

Aus dem Zentrum der Physiologie des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Institut für Kardiovaskuläre Physiologie
(Kommissarische Leitung Frau Prof.Dr.I.Fleming)

Die Rolle der NADPH-Oxidase bei der Blut-
Hirnschrankenstörung nach experimenteller cerebraler Ischämie
in der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
vorgelegt von

Peter Lüdike
aus Marbach am Neckar

Frankfurt am Main 2008

Dekan	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. RP. Brandes
Korreferent:	PD Dr. T. Neumann-Haefelin

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2008

Meiner Familie in ewiger Dankbarkeit

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Der Schlaganfall.....	7
1.1.1 Die cerebrale ischämische Durchblutungsstörung.....	8
1.1.2 Die Penumbra.....	11
1.2 Reaktive Sauerstoff Spezies- ROS.....	12
1.2.1 Struktur und Funktion der NADPH-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat).....	14
1.2.2 Weitere Mitglieder der NADPH-Oxidase- Familie.....	19
1.2.3 Regulation und Rolle der vaskulären NADPH-Oxidase als Quelle von oxidativem Stress in der Gefäßwand.....	21
1.3 Die Bluthirnschranke- Aufbau und Funktion.....	22
1.4 Ziele der Studie.....	29
2. TIERE UND METHODEN	30
2.1 Tiere.....	30
2.1.1 Arteria cerebri media Occlusionsmodel.....	30
2.1.2 Reperfusion nach transienter fokaler Ischämie.....	33
2.2 Histologische Bestimmung des Infarktvolumens und der Ödemausdehnung mittels Triphenyltetrazolium-Chlorid-Färbung.....	34
2.2.1 Präparation der Mäusegehirne zur Infarktvolumen Bestimmung.....	34
2.3.1 Fluoreszenzspektrophotometrische Bestimmung des Evans-Blau Extravasats.....	37
2.4 Untersuchung der Bluthirnschrankenpermeabilität <i>in vitro</i>	38
2.4.1 Zell Kultur.....	39
2.4.2 Effekt von H ₂ O ₂ auf die Funktion von cerebralen Endothelzellen <i>in vitro</i> mit Hilfe des Electric Cell-Substrate Impedance Sensing- ECIS.....	39
2.4.3 <i>in vitro</i> Ischämie/Reperfusion.....	41
2.5 Statistische Analysen.....	42
3. ERGEBNISSE.....	43
3.1 gp91phox -/- und p47phox-/- Mäuse entwickeln nach fokaler cerebraler Ischämie kleine Infarkte.....	43
3.2 Die NADPH-Oxidase ist an der Entstehung des frühen Blut-Hirnschranken Schadens nach cerebraler Ischämie und Reperfusion beteiligt.....	45
3.3 Rac-1 ist an der Entstehung des frühen Blut-Hirnschranken Schadens nach cerebraler Ischämie/ Reperfusion beteiligt- <i>in vivo</i>	48

3.4 Rac-1 wird durch Hypoxie/ Reoxygenierung aktiviert und transloziert an die Membran- <i>in vitro</i>	48
3.5 ROS führen zu einer gesteigerten Permeabilität von Zellbarrieren aus cerebralen Kapillarendothelzellen	50
3.6 Die Rho-Kinase ist an dem ROS-vermittelten Anstieg der Permeabilität von Zellverbänden aus Kapillarendothelzellen beteiligt	51
4. DISKUSSION	54
4.1 ROS und die Pathogenese von Gewebsschäden nach cerebraler Ischämie.....	54
4.2 Infarktreduktion durch pharmakologische Inhibition der NADPH-Oxidase.....	56
4.3 Die Beteiligung von ROS und Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen.....	59
(MAPK) am Bluthirnschrankenschaden	59
4.4 Die Beteiligung von ROS und der Rho-Kinase am Bluthirnschrankenschaden.	62
4.5 Kontroverse Aspekte zur Entstehung des Blut-Hirnschrankenschadens nach fokaler cerebraler Ischämie.....	64
ZUSAMMENFASSUNG	66
SUMMARY	67
LITERATURVERZEICHNIS	69
DANKSAGUNGEN	73
SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG.....	74
LEBENS LAUF.....	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APE	Apyrimidinic Endonuclease
ATP	Adenosin Tri Phosphat
BBB	Blood Brain Barrier
BMEC	Brain Microvessel Endothelial Cells
CAT	Catalase
CBF	Cerebral Blood Flow
CCT	Cranielle Computertomographie
CGD	Chronic Granulomatose Disease
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribunucleine Acid
ECIS	Electrical Cell Substrate Impedance Sensing
ERK	Extracellular signal Regulated Kinases
FAD	Flavin Adenin Dinucleotid
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GLUT	Glucosetransporter
GpX	Gluthathion Peroxidase
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Human Imundeficiency Virus
HMG CoA	Hydroxy-methylglutaryl-Coenzym-A
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICB	Intracerebrale Blutung
ICP	Intracranial Pressure
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	Jun-Kinase
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MMP	Matrix Metallo Proteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NCS	Normal calf serum
NO	Stickstoffmonoxid
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBCEC	Porcine brain capillary endothelial cells
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
Phox	phagozytäre Oxidase
PKC	Proteinkinase C
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
ROS	Reactive Oxygen Species
rtPA	recombinant tissue plasminogen activator
SAB	Subarachnoidalblutung
SOD	Superoxiddismutase
TcdB	Clostridium difficile lethal Toxin B
TEER	Transendothelial electric Resistance
TTC	Triphenyltetrazolium Chlorid
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Der Schlaganfall

Die cerebrale ischämische Durchblutungsstörung stellt in den westlichen Industrienationen mit einer Inzidenz von 250 – 400 pro 100.000 Einwohner und einer Mortalitätsrate von nahezu 30 % die dritthäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems und malignen Neoplasien dar. Die gemeinhin als Schlaganfall oder Apoplex bezeichnete Erkrankung gehört ferner zu den häufigsten Ursachen für Invalidität aufgrund persistierender neurologischer Defizite im hohen Lebensalter. In Deutschland erkranken zurzeit ungefähr 200.000 Personen pro Jahr neu an einem Schlaganfall, wobei 15 – 20% der Patienten innerhalb der ersten 4 Wochen sterben. Bei etwa einem Drittel der Schlaganfallpatienten ist eine Wiederaufnahme des gewohnten Lebensablaufs möglich. Ein weiteres Drittel wird wieder soweit selbstständig, dass sie einfache, alltägliche Dinge verrichten können, die Patienten sind aber durch Lähmungen oder andere Residualsymptome behindert, nicht mehr berufsfähig, und müssen im täglichen Leben viele Einschränkungen akzeptieren. Das letzte Drittel der Patienten bleibt dauerhaft pflegebedürftig. Man nimmt heute an, dass rund 1.000.000 Menschen in Deutschland unter den Folgen eines Schlaganfalls leiden.

Wie die Bezeichnung Schlaganfall nahe legt, handelt es bei der cerebralen ischämischen Durchblutungsstörung um eine Erkrankung, die einem sprichwörtlich schlagartigen Verlauf folgt und welche durch den plötzlich einsetzenden Verlust neurologischer Funktionsfähigkeit in variabler Ausprägung gekennzeichnet ist. Die klinische Symptomatik erstreckt sich von diskreten Sensibilitätsverlusten bis hin zur vollkommenen Bewegungsunfähigkeit und spiegelt damit das Ausmaß der Hirnsubstanzschädigung wieder. Die Einteilung der apoplektischen Insulte umfasst jedoch nicht ausschließlich cerebrale Durchblutungsstörungen, sondern beinhaltet ferner intrazerebrale Blutungen (ICB) in die Gehirnschubstanz aus Hirnarterienästen, die etwa 15% der Schlaganfälle ausmachen und in den meisten Fällen auf dem Boden von Mikroangiopathien

mit degenerativen Wandveränderungen entstehen. Eine weitere Gruppe bilden die Subarachnoidalblutungen (SAB), welche häufig durch Ruptur hirnbasisnaher Aneurysmen entstehen und einen Anteil von etwa 5% einnehmen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich jedoch im speziellen mit der ischämischen Durchblutungsstörung, die mit 80% die häufigste Ursache darstellt und im Weiteren eingehend erläutert werden soll [1].

1.1.1 Die cerebrale ischämische Durchblutungsstörung

Wie wir heutzutage wissen, wird der Großteil der Schlaganfälle durch transiente oder dauerhafte Verschlüsse der hirnversorgenden Gefäße verursacht. Die Ursachen für derartige Verschlüsse sind vielseitig. Mit etwa 70% bilden Thrombosen, die auf dem Boden arteriosklerotischer Makroangiopathien entstehen und der Stromrichtung des Blutflusses folgend distal gelegene Blutgefäße verschließen, die Hauptursache. Erste Entdeckungen hierzu gab es bereits 1730 durch Hermann Boerhaave, der in seiner Arbeit *Praelectiones de Morbis Nervorum* eine sogenannte *Stenochoria in chondrogonia arteria* der Halsgefäße beschreibt, was dem anatomisch-pathologischen Befund der Atherosklerose entspricht. Derartige Gefäßwandveränderungen der Arterien führen zur Ausbildung von atheromatösen Plaques, deren Ruptur den embolischen Verschluss der nachgeschalteten Gefäße verursacht. Ferner bilden solche Veränderungen die Grundlage zur Ausbildung arterieller Thrombosen. Wie auch im Formenkreis der Herz-Kreislaufkrankungen trägt der westliche Lebensstil zu derartigen Veränderungen maßgeblich bei. Erkrankungen wie der Diabetes mellitus Typ I und II, Bluthochdruck sowie Nicotinkonsum gehören auch bei der cerebralen ischämischen Durchblutungsstörung zu den Risikofaktoren. Weitere 30% aller Apoplexe resultieren aus kardialen Embolien die im Rahmen von Herzrhythmusstörungen, Herzklappenfehlern oder Entzündungen im linken Ventrikel entstehen und aufgrund der vorherrschenden hohen Drücke dazu neigen, mitgerissen zu werden. Embolien als Ursache für einen Schlaganfall in Betracht zu ziehen formulierte Gerhard von Swieten schon sehr früh im Jahre 1742 (*Commentaria in*

Hermanni Boerhaave aphorismos de cognoscendis et curandis morbis, Leyden, Verbeek, 1742) und stellte damit die damals vorherrschende Ansicht in Frage, dass die Hauptursache für die häufig beobachtete Symptomatik des Schlaganfalles einzig in Hirnblutungen zu suchen sei. Seltener Quellen embolischer oder thrombotischer Verschlüsse der Hirnarterien stellen Kollagenosen, Vaskulitiden oder spontane Dissektionen der extrakraniellen Hirngefäße dar.

