.: Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* *15*, 349–363 (1998)
- FOURMONT, A., HIRSCH, J. C., and MARC, M. E.: Reticular control of thalamic transmission during behavioral states, a study in dorsal lateral geniculate nucleus relay neurons of the cat. *Exp. Neurol.* *100*, 305–321 (1988)
- GARDNER, D. S., JACKSON, A. A., LANGLEY, and EVANS, S. C.: Maintenance of maternal diet-induced hypertension in the rat is dependent on glucocorticoids. *Hypertension* *30*, 1525–1530 (1997)
- GERHARDT, K. J., and ABRAMS, R. M.: Fetal hearing, characterization of the stimulus and response. *Semin. Perinatol.* *20*, 11–20 (1996)
- GERHARDT, K. J., ABRAMS, R. M., and OLIVER, C. C.: Sound environment of the fetal sheep. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *162*, 282–287 (1990)
- GOULD, E., WOOLLEY, C. S., and MCEWEN, B. S.: Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J. Comp. Neurol.* *313*, 479–485 (1991)
- GUYTON, A. C.: *Basic Neuroscience*. Philadelphia: Saunders 1987

- HACK, M., BRESLAU, N., ARAM, D., WEISSMAN, B., KLEIN, N., and BORAWSKI-CLARK, E.: The effect of very low birth weight and social risk on neurocognitive abilities at school age. *J. Dev. Behav. Pediatr.* *13*, 412–420 (1992)
- HAENSCHEL, C., BALDEWEG, T., CROFT, R. J., WHITTINGTON, M., and GRUZELIER, J.: Gamma and beta frequency oscillations in response to novel auditory stimuli. A comparison of human electroencephalogram (EEG) data with in vitro models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 7645–7650 (2000)
- HALASZ, P.: Arousals without awakening—dynamic aspect of sleep. *Physiol. Behav.* *54*, 795–802 (1993)
- HASSAN, A. H., ROSENSTIEL, P. VON, PATCHEV, V. K., HOLSBOER, F., and ALMEIDA, O. F.: Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp. Neurol.* *140*, 43–52 (1996)
- HORNER, H. C., PACKAN, D. R., and SAPOLSKY, R. M.: Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* *52*, 57–64 (1990)
- JOBÉ, A. H., WADA, N., BERRY, L. M., IKEGAMI, M., and ERVIN, M. G.: Single and repetitive maternal glucocorticoid exposures reduce fetal growth in sheep. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *178*, 880–885 (1998)
- JOELS, M., and DE KLOET, E. R.: Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci.* *15*, 25–30 (1992)
- JOELS, M., and DE KLOET, E. R.: Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Progr. Neurobiol.* *43*, 1–36 (1994)
- KADEKARO, M., ITO, M., and GROSS, P. M.: Local cerebral glucose utilization is increased in acutely adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* *47*, 329–334 (1988)
- KARST, H., WADMAN, W. J., and JOELS, M.: Long-term control by corticosteroids of the inward rectifier in rat CA1 pyramidal neurons, in vitro. *Brain Res.* *612*, 172–179 (1993)
- KLOET, E. R. DE, ROSENFELD, P., VAN EEKELLEN, J. A., SUTANTO, W., and LEVINE, S.: Stress, glucocorticoids and development. *Progr. Brain Res.* *73*, 101–120 (1988)
- KOENEN, S. V., MECENAS, C. A., SMITH, G. S., JENKINS, S., and NATHANIELSZ, P. W.: Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *186*, 812–817 (2002)
- LANGHORST, P., STROH-WERZ, M., DITTMAR, K., and CAMERER, H.: Facultative coupling of reticular neuronal activity with peripheral cardiovascular and central cortical rhythms. *Brain Res.* *87*, 407–418 (1975)
- LECANUET, J.-P., GRANIER-DEFERRE, C., and JAQUET, A.-Y.: Decelerative cardiac responsiveness to acoustical stimulation in the near term fetus. *Q. J. Exp. Psychol.* *44B*, 279–301 (1992)
- LIGGINS, G. C., and HOWIE, R. N.: A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* *50*, 515–525 (1972)
- LUPIEN, S. J., and McEWEN, B. S.: The acute effects of corticosteroids on cognition, integration of animal and human model studies. *Brain Res. Rev.* *24*, 1–27 (1997)
- MOLNAR, M., and SKINNER, J. E.: Correlation dimension changes of the EEG during the wakefulness-sleep cycle. *Acta. Biochim. Biophys. Hung.* *26*, 121–125 (1991)
- MORUZZI, G.: The physiological properties of the brain stem reticular system. In: ADRIAN E. D., BREMER F., and JASPER, H. H. (Eds.): *Brain Mechanisms and Consciousness*; pp. 21–48. Oxford: Blackwell 1954
- MULDER, E. J., DERKS, J. B., and VISSER, G. H.: Antenatal corticosteroid therapy and fetal behaviour, a randomised study of the effects of betamethasone and dexamethasone. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *104*, 1239–1247 (1997)
- NIH Consensus Statement*: Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *173*, 246–252 (1995)
- NIH Consensus Statement*: Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. *17*, 1–18 (2000)
- OHLSOON, A., BOTTU, J., GOVAN, J., RYAN, M. L., MYHR, T., and FONG, K.: The effect of dexamethasone on time averaged mean velocity in the middle cerebral artery in very low birth weight infants. *Eur. J. Pediatr.* *153*, 363–366
- OTA, A., IKEDA, T., IKENOUE, T., and TOSHIMORI, K.: Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *177*, 519–526 (1997)
- PALUS, M.: Nonlinearity in normal human EEG, cycles, temporal asymmetry, nonstationarity and randomness, not chaos. *Biol. Cybern.* *75*, 389–396 (1996)
- PARKES, M. J., MOORE, P. J., MOORE, D. R., FISK, N. M., and HANSON, M. A.: Behavioral changes in fetal sheep caused by vibroacoustic stimulation, the effects of cochlear ablation. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *164*, 1336–1343 (1991)
- PETERS, A. J. M., ABRAMS, R. M., and GERHARDT, K. J.: Abdominal vibration alters sleep state in fetal sheep. *J. Dev. Physiol.* *19*, 227–234 (1993)
- PETTIGREW, L. C., HOLTZ, M. L., CRADDOCK, S. D., MINGER, S. L., HALL, N., and GEDDES, J. W.: Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *16*, 1189–1202 (1996)
- RICHARDS, D. S., FRENTZEN, B., GERHARDT, K. J., McCANN, M. E., and ABRAMS, R. M.: Sound levels in the human uterus. *Obstet. Gynecol.* *80*, 186–190 (1992)

- SANCHEZ, C., DIAZ-NIDO, J., and AVILA, J.: Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progr. Neurobiol.* 61, 133–168 (2000)
- SAPOLSKY, R. M.: A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus, increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J. Neurosci.* 5, 1228–1232 (1985)
- SARUTA, T.: Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens. Res.* 19, 1–8 (1996)
- SCHMIDT, K., EISELT, M., SCHWAB, M., BAUER, R., ZWIENER, U., and HOYER, D.: The quality of the point prediction error to quantify and classify state changes. In: SCHACK B., WITTE H., and ZWIENER U. (Eds.): *Quantitative and Topological EEG and MEG Analysis II*; pp. 263–266. Jena: Universitätsverlag Druckhaus Mayer GmbH 1997
- SCHMIDT, K., SCHWAB, M., ABRAMS, R. M., and WITTE, H.: Nonlinear analysis of the fetal ECoG, predictability and bispectral measures. *Theor. Biosci.* 118, 219–230 (1999)
- SCHUMACHER, M.: Rapid membrane effects of steroid hormones, an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13, 359–362 (1990)
- SCHWAB, M., ANTONOW-SCHLORKE, I., KÜHN, B., MÜLLER, T., SCHUBERT, H., WALTER, B., SLIWKA, U., and NATHANIELSZ, P. W.: Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J. Physiol. (Lond.)* 530, 497–506 (2001a)
- SCHWAB, M., ANTONOW-SCHLORKE, I., ZWIENER, U., and BAUER, R.: Brain derived peptides reduce the size of cerebral infarction and loss of MAP2 after focal ischemia in rats. *J. Neural. Transmiss. Suppl.* 53, 299–311 (1998)
- SCHWAB, M., RÖDEL, M., ANWAR, M., A., BUCHWALDER, L.F., MÜLLER, T., SCHUBERT, H., WALTER, B., and NATHANIELSZ, P. W.: Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J. Physiol. (Lond.)* 528, 619–632 (2000a)
- SCHWAB, M., RÖDEL, M., SCHMIDT, K., MÜLLER, T., SCHUBERT, H., ANWAR, M., A., and NATHANIELSZ, P. W.: Nonlinear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *J. Physiol. (Lond.)* 531, 535–543 (2001b)
- SCHWAB, M., SCHMIDT, K., WITTE, H., and ABRAMS, R. M.: Investigation of nonlinear ECoG changes during spontaneous sleep state changes and cortical arousal in fetal sheep. *Cereb. Cortex* 10, 142–148 (2000b)
- SOJA, P. J., OKA, J. I., and FRAGOSO, M.: Synaptic transmission through cat lumbar ascending sensory pathways is suppressed during active sleep. *J. Neurophysiol.* 70, 1708–1712 (1993)
- THEILER, J., and RAPP, P. E.: Re-examination of the evidence for low-dimensional, nonlinear structure in the human electroencephalogram. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 98, 213–222 (1996)
- TUOR, U. I.: Glucocorticoids and the prevention of hypoxic-ischemic brain damage. *Neuroscience Biobehav. Rev.* 21, 175–179 (1997)
- TUOR, U. I., YAGER, J. Y., BASCARAMURTY, S., and DELBIGIO, M. R.: Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J. Neurochem.* 69, 1954–1963 (1997)
- UNO, H., EISELE, S., SAKAI, A., SHELTON, S., BAKER, E., DEJESUS, O., and HOLDEN, J.: Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm. Behav.* 28, 336–348 (1994)
- VANNUCCI, R. C.: Perinatal hypoxic/ischemic encephalopathy. *Neurologist* 1, 35–52 (1995)
- VISSER, G. H., MULDER, H. H., WIT, H. P., MULDER, E. J., and PRECHTL, H. F.: Vibro-acoustic stimulation of the human fetus, effect on behavioural state organization. *Early Hum. Dev.* 19, 285–296 (1989)
- WEINSTOCK, M.: Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Progr. Neurobiol.* 65, 427–451 (2001)
- WOOLLEY, C. S., GOULD, E., and McEWEN, B. S.: Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 531, 225–231 (1990)

PD Dr. med. habil. Matthias SCHWAB  
Klinik für Neurologie  
Friedrich-Schiller-Universität  
Erlanger Allee 101  
07743 Jena  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 3641 9323486  
Fax: +49 3641 9323402  
E-Mail: matthias.schwab@meduni-jena.de

# **Neurowissenschaften**

---

Dr. rer. nat. Karsten MÜLLER

Geboren 1969 in Leipzig. 1987 bis 1992 Mathematikstudium an der Universität Leipzig mit anschließendem Forschungsstudium als Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung. Promotion 1996 zum Dr. rer. nat. über Parametrisierung bestimmter Teilklassen meromorpher Matrixfunktionen. Auszeichnung 1996 mit dem Leopoldina-Förderpreis. Zwölfmonatiger Aufenthalt am Department of Computer Science der Universität Leuven. Ab Frühjahr 1997 zweijähriges Forschungsstudium an der Technischen Universität Chemnitz als Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Seit 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Kognitions- und Neurowissenschaften in Leipzig.

## Zur Anwendung multivariater Spektralanalyse in der funktionellen Magnetresonanztomographie

Karsten MÜLLER (Leipzig)

Mit 4 Abbildungen und 2 Tabellen

### *Zusammenfassung*

Das Ziel dieser Studie ist die Anwendung von Methoden aus der Spektraltheorie auf Zeitserien der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT). Hierbei wird die funktionelle Verbindung zwischen verschiedenen Strukturen des menschlichen Gehirns sowie die zeitliche Folge der beteiligten Areale untersucht.

Verschiedene Arbeiten zeigen, daß spektrale Methoden zur Erforschung des sogenannten BOLD-Signals geeignet sind (MARCHINI und RIPLEY 2000, MÜLLER et al. 2001). BOLD steht hierbei für *Blood Oxygenation-Level Dependent*. Im Gegensatz zu Korrelationsmethoden im Zeitbereich liefern spektrale Methoden Maße, welche unabhängig von der Phase sind. Aus der Spektraldichtematrix kann zum Beispiel die Stichprobenkohärenz von Zeitreihen geschätzt werden. Diese Kohärenz liefert ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs von Zeitreihen. Darüber hinaus kann der Phasenversatz separat angegeben werden. Die hierdurch entstehenden Kohärenz- und Phasenkarten geben Hinweise darauf, welche Hirnareale zum selben vaskulären Netzwerk gehören und zeigen überdies das zeitliche Verhalten der entsprechenden BOLD-Antwort.

Diese Arbeit diskutiert die Ergebnisse der Spektralanalyse von fMRT-Daten, wobei insbesondere Daten mit unterschiedlich langer visueller Stimulation verglichen werden. Da die Ursachen für das unterschiedliche zeitliche Verhalten der BOLD-Antwort in unterschiedlichen Hirnarealen noch weitgehend unbekannt sind, wurde die Beziehung zwischen Signalstärke und Phasenversatz untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß die Höhe der Signalamplitude von der Phase abhängt. Der Grad dieser Abhängigkeit wird zudem durch die Länge des Stimulus' beeinflusst.

### *Abstract*

The aim of the study is to apply spectral methods to functional magnetic resonance imaging (fMRI) data to reveal network structures and their temporal dynamics in the human brain.

Several studies show that spectral methods are appropriate for investigating the temporal behavior of the BOLD signal (MARCHINI and RIPLEY 2000, MÜLLER et al. 2001). BOLD stands for *Blood Oxygenation-Level Dependent*. In contrast to correlation methods in the temporal domain, spectral methods provide measures that are independent of the phase. Using the spectral density matrix, the sample coherence of time series can be estimated. The coherence provides a measure of the degree of linear association of time series. Moreover, the phase shift can be computed separately. The resulting maps of coherence and phase give detailed information on brain regions that belong to a structure with a similar vascular network and show the temporal behavior of the BOLD response function.

The paper discusses the results of the method comparing data using different lengths of visual hemifield stimulation. Because the reason for the different temporal behaviour of the BOLD response in different brain regions is still unknown, the relation between phase shifts and signal amplitudes was studied. It could be revealed that the height of the signal change depends on the phase shift influenced by the length of the stimulation.

## 1. Einleitung

Bei der Erforschung des menschlichen Gehirns spielen bildgebende Verfahren eine entscheidende Rolle. Hierbei liefert die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT) ein nichtinvasives Verfahren mit einer guten räumlichen und zeitlichen Auflösung des Signals. Dieses Signal

wird auch als BOLD (*Blood Oxygenation-Level Dependent*)-Signal bezeichnet. Moderne Verfahren der fMRT ermöglichen es, in dichter Folge eine große Anzahl von Bildern aufzunehmen, welche den sogenannten BOLD-Kontrast, d. h. das Verhältnis zwischen oxxygeniertem und deoxygeniertem Blut darstellen. Die Zeit zwischen zwei Aufnahmen heißt Repetitionszeit und ist während des gesamten Experiments konstant. Üblich sind Werte zwischen 0,6 und 4 s. Bei einer häufig verwendeten Repetitionszeit von 2 s und einer mittleren Experimentdauer von 30 min erhält man also 900 Bilder.

