



PD Dr. rer. nat. Stefan Schildknecht

Universität Konstanz, Fachbereich Biologie
Postfach M657
Universitätsstr. 10
78457 Konstanz

Tel.: 07531 885053

Mobil: 0162 8128477

E-mail: Stefan.Schildknecht@uni-konstanz.de

Name des Preises: Young Scientists Toxicology Award

Titel: Etablierung von LUHMES als Zellmodell menschlicher Dopamin-Neurone

VORNAME NAME: Stefan Schildknecht

INSTITUT/ORGANISATION: Universität Konstanz

Dr. Stefan Schildknecht erhielt den Young Scientists Toxicology Award 2014 für seine Arbeiten im Rahmen der Etablierung eines zellulären Modells mit dem die wesentlichen Vorgänge der Neurodegeneration von Dopamin-Neuronen bei der Parkinson Erkrankung in einem *in vitro* System nachgestellt werden können. Die hierbei generierte LUHMES Zell-Linie basiert auf menschlichen immortalisierten neuronalen Zellen aus dem Mittelhirn, die innerhalb einer Woche in postmitotische Nervenzellen mit dopaminergem Phänotyp ausdifferenziert werden können. Um ein breites Anwendungsspektrum der LUHMES zu erlauben, wurde für genetische Manipulationen der Zellen ein lentivirales System optimiert, das durch seine Kassettenstruktur eine hohe Flexibilität gewährleistet. Mit Hilfe dieses Systems wurden LUHMES Subklone generiert, die z.B. das in der Parkinson Erkrankung wichtige Protein Alpha Synuclein, oder in Mitochondrien lokalisiertes Fluoreszenzprotein überexprimieren, mit dessen Hilfe z.B. die Bewegung von Mitochondrien in den Neuriten lebender Zellen verfolgt werden kann. Eine grundlegende Anforderung an das LUHMES Modell bestand von Beginn an darin, die wesentlichen pathophysiologischen Prozesse, die aus *in vivo* Untersuchungen bekannt sind, widerzuspiegeln. Damit kommt dem chemischen Auslöser, welcher experimentell zur Induktion der Neurodegeneration verwendet wird,

besondere Bedeutung zu. Im Tiermodell hat sich MPTP als geeigneter Giftstoff etabliert, welcher diese Kriterien erfüllt. MPTP wird in Astrozyten in die aktive Form MPP⁺ umgewandelt. Um realitätsnahe Bedingungen in Bezug auf die MPTP Umwandlung zu erlauben und gleichzeitig die komplexen Interaktionen zwischen Nervenzellen und Gliazellen in einem *in vitro* Modell zu integrieren, wurde ein Co-Kultur Modell aus LUHMES und Astrozyten entwickelt. Während die Behandlung von reinen LUHMES Kulturen mit MPTP keinen Effekt zeigte, kann in der Co-Kultur mit Astrozyten eine Degeneration der LUHMES nach MPTP Gabe beobachtet werden. Die MPTP Umwandlung findet in Astrozyten interessanterweise im Zytosol statt, verursacht hier aber keine nennenswerte Schädigung. Obwohl diese Beobachtung schon lange bekannt und das MPTP Modell weit verbreitet ist, konnte hierfür bisher keine überzeugende Erklärung gefunden werden. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde gezeigt, dass der Export der MPTP Metabolite über eine instabile Zwischenstufe abläuft, die im Gegensatz zum Endprodukt MPP⁺ keine Ladung trägt und somit ohne Hilfe von Transportern passiv die Zellmembran überqueren kann. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Bedingungen im extrazellulären Milieu (pH, O₂-Partialdruck, eisenhaltige Proteine) die nichtenzymatische Umsetzung des Zwischenproduktes in MPP⁺ fördern. Sie begünstigen die extrazelluläre Bildung von MPP⁺ im Gehirn, welches dann über den Dopamintransporter in dopaminerge Neuronen aufgenommen wird und zu deren selektiver Degeneration führt.

Literatur:

[1] Schildknecht S, Pörtl D, Nagel DM, Matt F, Scholz D, Lotharius J, Schmiege N, Salvo-Vargas A, Leist M. (2009).

Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium to human cells.
Toxicol Appl Pharmacol. 241(1):23-35.

[2] Scholz D, Pörtl D, Genewsky A, Weng M, Waldmann T, Schildknecht S, Leist M. (2011).

Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line.
J Neurochem. 119(5):957-71.

[3] Schildknecht S, Pape R, Müller N, Robotta M, Marquardt A, Bürkle A, Drescher M, Leist M. (2011).

Neuroprotection by minocycline caused by direct and specific scavenging of peroxynitrite.
J Biol Chem. 286(7):4991-5002.

[4] Schildknecht S, Karreman C, Pörtl D, Efremova L, Kullmann C, Gutbier S, Krug A, Scholz D, Gerding H, Leist M, Schildknecht S. (2013).

Generation of genetically-modified human differentiated cells for toxicological tests and the study of neurodegenerative diseases.
ALTEX. 30(4):427-444

[5] Schildknecht S, Gerding HR, Karreman C, Drescher M, Lashuel HA, Outeiro TF, Di Monte DA, Leist M. (2013).

Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies. J Neurochem. 125(4):491-511. Review

[6] Krug AK, Gutbier S, Zhao L, Pörtl D, Kullmann C, Ivanova V, Förster S, Jagtap S, Meiser J, Leparo G, Schildknecht S, Adam M, Hiller K, Farhan H, Brunner T, Hartung T, Sachinidis A, Leist M. (2014).

Transcriptional and metabolic adaptation of human neurons to the mitochondrial toxicant MPP(+). Cell Death Dis. 2014 May 8;5:e1222. doi: 10.1038

Curriculum Vitae

Stefan Schildknecht, PhD

Born: October 23rd 1976 in Stuttgart

Nationality: German

Address: Reutestr. 92A, 78467 Konstanz, Germany

E-mail: Stefan.Schildknecht@uni-konstanz.de

Professional Training

12/2013	Habilitation “The Janus face of peroxynitrite: intracellular messenger and toxic species”, Venia legendi in Pharmacology and Toxicology
11/2013	Baden-Württemberg Zertifikat für Hochschuldidaktik
since 03/2007	Junior research group leader at the Chair of In vitro Toxicology and Biomedicine, Prof. Dr. Marcel Leist, University of Konstanz. Focus on the regulatory role of free radicals in neurodegeneration
02/2006–02/2007	Postdoctoral research associate, Vascular Biology Unit, Prof. Dr. Richard Cohen, Boston University
08/2005-02/2006	Post-doctoral fellow, Biological Chemistry, Prof. Dr. Volker Ullrich, University of Konstanz
12/2002-07/2005	Member of the graduate school “Biochemische Pharmakologie”
05/2002-07/2005	PhD thesis “Redoxregulation of Prostanoid Biosynthesis”, Biological Chemistry, Prof. Dr. Volker Ullrich, University of Konstanz (<i>summa cum laude</i>). Focus on the regulatory role of free radicals in the cardiovascular system.
10/2001- 05/2002	Diploma Thesis “Verhalten von Glattmuskelzellen unter Entzündungsbedingungen“, Biological Chemistry, Prof. Dr. Volker Ullrich, University of Konstanz (average grade 1.3)
10/1997 – 09/2001	Studies of Biology, University of Konstanz
1996-1997	Military service, ABC-Abw. Btl. 210, Sonthofen
1996	Abitur, average grade 1.3