Der aktuelle therapeutische Goldstandard ist die Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes mit Hilfe von fibrinolytisch aktiven Substanzen wie beispielsweise rtPA, einem rekombinanten Plasminogenaktivator, welcher den Thrombus auflösen soll und damit die Reperfusion ermöglicht. Die Lysemethode ist allerdings aufgrund der massiv gesteigerten Blutungsgefahr sehr komplikationsreich und wird durch eine Vielzahl von Kontraindikationen limitiert [2].

Allen Gefäßverschlüssen gemeinsam ist die Folge, dass das vom occludierten Gefäß versorgte Hirngewebe einen rapiden Versorgungsabfall von Sauerstoff und Glucose erleidet. Da die Energiegewinnung in diesem Gewebe nahezu ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung erfolgt, wird im Rahmen einer Durchblutungsstörung die Aufrechterhaltung der Ionengradienten nicht mehr gewährleistet. Dieser Energiemangel führt zum Verlust des Membranpotentials und somit zur Depolarisation von Neuronen und Gliazellen [3]. In der Folge kommt es zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanälen und damit zur Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren in den extrazellulären Raum. Zeitgleich entfallen weitere Energie abhängige Prozesse, wie die präsynaptische Wiederaufnahme der exzitatorischen Aminosäuren, was zu einer weiteren Anhäufung von Glutamat im extrazellulären Raum führt. Die Aktivierung von NMDA Rezeptoren sowie metabotropen Glutamat Rezeptoren tragen zu einer Ca^{2+} Überladung bei [4], wobei letztere die Phospholipase C und Inositoltrisphosphat (IP3) nutzen. Als Resultat der Glutamat vermittelten Überaktivierung, strömen über Ionenkanäle Na^+ und Cl^- in die Neuronen, was einen passiven Nachstrom von Wasser auslöst. Das dadurch bedingte Ödem beeinflusst zum einen die Perfusion im umliegenden Gewebe und führt ferner durch Steigerung des intrakraniellen Druckes (ICP) zur Kompression von

Gefäßen sowie Herniationen. Das Hirnödem kann mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) sowie der Cerebralen Computertomographie (CCT) quantitativ erfasst werden und stellt eine der wichtigsten prognostischen Aussagen dar, die das Überleben eines Patienten in den ersten Stunden nach einem Schlaganfall bestimmen [5].



Abb.1 Kraniale Computertomographie

Das dargestellte axiale, kraniale Computertomogramm (CT) zeigt einen kompletten, Territorialinfarkt im Stromgebiet der rechten Arteria cerebri media. Typisch in dieser Aufnahme ist die gut abgrenzbare Dichteminderung (Hypodensität) des infarzierten Areals, sowie die Kompression des rechten Ventrikels als Zeichen einer beginnenden Raumforderung. Ein weiteres Merkmal infarzierten Gewebes in der CT ist die aufgehobene Differenzierbarkeit zwischen grauer und weißer Substanz.

Ein Anstieg des universalen Second messengers Ca^{2+} führt zu einer Reihe von Reaktionen, die den Ablauf der Gewebszerstörung nachhaltig beeinflussen. Hierzu gehören die Aktivierung von proteolytischen Enzymen

welche sowohl Proteine des Cytoskelettes wie auch der extrazellulären Matrix abbauen (s.u.). Die Aktivierung der Phospholipase A2 und Cyclooxygenase löst die Bildung von freien Radikalen aus welche die Abwehrsysteme der Zelle überlasten, zu Lipid Peroxidation und Membranschäden führen. Die bedeutende Rolle der freien Sauerstoffradikale am Zelltod, welche im Folgenden noch eingehend erörtert werden soll, wird durch die Beobachtungen unterstrichen, dass sogar eine zeitverzögerte Behandlung mit Radikalfängern einen Benefit im experimentellen Ischämieversuch erzielt [6]. Weiterhin schützt eine Überproduktion an antioxidativen Enzymen vor den Folgen eines Schlaganfalles, wohingegen Tiere mit einer unzureichenden Ausstattung derselben, deutlich anfälliger für Gewebeschäden sind [7,8].

Neben den direkten Zellschädigungen fungieren die freien Sauerstoffradikale als wichtige Signalmoleküle welche Entzündungsvorgänge unterhalten oder die Apoptose einleiten.

In den Mitochondrien der betroffenen Zellen beeinträchtigt die intrazelluläre Radikalkonzentration die Funktion den Elektronentransport an der inneren mitochondrialen Membran, wodurch die Beseitigung von H^+ Ionen und die Bildung von ATP verhindert wird [9]. Es kommt zu einer Leckage der Mitochondrienmembran und einer gesteigerten Permeabilität, wodurch es unter anderem zu einem Efflux von Cytochrom C, einem Trigger der Apoptose, in den intrazellulären Raum kommt [10].

1.1.2 Die Penumbra

Die im voran Gegangenen beschriebenen hämodynamischen und metabolischen Veränderungen beeinträchtigen das Infarktterritorium nicht in allen Bereichen gleichermaßen. Vielmehr werden unterschiedliche Bereiche differenziert, in denen jeweils charakteristische Bedingungen vorherrschen.

So wird im Kern des Perfusionsdefizites ein cerebraler Blutfluss registriert, welcher 20% des normalen CBF (cerebral Blood Flow) unterschreitet [11]. Permanente und anoxische Depolarisation erfolgen hier bereits innerhalb von wenigen Minuten. Die Zellen in diesem Areal gehen aufgrund von Lipolyse, Proteolyse, der Disaggregation von Mikrotubuli und dem Zusammenbruch der Ionengradienten, zugrunde. Zwischen diesem nekrotischen Kernbereich und

dem vitalen Hirngewebe liegt die sogenannte Penumbra, ein Areal mit eingeschränktem Blutfluss, jedoch partiell erhaltenem Metabolismus [12].

Bei weiterbestehender Ischämie und ohne Therapie, entwickelt sich die Penumbra aufgrund der fortschreitenden Exzitotoxizität ebenfalls zu einem Infarktgebiet. Weitere schädigende Phänomene in diesem Gebiet sind die Entwicklung von post-ischämischen Entzündungsreaktionen und der Aktivierung von apoptotischen Prozessen.

Aus diesem Grund ist das primäre Ziel einer neuroprotektiven Therapie die Erhaltung des penumbralen Gewebes.

1.2 Reaktive Sauerstoff Spezies- ROS

Reactive Oxygen Species (ROS) sind eine Familie von hoch reaktiven Molekülen, welche in Zellen von Säugetieren enzymatisch durch die Reduktion eines einzelnen Elektrons von molekularem Sauerstoff entstehen (O_2^-). Es existieren zahlreiche Enzyme die in der Lage sind ROS zu generieren. Beteiligt sind die Xanthin- Oxidase, Cyclooxygenasen, NO Synthasen, mitochondriale Oxidasen und schließlich die NADPH-Oxidasen (NOXes), welche im Mittelpunkt unserer Betrachtung stehen sollen.

Die physiologischen Funktionen von ROS sind vielseitig und noch nicht ausreichend verstanden. Es ist bekannt, dass ROS in Gefäßmuskelzellen die Öffnung von K^+ -Kanälen und die vasodilatierenden Effekte von beispielsweise Bradykinin vermitteln [13]. Weiterhin vermitteln ROS die Funktion von Mediatoren für Mitogene, wie Angiotensin II oder den Platelet-derived relaxing factor (PDGF) und nehmen damit Einfluss auf langfristige Prozesse wie Zellwachstum und Zellteilung, indem sie in die Regulierung von Proteinkinasen, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder die Genexpression eingreifen [14]. Durch die phagozytäre NADPH-Oxidase generierte Superoxide tragen ferner zur Immunabwehr bei und nehmen durch ihre mikrobizide Eigenschaften eine wichtige Rolle im menschlichen Organismus ein. Die nachhaltige Bedeutung dieser Funktion wird bei Betrachtung der Chronischen Granulomatose (CGD) deutlich. Bei dieser Erkrankung sind die Phagozyten nicht in der Lage ROS zu produzieren, wodurch die Patienten unter lebenslangen, rezidivierenden Infektionen leiden

[15]. Hieraus wird ersichtlich, dass Superoxid Anionen wesentlichen Anteil an unterschiedlichsten Vorgängen im menschlichen Organismus haben.