Die Auflösung der gewonnenen Aufnahmen bestimmt die Zahl der betrachteten Meßpunkte. Bei einer räumlichen Auflösung von  $64 \times 64$  Bildpunkten/Schicht und 3 Schichten würde man 12288 Meßpunkte betrachten. Für jeden solchen Meßpunkt entsteht durch die ständig wiederholte Aufnahme des BOLD-Kontrasts eine Zeitreihe. Die Gesamtlänge der Zeitreihen ist durch die Länge des Experiments, d. h. durch die Zahl aller Aufnahmen, bestimmt. Neben den vielen funktionellen Bildern wird oft in gleicher Orientierung zusätzlich ein anatomisches Bild gewonnen. Hierdurch ist es möglich, die erzeugten Zeitreihen anatomischen Strukturen zuzuordnen. Eine Hirnregion wird dann als aktiviert angesehen, wenn die zugeordnete Zeitreihe mit einer Referenzzeitreihe korreliert. Eine solche Referenzzeitreihe kann entweder eine bestimmte Zeitreihe der gewonnenen Daten oder eine hypothesengerecht erzeugte Modellierung sein.

In den ersten fMRT-Experimenten wurde die Lokalisation von Hirnorten bei einem bestimmten Stimulationsparadigma betrachtet. Bei neueren Studien versucht man hingegen, die aktivierten Hirnorte als Teil funktioneller Netzwerkstrukturen zu erkennen und die Beziehung verschiedener Komponenten solcher Netzwerke zu untersuchen. Derartige funktionelle Netzwerke können durch die Korrelationsstruktur von Zeitreihen beschrieben werden. Hierfür lieferten FRISTON (1994) sowie WORSLEY und FRISTON (1995) ein statistisches Modell, welches insbesondere die Autokorrelation innerhalb der Zeitreihen berücksichtigt. In diesem Zusammenhang wurde auch der Begriff der funktionellen Konnektivität geprägt, um Beziehungen zwischen verschiedenen Hirnregionen zu beschreiben (FRISTON et al. 1995).

Ein gravierender Nachteil dieser klassischen Korrelationsmethoden bleibt aber die Phasenabhängigkeit des gelieferten Korrelationsmaßes. Man kann sich hierbei leicht zwei sinusartige Zeitreihen vorstellen, welche lediglich eine geringe Korrelation zeigen, obwohl sie fast identisch sind. Der Grund liegt dann im Zeitversatz zwischen den Zeitreihen. Ein anschauliches Beispiel ist die Betrachtung zweier identischer Sinuskurven, welche gegenseitig um eine halbe Periode verschoben sind. Die Korrelation zwischen den beiden Zeitreihen ist hierdurch 0. Bei der Untersuchung von Netzwerkstrukturen im Gehirn würde man sich deshalb ein Maß wünschen, welches unabhängig vom Phasenversatz bei gleichartigen Zeitserien einen hohen Wert liefert. Die gewöhnliche Korrelation liefert kein geeignetes Maß zur Beschreibung von Netzwerkstrukturen im menschlichen Gehirn, wenn man davon ausgeht, daß Hirnareale ein Netzwerk bilden, dessen Zeitserien trotz eventueller zeitlicher Verschiebungen eine ähnliche Form besitzen.

Die Spektraltheorie für stationäre stochastische Prozesse (PRIESTLEY 1981) liefert hingegen ein phasenunabhängiges Maß über den Grad des linearen Zusammenhangs von Zeitreihen. Dieses Maß wird Kohärenz genannt. Grob gesprochen kann die Kohärenz als Korrelation im Frequenzbereich aufgefaßt werden. Bei der Untersuchung des BOLD-Signals werden paarweise Kohärenzkoeffizienten bestimmt. Unter Verwendung eines Schwellwertes kann man dann die erhaltenen Ergebnisse als Teile eines funktionellen Netzwerks interpretieren (MÜLLER et al. 2001). Ein weiterer Vorteil der Spektralanalyse besteht darin, daß die Phase separat berechnet werden kann. Für Hirnareale mit einer hohen Kohärenz ist es sinnvoll, Phasenverschiebungen

anzugeben und zu interpretieren. Wenn man die Phase zusätzlich durch die betrachtete Frequenz teilt, erhält man die durchschnittliche Verschiebung zwischen den betrachteten Zeitreihen in Sekunden. Mit diesem Maß kann man also die zeitliche Verschiebung des BOLD-Signals zwischen Hirnregionen betrachten.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Diskussionen über die zeitliche Verschiebung des BOLD-Signals zwischen verschiedenen Hirnarealen. MIZIEN et al. (2000) untersuchten Zeitverläufe innerhalb eines Probanden und erhielten nur eine ungenaue zeitliche Relation zwischen verschiedenen Arealen. Als Grund hierfür vermuteten MIZIEN et al. die unterschiedliche Gefäßarchitektur in den verschiedenen Hirnarealen. Das beobachtete BOLD-Signal hängt nämlich in starkem Maße vom Durchmesser benachbarter Venen ab (LEE et al. 1995). Starke Phasenverschiebungen des BOLD-Signals könnten also wesentlich durch größere Venen bedingt sein. Dagegen sprechen jedoch Studien von ROSEN et al. (1998) und BUCKNER et al. (1998). Hierbei zeigten sich die größten zeitlichen Verschiebungen in Regionen mit kleinkalibrigen Gefäßen. Dies deutet darauf hin, daß zusätzliche Faktoren an der Verzögerung des BOLD-Signals beteiligt sein müssen. Um das zeitliche Verhalten der BOLD-Antwort genauer verstehen zu können, müssen vor allem die Abhängigkeit dieser Faktoren von anderen physiologischen Parametern untersucht werden.

Eine wichtige Frage ist hierbei der Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Verhalten und der Amplitude des Signals. Man könnte zum Beispiel annehmen, daß Areale mit den stärksten Amplituden das Signal zuerst zeigen, d. h. eine minimale Phase besitzen. Die Ergebnisse unserer Analysen zeigen jedoch einen umgekehrten Zusammenhang. Areale mit einer großen Signalamplitude zeigen eine späte BOLD-Antwort. Je größer die Signaländerung, desto größer der Phasenversatz. Der Zusammenhang zwischen Phase und Signalstärke hängt aber auch davon ab, wie lange die Stimulation des Probanden erfolgte. Hierbei geben die vorliegenden Daten einen Hinweis darauf, daß der Zusammenhang zwischen Phase und Signalstärke mit der Dauer der Stimulation abnimmt.

Für die Untersuchung der Beziehung von Phase und Signalstärke wurden fMRT-Experimente mit unterschiedlicher Stimulationsdauer durchgeführt. Für die erhaltenen Zeitreihen wurde die Spektraldichtematrix geschätzt und hieraus Kohärenz und Phase berechnet. Kapitel 2 gibt eine kurze Einführung in die Spektraltheorie schwach stationärer Prozesse. Die konkrete Durchführung der Experimente sowie die Auswertung der Daten ist im Kapitel 3 beschrieben. In Kapitel 4 wird ein Überblick über die wichtigsten Resultate gegeben.

## 2. Mathematische Grundlagen

Das folgende Kapitel gibt eine kurze Einführung in die Spektraltheorie für schwach stationäre Prozesse. Eine ausführliche Darstellung dieses Gegenstandes ist in den Monographien von HANNAN (1970) und PRIESTLEY (1981) zu finden.

### 2.1 Zur Spektraltheorie stationärer Prozesse

Die Theorie schwach stationärer Prozesse entstand in den vierziger Jahren durch eine Mehrzahl vorhersagetheoretischer Fragestellungen (KOLMOGOROV 1941). Es zeigte sich hierbei, daß für die Untersuchung einer Vielzahl von Phänomenen lediglich die Kovarianzstruktur von Bedeutung ist. Im weiteren bezeichne  $N$  die Menge der natürlichen Zahlen. Es sei  $n \in N$

sowie  $X(t) = (x(t), \dots, X_n(t))$  in Vektor stochastischer Prozesse. Es heißt  $X(t)$  ein multivariater schwach stationärer Prozeß, falls  $E[X_j(t)] = m_j$  sowie  $E[X_j(\tau+t)X_k(t)] = E[X_j(\tau)X_k(0)] = C_{jk}(\tau)$  mit  $j, k \in \{1, \dots, n\}$ . Die Folge von Matrizen  $C(\tau) = [C_{jk}(\tau)]_{j,k=1}^n$  heißt Kreuzkovarianzfolge des schwach stationären Prozesses  $X(t)$ .

Über den Satz von HERGLOTZ und BOCHNER läßt sich die Kreuzkovarianzstruktur in den Raum sogenannter nichtnegativ hermitescher Maße übertragen. Es bezeichne  $C_{\geq}^{n \times n}$  die Menge der nichtnegativ hermiteschen komplexen  $n \times n$ -Matrizen. Sei  $(\Omega, \Lambda)$  ein meßbarer Raum und  $F$  eine Abbildung  $F : \Lambda \rightarrow C_{\geq}^{n \times n}$  derart, daß

$$F\left(\bigcup_{m=1}^{\infty} A_m\right) = \sum_{m=1}^{\infty} F(A_m) \tag{1}$$

für alle Folgen  $(A_m)_{m \in \mathbb{N}}$  von paarweise disjunkten Mengen aus  $\Lambda$ . Dann heißt  $F$  ein nichtnegativ hermitesches  $n \times n$ -Maß auf  $(\Omega, \Lambda)$ . Zu jeder Kreuzkovarianzfolge  $C(\tau)$  existiert ein eindeutig bestimmtes nichtnegativ hermitesches Maß  $F$  derart, daß

$$C_{jk}(\tau) = \int_T e^{i\lambda\tau} dF_{jk}(\lambda). \tag{2}$$

Das in dieser Weise zur Kreuzkovarianzfolge zugeordnete Maß  $F$  heißt das nichtstochastische Spektralmaß der stationären Folge  $X(t)$  (KOOPMANS 1974). Das Maß  $\lambda$  ist das normalisierte Lebesguemaß auf der Einheitskreislinie  $T$ . Die Matrizen  $C(\tau)$  heißen auch Fourier-Koeffizienten des nichtnegativ hermiteschen Maßes  $F$ .

Da die Kreuzkovarianzfolge keine gerade Funktion ist, ist das nichtstochastische Spektralmaß und deren Spektraldichte eine komplexwertige Funktion. Die Spektraldichte ergibt sich aus der Ableitung  $f_{jk}(\lambda) = dF_{jk}(\lambda)/d\lambda$  des nichtstochastischen Spektralmaßes  $F$ . Hierdurch entsteht folgender Zusammenhang zwischen der Spektraldichte und der Kovarianzfunktion

$$C_{jk}(\tau) = \int_T e^{i\lambda\tau} f_{jk}(\lambda) d\lambda. \tag{3}$$

Die Spektraldichtematrix  $f(\lambda) = [f_{jk}(\lambda)]_{j,k=1}^n$  ist der zentrale Parameter für die Untersuchung des Zusammenhangs von Zeitreihen. Der Zusammenhang von zwei Zeitreihen  $X_j(t)$  und  $X_k(t)$  kann durch sogenannte bivariate Spektralparameter beschrieben werden. Diese Parameter ergeben sich aus Betrag und Phase der verschiedenen Elemente der Spektraldichtematrix. Der normierte absolute Betrag  $\rho_{jk}(\lambda) = |f_{jk}(\lambda)| / \sqrt{f_{jj}(\lambda)f_{kk}(\lambda)}$  heißt Kohärenz und ist ein wichtiger Parameter zur Bestimmung des Grades des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Zeitreihen, welcher auch quantitativ interpretiert werden kann. Unter Beachtung der Eigenschaft  $|f_{jk}(\lambda)| \leq \sqrt{f_{jj}(\lambda)f_{kk}(\lambda)}$  ergibt sich für die Kohärenz dann:  $0 \leq \rho_{jk}(\lambda) \leq 1$ . Unter gewissen Annahmen kann die Kohärenz als Korrelationskoeffizient im Frequenzbereich bezüglich einer vorgegebenen Frequenz  $\lambda$  angesehen werden. Zeitreihen mit einem ähnlichen Verhalten im Frequenzbereich bekommen einen hohen Kohärenzwert zugeordnet. Der entscheidende Vorteil gegenüber dem klassischen Korrelationskonzept besteht aber in der Phasenunabhängigkeit dieses Maßes. Bei einer entsprechenden Phasenverschiebung des gleichen Signals verschwindet

die Korrelation nahezu. Die Kohärenz hingegen bleibt unverändert. Das Konzept der Kohärenz von Zeitreihen wurde im Rahmen der Vorhersagetheorie von WIENER (1949) eingeführt. Deshalb wird diese Theorie oftmals auch Wiener-Theorie genannt.

Neben der Angabe des phasenunabhängigen Kohärenzmaßes kann die Phase  $\vartheta_{jk}(\lambda)$  zwischen Zeitreihen explizit angegeben werden. Dieser Parameter ergibt sich unmittelbar aus der Polardarstellung der komplexen Spektraldichte  $f_{jk}(\lambda) = |f_{jk}(\lambda)| e^{i\vartheta_{jk}(\lambda)}$ . Der Parameter  $\vartheta_{jk}(\lambda)$  kann als durchschnittliche Phasenverschiebung zwischen den Zeitreihen  $X_j(t)$  und  $X_k(t)$  interpretiert werden. Teilt man die Phase durch die Frequenz, erhält man die durchschnittliche zeitliche Verschiebung zwischen den betrachteten Zeitreihen.

## 2.2 Schätzung der Spektralparameter

Oftmals werden charakteristische Eigenschaften stochastischer Phänomene durch eine Anzahl von Realisierungen einer Stichprobenmenge bestimmt. Diese Vorgehensweise findet z. B. bei parametrischen Tests eine Anwendung. Bei stationären stochastischen Prozessen hingegen werden die Eigenschaften der Zufallsvariablen durch Mittelung über die Zeit geschätzt. Man wählt also nur eine einzige Realisierung des Prozesses und schätzt die Parameter durch die Betrachtung des Zeitverlaufs.

Es sei nun  $l \in N$  und  $X(t)$  für  $t = 1, \dots, l$  eine Realisierung eines multivariaten stationären stochastischen Prozesses. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit sei vorausgesetzt, daß der Mittelwert von  $X(t)$  bereits Null ist. Es sei  $j, k \in N$ . Dann heißt die Funktion

$$\hat{C}_{l,jk}(s) = \begin{cases} \frac{1}{l} \sum_{t=1}^{l-s} X_j(s+t)X_k(t) & , \quad s = 0, 1, \dots, l-1 \\ \hat{C}_{l,kj}(-s) & , \quad s = -1, \dots, -l+1 \end{cases} \quad [4]$$

die multivariate Kovarianzschätzung bezüglich der Realisierung  $X(t)$ . Man beachte, daß für  $|s| \geq l$  die Schätzung der Kreuzkovarianzfunktion den Wert Null annimmt. Hieraus ergibt sich ein Problem. In einer Umgebung von  $n$  gehen nämlich nur sehr wenige Beobachtungen in die Schätzung ein. Im ungünstigsten Fall (für  $|s| = l-1$ ) wird nur ein einziges Element der Zeitreihe für die Schätzung benutzt. Daher liefert die diskrete Fourier-Transformation der Kovarianzschätzung

$$\hat{P}_{l,jk}(\lambda) = \frac{1}{2\pi} \sum_{s=-l+1}^{l-1} e^{-i\lambda s} \hat{C}_{l,jk}(s), \quad \lambda \in (-\pi, \pi] \quad [5]$$

keine geeignete Schätzung der Spektraldichte (HANNAN 1970). Die Lösung dieses Problems besteht darin, bei der Spektraldichteschätzung nur die »gut« geschätzten Elemente der Kreuzkovarianzschätzung zu betrachten. Man wählt also eine maximale Verschiebung  $m_l < l$  und schätzt die Spektraldichte wie folgt:

$$\hat{f}_{l,jk}(\lambda) = \frac{1}{2\pi} \sum_{s=-m_l}^{m_l} e^{-i\lambda s} \varpi\left(\frac{s}{m_l}\right) \hat{C}_{l,jk}(s). \quad [6]$$

Die Verschiebung  $m_l$  heißt auch Spektraldichtefenster. Bei der Wahl von  $m_l$  sollte beachtet werden, daß ein zu großes oder zu kleines Spektraldichtefenster die Güte der Schätzung verschlechtert. Eine detaillierte Diskussion zur Wahl des Spektraldichtefensters ist in PRIESTLEY (1981) zu finden. In dieser Monographie wird auch die Wahl des sogenannten Phasenfenster-Generators  $\varpi$  ausführlich behandelt. Diese Gewichtsfunktion ist wichtig, um die Güte der Spektraldichteschätzung zu verbessern. Grob gesprochen wird hierdurch das Fehlen der »schlecht« geschätzten Elemente der Kovarianzfunktion ausgeglichen. Der Phasenfenster-Generator  $\varpi$  ist eine reelle, gerade und beschränkte Funktion, welche auf dem abgeschlossenen Intervall  $[-1,1]$  definiert ist.