Unter physiologischen Bedingungen stehen die Produktion von ROS und die antioxidative Kapazität der Zellen in einem ständigen Gleichgewicht, so dass Radikale beispielsweise durch die Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O und O_2 metabolisiert werden können. Weiter Enzyme die an der Erhaltung dieses Gleichgewichtes beteiligt sind, sind Katalase (CAT) oder Gluthathion Peroxidase (Gpx) welche eine weitere Konvertierung von H_2O_2 zu Wasser (H_2O) ermöglichen. Jedoch kommt es im Rahmen von Erkrankungen wie der Hypertonie oder des Diabetes mellitus zu einer Störung dieser Homöostase und schließlich zu einer Überladung der Zelle mit ROS. Dieses Missverhältnis wird auch als oxidativer Streß bezeichnet und hat großen Anteil an der Entstehung von Erkrankungen wie beispielsweise der Atherosklerose [16]. Durch die unzureichende Eliminierung der ROS kommt es zur Interaktion dieser Moleküle mit zahlreichen Systemen der Zelle. Unter anderem kommt es zu einer Reaktion der Superoxidanionen mit Stickoxid ($NO\cdot$), wodurch nicht nur die Bioverfügbarkeit dieses vasoprotektiven Moleküls abnimmt, sondern vielmehr die Bildung des sehr potenten Oxidans Peroxynitrit ($ONOO^-$) gesteigert wird [17]. Ein weiteres Molekül das im Rahmen von oxidativem Stress durch Interaktion von Wasserstoffperoxid mit divalenten Kationen entsteht ist das Hydroxyl Radikal (OH-Radikal), welches äußerst zytotoxisch ist und durch oxidative Modifikation von Proteinen und DNS zur zellulären Dysfunktion führt [18,19].

Hiermit wird deutlich, dass die funktionellen und schädigenden Eigenschaften der ROS eng beieinander liegen und daher das Verständnis der Radikalproduktion eine Schlüsselrolle bei der Therapie zahlreicher Erkrankungen einnimmt. Im Falle der ROS welche in der Gefäßwand generiert werden, stellt das Enzym NADPH Oxidase die wichtigste Quelle dar, weshalb Aufbau und Funktion im Folgenden näher erläutert werden.

1.2.1 Struktur und Funktion der NADPH-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat)

Die NADPH-Oxidase stellt eine Familie von membranassoziierten Enzymkomplexen dar, welche in Abhängigkeit von diversen Stimuli ROS bilden und im größten Teil aller Gewebearten anzutreffen sind. Die am besten charakterisierte NADPH-Oxidase ist in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) lokalisiert und ist für den sogenannten „respiratory burst“ verantwortlich. Dieser Begriff beschreibt den sprunghaften Anstieg des Sauerstoffverbrauches (O_2) welcher mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase verbunden ist und zu einer Freisetzung von O_2^- in den Extrazellularraum oder in die phagozytären Vesikel führt. Die freigesetzten Sauerstoffradikale tragen zur Neutralisierung von phagozytiertem Material bei und sind damit ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr.

Der grundlegende Mechanismus der NADPH-Oxidase besteht aus einem Elektronentransfer von NADPH auf molekularen Sauerstoff (O_2) wodurch das Superoxidanion (O_2^-) entsteht. Die Superoxidanionenproduktion erfolgt entsprechend der folgenden Reaktion:



Das Enzym besteht aus zwei membrangebundenen Untereinheiten- zum einen aus der gp91phox (phagozytäre Oxidase) β -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 91-kD und zum anderen aus der p22phox α -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 22-kD, sowie mindestens drei cytoplasmatische Untereinheiten [20]. Das Glykoprotein gp91phox wird auch als Nox 2 bezeichnet. Das N-terminale Ende dieser katalytischen Untereinheit besteht aus sechs transmembranösen α -Helices, wobei die dritte und fünfte Helix je eine Häm-Bindungsstelle tragen, sowie einem C-terminalen cytoplasmatischen Ende, welches die Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und NADPH Bindungsstellen enthält und für den Elektronentransfer benötigt wird [21]. Damit enthält die gp91phox Untereinheit den gesamten Redox Apparat, welcher Elektronen von NADPH auf der cytoplasmatischen Seite, über FAD und die zwei Häm-Gruppen auf molekularen Sauerstoff im extrazellulären beziehungsweise intraphagosomalen Raum übertragen kann.

Die zweite membranassoziierte Untereinheit mit zwei bis vier Transmembrandomänen ist die p22phox Einheit, welche NOX 2 stabilisiert, indem beide zusammen einen Cytochrom b_{558} Komplex bilden.

Da eine unkontrollierte Produktion von ROS durch die NADPH-Oxidase einer ständigen Entzündungsreaktion entspräche, ist der Aktivierungsvorgang stringent reguliert. Aus diesem Grund produziert gp91phox ohne vorhergehende Aktivierung in ruhenden Zellen keine Radikale, sondern ist vielmehr auf die Beteiligung weiterer Untereinheiten angewiesen. Die Aktivierung erfordert eine Membrantranslokation von drei weiteren, im Cytosol lokalisierten Untereinheiten. Auf diverse Stimuli hin, wie beispielsweise die Detektierung opsonierter antigener Strukturen, werden über unterschiedliche Signaltransduktionsprozesse die cytosolischen Einheiten p47phox, p67phox sowie die GTPase Rac 1 aktiviert. Die essentielle Rolle dieser Regulatorproteine beim Aktivierungsvorgang wird bei der Betrachtung zweier Beispiele deutlich:

Die Aktivität der phagozytären NADPH-Oxidase kann in einem zellfreien System dadurch rekonstruiert werden, dass die genannten Komponenten durch einen *in vitro* Stimulus, wie beispielsweise Arachidonsäure aktiviert werden und so, ohne die Beteiligung weiterer zellulärer Strukturen, zur Bildung von ROS in der Lage sind [22]. Dieser Vorgang ist jedoch nicht möglich wenn eine der genannten Untereinheiten fehlt und so nicht zur Ausbildung des Oxidase Komplexes beitragen kann.

Weiterhin ist bekannt, dass alle Patienten die an der CGD leiden, einen Defekt der Gene für die gp91phox, p22phox, p47phox und die p67phox aufweisen. Eine ineffektive Erregerabwehr und der Erwerb von Infektionen aufgrund von phagosomalen ROS Mangel ist die Folge. Diese Beispiele zeigen, dass eine Interaktion zwischen allen Untereinheiten für den Elektronentransfer zwingend erforderlich ist und ein Defekt, das Fehlen oder eine inadäquate Aktivierung einer solchen zum Funktionsverlust der NADPH-Oxidase führt. Neben diesen drei essentiellen Proteinen konnte desweiteren gezeigt werden, dass zwei weitere Proteine mit dem b_{558} Komplex interagieren: Rap 1a sowie p40phox, wobei letzteres bei der Translokation von p67phox und p47phox beteiligt ist indem es die Affinität der p47phox Untereinheit zum b_{558} Komplex erhöht [23,24].

Im Folgenden sollen die Interaktionen näher erläutert werden, die zwischen den einzelnen Untereinheiten erfolgen. Unter physiologische Bedingungen ist die phagozytäre NADPH-Oxidase in einem inaktiven Zustand. Die Aktivierung erfolgt auf verschiedene Stimuli hin, wie beispielsweise Opsonierung von antigenen Strukturen, wobei das F_C Fragment des Antikörpers den Prozess einleitet. Dieser Aktivierungsprozess benötigt unter physiologischen Bedingungen drei verschiedene Elemente. Hierfür muss die p67phox Einheit mit der gp91phox Einheit interagieren, es bedarf einer Aktivierung der GTPase Rac-1 und schließlich benötigt die Reaktion freie Fettsäuren [25,26,27]. Die Aktivierung von gp91phox durch die cytosolische p67phox Untereinheit erfolgt mit Hilfe einer Aktivierungsdomäne am N-terminalen Ende der p67phox und führt zu einer relativ instabilen Interaktion zwischen den beiden Einheiten. Eine stabile Verbindung zwischen den Molekülen wird durch die Reaktion der C-terminalen SH3 Domäne der p67phox mit dem korrespondierenden C-Terminus der p47phox Untereinheit ermöglicht. Die p47phox übernimmt somit die Funktion eines Adapters. Diese Funktion des Proteins wird durch die Phosphorylierung von Serin reguliert, die im Rahmen der Aktivierung erfolgt. Unphosphoryliertes p47phox kann nicht mit weiteren Untereinheiten interagieren, da die benötigten N-terminalen SH3 und die C-terminalen PX Domänen des Proteins von einem autoinhibitorischen Loop verdeckt sind [28](Abb.2.1). Im phosphorylierten Zustand kommt es zu einer Konformationsänderung. In diesem offenen Zustand bindet die SH3 Domäne der p47phox an eine Prolin-reiche Region der membranassoziierten p22phox Untereinheit wohingegen die PX Domäne für die Verankerung in der Membran verantwortlich ist [29,30](Abb.2.2). Die bereits erwähnte Interaktion zwischen den cytosolischen Untereinheiten erfolgt durch Bindung der SH3 Domäne der p67phox mit einer Prolin-reichen Region auf p47phox [31]. Somit bildet die p22phox Untereinheit die Andockstelle für die cytosolischen Komponenten der NADPH-Oxidase. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Untereinheiten spielt die GTPase Rac-1 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase. Die Translokation von Rac-1 an die Plasmamembran nach Stimulation erfolgt im Gegensatz zu p67phox unabhängig von p47phox. Nach Verankerung der GTPase interagieren vier

repetitive Tetratricomotive (TPR) mit dem N-terminalen Teil von p67phox woraufhin der Rac-p67phox Komplex mit dem b₅₅₈ Komplex gekoppelt ist [32] (Abb.2.3).

Hiermit wird also ersichtlich, dass es einer Interaktion aller Untereinheiten bedarf damit die NADPH Oxidase aktiv wird.

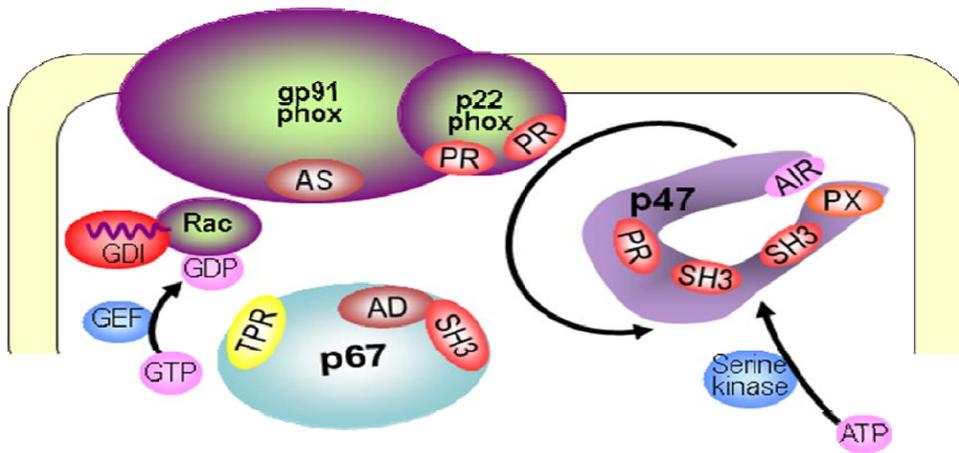


Abb.2 1

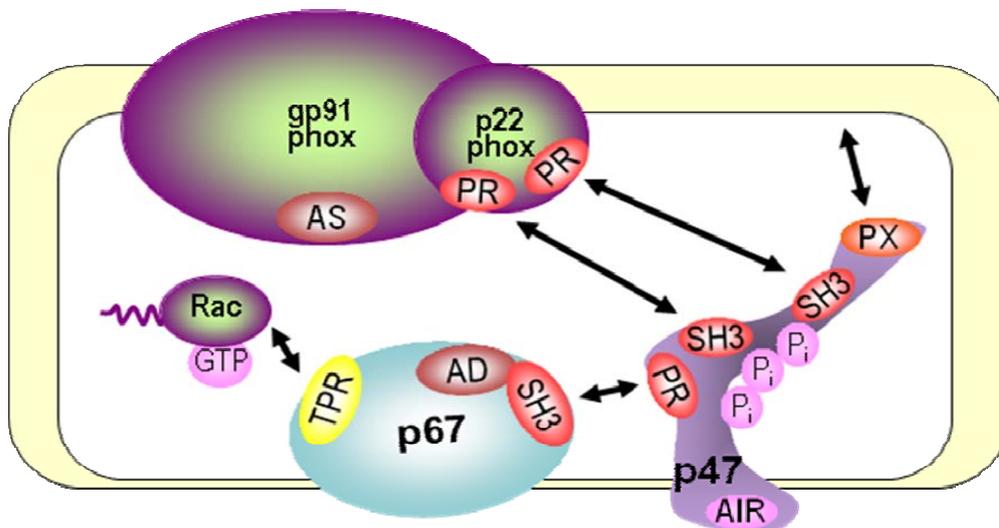


Abb.2 2

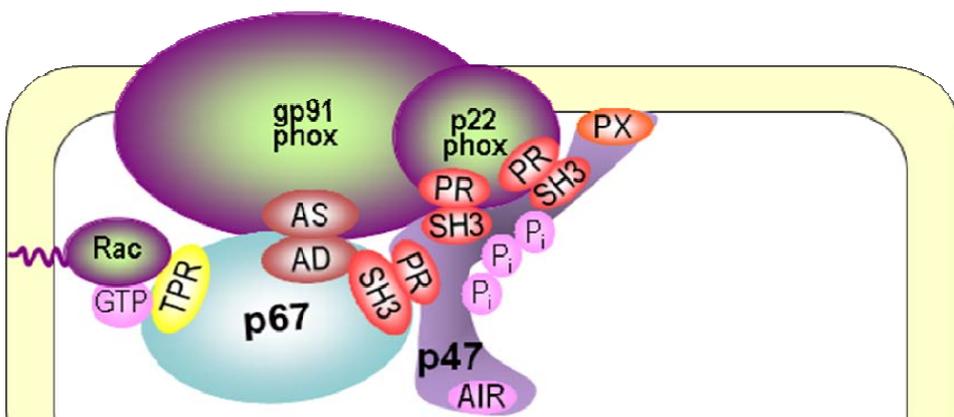


Abb.2 3

Abb.2 Aktivierung der NADPH-Oxidase (modifiziert nach Brandes R.P. et al. Cardiovascular

Research 65 (2005) 16 - 27)

In dieser Abbildung sind schematisch die Komponenten der NADPH-Oxidase vor und nach Aktivierung dargestellt. In 2.1 sieht man die membrangebundenen Komponenten gp91phox und p22phox sowie die im Zytosol lokalisierten Einheiten p67phox und p47phox sowie die GTPase Rac. Hier wird veranschaulicht, dass die SH- und die C-terminale PX-Domäne der p47phox durch einen autoinhibitorischen Loop verdeckt sind, welcher in Abb.2.2 durch eine Konformationsänderung nach Phosphorylierung geöffnet dargestellt ist und die p67phox- sowie die p22phox Bindungstellen freiliegen. In Abb.2.3 ist die NADPH-Oxidase in aktivierter Form dargestellt. Wie im Text beschrieben, kommt es zu einer Interaktion aller Komponenten an der Membran.

1.2.2 Weitere Mitglieder der NADPH-Oxidase-Familie

Die im Vorangegangenen beschriebene phagocytäre Isoform stellt zum jetzigen Zeitpunkt die am besten untersuchte NADPH-Oxidase dar, repräsentiert aber lediglich einen Ausschnitt aus einer Enzymfamilie mit sieben bekannten Mitgliedern. Die Gruppe umfasst die Proteine NOX 1 bis NOX 5 sowie die zwei zuletzt identifizierten Oxidasen DUOX 1 und 2. Unterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern bestehen zum einen in ihrer Lokalisation respektive ihrer Gewebsverteilung, sowie im Ablauf ihrer Aktivierung und ihrer teilweise unterschiedlichen Untereinheiten. So findet sich die eingangs beschriebene phagocytäre NOX 2 sowohl auf Zellen der Immunabwehr, wie auch in arteriellen Endothel- und Adventitiazellen. Die Rolle von NOX 2 im Rahmen der Immunabwehr wurde eingehend erläutert, wohingegen im Folgenden ein kurzer Überblick über die bislang bekannten physiologischen Eigenschaften der anderen Oxidasen gegeben werden soll. NOX 1 war das erste in Säugetierzellen identifizierte Homolog zu gp91phox und weist eine 56 % Übereinstimmung in der Aminosäurefrequenz auf. Sie findet sich vorwiegend in Zellen des Magen-Darm-Traktes, ist aber auch durch PDGF in aortalen Gefäßmuskelzellen induzierbar [33,34]. Über die Funktion der NOX 1 im menschlichen Organismus gibt es zwei Auffassungen: Zum einen ist es durchaus wahrscheinlich, dass die NOX 1 zur Erregerabwehr im Magen-Darm-Bereich beiträgt, da hier eine massive Auseinandersetzung mit Bakterien stattfindet und zum anderen liegt aufgrund ihrer induzierbaren Expression in Gefäßmuskelzellen eine Beteiligung an der Blutdruckregulation nahe. Eine Besonderheit von NOX 1 besteht darin, dass

die zwei cytosolischen Untereinheiten NoxO1 und NoxA1, welche Homologie zu p47phox respektive p67phox Einheit zeigen, eine ähnliche Gewebsverteilung aufweisen und daher wahrscheinlich am Aktivierungsprozess der NOX 1 beteiligt sind [35]. Dies ist in sofern von Interesse, da NoxO1 im Gegensatz zu p47phox Untereinheit keinen autoinhibitorischen Loop besitzt und es daher für eine Aktivierung keiner vorangegangenen Phosphorylierung bedarf. Dieses Fehlen einer separaten Aktivierung könnte ein Hinweis für ein konstitutiv aktives NOX 1 sein.

NOX 3 dagegen weist eine sehr restriktive Gewebsverteilung auf und findet sich vornehmlich im Bereich des Innenohres wo es wiederum im sensorischen Epithel des auditorischen und vestibulären Systems vorkommt und an der Bildung von Otholithen beteiligt ist [36,37]. Über die molekulare Funktion dieses Familienmitgliedes gibt es erst wenig aufschlussreiche Daten.

Die am häufigsten exprimierte Unterform der NADPH-Oxidasen ist NOX 4. Neben ihrem primären Vorkommen in der Niere wurde NOX 4 Expression ebenfalls in Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, im Herz, im Pankreas, der Plazenta, Skelettmuskel, Ovarien, Hoden, Osteoklasten, Fibroblasten sowie Astrocyten beobachtet [38]. Ebenso vielfältig wie ihre Lokalisation sind auch die Hypothesen zu ihrer Funktion. Die populärste Arbeitshypothese basiert auf der Rolle von NOX 4 generierten Sauerstoffspezies als intrazelluläre Botenstoffe in den Zellen des Nierenkortex, wofür bekräftigende Daten allerdings fehlen [38]. Weiterhin sind bislang keine Aktivierungsmechanismen dieser Unterform gefunden worden und es wird angenommen, dass es sich bei NOX 4 um ein konstitutiv aktives Enzym handelt welches auf der Ebene der Gen Expression reguliert wird.