Die polare Zerlegung der Spektraldichteschätzung liefert bivariate Spektralmaße für Komponenten  $X_j(t)$  und  $X_k(t)$  des multivariaten stationären stochastischen Prozesses  $X(t)$ . Die Schätzung für den Kohärenzkoeffizienten  $\rho(\lambda)$  ergibt sich aus dem normierten Betrag der Spektraldichte  $\hat{\rho}_{l,jk}(\lambda) = |\hat{f}_{l,jk}(\lambda)| / \sqrt{\hat{f}_{l,jj}(\lambda)\hat{f}_{l,kk}(\lambda)}$ . Diese Schätzung der Kohärenz wird auch Stichprobenkohärenz genannt. Die Schätzung für die Phasenverschiebung  $\vartheta(\lambda)$  ergibt sich durch  $\hat{\vartheta}_{l,jk}(\lambda) = \tan^{-1}\left(\frac{\Im(\hat{f}_{l,jk}(\lambda))}{\Re(\hat{f}_{l,jk}(\lambda))}\right)$ .

Die Größe der Konfidenzintervalle für Kohärenz und Phase hängt maßgeblich vom Phasenfenster-Generator  $\varpi$  sowie von der gewählten Größe des Spektraldichtefensters  $m_l$  ab. Diese Werte gehen in die sogenannten effektiven Freiheitsgrade  $r_l$  der Spektraldichteschätzung wie folgt ein:

$$r_l^{-1} = \frac{1}{2l} \sum_{s=-m_l}^{m_l} \varpi\left(\frac{s}{m_l}\right). \quad [7]$$

Konfidenzintervalle beschreiben die mögliche Abweichung der Schätzung bei vorgegebener Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  und dienen damit als Maß für die Güte der Schätzung. Für eine entsprechend große Anzahl von effektiven Freiheitsgraden ( $r_l > 20$ ) kann die Zufallsvariable  $\hat{\rho}_{l,jk}(\lambda) = \tanh^{-1}(\hat{\rho}_{l,jk}(\lambda))$  als normalverteilt angesehen werden (ENOCHSON und GOODMAN 1965). Hierdurch kann man nun die obere und untere Schranke des Konfidenzintervalls für die Kohärenzschätzung angeben

$$\tanh\left\{\hat{\rho}_{l,jk}(\lambda) \pm \frac{u_{\alpha/2}(r_l - 2)^{1/2} - 1}{r_l - 2}\right\}, \quad [7]$$

wobei  $u_{\alpha/2}$  das entsprechende  $\alpha/2$ -Quantil der standardisierten Normalverteilung  $\mathcal{N}(0,1)$  ist. Für  $\lambda \notin \{0; \pi\}$  berechnen sich die Grenzen des Konfidenzintervalls für die Phase wie folgt:

$$\hat{\vartheta}_{l,jk}(\lambda) \pm \left\{ \frac{1 - \hat{\rho}_{l,jk}(\lambda)^2}{(r_l - 2)\hat{\rho}_{l,jk}(\lambda)^2} \right\}^{1/2} t_{2r_l - 2}\left(\frac{\alpha}{2}\right), \quad [8]$$

wobei der Wert  $t_{2r_j-2}(\alpha/2)$  das  $\alpha/2$ -Quantil der  $t$ -Verteilung mit  $2r_j - 2$  Freiheitsgraden ist. Genau wie für die Kohärenz liefert das Konfidenzintervall für die Phase ein Maß für die Abweichung der Schätzung bei gegebener Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ .

### 3. Datenerhebung und Datenauswertung

Für die Anwendung der Theorie schwach stationärer Prozesse auf fMRT-Daten wurde ein Experiment mit visueller Stimulation der Probanden durchgeführt. Hierbei wurde die Dauer der Stimulation variiert. Es konnte gezeigt werden, daß spektrale Parameter geeignete Maße zur Untersuchung von Prozessen im menschlichen Gehirn liefern. Im Gegensatz zu Standardmethoden kann hierbei zusätzlich die zeitliche Dynamik betrachtet werden.

#### 3.1 Zur Durchführung des Experiments

An dem Experiment nahmen 8 Probanden (5 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 25 Jahren teil. Die Probanden lagen auf dem Scanner-Bett eines 3-Tesla-Bruker-Medseq-30/100-Systems. Um ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Daten zu erhalten, wurde eine visuelle Stimulation gewählt, welche durch einen LCD-Projektor hinter dem Kopf des Probanden dargeboten wurde. Über eine spezielle Spiegelbrille betrachtete der Proband die Reizpräsentation, welche aus einer Anzahl periodischer Stimulations- und Ruhephasen bestand.

Während der Stimulationsphase wurde eine Matrix rotierender roter L-förmiger Figuren auf schwarzem Hintergrund gezeigt. Alle 100 Millisekunden rotierte jede Figur um ein Vielfaches von  $60^\circ$ . Somit waren 6 Orientierungen der Figuren möglich. In der Ruhephase hingegen wurde nur ein schwarzer Bildschirm präsentiert. Die Längen der Stimulations- und Ruhephasen waren für die Probanden unterschiedlich und sind in Tabelle 1 dargestellt. Aus physiologischen Gründen mußte die Länge der Ruhephase mindestens 30 s betragen.

Tab. 1 Längen von Stimulations- und Ruhephasen in verschiedenen Probandengruppen<sup>[1]</sup>

	#Subj	$t_{STIM}$	$t_{REST}$	$RT$	Cycles	$l$
A	2	30 s	30 s	1 s	5	300
B	2	12 s	78 s	1 s	6	540
C	4	6 s	54 s	1 s	6	360

[1] Die ersten 3 Spalten beinhalten die Zahl der Probanden sowie Länge von Stimulationszeit  $t_{STIM}$  und Ruhephase  $t_{REST}$ . Die Repetitionszeit  $RT$  bedeutet das konstante Abtastintervall  $\Delta t$  der betrachteten Zeitreihen, welches für alle Probanden eine Sekunde beträgt. Die Zahl der Cycles ergibt sich aus der Anzahl der Stimulations- und Ruhephasen in einer Sitzung. Die gesamte Zahl aller Scans  $l$  entspricht der Länge der betrachteten Zeitreihen.

Über den gesamten Zeitraum des Experiments wurde ein graues Fixationskreuz in der Mitte des Bildes eingeblendet, welches im Durchschnitt alle 4 s für etwa 200 ms verschwand. Es wurde die Aufgabe gestellt, bei Verschwinden des Kreuzes eine Taste zu drücken, um die Aufmerksamkeit des Probanden beizubehalten. Zudem wurde hierdurch garantiert, daß der Proband die gesamte Zeit auf die Mitte der Präsentationsfläche schaute.

Für die Signalgewinnung wurde eine zusätzliche Standard-Kopfspule mit einem Durchmesser von 28 cm eingesetzt. Die funktionellen Daten wurden mittels einer sogenannten Gradienten-echo-EPI (*Echo Planar Imaging*)-Sequenz mit einer Pixelmatrix von  $64 \times 64$  und einer Pixelgröße von  $3 \times 3$  mm erhoben. Entlang des visuellen Kortex wurden 3 Schichten mit je 5 mm Schichtdicke und 2 mm zusätzlichem Abstand aufgenommen. Eine gesamte Aufnahme mit  $64 \times 64 \times 3$  Bildpunkten wird auch als Scan bezeichnet. Während des Experiments wurden viele solche Scans im Abstand von je 1 s aufgenommen. Hierdurch entstand eine fMRT-Zeitreihe für jeden der  $64 \times 64 \times 3$  Bildpunkte.

Zusätzlich zu den funktionellen Scans wurde zu Beginn der Messung ein anatomischer Scan aufgenommen, welcher ebenfalls aus 3 Schichten bestand. Allerdings besteht hierbei eine Schicht aus  $256 \times 256$  Pixel. Die Lage des anatomischen Scans war identisch zur Lage der funktionellen Scans. Die Bildgebung erfolgte mit einer sogenannten MDEFT-Sequenz (NORRIS 2000). Die Aufnahme einer anatomischen Referenzschicht ist wichtig für die anatomische Lokalisation der funktionellen Daten.

### 3.2 Datenanalyse durch Wiener-Konzept

Die gewonnenen fMRT-Zeitreihen wurden auf einem Multiprozessor-System SGI Origin 2000 ausgewertet. Hierbei wurde ausschließlich Software verwendet, welche am Max-Planck-Institut für Kognitions- und Neurowissenschaften in Leipzig entwickelt wurde. Für die Vorverarbeitung der Daten sowie für die Durchführung von statistisch parametrischen Tests wurde das Software Paket Lipsia (LOHMANN et al. 2001) verwendet. Für die Bestimmung der im Abschnitt 2.2 beschriebenen Spektralparameter wurde zusätzlich Software implementiert (MÜLLER et al. 2001).

Die Vorverarbeitung der Rohdaten beinhaltet als ersten Schritt eine Bewegungskorrektur. Diese war notwendig, um eventuell aufgetretene Bewegungen des Probanden zu berücksichtigen. Hierfür wurde ein Optimierungsalgorithmus verwendet, welcher auf der Korrelation der Bilddaten basiert. Ein weiterer Schritt der Vorverarbeitung bestand in der sogenannten *Slicetime-Korrektur*. Während der Aufnahme eines funktionellen Scans werden die Schichten nicht zum selben Zeitpunkt, sondern nacheinander aufgenommen. Um auch einen direkten Vergleich der Zeitreihen zwischen den Schichten zu ermöglichen, wurde dieser Versatz mittels Interpolation ausgeglichen. Die mathematische Grundlage hierfür bietet das Nyquist-Shannon-Theorem, welches auch als Abtasttheorem bekannt ist. Jede Band-beschränkte Funktion ist nämlich vollständig durch diskrete Meßpunkte mit einer konstanten Abtastrate bestimmt (PRESS et al. 1992).

Ein weiterer Schritt der Vorverarbeitung bestand in der Basislinien-Korrektur. Hierbei werden sogenannte Drifts ausgeglichen. Drifts sind starke Veränderungen des Mittelwertes der Meßreihe über die Zeit. Diese Schwankungen wurden durch die Anwendung eines Hochpaß-Filters mit einer Cutoff-Frequenz von 1/120 Hz beseitigt. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Daten zu verbessern, wurde zusätzlich ein räumlicher Gaußfilter mit  $\sigma = 0,8$  Pixel ausgeführt.

Die statistische Auswertung der fMRT-Zeitreihen basierte auf dem allgemeinen linearen Modell (WINER et al. 1991), welches eine Verallgemeinerung verschiedener statistisch parametrischer Tests darstellt. Das allgemeine lineare Modell kann vereinfacht als multiple Regression aufgefaßt werden. Ein Problem besteht hierbei darin, daß die Elemente von fMRT-Zeitreihen nicht als unabhängig betrachtet werden können. Die Unabhängigkeit der Beobachtungen ist

aber eine zentrale Voraussetzung für die meisten statistischen Tests. Daher wurde von WORSLEY und FRISTON (1995) eine Erweiterung des allgemeinen linearen Modells für autokorrelierte Beobachtungen vorgenommen. Dieses Konzept ist auch im Software Paket Lipsia (LOHMANN et al. 2001) implementiert.

Im weiteren wird nun die Datenauswertung mittels der Theorie schwach stationärer Prozesse beschrieben. Die mathematischen Grundlagen hierfür sind in Kapitel 2 angeführt. Die Berechnung der Spektraldichtematrix basierte auf der Schätzung der multivariaten Kreuzkovarianzfunktion. Für die Berechnung der bivariaten Spektralmaße wurde eine Referenz-Zeitreihe gewählt. Hierbei entschied man sich für das Pixel, welches die stärkste Aktivierung zeigte. Unter Hinzunahme dieses Referenz-Pixels wurden die Spektraldichtematrix für jedes der  $64 \times 64 \times 3$  Zeitreihen berechnet. Für alle Probanden wurde der Phasenfenster-Generator von PARZEN verwendet. Andere Gewichtsfunktionen wurden ebenfalls ausprobiert. Für die vorliegenden Daten zeigte sich aber, daß die Wahl des Phasenfenster-Generators  $\varpi$  keinen großen Einfluß hat. Die Wahl der Größe des Spektralfensters  $m_l < l \in N$  hat hingegen einen entscheidenden Einfluß auf die Eigenschaften der Spektraldichtematrix (PRIESTLEY 1981). Das Spektralfenster  $m_l$  wurde derart adjustiert, daß bei einer großen Zahl effektiver Freiheitsgrade ( $r_l > 50$ ) eine optimale Abtastrate der Daten im Frequenzbereich erreicht wurde (KOOPMANS 1974). Um die Ergebnisse zwischen den Probanden vergleichen zu können, wurde eine einheitliche Größe des Spektralfensters  $m_l = l/10$  gewählt. Hieraus ergab sich die Zahl effektiver Freiheitsgrade von  $r_l = 53,3$  für alle Probanden.

Durch die Betrachtung von Betrag und Phase der komplexen Spektraldichtematrix wurden weitere bivariate Spektralmaße berechnet. Hierbei entstanden zwei reellwertige Maße, welche Beziehungen zwischen Zeitreihen beschreiben. Der normierte Betrag der Spektraldichtematrix liefert die Kohärenz. Die Kohärenz beschreibt den Grad des linearen Zusammenhangs von Zeitreihen. Die Phase hingegen liefert ein Maß für die mittlere Phasenverschiebung, welche in Sekunden angegeben werden kann. Die erhaltenen Matrizen für Kohärenz und Phase können in Form von Karten den zugehörigen anatomischen Bildern überlagert werden. Diese Karten wurden mit einem Schwellwert versehen. Hierbei wurden Pixel mit einer Kohärenz über 0,8 betrachtet. Um die Güte der Schätzung bewerten zu können, wurden Konfidenzintervalle für Kohärenz und Phase bestimmt. Die Berechnung solcher Konfidenzintervalle ist in Abschnitt 2.2 beschrieben. Die ermittelten Konfidenzintervalle wurden ebenfalls zu Karten angeordnet, welche anatomischen Bildern überlagert wurden.

Für die Untersuchung der Beziehung zwischen Phasenverschiebung und Signalstärke wurde für jedes Pixel die maximale Signalamplitude  $\Delta S_l$  während jeder Stimulationsphase betrachtet. Die hierdurch für jede Stimulationsphase erhaltenen Werte wurden zum Schluß gemittelt. Hierdurch wurden Karten von Signaländerungen  $\Delta S$  generiert, welche durch Korrelationsanalysen mit den zugehörigen Phasenverschiebungen verglichen wurden.

#### 4. Ergebnisse

Die statistische Auswertung unter Verwendung des allgemeinen linearen Modells zeigt die gleichen Hirnorte wie die durch die Theorie schwach stationärer Prozesse erhaltenen Kohärenzkarten. Primäre visuelle Areale zeigen sowohl die statistische Signifikanz bezüglich des Paradigmas ( $p < 0,001$ ) als auch einen hohen Kohärenzwert ( $\hat{\rho} > 0,8$ ) mit dem gewählten Referenz-Pixel. Kleinere Unterschiede sind hierbei darauf zurückzuführen, daß die Kohärenz

ein phasenunabhängiges Maß liefert. Die Größe des aktivierten Areals nimmt mit wachsender Stimulationslänge zu. Tabelle 2 zeigt die Abhängigkeit zwischen Stimulationsdauer und Zahl kohärenter Pixel.