Bei NOX 5 hingegen ist ein Ca^{2+} abhängiger Aktivierungsmechanismus gezeigt worden, der für die Bildung von ROS verantwortlich ist [39]. Die wahrscheinlichste Funktion der, vornehmlich in Hoden und lymphatischen Gewebe lokalisierten, NOX 5 besteht in einer Beteiligung an ROS abhängigen Regulationsprozessen von Transkriptionsfaktoren.

Die von der bisherigen Nomenklatur abweichenden NADPH Oxidasen DUOX 1 und 2 werden aufgrund ihrer Expression im Schilddrüsengewebe auch als thyroidale Oxidasen (ThOx) bezeichnet. Ähnlich wie bei der Chronischen

Granulomatose führt der Verlust oder die Mutatione einer funktionellen Oxidase, in diesem Falle der DUOX 2 zu einem charakteristischen Krankheitsbild. Es kommt zu einem Hypothyreoidismus was zu der Annahme führt, dass die DUOX an der Synthese der Schilddrüsenhormone maßgeblich beteiligt sind [40]. Für die extrathyreoidal gefundenen DUOX in Zellen des respiratorischen Epithels (DUOX 1) oder dem Speicheldrüsenepithel (DUOX 2) wird eine Funktion in der Erregerabwehr postuliert [41].

1.2.3 Regulation und Rolle der vaskulären NADPH-Oxidase als Quelle von oxidativem Stress in der Gefäßwand

Wie bereits im Kapitel 1.2.2. erläutert, unterliegen die einzelnen Mitglieder der NADPH-Oxidasen einer jeweils unterschiedlichen Gewebsverteilung. Im Falle der cerebralen Ischämie und des Reperfusionsschadens sind von daher besonders die im Hirngewebe und den versorgenden Gefäßen lokalisierten Subtypen von Interesse.

In diesen Geweben ist die Verteilung der Oxidasen sehr komplex und eine exakte Zuordnung ist oft nicht möglich.

Jede Gefäßwandschicht enthält unterschiedliche Komponenten der NADPH-Oxidase, welche wiederum zwischen den verschiedenen Spezies variieren können [42]. Die kleinste Übereinstimmung die sich aus zahlreichen Studien hinsichtlich des Verteilungsmusters ergibt besteht darin, dass in allen Gefäßwandzellen, sowie in den Astrocyten die membranassoziierten Untereinheiten p22phox und NOX 4 exprimiert werden, wohingegen die gp91phox in den Endothel- und Adventitiazellen dominiert [43,44,45,46]. Die vaskuläre Expression von NOX 1 ist dagegen ausgesprochen gering und ihre Beteiligung an der Bildung von O_2^- im Gefäßsystem wurde in erster Linie für die Gefäßmuskelzellen gezeigt [47]. Im Hinblick auf die cytosolischen Untereinheiten p47phox und die GTPase Rac 1 hat sich herausgestellt, dass sie ebenfalls in allen Gefäßwandschichten anzutreffen sind, wohingegen die p67phox, wie auch die membrangebundene gp91phox, ausschließlich im Endothel und der Adventitia gefunden wurde. In Anbetracht dieser Konstellation von Oxidasen im Gefäßsystem ist es nun von Interesse, welche Mitglieder in welchem Maße an der Bildung von ROS beteiligt sind und auf

welchem Wege, beziehungsweise auf welche Stimuli hin sie aktiviert werden. Da die Beteiligung der ROS am Ausmaß des Hirninfarktes sowie der Permeabilitätsstörung von großer Bedeutung ist, ist die Betrachtung der NADPH-Oxidasen als Quelle dieser Sauerstoffradikale ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Pathophysiologie von Ischämie und Reperfusionsschaden. Die Aktivierung der beteiligten Oxidasen erfolgt auf zahlreiche unterschiedliche Stimuli, deren Mechanismen nur in Einzelfällen nachvollziehbar sind. So vermittelt Angiotensin II über die Bindung an ein AT1-Rezeptor gekoppeltes G-Protein die Aktivierung der Phospholipase C, die einerseits einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} bewirkt und andererseits über die Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) die Proteinkinase C (PKC) aktiviert [48]. Die PKC phosphoryliert p47phox, welche daraufhin zur Membran transloziert und damit die NADPH Oxidase aktiviert. Andere Wege der Aktivierung benötigen keine G-Protein gekoppelten Rezeptoren sondern erfolgen nach Stimulation von Tyrosinkinase-Rezeptoren. Der platelet-derived growth factor (PDGF) ist beispielsweise ein Agonist, von dem bekannt ist, dass er in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) sowie in Fibroblasten die ROS Bildung steigert [49,50]. So führt PDGF β Stimulation zur Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-Tris-Kinase welche wiederum die GTPase Rac aktiviert, deren Beteiligung an der ROS Bildung obligat ist [51]. So führt eine Vielzahl von externen Stimuli zur Aktivierung der NADPH Oxidase im Gefäßsystem. Beteiligt sind auch Thrombin, der Tumornecrosefaktor α oder Zustände wie Hyperglykämie im Rahmen eines Diabetes mellitus, aber ebenso mechanische Stimuli wie Dehnungsbelastung der Gefäße, wie sie beim arteriellen Hypertonus auftreten.

Welche Mechanismen im Zusammenhang mit Hypoxie und Reoxygenierung zur gesteigerten Bildung von ROS durch NADPH-Oxidasen führen, konnte noch nicht befriedigend geklärt werden, sind aber im Hinblick auf den cerebralen ischämischen Insult von großer Bedeutung.

1.3 Die Bluthirnschranke- Aufbau und Funktion

Im Jahre 1885 entdeckte Paul Ehrlich, dass sich nach Injektion eines Farbstoffes der gesamte Organismus des Versuchstieres mit Ausnahme des

zentralen Nervensystems anfärbte. Diese Beobachtung führte in den folgenden Jahrzehnten zu den unterschiedlichsten Vorstellungen über die Blut-Hirn-Schranke.

Die Bluthirnschranke (eng. Blood Brain Barrier \approx BBB) ist eine Diffusionsbarriere, welche für die physiologische Funktion des zentralen Nervensystem essentiell ist und die meisten im Blut enthaltenen Komponenten vom Hirngewebe trennt. Die Endothelzelle der Bluthirnschranke unterscheidet sich von anderen Endothelien im Organismus dadurch, dass sie keine Fenestrierung zwischen den Zellen der Hirnkapillaren aufweist, sowie durch das Vorkommen von Tight junction (TJ) und Zonula adherens (AJ) Zell-Zell-Verbindungen, welche eine parazelluläre Diffusion von hydrophilen Molekülen erschweren (Zonulae occludentes). Insgesamt sind drei Bestandteilen an der Ausbildung der Bluthirnschranke beteiligt. Die Endothelzelle, die das Gefäßinnere auskleidet, dem Astrozyten, dessen Zellfortsätze mit der abluminalen Zellmembran der Endothelzelle kommunizieren (*Membrana limitans glialis perivaskularis*) und letztlich der Perizyt, eine Zelle mesenchymalen Ursprungs, die in regelmäßigen Abständen die Endothelzellen umgreift. Einen weiteren Bestandteil der Bluthirnschranke stellt die zwischen der abluminalen Endothelzellmembran und den Astrozytenfortsetzen gelegene Basalmembran dar, eine Extrazellulärmatrix aus Kollagen und Fibronectin, welche neben der Beteiligung an der Barriere vor allem eine Stützfunktion hat [52](Abb. 3).

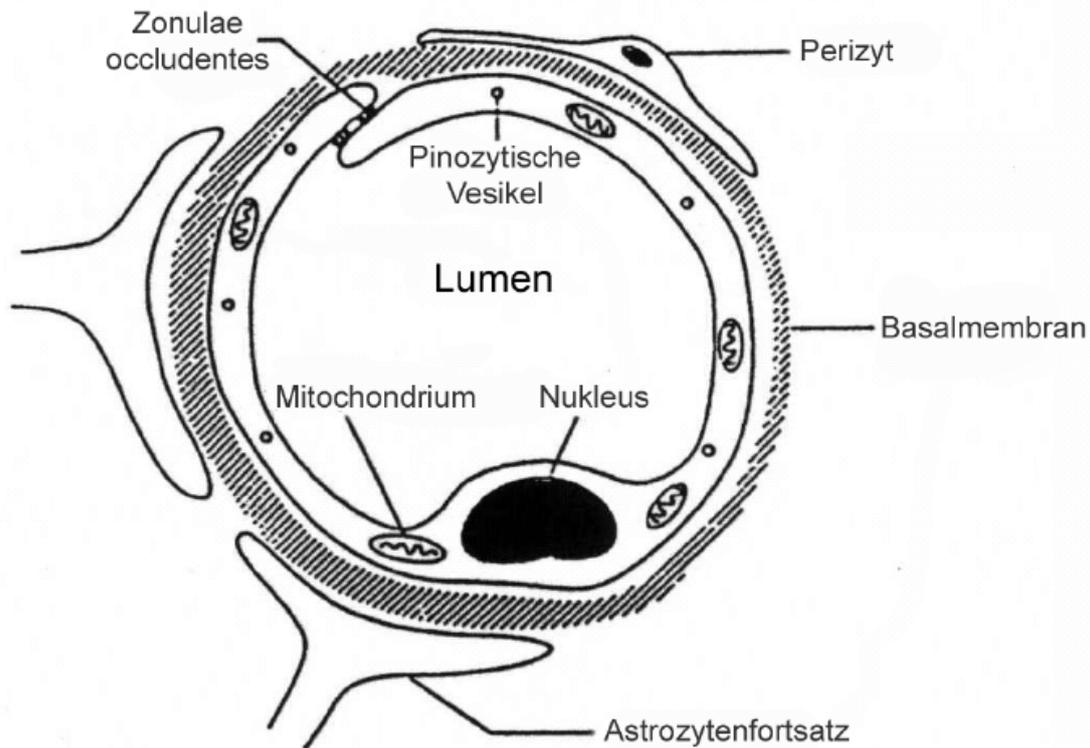


Abb.3 Anatomie der Bluthirnschranke

Die Abbildung zeigt den schematischen Querschnitt eines Hirngefäßes. Zu sehen ist die Anordnung der einzelnen Zelltypen, welche am Aufbau der Bluthirnschranke beteiligt sind. Wie im Text beschrieben befindet sich im Inneren die Endothelzelle und zwischen den Astrozytenfortsätzen und Endothel die Basalmembran. Als dritter, an der Barriere beteiligter Zelltyp ist der Perizyt zu sehen.

Die Aufgabe der Bluthirnschranke besteht darin, die präzise Kontrolle der Ionengradienten zu gewährleisten, die für eine normale Funktion des zentralen Nervensystems benötigt werden. Weiterhin sorgt sie dafür, dass Fluktuationen in der Plasmazusammensetzung und Fremdstoffe, die in der Lage wären die Funktion von Nervenzellen zu stören, nicht auf das ZNS einwirken können. Diese Aufrechterhaltung der zerebralen Homöostase wird durch eine Reihe von Eigenschaften der Beschriebenen Komponenten gewährleistet. Die Undurchlässigkeit der Kapillaren, welche durch die eingangs beschriebenen Zonulae occludentes erreicht wird, bedingt eine sehr niedrige parazelluläre Permeabilität für hydrophile Substanzen. Ferner wird die Schrankenfunktion durch die fehlende Fenestrierung sowie eine niedrige Endo- und Transzytoserate aufrechterhalten. Wohingegen die beteiligten Zelltypen einen hohen Anteil an Carrier-vermittelten Transportprozessen und

rezeptorvermittelten Transzytoseprozessen aufweisen. So werden kleine polare Substanzen über spezifische Carriersysteme transportiert, wie beispielsweise Glucose mit Hilfe des GLUT-1-Transportproteins, das spezifisch in zerebralen Endothelzellen exprimiert wird. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass Substanzen, die für die Aufrechterhaltung der Gehirnfunktion notwendig sind durch spezifische Transportmechanismen ins Parenchym gelangen. Ungehindert können Sauerstoff, Kohlendioxid sowie lipophile Stoffe die Blut-Hirn-Schranke passieren, wobei der letzte Aspekt therapeutische genutzt werden kann. Histologisch wird der enge Zell-Zell Kontakt im Falle der AJ durch Cadherin-Dimere hergestellt, die sich auch in anderen Endothel und Epithelzellen finden und zu einer Familie von Adhäsionsmolekülen gehören, die alle eine einzelne Transmembrandomäne aufweisen [53]. Die Zelladhäsion wird mit Hilfe eines Ca^{2+} -abhängigen Bindungsmechanismus zu Actin ermöglicht, wobei das Protein Catenin als Bindeglied fungiert [54]. Weiterhin tragen die extrazellulären Domänen der Cadherine Ca^{2+} -Bindungsstellen, da die Bindung von Ca^{2+} für die Funktion der Cadherine essentiell ist. Bei niedrigem extrazellulären Ca^{2+} kommt es zu einer Lockerung der Cadherin Interaktion und damit zu einer Störung der Zelladhäsion. Die besonders niedrige Permeabilität wird jedoch hauptsächlich durch die Tight Junction Verbindungen getragen, welche die parazelluläre Diffusion und den freien Ionenaustausch verhindern. Die TJ-Verbindungen sind Komplexe aus drei verschiedenen Proteinen die als Adhäsionsmoleküle dienen. Diese sind Occludin, Claudin und die Familie der Zonula occludens Proteine ZO-1 bis ZO-3 [55,56]. Claudin und Occludin besitzen zahlreiche transmembranäre Domänen und blockieren unter Ausbildung heterodimerer Brücken den parazellulären Transport. Die ZO Proteine wiederum verankern die erwähnten Adhäsionsmoleküle mit dem Actin-Zytoskelett der Zelle (Abb. 4).

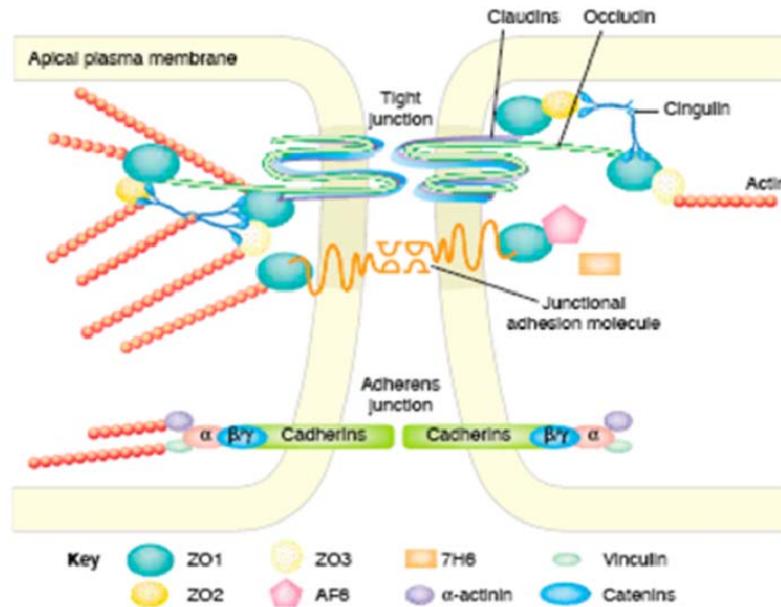


Abb.4 Zell-Zell Kontakt der Bluthirnschranke (modifiziert nach Trends in Neuroscience 2003)

In dieser Abbildung sieht man eine schematische Darstellung der Interzellularkontakte, welche zur Ausbildung der Bluthirnschranke beitragen.

Im oberen und mittleren Bereich des Interzellulärspaltes ist eine Tight junction Verbindung zu sehen sowie die Vernetzung des Claudins, über Occludin und die ZO Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle. Im unteren Abschnitt ist eine Zonula adhaerens Verbindung dargestellt und die daran beteiligten Cadherin Dimere sowie das Catenin, welches das Bindeglied zum Zytoskelett bildet.

Wie im Vorangegangenen bereits kurz angedeutet wurde, spielt Ca^{2+} bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Barrierefunktion der BBB eine wichtige Rolle. Der Einfluss von Ca^{2+} und ROS auf die BBB unter hypoxischen Bedingungen, wie sie bei der cerebralen Ischämie vorherrschen wurde mit Hilfe von zahlreichen Modellen untersucht. So konnte 1996 von Belayev und Albayrak *in vivo* gezeigt werden, dass ein vorübergehender Verschluss der Arteria cerebri media der Ratte zu einem erhöhten Durchtritt des Farbstoffes *Evans Blue* in das Hirngewebe führte [57,58]. In diesem Zusammenhang zeigte sich ebenfalls eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der BBB Permeabilität und der Größe des Gewebes Schadens. Diese durch Hypoxie und Hypoglykämie hervorgerufenen Effekte wurden 1999 von Abbruscato et al. im *in vitro* Modell unter Verwendung von Brain microvessel endothelia cells

(BMEC) weiter untersucht, wobei ein Abfall der E-Cadherin Expression und ein Anstieg der Permeabilität in den Zellen beobachtet werden konnte [59]. Weiter Untersuchungen an BMEC unter hypoxischen Bedingungen sowie Reoxygenierung führten zu Hinweisen, dass ROS eine Schlüsselrolle bei Ca^{2+} vermittelten Signaltransduktionsprozessen *in vitro* spielen [60]. Diese Studien legen nahe, dass Hypoxie und Reoxygenierung die Bildung von ROS stimulieren und die Ca^{2+} Mobilisation beeinträchtigen, was zu einer Modulation der BBB Funktion beiträgt. Eine weitere Beeinflussung der BBB Permeabilität durch gesteigerte ROS Produktion wird durch die Aktivierung von zahlreichen Kinasen, wie die Familie der Mitogen-activated-Proteinkinase (MAPK) verursacht, da diese die Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMP) induzieren. MMP's wiederum erhöhen durch Abbau der Tight junction Proteine die Durchlässigkeit der BBB, wodurch Ödembildung und intracerebrale Blutungen vermehrt auftreten [61].

Jedoch kann es auch im Rahmen von nicht ischämischen pathophysiologischen Prozessen wie zerebralen Entzündungen oder Traumata zu Störungen der beschriebenen Barrierefunktion kommen. Am häufigsten wird eine Blut-Hirn-Schrankenstörung im Zusammenhang mit einer bakteriellen Infektion der weichen Hirnhaut (Meningitis), bei HIV Enzephalitis sowie der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose beobachtet. Bei diesen Erkrankungen finden sich in der Analyse des Liquor cerebrospinalis jeweils pathognomonische Zelltypen des Immunsystems, welche unter physiologische Bedingungen von der Blut-Hirn-Schranke zurückgehalten werden, wie Granulozyten oder Lymphozyten [62]. In der Folge kommt es zu umfangreichen immunologischen Reaktionen, wie beispielsweise der Sekretion von Interleukin-1, was zu einer fortschreitenden Auflockerung der Blut-Hirn-Schranke führt und damit den Übertritt weiterer Blutbestandteile ermöglicht und damit die zerebrale Homöostase aus dem Gleichgewicht bringt [63].