Tab. 2 Zusammenhang zwischen Amplitude des BOLD-Signals und Phasenverschiebung<sup>[1]</sup>

	$t_{STM}/t_{REST}$	$m/r_i$	$r(\Delta S, \vartheta)$		$N(\hat{\rho} > 0.8)$
HS	30/30	30/53,3	0,00	(-0,07, 0,07)	688
SJ	30/30	30/53,3	-0,07	(-0,17, 0,03)	367
KA	12/78	54/53,3	0,44	(0,36, 0,52)	397
PA	12/78	54/53,3	0,52	(0,42, 0,61)	237
MA	6/54	36/53,3	0,60	(0,53, 0,66)	429
SD	6/64	36/53,3	0,62	(0,55, 0,68)	342
SJ	6/54	36/53,3	0,68	(0,60, 0,75)	196
WC	6/54	36/53,3	0,71	(0,64, 0,78)	197

[1] Die Korrelation  $r(\Delta S, \vartheta)$  zwischen Signalamplitude und Phase verringert sich mit wachsender Stimulationsdauer. Bei kurzen Stimuli von 6 s ist die Korrelation jeweils über 0,6. Bei den langen Stimuli hingegen ist kein Zusammenhang mehr erkennbar. Die zugehörigen Konfidenzintervalle sind für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  angegeben. Durch geeignete Wahl des Spektraldichtefensters  $m_i$  ist bei allen Probanden die Zahl der effektiven Freiheitsgrade  $r_i$  einheitlich 53,3. Die rechte Spalte zeigt die Zahl der Pixel, welche eine Kohärenz  $\hat{\rho} > 0,8$  aufweisen. Für diese Pixel wurde die Phase berechnet. Die Zahl aktivierter Pixel wächst mit der Länge der Stimulation.

Die Karten der Phasenverschiebungen zeigen im primären visuellen Kortex Areale mit positiver und negativer Phase. Hierdurch können Regionen mit einer frühen BOLD-Antwort von denen mit einer späten unterschieden werden. Abbildung 1 zeigt Phasen-Karten einzelner Probanden für eine Stimulationsdauer von 6 und 30 s. Für den kurzen bzw. langen Stimulus betrug die durchschnittliche Verschiebung der BOLD-Antwort etwa 1 bis 2 s. Diese Ergebnisse wurden durch die Betrachtung der zugeordneten Zeitverläufe bzw. durch Mittelung von entsprechender Zeitreihen bestätigt (siehe rechte Spalte in Abb. 1). Um methodische Fehler auszuschließen, wurde der Algorithmus zusätzlich unter Verwendung von synthetischen Daten validiert. Hierbei stimmte die durch die Spektraldichte ermittelte Phasenverschiebung exakt mit der zeitlichen Verschiebung der synthetischen Daten überein.

Wie erwartet, sind die stärksten Signaländerungen in primären visuellen Arealen lokalisiert (Abb. 2). Unabhängig von der Stimulationsdauer beträgt die maximale Signaländerung etwa 10%. Die Korrelation zwischen Signalamplitude und Phasenverschiebung hängt von der Dauer der Stimulation ab. Die Ergebnisse aus Tabelle 2 geben einen Hinweis darauf, daß diese Korrelation mit wachsender Stimulationsdauer abnimmt. Für die Stimulation von 30 s ist für beide Probanden eine Korrelation um 0 zu beobachten. Für die Stimulation von 12 s ist die Korrelation um 0,4–0,5, und für die kurze Stimulation von 6 s ist die Korrelation über 0,6 für alle 4 Probanden (siehe Tab. 2 und Abb. 2). Bei dem kurzen Stimulus von 6 s zeigen Areale mit hohen Signaländerungen auch einen großen Phasenversatz. Regionen mit einer frühen Response zeigen hingegen nur geringe Signaländerungen (Abb. 3).

Abbildung 4 zeigt Ergebnisse von Untersuchungen zur Stabilität der Phase über die Zeit. Hierbei ergibt sich ein starker Zusammenhang zwischen der Schwankung der Phase und der

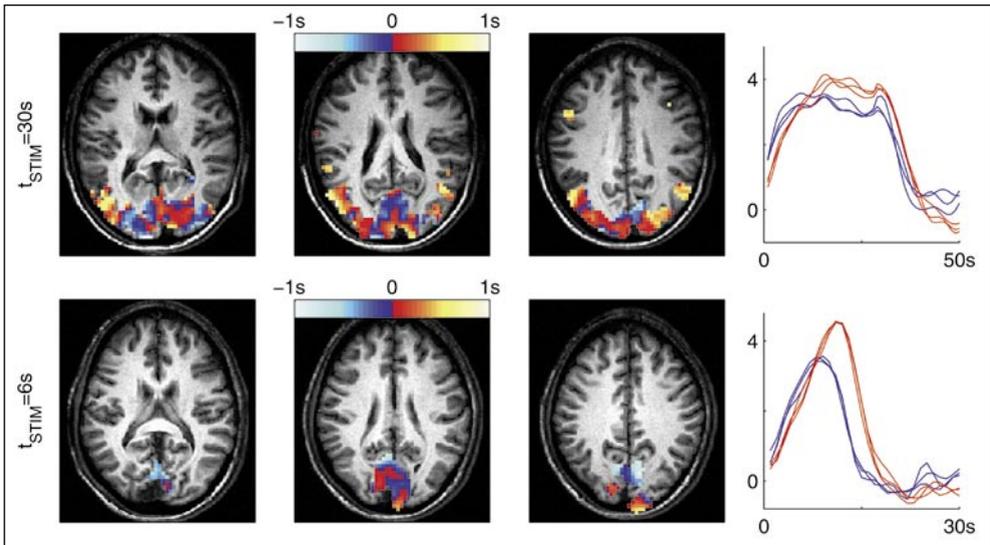


Abb. 1 Die farblich gekennzeichneten Areale in den axialen Schichten zeigen die Phasenverschiebung des BOLD-Signals bei Verwendung einer visuellen Stimulation von 30 s (*obere Zeile*) und 6 s (*untere Zeile*). Die Phase wurde hierbei für Pixel mit einer Kohärenz größer 0,8 berechnet (d. h. in primären visuellen Arealen). Die zeitlichen Verschiebungen korrespondieren mit den gemittelten Zeitverläufen des BOLD-Signals (siehe rechte Seite der Abbildung). Insbesondere für den kürzeren Stimulus geben die Zeitverläufe einen Hinweis auf die Abhängigkeit von Signalstärke und Phase (siehe hierzu auch Abb. 3).

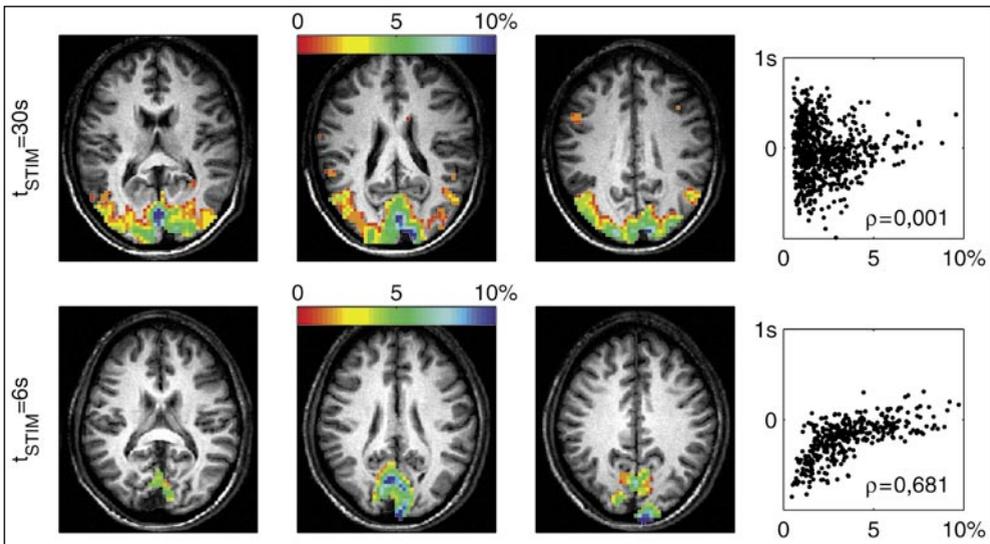


Abb. 2 Darstellung von BOLD-Signaländerungen bei einer visuellen Stimulation von 30 s (*obere Zeile*) und 6 s (*untere Zeile*). Signaländerungen wurden für Areale berechnet, welche eine Kohärenz größer 0,8 zeigen (Abb. 1). Die Korrelation zwischen Signalamplitude und Phase hängt von der Stimulationsdauer ab (Tab. 2). Für den langen Stimulus könnte die verringerte Korrelation durch das Vorhandensein zusätzlich aktivierter Pixel hervorgerufen werden (siehe Grafiken in der letzten Spalte der Abbildung).

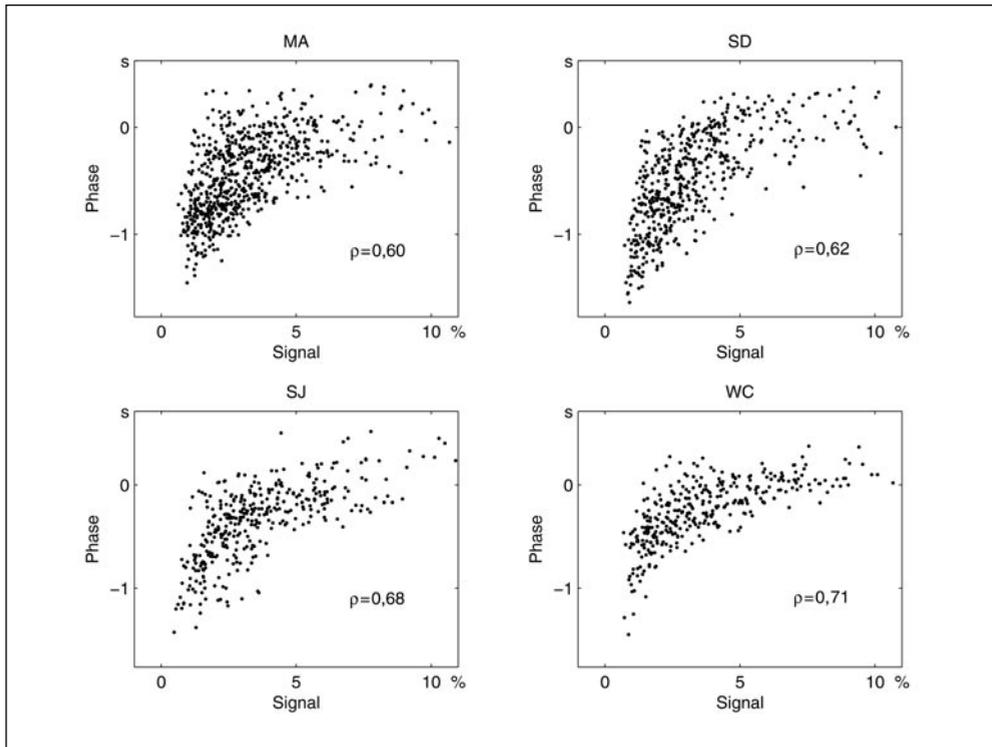


Abb. 3 Bei einer kurzen visuellen Stimulation von 6 s ist die Korrelation zwischen Signaländerung und Phasenverschiebung über 0,6 für alle Probanden (siehe Tab. 2 für zugehörige Konfidenzintervalle). Areale mit hohen Signaländerungen zeigen auch einen großen Phasenversatz. Regionen mit einer frühen Response (negative Phase) zeigen nur geringe Signaländerungen.

Stärke der Aktivierung. Die Korrelation ist größer als 0,8 unabhängig von der Länge der visuellen Stimulation. Je stärker die Aktivierung, desto geringer die Schwankung der Phase.

## 5. Diskussion

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode liefert ein Maß zur Beschreibung des Grades des linearen Zusammenhangs von Zeitreihen, das unabhängig von der Phase ist. Dieses Maß heißt Kohärenz und wird aus der Spektraldichtematrix berechnet. Die Kohärenz liefert auch bei gegebener Phasenverschiebung einen hohen Wert für ähnliche Zeitserien und kann als eine Art Korrelation im Frequenzbereich aufgefaßt werden. Der Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit, die zeitliche Dynamik zerebraler Prozesse untersuchen zu können. Neben der Kohärenz kann man aus der Spektraldichtematrix auch die Phase explizit berechnen. Die Phase beschreibt den zeitlichen Zusammenhang des BOLD-Signals zwischen verschiedenen Hirnregionen.

Um die Stabilität der Phase während des Experiments beurteilen zu können, wurde die sogenannte *Wavelet Coherence Phase* bestimmt (TORRENCE and COMPO 1998). Während man

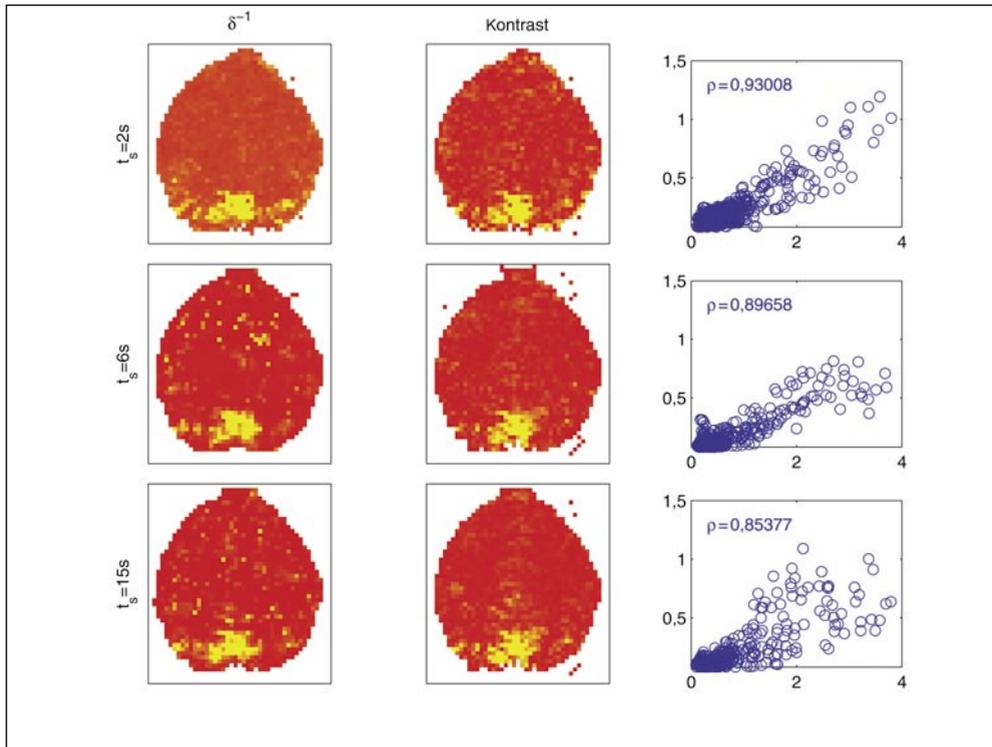


Abb. 4 Varianz der Phasenverschiebungen über die Zeit (*erste Spalte*) sowie Aktivierungskarten (*zweite Spalte*) eines einzelnen Probanden unter Verwendung verschiedener Stimulationslängen. Aktivierte Areale mit hohen Signaländerungen zeigen eine auffällig geringe Varianz in der Phase. Die Korrelation zwischen den Phasenvarianz- und Aktivierungskarten ist über 0,8 für alle Stimulationslängen. Je stärker die Aktivierung (je höher der Kontrastwert), desto geringer die Varianz der Phase. Aktivierte Areale zeigen ein nahezu stationäres Verhalten der Phase.

bei der Spektralanalyse ein Maß für die durchschnittliche Phasenverschiebung erhält, liefert die Waveletanalyse dieses Maß zu jedem Zeitpunkt, d. h. für jedes Element der Zeitreihen. Hierdurch kann der Verlauf der Phase während des gesamten Experiments betrachtet werden. Es zeigt sich aber, daß sich die Phase in aktivierten Arealen kaum verändert. Unabhängig von der Dauer der Stimulation zeigte die Phase hier ein stationäres Verhalten. Die durchschnittliche Phasenverschiebung ist also ein geeignetes Maß für die Betrachtung der zeitlichen Dynamik aktivierter Hirnareale.

Das zeitliche Verhalten des BOLD-Signals in verschiedenen kortikalen Regionen wird in der Literatur ausführlich behandelt. Hierbei seien insbesondere die Arbeiten von ROSEN et al. (1998) und BUCKNER et al. (1998) genannt. Die Ursachen für das unterschiedliche zeitliche Verhalten verschiedener Hirnregionen sind noch unklar. Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen Gefäßarchitektur verschiedener Areale liegen (LEE et al. 1995, MIEZIN et al. 2000). Dieser Frage wurde insbesondere in einer Arbeit von MÜLLER et al. (2003) unter Verwendung einer sogenannten Diffusionswichtung nachgegangen. Bei einer magnetischen Feldstärke von 3 Tesla entfernt die Diffusionswichtung der geschalteten Gradienten die meisten intravaskulären Anteile. Dies bedeutet, daß der Fluß innerhalb großer Gefäße keinen Beitrag

zum gemessenen Signal liefert. Der extravaskuläre Anteil bleibt hingegen erhalten. Der Vergleich zwischen den Phasenkarten diffusionsgewichteter und nicht diffusionsgewichteter Daten erbrachte keine nennenswerten Unterschiede.

Die Abhängigkeit von Amplitude und Phase des Signals hängt von der Dauer der Stimulation ab. Hierbei geben die Ergebnisse einen ersten Hinweis darauf, daß dieser Zusammenhang bei längerer Stimulationsdauer abnimmt. Je länger die Stimulation, desto kleiner die Korrelation zwischen Signalstärke und Phase. Für den langen Stimulus könnte man die verringerte Korrelation durch das Vorhandensein zusätzlicher Aktivierungen in extrastriaten visuellen Arealen erklären. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse auch einen Zusammenhang zwischen der Zahl aktivierter Pixel und der Länge des Stimulus. Je länger der Stimulus dauert, desto größer ist die Zahl aktivierter Pixel.

Für die kurze Stimulation von 6 s gibt es eine starke Korrelation zwischen Signalstärke und Phase. Je größer die Signaländerung, desto größer die Phasenverschiebung. Dieses Phänomen ist schwierig zu erklären. Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, daß größere Venen zu höheren Signaländerungen beitragen. Wäre dies der Fall, könnte die beobachtete Korrelation durch die erhöhte Transitzeit des Blutes bedingt sein. Hinweise auf eine späte BOLD-Antwort der großen Venen im Vergleich zu den Kapillaren sind bei LEE et al. (1995) zu finden.

Eine alternative Erklärung bietet die sogenannte Fast-Response (ERNST and HENNIG 1994, HU et al. 1997). Sie besteht in einer kurzzeitigen Abnahme der Konzentration des Deoxyhämoglobins nach der Stimulation und könnte die Ursache für die erhöhte Korrelation zwischen Phase und Signalstärke sein. Durch die Kopplung von Blutfluß und Stoffwechsel besitzen Areale mit einem stärkeren Sauerstoffverbrauch auch einen erhöhten Blutfluß. Durch die Fast-Response bedingt könnte der erhöhte Anteil des Deoxyhämoglobins ein verspätetes BOLD-Signal verursachen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß spektrale Methoden zur Auswertung von fMRT-Zeitreihen geeignet sind. Der Vorteil gegenüber Methoden im Zeitbereich besteht in der Möglichkeit, eine phasenunabhängige Beschreibung des linearen Zusammenhangs zwischen Zeitserien geben zu können. Die Phase selbst ergibt sich explizit aus der Spektraldichtematrix und kann zur Beschreibung der zeitlichen Dynamik von Prozessen im menschlichen Gehirn verwendet werden. Hierbei sind die Ursachen für das unterschiedliche zeitliche Verhalten verschiedener Hirnregionen noch unklar. Weitere Forschung ist erforderlich, um den Zusammenhang dieses zeitlichen Verhaltens mit anderen Parametern beschreiben zu können.

### *Dank*

An der Entwicklung der Methoden sowie an der Durchführung der Experimente waren Gabriele LOHMANN und Toralf MILDNER beteiligt. Ihnen sei besonderer Dank gesagt. Weiterhin möchte ich Herrn D. Yves von CRAMON für die vielen Anregungen und Diskussionen danken. Mein besonderer Dank gilt der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina. Die intensive Förderung der Akademie ermöglichte mir zahlreiche Aufenthalte an bedeutenden internationalen Forschungseinrichtungen.

### *Literatur*

- BUCKNER, R. L., KOUTSTAAL, W., SCHACHTER, D. L., DALE, A. M., ROTTE, M., and ROSEN, B. R.: Functional-anatomic study of episodic retrieval. II. Selective averaging of event-related fMRI trials to test the retrieval success hypothesis. *Neuroimage* 7, 163–175(1998)
- ENOCHSON, L. D., and GOODMAN, N. R.: Gaussian approximation to the distribution of sample coherence. AFFDL TR 65–67, Res. and Technol. Div. AFSC. Ohio: WrightPatterson AFB (1965)

- ERNST, T., and HENNIG, J.: Observation of a fast response in functional MR. *Magn. Reson. Med.* 32, 146–149 (1994)
- FRISTON, K. J.: Statistical parametric maps in functional imaging: A general linear approach. *Human Brain Mapping* 2, 189–210 (1994)
- FRISTON, K. J., UNGERLEIDER, L. G., JEZZARD, P., and TURNER, R.: Characterizing modulatory interactions between V1 and V2 in human cortex with fMRI. *Human Brain Mapping* 2, 211–224 (1995)
- HANNAN, E. J.: *Multiple Time Series*. New York: Wiley 1970
- HU, X., LE, T. H., and UGURBIL, K.: Evaluation of the early response in fMRI using short stimulus duration. *Magn. Reson. Med.* 37, 877–884 (1997)
- KOLMOGOROV, A. N.: Stationary sequences in Hilbert space. *Bull. Math. Univ. Moscow* 2, 1–40 (1941)
- KOOPMANS, L. H.: The spectral analysis of time series. In: BIRNBAUM, Z. W., and LUKACS, E. (Eds.): *Probability and Mathematical Statistics*. Vol. 22. New York, San Francisco, London: Academic Press 1974
- LEE, A. T., GLOVER, G. H., and MEYER, C. H.: Discrimination of large venous vessels in time-course spiral blood-oxygen-level-dependent magnetic-resonance functional neuroimaging. *Magn. Reson. Med.* 33, 745–754 (1995)
- LOHMANN, G., MÜLLER, K., BOSCH, V., MENTZEL, H., HESSLER, S., CHEN, L., ZYSSET, S., and CRAMON, D. Y. VON: Lipsia – a new software system for the evaluation of functional magnetic resonance images of the human brain. *Comput. Med. Imaging and Graphics* 25, 449–457 (2001)
- MARCHINI, J. L., and RIPLEY, B. D.: A new statistical approach to detect significant activation in functional MRI. *Neuroimage* 12, 366–380 (2000)
- MIEZIN, F. M., MACCOTTA, L., OLLINGER, J. M., PETERSEN, S. E., and BUCKNER, R. L.: Characterizing the hemodynamic response: Effects of presentation rate, sampling procedure, and the possibility of ordering brain activity based on relative timing. *Neuroimage* 11, 735–759 (2000)
- MÜLLER, K., LOHMANN, G., BOSCH, V., and CRAMON, D. Y. VON: On multivariate spectral analysis of fMRI time series. *Neuroimage* 14, 347–356 (2001)
- MÜLLER, K., MILDNER, T., LOHMANN, G., and CRAMON, D. Y. VON: Investigating the stimulus-dependent temporal dynamics of the BOLD signal using spectral methods. *J. Magn. Reson. Imaging* 17, 375–382 (2003)
- NORRIS, D. G.: Reduced power multi-slice MDEFT imaging. *J. Magn. Reson. Imaging* 11, 445–451 (2000)
- PRESS, W. H., TEUKOLSKY, S. A., VETTERLING, W. T., and FLANNERY, B. P.: *Numerical Recipes in C*. Cambridge: Cambridge University Press 1992
- PRIESTLEY, M. B.: *Spectral analysis and time series*. In: *Probability and Mathematical Statistics*. London: Academic Press 1981
- ROSEN, B. R., BUCKNER, R. L., and DALE, A. M.: Event-related functional MRI: Past, present, and future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 773–780 (1998)
- TORRENCE, C., and COMPO, G. P.: *A practical guide of wavelet analysis*. *Bull. Amer. Meteorol. Soc.* 79, 61–78 (1998)
- WIENER, N.: *Extrapolation, Interpolation, and Smoothing of Stationary Time Series with Engineering Applications*. Cambridge: MIT Press 1949
- WINER, B., BROWN, D., and MICHELS, K.: *Statistical Principles in Experimental Design*. New York: McGraw-Hill 1991
- WORSLEY, K. J., and FRISTON, K. J.: Analysis of fMRI time-series revisited – Again. *Neuroimage* 2, 359–365 (1995)

Dr. Karsten MÜLLER  
Max-Planck-Institut für Kognitions- und Neurowissenschaften  
Stephanstraße 1a  
04103 Leipzig  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 341 9940224  
Fax: +49 341 9940221  
E-Mail: karstenm@cbs.mpg.de

## **Parasitismus, Commensalism, Symbiosis – Common Themes, Different Outcome**

*Leopoldina-Symposium,*

gemeinsam veranstaltet von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina in Kooperation mit dem Forschungszentrum für Infektionskrankheiten der Universität Würzburg und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) vom 24. bis 26. Juli 2002 in Würzburg

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 88, Nr. 333

Herausgegeben von Roy GROSS, Matthias FROSC, Werner GOEBEL,

Jörg HACKER, Ute HENTSCHEL, Jürgen KREFT, Markus RIEDERER,

Michael STEINERT und Volker TER MEULEN (Würzburg)

(2004, 198 Seiten, 23 Abbildungen, 19 Tabellen, 21,80 Euro,

ISBN 3-8047-2095-1)

Die Charakterisierung der komplexen Interaktionen zwischen pathogenen, kommensalen und symbiontischen Bakterien und ihren Wirtsorganismen hat durch die Entwicklung der modernen molekularbiologischen Techniken wie Polymerasekettenreaktion, Genomsequenzierung und *In-situ*-Hybridisierung (»Genomics«) große Fortschritte verzeichnen können. Die neuen Erkenntnisse über die Genomorganisation der Mikroorganismen erlauben nun auch bei bisher nicht kultivierbaren Bakterien interessante Einblicke in deren Biologie und Phylogenie. Vor allem lassen sich die verschiedenen Strategien der Wechselwirkung von Mikroorganismen mit ihren Wirten aus der Pflanzen- oder Tierwelt aufklären. Darüber hinaus werden in den Beiträgen die Evolutionsvorgänge im Reich der Mikroorganismen im Lichte der Genomik-Ära betrachtet. Die genetische Variabilität als Grundlage der Evolution beruht in Prokaryoten im wesentlichen auf horizontalem Gentransfer, Umlagerungen der DNA und auf Punktmutationen. Die Beiträge reichen von der Analyse von Selektionsprozessen bei bioaktiven Molekülen bis hin zu pathogenetischen Prozessen bei Interaktionen von Mikroben mit Pflanzen, Vertebraten und Nichtvertebraten. Dabei werden an ausgewählten Beispielen Prozesse der Symbiose, des Kommensalismus und der Pathogenese beschrieben. Der aktuelle Wissensstand zu Fragen der bakteriellen Pathogenität und Symbiose wird aus der Sicht verschiedener Wissenschaften (Evolutionsbiologie, Mikrobiologie, Infektionsbiologie, Biochemie, Biophysik, Molekularbiologie, Genetik, Zoologie und Botanik) an einer Reihe von Beispielen diskutiert.

*In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*

# **Ophthalmologie, Oto-Rhino-Laryngologie und Stomatologie**

---

PD Dr. Mike JOHN

Geboren 1965 in Merseburg, 1987–1992 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. 1992–1996 Assistent an der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der MLU; 1993 Promotion zum Dr. med. an der Medizinischen Fakultät. 1995 Zuerkennung des Leopoldina-Förderpreises und sechsmonatiger Aufenthalt in der Section for Orofacial Pain and Occlusion der University of California, Los Angeles. Seit 1996 Oberarzt an der Poliklinik. Förderung eines Forschungsaufenthalts als Affiliate Assistant Professor am Department of Oral Medicine, University of Washington, Seattle, von September 1999 bis August 2001 durch die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina. Danach Rückkehr an die Poliklinik und einzelne Aufenthalte am Gastinstitut in Seattle. 1999–2002 Studium von Public Health (Master of Public Health) und Epidemiologie (Doctor of Philosophy) an der University of Washington. Seit 2004 Oberarzt an der Poliklinik für zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde der Universität Leipzig.

## Mundgesundheitsbezogene Lebensqualität in der Allgemeinbevölkerung und klinischen Patienten

Mike JOHN (Leipzig) und Wolfgang MICHEELIS (Köln)

Mit 4 Abbildungen und 1 Tabelle

### Zusammenfassung

Auf die Mundgesundheit bezogene Lebensqualität (MLQ) ist ein umfassendes Konzept, welches die individuelle subjektive Empfindung des Mundgesundheitszustandes widerspiegelt. Wichtige Teilbereiche von MLQ sind funktionelle Einschränkungen des Kausystems (z. B. Probleme beim Essen, beim Sprechen), orofaziale Schmerzen (z. B. Zahnschmerzen) und psychosoziale Auswirkungen, welche durch orale Erkrankungen hervorgerufen werden (z. B. sich Sorgen machen, Einschränkung täglicher Aktivitäten). Obwohl nur klinische Befunde und das Befinden des Patienten zusammen den gesundheitlichen Zustand entsprechend eines biopsychosozialen Krankheitsverständnisses umfassend beschreiben können, fehlten bisher im deutschsprachigen Raum Instrumente zur Charakterisierung der mundgesundheitsbezogenen Lebensqualität. Seit kurzem ist jedoch mit der deutschen Version des *Oral Health Impact Profile* (OHIP-G) ein Instrument vorhanden, daß sowohl ausgezeichnete psychometrische Eigenschaften besitzt, als auch international vergleichbar ist.

Es ist Anliegen dieser Übersicht, die ersten Anwendungen des Instrumentes in einer bundesweiten bevölkerungsrepräsentativen Studie ( $n = 2050$  Probanden) vorzustellen. Komplettiert werden diese Ergebnisse durch klinische Untersuchungen an Patienten mit Totalprothesen ( $n = 50$ ) und an Patienten mit Schmerzen in den Kiefergelenken und in der Kaumuskulatur ( $n = 50$ ), die in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Martin-Luther-Universität behandelt worden sind.

Mit der deutschen Version des *Oral Health Impact Profile* (OHIP-G) steht erstmalig im deutschsprachigen Raum ein international anerkanntes Instrument zur Erfassung der auf die Mundgesundheit bezogenen Lebensqualität zur Verfügung. Das Instrument eignet sich sowohl für Quer- als auch Längsschnittuntersuchungen in der Allgemeinbevölkerung und in Populationen klinischer Patienten.