Beim Schlaganfall hat dieser Verlust der Ionenregulation, sowie die weitere Auflockerung der BBB durch Einschwemmung von neutrophilen Granulozyten und Formation von Sauerstoffradikalen die passive Diffusion von Wasser zur Folge, was zur Ausbildung von lebensbedrohlichen Hirnödemen führt [63]. Da die Schädelkalotte des Erwachsenen starr ist, hat die Volumenzunahme jedes

der drei Kompartimente Hirnparenchym, Liquor oder Blut einen Anstieg des intrakraniellen Druckes zur Folge. Mit steigendem Hirndruck sinkt der zerebrale Perfusionsdruck. Die durch Minderperfusion und Anreicherung von Stoffwechselmetaboliten bedingte Vasodilatation wird zunächst durch die Autoregulation der Hirngefäße, den zentral ausgelösten Anstieg des peripheren Blutdrucks, die sogenannte Cushing-Reaktion, sowie letztlich eine reaktive Tachypnoe mit vermehrter CO₂-Abatmung kompensiert. Bei anhaltender Minderperfusion wird die Autoregulation der Hirngefäße aufgehoben, woraus neben einer Erhöhung des intrazerebralen Blutvolumens zusätzlich ein Hirnödem unterhalten wird, welches seinerseits zu einer Zunahme des Hirndrucks beiträgt. Diese Veränderungen des Hirnparenchyms führen zur Kompression der inneren und äußeren Liquorräume, bis sich ein Druckgradient in Richtung des Tentoriumschlitzes und des Foramen Magnum ausbildet. Wird dieser Prozess nicht unterbrochen übersteigt der Hirndruck den systemischen Blutdruck wodurch die zerebrale Durchblutung zum Erliegen kommt und ein hypoxischer Hirntod die Folge ist. Diagnostisch macht man sich die Beeinträchtigung der einzelnen Hirnkompartimente durch steigenden Hirndruck in der zerebralen Computertomographie (CCT) zu nutze. Veränderungen der makroskopischen Hirnstrukturen, Kompressionen der Ventrikelräume sowie Verlagerungen des Interhemisphärenspaltes können mit dieser röntgenologischen Bildgebungsmethode sehr früh erkannt werden und bilden damit einen wichtigen Aspekt für die Diagnostik. Interventionsmöglichkeiten sind die intravenöse Applikation von hyperosmolaren Lösungen wie beispielsweise Mannitol, wodurch ein Einstrom von Wasser in das Gefäßsystem erreicht wird und ein Rückgang des Ödems resultiert. Eine invasivere, neurochirurgische Option ist die Kraniotomie, bei welcher ein Teil der Schädelkalotte entfernt wird und damit der Druckgradient ausgeglichen werden kann. Ebenso gehören Methoden wie die maschinelle Hyperventilation beatmeter Patienten oder eine 30° Oberkörperhochlagerung zu intensivmedizinischen Maßnahmen die den Hirndruck zu senken.

Von den zahlreichen Erkrankungen die zu einer Beeinträchtigung der cerebralen Blut-Liquor-Barrier führen, stehen in dieser Studie die frühen Folgen der Reoxygenierung nach zerebraler Ischämie und die damit verbundene ROS Produktion durch NADPH-Oxidasen, sowie deren

Auswirkung auf die BBB Integrität im Vordergrund. Da die Störung der BBB Permeabilität die Ausbildung von Hirnödemen begünstigt ist dies ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt um die Letalität beziehungsweise das Ausmaß des Funktionsverlustes einzuschränken.

1.4 Ziele der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der beschriebenen Enzymsysteme im Zusammenhang mit der fokalen cerebralen Ischämie zu untersuchen. Im Vordergrund standen die Auswirkungen der genetischen Deletion der NADPH-Oxidase Untereinheit gp91phox auf das Ausmaß der Gewebeschädigung, so wie der Bluthirnschrankenstörung im Tiermodell. Weiterhin waren die Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention von Interesse, welche in die Prozesse der Ischämie und Reperfusion regulierend eingreifen können. Vorrangig waren hier die Einflüsse auf die Bluthirnschrankepermeabilität *in vivo*, so wie die physiologischen Hintergründe die wir an Endothelzellkulturen untersuchten.

2. Tiere und Methoden

Im Folgenden sollen die *in vivo* Versuche an Mäusen, die *in vitro* Versuche an Endothelzellen sowie die verwendeten Analyseverfahren erläutert werden.

2.1 Tiere

In den Tierversuchen wurden immunkompetente, ausschließlich männliche C57/BL6 Wildtypmäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt, sowie transgene, gp91phox ^{-/-} Mäuse (Jackson, Bar Harbor, Main, USA-rückgekreuzt über 10 Generationen mit C57/BL6.). Weiterhin wurden p47phox Knock-out Tiere verwendet, welche wie die gp91phox Knock-out Tiere der eigenen Zucht entstammten. Die Tiere waren zwischen acht und zehn Wochen alt, mit einem Gewicht zwischen 20 und 25 g. Die Versuchstiere erhielten Wasser und Futter ad libitum. Gehalten wurden die Mäuse in Gruppen zu je zehn Tieren unter Standardbedingungen. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) vorgenommen.

2.1.1 Arteria cerebri media Occlusionsmodell

Die Tiere wurden mit Hilfe einer Betäubungskammer unter Zuleitung eines Gasmischtes im Verhältnis von 0,1 l/min Sauerstoff zu 0,3 l/min Stickstoff sowie 4 Volumen % Isofluran (Forene®, Abott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) narkotisiert. Hierfür wurde ein Isofluranvernebler der Firma Dräger verwendet (Trajan 808, Vapor 19.3, Ludwigshafen). Die Narkosetiefe wurde durch die Reaktion auf interdigitale Schmerzreize sowie den Schwanztonus beurteilt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte bei Spontanatmung mit 1,5 Volumen % Isofluran. Die Analgesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®, ESSEX PHARMA GmbH, München) gelöst in 100 µl 0,9 %iger isotoner Kochsalz-Lösung. Für den Eingriff wurden die Tiere in Rückenlage fixiert. Der Zugang zur rechtsseitigen Arteria carotis communis erfolgte durch Präparation von ventral unter Eröffnung der Capsula interna und der Capsula fibrosa der Schilddrüse.

Nach Trennung der Schilddrüsenlappen erfolgte die Freilegung der Arteria carotis communis im Trigonum caroticum und der Aufteilung in die Arteria carotis interna und Arteria carotis externa. Nach Ablösung des perivaskulären Gewebes wurde die Arteria carotis communis mit einem Seidenfaden der Stärke 7-0 (geflochten, Suprama®, Berlin) legiert. Die extrakranielle Arteria carotis externa wurde unmittelbar nach ihrer Abzweigung aus der Arteria Carotis communis legiert, wobei auch ein Verschluss der Arteria occipitalis erfolgte, welche ca. 1 mm distal der Carotis Bifurkation aus der Arteria carotis externa entspringt. Die Arteria carotis interna wurde in Höhe der Abzweigung der Arteria pterygopalatina temporär mit Hilfe eines Gefäßclips verschlossen. Durch diese Ligaturen wurde ein temporäres Sistieren des Blutflusses in der rechten Arteria carotis communis erreicht (Abb.5.1).

Hiernach wurde proximal der Bifurkation mit Hilfe einer Federschere ein Loch in die Arteria carotis communis geschnitten und ein 11 mm langer, mit Silikon beschichteter Monofilamentfaden der Stärke 8-0 in das Lumen eingeführt. Nach der Entfernung des Gefäßclips wurde der Faden im Lumen der Arteria carotis interna bis zum Abgang der Arteria cerebri media vom Circulus arteriosus cerebri vorgeschoben, wodurch eine fokale Ischämie im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media verursacht wurde. Die Endposition war erreicht, wenn der Faden jeweils 9 mm, gemessen ab der Bifurkation, im Gefäßlumen vorgeschoben wurde. Der regionale Blutfluss wurde mit Hilfe der Laser Doppler Fluometrie (PF5010, Perimed, Schweden) kontrolliert, indem eine flexible fiberoptische Sonde unmittelbar über dem Stromgebiet der Arteria cerebri media auf dem Schädeldach befestigt wurde. Um den Occlusionsfaden in der erreichten Position zu fixieren wurde der Faden distal der Gefäßinzision in der Arteria carotis communis mit einer Schlinge um den im Gefäß befindlichen Faden gelegt. Durch diese Fixationsschlinge wurde ebenfalls verhindert, dass es zu einem Blutverlust durch die Inzision kommen konnte. Hierfür wurde ein Seidenfaden der Stärke 4-0 (PERMA-HAND®, Johnson&Johnson Intl) verwendet. Nach Einbringung des Occlusionsfadens wurde die Wunde mit Einzelknopfnähten verschlossen. Hierfür wurde ein Seidenfaden der Stärke 3-0 (PERMA-HAND®, Johnson&Johnson Intl) verwendet.

Während dem Eingriff wurde die Körpertemperatur rektal kontrolliert und mit Hilfe eines Heizkissens zwischen 37 und 38°C gehalten. Nach Verschluss der Wunde wurden die Tiere in jeweils separate Käfige verbracht. Die Tiere wurden in allen Behandlungsgruppen für die Dauer von 120 Minuten in den Käfigen unter Standardbedingungen belassen wo sie Futter und Wasser ad libidum erhielten. Im Durchschnitt dauerte der Eingriff 10 Minuten.