### Abstract

Oral health-related quality of life (OHRQOL) is a construct which describes the individual's perception of oral health. Dimensions of oral health are functional limitations, orofacial pain, psychological discomfort and physical, psychological, social disability and handicap. Currently, clinical parameters of oral disease dominate in clinical practice and research. However, it is necessary to broaden this narrow focus by introducing measures such as oral health-related quality of life to capture non-clinical aspects of oral disease. There is a substantial interest in the Anglo-American literature in oral health-related quality of life. In Germany, however, only recently an instrument (Oral Health Impact Profile German version – OHIP-G) with acceptable psychometric properties was developed.

It was the aim of this report to summarize first results about impaired OHRQOL in the German population and in two samples of clinical patients. Results came from a national survey ( $n = 2050$  subjects) and from patients treated in the Department of Prosthodontics, Martin Luther University Halle-Wittenberg. A group of edentulous patients ( $n = 50$ ) treated with complete dentures in the Department was re-examined 1–10 years after the initial treatment. A second group of patients consisted of patients with pain in their masticatory muscles and their temporomandibular joints ( $n = 50$ ). They were examined using the OHIP-G before and after treatment.

The German version of the Oral Health Impact Profile (OHIP-G) was found to be a valid and reliable instrument useful in the assessment of subjects from the general population as well as clinical patients.

## 1. Einleitung

### *Mundgesundheitsbezogene Lebensqualität – die subjektive Seite des Mundgesundheitszustandes*

Lebensqualität ist ein mehrdimensionales, sehr umfassendes Konzept (Abb. 1).

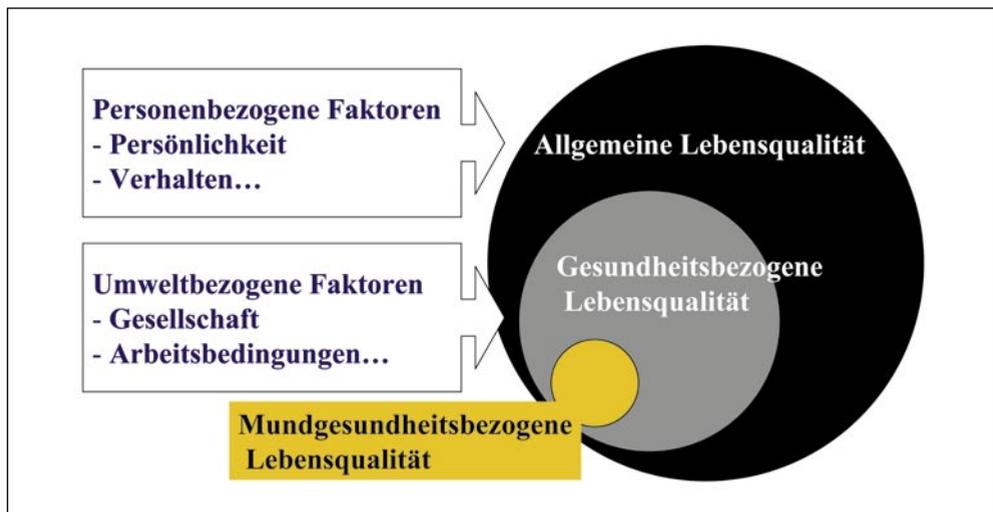


Abb. 1 Mundgesundheitsbezogene Lebensqualität, gesundheitsbezogene Lebensqualität und (allgemeine) Lebensqualität

Gesundheit ist eine Dimension der Lebensqualität (*health-related quality of life*, HRQOL), definiert als »the values assigned by individuals, groups, or society to the duration of survival as modified by impairments, functional status, perceptions, and social opportunity influenced by disease, injury, treatment, or policy« (PATRICK and ERICKSON 1993); oder: »Quality of life is defined as individual's perception of their position in life in the context of the culture and value system where they live, and in relation to their goals, expectations, standards and concerns. It is a broad-ranging concept, incorporating in a complex way a person's physical health, psychological state, level of independence, social relationships, personal beliefs and relationship to salient features of their environment« (WHOQOL Group 1993).

Wie krank sich Patienten fühlen, wie sie den Grad ihres Wohlbefindens einschätzen, ist die komplementäre Seite zu klinischen Morbiditätsindikatoren. Beide Einschätzungen müssen aber nicht übereinstimmen. Einer Krankheit liegen sowohl physiologische als auch psychologische Prozesse zugrunde. In dieser Hinsicht ist das subjektive Empfinden integraler Bestandteil des Gesundheitszustandes.

Mund- und Allgemeingesundheit sind eng miteinander verbunden. Allerdings scheint mundgesundheitsbezogene Lebensqualität spezifische Aspekte zu umfassen, die nicht mit auf die allgemeine Lebensqualität ausgerichteten Instrumenten wie dem *Medical Short Form 36* (SF-36; WARE et al. 1993) beschrieben werden können (ALLEN et al. 1999).

Das hat zur Entwicklung von Instrumenten geführt, die spezifisch auf die Mundgesundheit ausgerichtet sind:

- Sociodental Scale (CUSHING et al. 1986),
- Geriatric Oral Health Assessment Index (ATCHISON und DOLAN 1990),
- Dental Impact Profile (STRAUSS und HUNT 1993),
- Oral Health Impact Profile (SLADE und SPENCER 1994),
- Dental Impact on Daily Living (LEAO und SHEIHAM 1996),
- Oral Health-Related Quality of Life (KRESSIN 1996),
- Oral Impacts on Daily Performances (ADULYANON und SHEIHAM 1997).
- OHQoL-UK(W)<sup>®</sup> (McGRATH und BEDI 2001).

Unter den im englischen Sprachraum vorhandenen Instrumenten zur mundgesundheitsbezogenen Lebensqualität (MLQ) (SLADE et al. 1998) besitzt wohl das *Oral Health Impact Profile* (OHIP), das von SLADE und SPENCER (1994) ursprünglich in Australien entwickelt worden ist, die weiteste Anerkennung.

Die Notwendigkeit eines international vergleichbaren deutschen Instrumentes hat zur Entwicklung einer deutschen Version des *Oral Health Impact Profile* (OHIP-G) geführt (JOHN et al. 2002).

Diese Übersicht faßt die ersten Anwendungen zur Messung der mundgesundheitsbezogenen Lebensqualität in Deutschland, die mit dem *Oral Health Impact Profile* sowohl in der Allgemeinbevölkerung (JOHN und MICHEELIS 2003) als auch an spezifischen Gruppen von klinischen Patienten (JOHN 1998, 1999) durchgeführt worden sind, zusammen.

## 2. Material und Methode

### 2.1 Untersuchungsteilnehmer

Die Untersuchungsteilnehmer kamen aus drei unterschiedlichen Stichproben. Die erste Stichprobe umfaßte nichtselektierte Probanden aus einer bundesweiten bevölkerungsrepräsentativen Befragung, die von Februar bis April 2001 durchgeführt wurde. Bei der Bruttostichprobe ( $n = 3873$ ) gab es keine qualitätsneutralen Ausfälle (angegebene Straße/Hausnummer nicht auffindbar, Wohnung unbewohnt, keine Person der Zielgruppe im Haushalt). Die systematischen Ausfälle (trotz mehrfacher Versuche niemanden angetroffen, Haushalt verweigert Auskunft, Zielperson trotz mehrfacher Versuche nicht angetroffen, krank/nicht in der Lage für Interview, verreist/im Urlaub oder Verweigerung der Auskunft) betrug  $n = 1560$ . Von den 2313 Personen (Rücklauf: 59,7%) wurden in die vorliegende Untersuchung  $n = 2050$  Personen im Altersbereich zwischen 16 und 79 Jahren einbezogen.

Die in die Studie aufgenommenen Personen wurden von geschulten Interviewern zu Hause aufgesucht und dort befragt (sogenanntes *Computer-assisted personal interview*). Für weitere Einzelheiten siehe JOHN und MICHEELIS (2003). Die Erhebung wurde von dem Marktforschungsinstitut TNS EMNID (Taylor Nelson Sofres-Erforschung der öffentlichen Meinung, Marktforschung, Nachrichten, Informationen, Dienstleistungen) durchgeführt.

Die zweite Stichprobe umfaßte 50 Patienten ( $72,5 \pm 7,4$  Jahre, 66% Frauen) mit Totalprothesen, die an der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor 1–10 Jahren versorgt wurden. Diese Patienten wurden im Rahmen einer

Nachuntersuchung zur Situation ihrer mundgesundheitsbezogenen Lebensqualität befragt. Für weitere Einzelheiten siehe JOHN (1998).

In eine dritte Stichprobe wurden 50 Patienten ( $40,0 \pm 15,4$  Jahre, 69% Frauen) mit einem Behandlungswunsch für ihre Schmerzen im Bereich der Kiefergelenke und der Kaumuskulatur einbezogen. Diese Patienten kamen aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Patienten wurden vor Beginn der Behandlung und nach einem Monat Therapie zur Situation ihrer mundgesundheitsbezogenen Lebensqualität befragt. Für weitere Einzelheiten siehe JOHN (1999).

## 2.2 Oral Health Impact Profile – Deutsche Version (OHIP-G)

Die deutsche Version des *Oral Health Impact Profile* (OHIP-G) umfaßt die 49 Items des englischen Originals (OHIP-E, um es von der deutschen Version abzugrenzen) und 4 zusätzliche Items, die spezifisch für die deutsche Bevölkerung als bedeutend angesehen wurden und nicht im englischen Original enthalten sind (JOHN et al. 2002).

Im englischen Original sind die 49 Items sieben Subskalen zugeordnet. Diese beruhen auf einem (Mund)-Gesundheitsmodell, das die vielfältigen biologischen, verhaltensrelevanten und psychosozialen Auswirkungen oraler Erkrankungen verkörpert (LOCKER 1988).

Die sieben Subskalen des OHIP-E enthalten jeweils eine unterschiedliche Zahl von Items:

- Funktionelle Einschränkungen (Functional limitation, 9 Items);
- Schmerzen (Physical pain, 9 Items);
- Psychisches Unwohlsein/Unbehagen (Psychological discomfort, 5 Items);
- Physische Beeinträchtigung (Physical disability, 9 Items);
- Psychische Beeinträchtigung (Psychological disability, 6 Items);
- Soziale Beeinträchtigung (Social disability, 5 Items);
- Benachteiligung/Behinderung (Handicap, 6 Items).

Alle 49 Fragen, die sich in der deutschen Version auf den Zeitraum des vergangenen Monats beziehen, sind jeweils einer der sieben Skalen zugeordnet. Die vier zusätzlichen deutschen Items sind bisher keiner der sieben englischen Subskalen zugeordnet.

Antwortmöglichkeiten zur Häufigkeit eingeschränkter Lebensqualität können vom Patienten auf einer Mehrstufenskala angegeben werden, die folgende Abstufungen umfaßt: »nie« = 0, »kaum« = 1, »ab und zu« = 2, »oft« = 3 und »sehr oft« = 4. Obwohl unterschiedliche Möglichkeiten zur Berechnung eines OHIP-Gesamtwertes bestehen, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Summe aller 49 Item-Antworthäufigkeiten, die im englischsprachigen Original enthalten sind, als Gesamtwert des OHIP-G eingesetzt (= OHIP-G49).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Prävalenz eingeschränkter mundgesundheitsbezogener Lebensqualität in der Allgemeinbevölkerung

Die Prävalenz eingeschränkter MLQ, die sich auf den Zeitraum des vergangenen Monats bezog, war nicht unerheblich in der nicht-selektierten Allgemeinbevölkerung (Tab. 1). Zwischen 13 %

und 46 % der befragten Probanden gaben Probleme an. Unter den Personen, die herausnehmbaren Zahnersatz haben, waren Probleme, wie *der Zahnersatz sitzt schlecht* oder *der Zahnersatz hat unangenehm gedrückt*, sogar von über der Hälfte der Probanden angegeben worden. Da der Bezugszeitraum einen Monat umfaßte, können diese Probleme als »gegenwärtig« oder »zur Zeit vorliegend« angesehen werden, was die Bedeutung von MLQ als wesentlichen Indikator für den oralen Mundgesundheitszustand unterstreicht.

Tab. 1 Profil der Antworthäufigkeiten für 53 Fragen des deutschen Oral Health Impact Profile (OHIP-

Nr.	Item	Nie 0 %	Kaum 1 %	Ab und zu 2 %	Oft 3 %	Sehr oft 4 %
<b>Funktionelle Einschränkungen</b>						
1	Schwierigkeiten beim Kauen von Nahrungsmitteln	63,0	21,7	11,9	2,3	1,1
2	Schwierigkeiten, bestimmte Worte auszusprechen	79,0	13,6	5,5	1,4	0,5
3	Zahn sieht nicht gesund aus	76,2	14,9	6,2	1,9	0,6
4	Aussehen war beeinträchtigt	78,6	13,4	6,2	1,5	0,3
5	Mundgeruch	61,3	24,0	12,8	1,6	0,3
6	Geschmackssinn beeinträchtigt	76,1	17,0	5,6	1,1	0,2
7	Speisereste zwischen Zähnen oder am Zahnersatz festgesetzt	53,9	17,3	22,9	4,8	1,1
8	Verdauung gestört	73,2	16,2	8,6	1,5	0,5
9	Zahnersatz sitzt schlecht <sup>[1]</sup>	41,1	34,0	18,8	4,4	1,7
<b>Schmerzen</b>						
10	Schmerzen im Mundbereich	72,3	18,1	8,2	1,0	0,4
11	Wunder, entzündeter Kiefer bzw. Mund	73,4	17,8	7,4	1,2	0,2
12	Kopfschmerzen	81,8	12,5	4,7	0,9	0,1
13	Empfindliche Zähne	60,7	21,1	14,9	2,6	0,5
14	Zahnschmerzen	69,2	20,2	9,5	0,8	0,3
15	Zahnfleischschmerzen	67,1	20,6	10,9	1,1	0,2
16	Unangenehm, bestimmte Nahrungsmittel zu essen	73,7	15,9	8,6	1,4	0,4
17	Wunde Stellen im Mund	70,9	18,6	9,4	0,8	0,3
18	Unangenehm drückender Zahnersatz <sup>[1]</sup>	49,1	24,0	24,0	2,0	1,0
<b>Psychisches Unwohlsein/Unbehagen</b>						
19	Sorgen	73,3	17,1	7,8	1,3	0,4
20	Gefühl der Unsicherheit	78,0	15,0	5,8	0,8	0,4
21	Gefühl, daß es einem ganz schlecht geht	82,7	12,7	4,0	0,4	0,1
22	Sich unwohl fühlen wegen des Aussehens der Zähne/ des Zahnersatzes	76,5	16,4	6,0	0,8	0,3
23	Sich angespannt gefühlt	69,6	18,2	9,6	2,5	0,2
<b>Physische Beeinträchtigung</b>						
24	Nur undeutlich sprechen können	83,2	12,2	3,6	1,0	–
25	Andere Leute haben bestimmte Worte mißverstanden	84,0	10,8	3,3	1,6	0,4
26	Eindruck, Essen sei geschmacklich weniger gut	75,4	19,1	4,4	0,8	0,3
27	Zähne nicht richtig putzen können	78,8	14,4	5,6	1,0	0,2
28	Verzichten auf bestimmte Nahrungsmittel	75,6	14,8	8,2	1,1	0,3
29	Unbefriedigende Ernährung	80,3	15,3	3,3	0,7	0,3
30	Nicht mit Zahnersatz essen können <sup>[1]</sup>	65,9	20,8	10,7	2,2	0,4
31	Lächeln vermieden	82,3	11,9	4,6	1,0	0,2
32	Mahlzeiten unterbrechen müssen	82,9	11,9	4,1	0,9	0,2
Nr.	Item	Nie	Kaum	Ab und zu	Oft	Sehr oft

Fortsetzung Tab. 1

	0 %	1 %	2 %	3 %	4 %
<b>Psychische Beeinträchtigung</b>					
33 Schlaf unterbrochen	80,7	14,0	4,3	0,7	0,3
34 Sehr verärgert sein	77,8	15,9	5,2	0,7	0,4
35 Schwierigkeiten, zu entspannen	72,4	17,2	8,4	1,5	0,5
36 Sich bedrückt/depressiv fühlen	80,7	13,6	4,7	0,9	0,2
37 Sich schlechter konzentrieren können	79,9	14,3	4,3	1,2	0,2
38 Sich ein wenig verlegen fühlen	80,0	13,8	5,8	0,3	0,1
<b>Soziale Beeinträchtigung</b>					
39 Vermieden, außer Haus zu gehen	87,0	9,4	3,0	0,5	0,1
40 Weniger nachsichtig im Umgang mit Ehepartner/ Familie	81,5	12,3	5,3	0,6	0,3
41 Allgemein Schwierigkeiten, mit anderen Menschen zurechtzukommen	77,9	16,9	4,0	1,0	0,2
42 Anderen Menschen gegenüber eher reizbar sein	79,0	12,5	7,3	0,9	0,3
43 Es ist schwergefallen, den alltäglichen Beschäftigungen nachzugehen	81,2	13,7	4,2	0,6	0,3
<b>Benachteiligung/Behinderung</b>					
44 Verschlechterte Allgemeingesundheit	69,1	20,7	7,7	1,6	0,8
45 Finanzielle Einbußen	74,6	16,1	7,1	1,7	0,6
46 Gesellschaft anderer Menschen nicht so recht genießen können	80,6	13,1	5,1	0,7	0,5
47 Leben ganz allgemein weniger zufriedenstellend	72,7	18,1	7,4	1,1	0,7
48 Vollkommen unfähig sein, etwas zu tun	85,8	10,8	2,6	0,7	0,1
49 Bei der Arbeit nicht so leistungsfähig sein wie üblich	79,8	12,6	5,9	1,2	0,6
<b>Zusätzliche deutsche Items, die nicht im englischen OHIP enthalten sind</b>					
50 Es vermieden haben, mit anderen Personen gemeinsam zu essen	87,4	8,7	3,1	0,9	–
51 Es hat länger gedauert, eine Mahlzeit zu beenden	81,4	11,2	6,4	0,8	0,2
52 Störendes Geräusch im Kiefergelenk	85,9	9,5	3,8	0,6	0,2
53 Unangenehm trockener Mund	70,2	19,1	8,8	1,6	0,3

[1] Prävalenz bezieht sich auf Personen mit herausnehmbarem Zahnersatz.

### 3.2 Eingeschränkte mundgesundheitsbezogene Lebensqualität in spezifischen Patientenpopulationen: Patienten mit Totalprothesen

Patienten mit Totalprothesen wurden in Gruppen aufgeteilt. Die Mehrheit der Patienten ( $n = 34$ ) wies kaum wesentliche Probleme im Kausystem auf. Lediglich die Dimensionen *funktionelle Einschränkungen* und *orofaziale Schmerzen* waren etwas stärker beeinträchtigt als die Dimensionen des psychosozialen Bereiches (Abb. 2).

Eine zweite Gruppe von Patienten ( $n = 16$ ) wies funktionelle Einschränkungen auf, deren Ausmaß als klinisch relevant eingeschätzt wurde (Abb. 3). Diese Patienten konnten weiter in Patienten mit psychosozialer Beeinträchtigung und ohne eingeteilt werden. Patienten mit einem wesentlichen Ausmaß von Problemen waren selten.

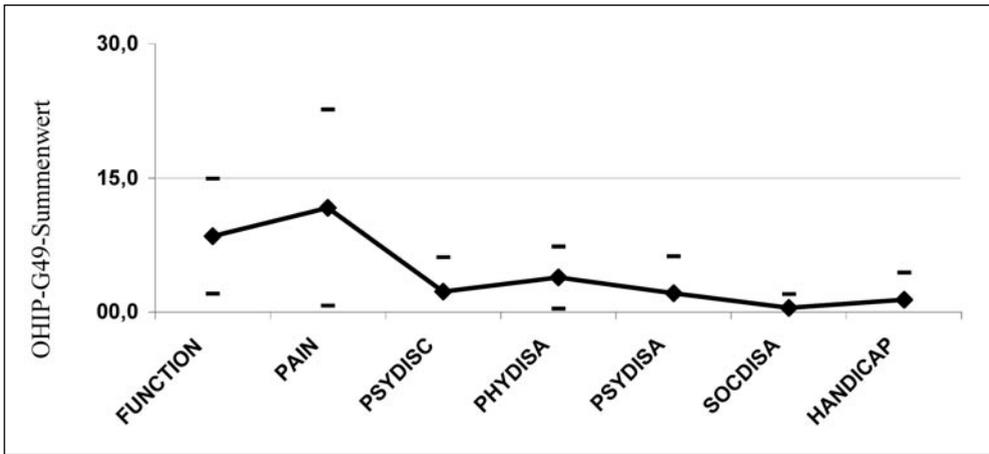


Abb. 2 Profil der Dimensionen mundgesundheitsbezogener Lebensqualität entsprechend dem OHIP-E (SLADE and SPENCER 1994) in 34 der insgesamt 50 Patienten, die mit Totalprothesen versorgt wurden

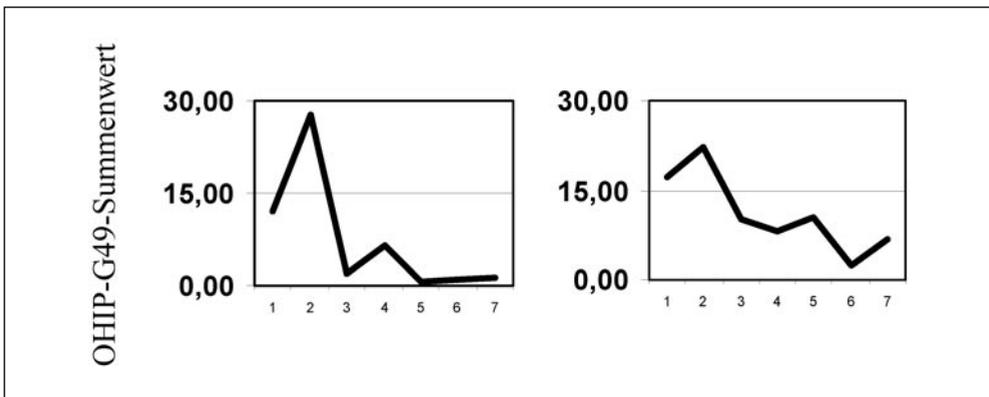


Abb. 3 Profil der Dimensionen mundgesundheitsbezogener Lebensqualität entsprechend dem OHIP-E (SLADE und SPENCER 1994) in 8 Patienten mit stärkeren funktionellen Beeinträchtigungen und orofazialen Schmerzen (A) und 8 Patienten mit funktionellen Beeinträchtigungen und orofazialen Schmerzen und psychosozialen Problemen (B)

### 3.3 Eingeschränkte mundgesundheitsbezogene Lebensqualität in spezifischen Patientengruppen: Patienten mit Schmerzen in der Kaumuskulatur und den Kiefergelenken

Patienten mit Schmerzen in den Kiefergelenken und der Kaumuskulatur waren durch wesentlich mehr Probleme als Patienten mit Totalprothesen gekennzeichnet (Abb. 4). Der OHIP-Summenwert von 44,9 für die Gruppe von 50 Patienten vor der Behandlung zeigte eine wesentliche Beeinträchtigung der Patienten (der OHIP-Summenwert kann von 0 bis 196 reichen). Dieser Wert verringerte sich jedoch nach einer einmonatigen Behandlung auf fast die Hälfte des Anfangsniveaus ( $P < 0,001$ , gepaarter t-Test), d. h., infolge der Therapie der orofazialen Schmerzen hat die Lebensqualität zugenommen.

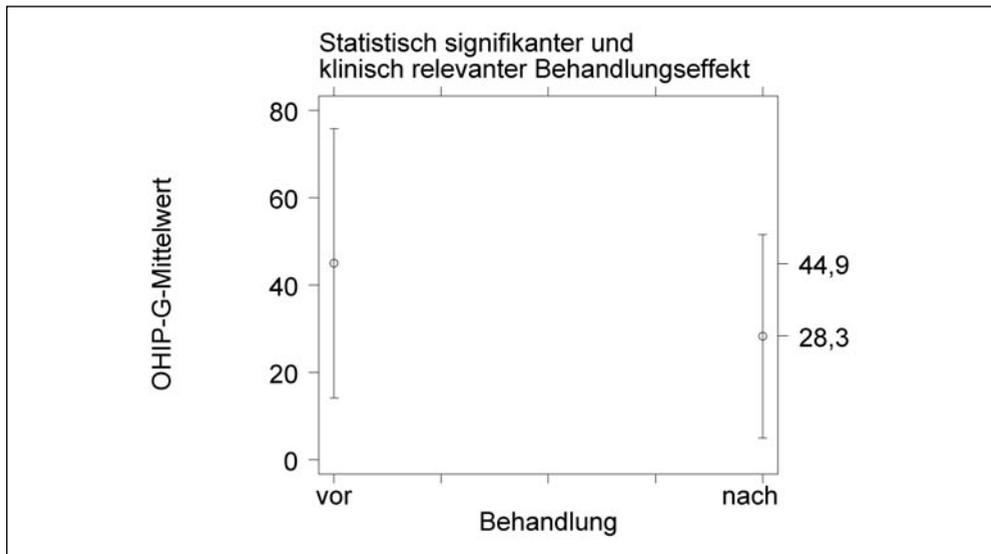


Abb. 4 50 Patienten mit Schmerzen in den Kiefergelenken und in der Kaumuskulatur (schmerzhafte kraniomandibuläre Dysfunktionen) – Ausmaß der mundgesundheitsbezogenen Lebensqualität vor und nach der Behandlung (Zeitraum eines Monats)

## 4. Diskussion

### 4.1 Häufigkeit von Beeinträchtigungen im Kausystem

*Allgemeinbevölkerung:* Unsere Ergebnisse zeigten, daß Symptome oraler Erkrankungen bzw. Einschränkungen durch orale Erkrankungen häufig sind. Hauptfunktionen des stomatognathen Systems wie Kauen, Sprechen und Aussehen waren nicht unwesentlich in der Allgemeinbevölkerung eingeschränkt. Die Prävalenz funktioneller Einschränkungen war auch in anderen internationalen Untersuchungen hoch (FOERSTER et al. 1998). Andere Untersuchungen in Deutschland beschrieben ebenfalls eine nicht unbeträchtliche Prävalenz von Symptomen oraler Erkrankungen. In der zweiten *International Collaborative Study* wurde gefunden, daß 65 % der Erwachsenen in der Altersgruppe 35–44 Jahre und 67 % der Probanden in der Altersgruppe 65–74 Jahre über ein oder mehrere Symptome von Mund- und Kieferkrankheiten berichteten (CHEN et al. 1997). Psychosoziale Probleme waren nicht so häufig.

*Klinische Patienten:* Untersuchungen zur MLQ in spezifischen Patientenpopulationen sind nicht häufig. Unsere Untersuchung an Patienten mit orofazialen Schmerzen läßt sich am besten mit der Studie von MURRAY et al. (1996) vergleichen. Dort wurden Patienten mit »kraniofazialen« Schmerzen untersucht, eine Patientengruppe, die ähnlich unseren Patienten mit kraniomandibulären Dysfunktionen (CMD) ist. Kraniomandibuläre Dysfunktionen waren mit weniger Beeinträchtigungen verbunden als kraniofaziale Schmerzen. Unsere CMD-Patienten wiesen zwar mehr funktionelle Einschränkungen auf, aber in den Skalen, die psychosoziale Bereiche charakterisieren, waren weit weniger Probleme vorhanden als bei Patienten mit kraniofazialen Schmerzen.

Für Patienten mit Totalprothesen waren funktionelle Einschränkungen ein größeres Problem als Beeinträchtigungen im psychosozialen Bereich. Obwohl unsere Untersuchung eine Nachuntersuchung ist und sich damit nur begrenzt mit anderen Studien vergleichen läßt, die MLQ vor bzw. in der Regel unmittelbar nach der Therapie erfaßt haben, stimmen die Profile unserer Untersuchung, welche Dimensionen der Lebensqualität besonders betroffen sind, mit Literaturangaben überein. Literaturangaben bestätigen, daß funktionelle Einschränkungen und orofaziale Schmerzen bei Patienten mit Totalprothesen die Dimensionen sind, die am stärksten betroffen sind (AWAD et al. 2000, ALLEN et al. 2001).

#### 4.2 MLQ als die »zweite Dimension« des Mundgesundheitszustandes

MLQ charakterisiert die subjektive, vom Probanden/Patienten wahrgenommene Seite des Mundgesundheitszustandes. Wird traditionell der Mundgesundheitszustand durch klinische Indizes (z. B. für Karies, parodontale Erkrankungen oder funktionelle Erkrankungen des Kau-systems) beschrieben, sind doch diese klinischen Indikatoren nur ein Aspekt. Im wesentlichen ist für alle Erkrankungen eine mehrdimensionale Betrachtung zu fordern, ähnlich wie sie für kranio-mandibuläre Dysfunktionen (CMD), eine Erkrankungsgruppe der Kiefergelenke und der Kaumuskulatur, vorgeschlagen wird.

Die *Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders* (DWORKIN et al. 1992) sind das international anerkannte mehrdimensionale System zur Erhebung von CMD. Dieses Diagnose- und Klassifikationssystem wird in Deutschland vom Arbeitskreis Epidemiologie und Public Health in der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde für epidemiologische Untersuchungen (JOHN 2001) und von der Deutschen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes für die klinische Untersuchung von Patienten mit CMD empfohlen (TÜRPEL et al. 2000). Das Diagnosesystem umfaßt zwei »Achsen« in der Befunderhebung. In der ersten Achse sind physische Befunde wie Palpations- und Bewegungsschmerzen der Kaumuskulatur und der Kiefergelenke, Kiefergelenkgeräusche und Bewegungsumfang des Unterkiefers enthalten, die dann zu Diagnosen zusammengefaßt werden. In einer zweiten Achse werden psychologische Befunde wie Grundstimmung und Somatisierung, aber auch Einschränkungen von täglichen Aktivitäten des Kau-systems und schmerzbezogene Beeinträchtigungen allgemeiner täglicher Aktivitäten erhoben. Die »Achse 2-Befunde« liefern komplementäre, oft nicht aus den klinischen Symptomen ableitbare Informationen.

Für die weiter verbreiteten oralen Erkrankungen Karies und Parodontopathien hat sich bisher diese zweidimensionale Betrachtungsweise noch nicht durchgesetzt. Sie ist jedoch zu empfehlen, da hier ebenso wie bei kranio-mandibulären Dysfunktionen klinische Befunde nur schwach mit der subjektiven Wahrnehmung des Patienten übereinstimmen, psychosoziale Auswirkungen der Erkrankungen jedoch nicht selten sind, wie diese Untersuchung zeigt. MLQ hat das Potential, die »zweite Dimension« für viele orale Erkrankungen zu sein.

#### 4.3 Anwendbarkeit der Ergebnisse zur mundgesundheitsbezogenen Lebensqualität

Die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse ist vielschichtig. In Deutschland ist das Interesse an mundgesundheitsbezogener Lebensqualität in den letzten Jahren stetig gewachsen (JOHN und MICHEELIS 2000). Drei grundsätzliche Anwendungsbereiche werden beschrieben: praktische, theoretische und gesundheitspolitische Anwendungen (LOCKER 1996). In der klinischen Praxis können subjektive Mundgesundheitsindikatoren bei der klinischen Entscheidungsfin-

dung helfen, wenn unterschiedliche Therapievarianten vorliegen und Aufwand-Nutzen- bzw. Aufwand-Kosten-Beziehungen analysiert werden. Qualitätssicherung ist ein weiteres Anwendungsgebiet. MLQ-Instrumente sind unverzichtbar in der zahnmedizinischen Forschung und nützlich in Studien angrenzender Fachgebiete. Lebensqualitätsforschung trägt weiterhin zum Verständnis von Folgen oraler Erkrankungen und des Zusammenhanges von Mundgesundheit und allgemeinem Wohlbefinden bei. Gesundheitspolitische Anwendungen vervollständigen ein weites Potential von Anwendungsmöglichkeiten von MLQ-Instrumenten, insbesondere des OHIP-G.

### Dank

Wir danken dem Vorstandsausschuß des Instituts der Deutschen Zahnärzte (IDZ), einer gemeinsamen Forschungseinrichtung von Bundeszahnärztekammer (BZÄK) und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung, für die Bereitstellung der erforderlichen Finanzmittel, um dieses Projektvorhaben zu realisieren. Der Basistext zu den Ergebnissen der bevölkerungsrepräsentativen Studie des OHIP-Fragebogens zu Prävalenz und Normierung von eingeschränkter Mundgesundheitsbezogener Lebensqualität in Deutschland ist im IDZ-Informationdienst unter der Nr. 1/2003 am 15. 1. 2003 erschienen (ISSN 0931-9816).

### Literatur

- ADULYANON, S., and SHEIHAM, A.: Oral impacts on daily performances. In: SLADE, G. D. (Ed.): *Measuring Oral Health and Quality of Life*; pp. 151–160. Chapel Hill: University of North Carolina, Department of Dental Ecology 1997
- ALLEN, P. F., McMILLAN, A. S., and LOCKER, D.: An assessment of sensitivity to change of the Oral Health Impact Profile in a clinical trial. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 29, 175–182 (2001)
- ALLEN, P. F., McMILLAN, A. S., WALSHAW, D., and LOCKER, D.: A comparison of the validity of generic- and disease-specific measures in the assessment of oral health-related quality of life. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 27, 344–352 (1999)
- ATCHISON, K. A., and DOLAN, T. A.: Development of the Geriatric Oral Health Assessment Index. *J. Dent. Educ.* 54, 680–687 (1990)
- AWAD, M. A., LOCKER, D., KORNER-BITENSKY, N., and FEINE, J. S.: Measuring the effect of intra-oral implant rehabilitation on health-related quality of life in a randomized controlled clinical trial. *J. Dent. Res.* 79, 1659–1663 (2000)
- CHEN, M., ANDERSEN, R. M., BARMES, D. E., LECLERCQ, M.-H., and LYTTLE, C. S.: *Comparing Oral Health Care Systems – A Second International Collaborative Study*. Geneva: World Health Organization 1997
- CUSHING, A. M., SHEIHAM, A., and MAIZELS, J.: Developing socio-dental indicators—the social impact of dental disease. *Community Dent. Health* 3, 3–17 (1986)
- DWORKIN, S. F., and LERESCHE, L.: Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. *J. Craniomandib. Disord.* 6, 301–355 (1992)
- FOERSTER, U., GILBERT, G. H., and DUNCAN, R. P.: Oral functional limitation among dentate adults. *J. Public Health Dent.* 58, 202–209 (1998)
- JOHN, M.: Lebensqualität bei Patienten mit Totalprothesen. Symposium der DGZPW, Gotha (1998)
- JOHN, M.: Mehrdimensionaler Therapieerfolg für schmerzhaft kranio-mandibuläre Dysfunktionen (CMD). *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 54, 391–394 (1999)
- JOHN, M.: Epidemiologie kranio-mandibulärer Dysfunktionen. In: SCHIFFNER, U., REICH, E., MICHEELIS, W., und KERSCHBAUM, T. (Eds.): *Methodische Empfehlungen und Forschungsbedarf in der oralen Epidemiologie*. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 56, 411–414 (2001)
- JOHN, M., und MICHEELIS, W.: *Lebensqualitätsforschung in der Zahnmedizin: Konzepte, Erfahrungen und Perspektiven*. Köln: Institut der Deutschen Zahnärzte (Institute of German Dentists) 2000
- JOHN, M., und MICHEELIS, W.: *Mundgesundheitsbezogene Lebensqualität in der Bevölkerung: Grundlagen und Ergebnisse des Oral Health Impact Profile (OHIP) aus einer repräsentativen Stichprobe in Deutschland*. Köln: Institut der Deutschen Zahnärzte 2003
- JOHN, M. T., PATRICK, D. L., and SLADE, G. D.: The German version of the Oral Health Impact Profile – translation and psychometric properties. *Eur. J. Oral Sci.* 110, 425–433 (2002)
- KRESSIN, N. R.: Associations among different assessments of oral health outcomes. *J. Dent. Educ.* 60, 501–507 (1996)

- LEAO, A., and SHEIHAM, A.: The development of a socio-dental measure of dental impacts on daily living. *Community Dent. Health* 13, 22–26 (1996)
- LOCKER, D.: Measuring oral health: A conceptual framework. *Community Dent. Health* 5, 3–18 (1988)
- LOCKER, D.: Applications of self-reported assessments of oral health outcomes. *J. Dent. Educ.* 60, 494–500 (1996)
- MCGRATH, C., and BEDI, R.: An evaluation of a new measure of oral health related quality of life–OHQoL-UK(W). *Community Dent. Health* 18, 138–143 (2001)
- MURRAY, H., LOCKER, D., MOCK, D., and TENENBAUM, H. C.: Pain and the quality of life in patients referred to a craniofacial pain unit. *J. Orofac. Pain* 10, 316–323 (1996)
- PATRICK, D. L., and ERICKSON, P.: *Health Status and Health Policy – Quality of Life in Health Care Evaluation and Resource Allocation*. New York: Oxford University Press 1993
- SLADE, G. D., and SPENCER, A. J.: Development and evaluation of the Oral Health Impact Profile. *Community Dent. Health* 11, 3–11 (1994)
- SLADE, G. D., STRAUSS, R. P., ATCHISON, K. A., KRESSIN, N. R., LOCKER, D., and REISINE, S. T.: Conference summary: assessing oral health outcomes–measuring health status and quality of life. *Community Dent. Health* 15, 3–7 (1998)
- STRAUSS, R. P., and HUNT, R. J.: Understanding the value of teeth to older adults: influences on the quality of life. *J. Amer. Dent. Assoc.* 124, 105–110 (1993)
- TÜRPEL, J. C., JOHN, M., NILGES, P., and JÜRGENS, J.: Schmerzen im Bereich der Kaumuskulatur und Kiefergelenke. *Der Schmerz* 14, 416–428 (2000)
- WARE, J. E., SNOW, K. K., KOSINSKI, M., and GANDECK, B.: *SF-36 health survey: Manual and interpretation guide*. Boston, MA: The Health Institute, New England Medical Center 1993
- WHOQOL Group*: Study protocol for the World Health Organization project to develop a Quality of Life assessment instrument (WHOQOL). *Qual. Life Res.* 2, 153–159 (1993)

Dr. Mike JOHN  
Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und  
Werkstoffkunde  
Universität Leipzig  
Nürnberger Straße 57  
04103 Leipzig  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel: +49 341 9721 363  
Fax: +49 341 9721 309  
E-Mail: mike.john@medizin.uni-leipzig.de

Dr. Wolfgang MICHEELIS, Dipl.-Sozialw.  
Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ)  
Universitätsstraße 73  
50931 Köln  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel: +49 221 4001140  
Fax: +49 221 404886  
E-Mail: w.micheelis@kzbv.de

## **Bildgebung und Tumorheilung**

*Leopoldina-Symposium*

vom 16. bis 17. Mai 2003 in Leipzig

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 89, Nr. 337

Herausgegeben von Thomas HERRMANN (Dresden) und Friedrich KAMPRAD (Leipzig)

(2004, 180 Seiten, 48 Abbildungen, 11 Tabellen, 23,80 Euro,

ISBN 3-8047-2096-X)

Verfahren der Bildgebung sind von großer Aktualität in der Medizin, vor allem in der Tumorbehandlung. Die Computertechnologie erlaubt heute diagnostische Einblicke, die noch vor wenigen Jahren undenkbar waren. Die Fortschritte in der Technik vollziehen sich mit so atemberaubendem Tempo, daß die Studien zum klinischen Nutzen der verschiedenen Verfahren, die zeitaufwendig und kostenintensiv sind, kaum mithalten können. Der Band versucht daher, Anwendungsmöglichkeiten und Einsatzgrenzen der modernen bildgebenden Verfahren für die medizinische Praxis auszuleuchten. Die »Bilderflut aus dem Körper« wird geordnet und die Aussagefähigkeit der einzelnen Methoden systematisiert. Behandelt werden u. a. Computertomographie (CT), Positronenemissionstomographie (PET), Magnetresonanztomographie (MRT) und Magnetresonanzspektroskopie (MRS). Ein Schwerpunkt ist den Anforderungen und Fragestellungen gewidmet, die von den tumorbehandelnden Fächern an die Bildgebung gestellt werden. Die Darstellung und Interpretation von Tumorstrukturen wird sowohl mit bildgebenden Verfahren aus Radiologie und Nuklearmedizin als auch mit Verfahren der Pathologie behandelt. Außerdem werden Zusammenhänge von Tumormasse und Tumorkontrolle bzw. von gewebespezifischer Bildgebung und Tumorheilung erörtert sowie Verfahren der interventionellen Radiologie dargestellt. Einen weiteren Schwerpunkt bilden Überlegungen zur Indikation der einzelnen Verfahren und zur Kosten-Nutzen-Problematik. Es wird diskutiert, welchen Gewinn die verbesserte Primärdiagnostik von Tumoren für den Patienten bringt und wie sich die verbesserte Diagnostik des Rezidivs auf dessen Therapie auswirkt. Dabei werden auch offene Fragen angesprochen, etwa bei der Erfassung postoperativ zurückbleibender Tumoranteile oder bei der Lokalisation von Lymphknotenmetastasen in verschiedenen Körperregionen bzw. bei Unterscheidung der Patienten in Responder oder Nicht-Responder in therapeutischen Maßnahmen. Der Band zeigt, daß man in der Tumorbehandlung von der Weiterentwicklung der bildgebenden Verfahren vor allem differenzierte Aussagen erwartet: über den Wert entsprechender therapeutischer Varianten für die Heilung oder ein palliativ symptomatisches Vorgehen, wenn eine belastende »kurative« Therapie überflüssig und letztendlich nicht erfolgreich sein wird.

*In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*

## Teilnehmer

- BAKOWSKY, Dr. Udo, Saarbrücken  
BAKOWSKY, Heike, Eisleben  
BEHREND, Dr. Oliver, Sydney  
BRÜSER, Dr. Thomas, Halle (Saale)  
BÜCHEL, Prof. Dr. Karl Heinz, Leverkusen  
BÜRGER, Dr. Antje, Hannover  
BÜRGER, Dr. Martin, Hannover  
CLAUSING, PD Dr. Andreas, Halle (Saale)  
DATHE, Dr. Margitta, Berlin  
DISTLER, Dr. Oliver, Zürich  
ENDERS, Dr. Peter, Berlin  
FISCHER, Prof. Dr. Gunter S., Halle (Saale)  
FRISCHKORN, Dr. Christian, Berlin  
GROSS, Prof. Dr. Hans, Berlin  
HADRY, Dr. Thorsten, Braunschweig  
HAGEMANN, Prof. Dr. Rudolf, Halle (Saale)  
HAHN, Dr. Christine, Erlangen  
HARTWIG, Dr. Werner, Heidelberg  
HOFMANN, Prof. Dr. Eberhard, Leipzig  
JANASEK, Dr. Dirk, London  
JOCHUM, Dr. Christoph, Essen  
JOHN, Dr. Mike, Halle (Saale)  
JUNGNICKEL, Dr. Berit, München  
KIRCHHOFF, Dr. Jan H., Frankfurt (Main)  
KLÖTZLER, Prof. Dr. Rolf, Leipzig  
KÖNIG, Dr. Stephan, Halle  
KORTE, Dr. Christoph, Bochum  
KÜHRT, Dr. Ekkehard, Berlin  
LANDFESTER, Dr. Katharina, Berlin  
MÄDLER, Dr. Burkhard, Vancouver  
MAIER, Dr. Olaf, Groningen  
MEYER, Dr. Volker, Essen  
MÖSSNER, Prof. Dr. Joachim, Leipzig
- MÜLLER, Dr. Karsten, Leipzig  
NOFFKE, Prof. Dr. Nora, Norfolk  
OSTARECK-LEDERER, Dr. Antje, Heidelberg  
OSTARECK, Dr. Dirk H., Halle (Saale)  
PARTHIER, Prof. Dr. Dr. h. c. Benno, Halle (Saale)  
PETERSEN, Dr. Holger, Stuttgart  
PORZEL, Dr. Andrea, Halle (Saale)  
REMANE, PD Dr. Horst, Halle (Saale)  
RENNEKAMP, Prof. Dr. Reinhold, Dresden  
RIEDEL, Dr. Roland, Halle (Saale)  
RINKWITZ, Dr. Silke, Braunschweig  
RUDOLF, Dr. Jan, Magdeburg  
SCHALLEY, Dr. Christoph A., Bonn  
SCHMIDT-KÜNTZEL, RD Dr. Benno, Bonn  
SCHMITZ, Prof. Dr. Ernst, Berlin  
SCHNITZER-UNGEFUG, Prof. Dr. Jutta, Halle (Saale)  
SCHROTH, Prof. Dr. Werner, Halle (Saale)  
SCHUBERT, Prof. Dr. Rudolf, Halle (Saale)  
SCHWAB, Dipl.-Math. Karin, Jena  
SCHWAB, Prof. Dr. Max, Halle (Saale)  
SCHWAB, Dr. Matthias, Jena  
SEIWER, Bettina  
TAUBE, Prof. Dr. Rudolf, Merseburg  
UHLMANN, Dr. Dirk, Leipzig  
VOGEL, PD Dr. Nadeshda, Chemnitz  
WERDAN, Prof. Dr. Karl, Halle (Saale)  
WINKLER, Dr. Eckart, Leipzig  
WINTERFELDT, Prof. Dr. Dr. h.c. Ekkehard, Isernhagen  
WOLF, Dr. Bodo, Dresden

## **Epithelial Transport of Ions in Health and Disease**

*Leopoldina-Symposium*

vom 19. bis 22. März 2003 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 89, Nr. 336

Herausgegeben von Irene SCHULZ (Homburg) und

Gerrit ISENBERG (Halle/Saale)

(2004, 184 Seiten, 40 Abbildungen, 4 Tabellen,

21,80 Euro, ISBN 3-8047-2169-9)

Die Transporte von Elektrolyten, organischen Substanzen und Stoffwechselprodukten in Zellen des menschlichen Organismus sind sehr fein regulierte Prozesse und dienen zur Aufrechterhaltung seines inneren Milieus, der Energiezufuhr und der Ausscheidung von Endprodukten. Fehlfunktionen der Stofftransporte können zu Krankheiten führen. Proteine, die diese Stoffe durch die Zellmembran schleusen, sind Kanäle, Poren oder Transporter, die seit mehr als 700 Millionen Jahren von primitiven Organismen (z. B. der Hefe) bis zum Menschen in der Evolution erhalten geblieben sind. Allerdings können Mutationen in den Genen für transportierende Proteine zu vererbaren Krankheiten, wie z. B. der Mukoviszidose, führen. Der Band über das in Zusammenarbeit von Leopoldina und der »International Union of Physiological Sciences« durchgeführte Symposium diskutiert neueste Erkenntnisse über molekulare Ursachen von Erbkrankheiten, die auf Defekten von Transportproteinen beruhen, sowie die Grundlagen physiologischer und patho-physiologischer Funktionen von Transportproteinen, die für neue Therapieansätze wichtig sein können. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfaßt.

*In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*