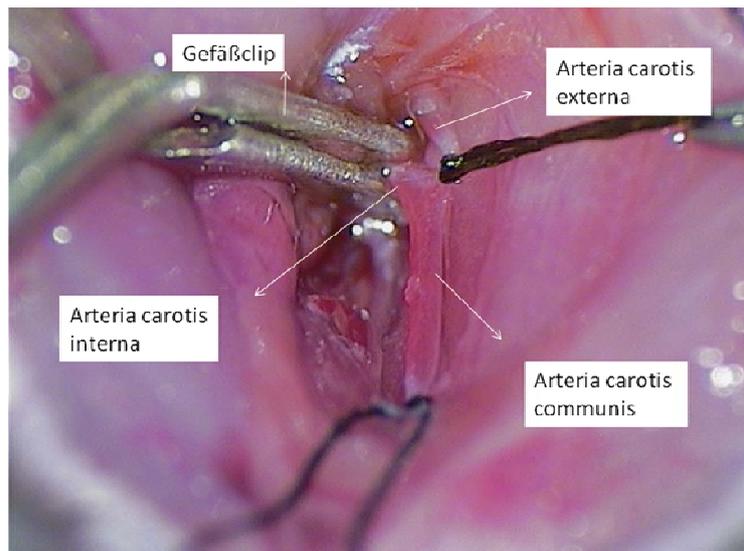


Abb.5 1

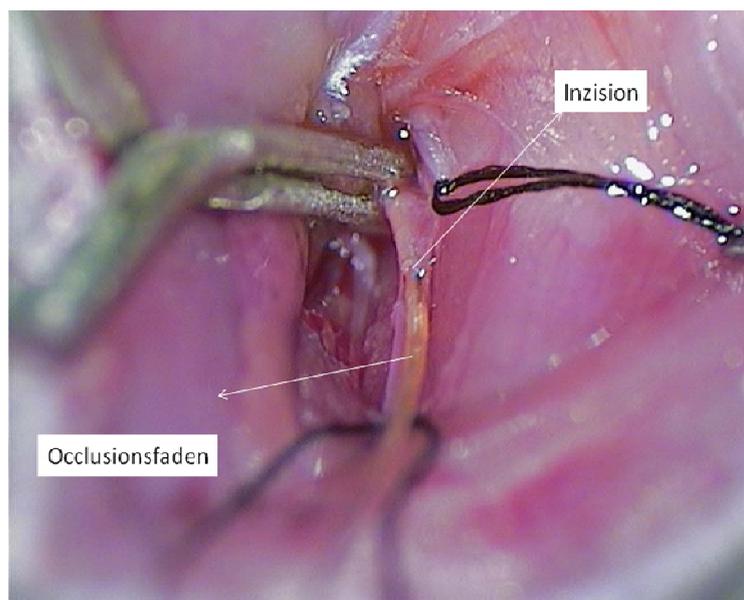


Abb.5 2

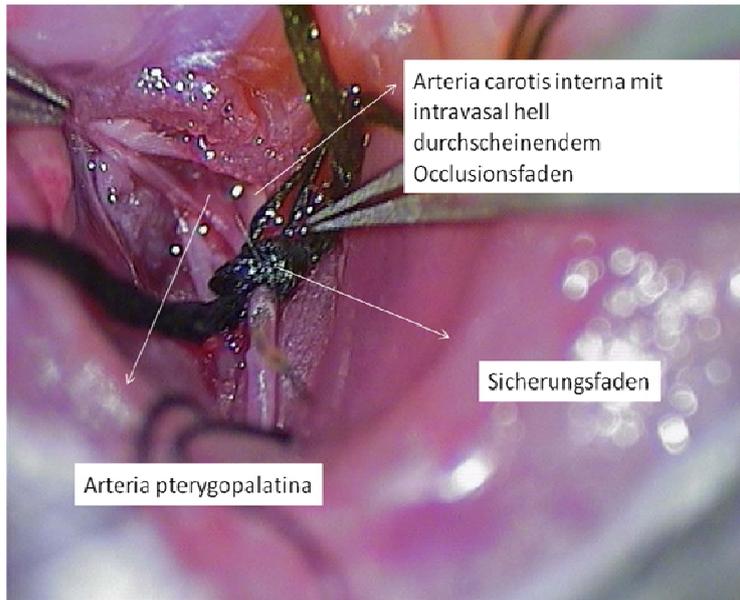


Abb.5 3

Abb.5 Arteria-Cerebri-Occlusionsmodell

Zu sehen ist ein Operationssitus des rechten Trigonum caroticum. In Abb.5.1 ist der Gefäßbaum zu sehen, wie er sich nach Präparation darstellt. Zu sehen sind ebenfalls die Ligaturen an der proximalen Arteria carotis comunis sowie der Arteria carotis externa, welche eine Blutung nach Inzision (Abb.5.2) und Einbringen des Occlusionsfadens verhindern. Nachdem der in den Abb. 5.1+2 zu sehende Gefäßclip entfernt wurde und der Occlusionsfaden bis zum Ursprung der Arteria cerebri media vorgeschoben wurde, erfolgt die Fixierung und Sicherung durch Knotung einer Schlinge um die Arteria carotis comunis (Abb.5.3).

2.1.2 Reperfusion nach transienter fokaler Ischämie

Nach 120 Minuten wurden die Tiere erneut mit Hilfe einer Betäubungskammer unter Zustrom von 4 Volumen% Isofluran narkotisiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte erneut unter Spontanatmung bei Zustrom eines Gasmisches aus 0,1 l/min Sauerstoff und 0,3 l/min Stickstoff bei 1,5 Volumen% Isofluran. Nach Eröffnung der Wundnaht wurde der Faden gelöst, der den in das Lumen der Arteria carotis comunis eingebrachten Occlusionsfaden fixierte. Hiernach wurde der Occlusionsfaden zurückgezogen und vollständig aus dem Gefäß entfernt sowie die Inzision in der Arteria carotis comunis durch eine Ligatur verschlossen. Hierfür wurde ein Seidenfaden der Stärke 4-0 (PERMA-HAND®, Johnson&Johnson Intl)

verwendet. Durch den Rückzug des Occlusionsfadens wurde eine Reperfusion des Versorgungsgebietes der Arteria cerebri media ermöglicht. Nach Inspektion der Wunde auf einen Blutverlust wurde sie erneut unter Verwendung von Einzelknopfnähten verschlossen und die Narkose beendet.

2.2 Histologische Bestimmung des Infarktvolumens und der

Ödemausdehnung mittels Triphenyltetrazolium-Chlorid-Färbung

Zur Messung des Ausmaßes der Hirngewebsnekrose wurde eine Triphenyltetrazolium Chlorid -Färbung (TTC) verwendet (Goldlust et al., 1996). TTC ermöglicht die makroskopische Erkennung von Hirngewebsnekrosen. Tetrazoliumfärbungen bilden in Gegenwart von intakten Dehydrogenase- Enzymsystemen in Mitochondrien farbige Ausfällungen. Im toten Gewebe fehlt die Dehydrogenase Aktivität, was dazu führt, dass es sich nicht färbt und weiß erscheint, wohingegen intaktes Gewebe rot gefärbt wird. Die Herstellung des verwendeten Reagenz erfolgte durch Lösung von 1 g TTC in 50 ml phosphate buffered saline (Phosphatpuffer, PBS) wodurch eine 2% Konzentration erreicht wurde.

2.2.1 Präparation der Mäusegehirne zur Infarktvolumen Bestimmung

Die für die Bestimmung des Infarktvolumens verwendeten Tiere wurden nach 22 Stunden Reperfusion in tiefer Isofluran Narkose dekapitiert und die Hirne rasch entnommen. Die Gehirne wurden unmittelbar nach der Entnahme mit Hilfe einer Hirn-Matrix (RBM 2000C, ASI-Instruments, Michigan, USA) in 1 mm dicke coronare Scheiben geschnitten und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2 % iger TTC Lösung inkubiert. Hiernach wurden die Schnitte aus der Lösung entnommen und mit Hilfe eines Scanners dokumentiert. Um das Infarktvolumen quantitativ darzustellen, erfolgte einer Berechnung mit Hilfe der Computerplanimetrie (NIH ImageJ Software). Hierfür wurden die zweidimensionalen Infarktareale sowie die Flächen der benachbarten Hemisphären erfasst und unter Kenntnis der Hirnscheibendicke dreidimensional aufgerechnet. Um die Ödem bedingte Flächenzunahme der infarzierten Seite zu berücksichtigen, wurde die infarzierte Hemisphäre mit dem Verhältnis aus kontralateraler zu ipsilateraler Hemisphäre multipliziert.

Die Ödemausdehnung wurde durch Subtraktion der Flächen der nicht ischämischen Hemisphäre von der ischämischen Hemisphäre bestimmt.



Abb.6 TTC Färbung

In der Abbildung ist ein exemplarisches, TTC gefärbtes Maushirn zu sehen. Von unten nach oben betrachtet sind die 1mm dicken Schnitte von rostral nach kaudal angeordnet, so dass der unterste Schnitt dem Frontalhirn entspricht. In diesem Bild zeichnet sich sehr deutlich ein rechtshemisphärischer Infarkt ab, welcher dem weißen Gewebe entspricht und welcher sowohl den Bereich der Stammganglien, wie auch das gesamte rechtshemisphärische, kortikale Stromgebiet der Arteria cerebri media betrifft.

**2.3 Nachweis erhöhter Permeabilität der Blut-Hirnschranke *in vivo* –
Behandlungsprotokoll**

Gruppe	Tiere	Pharmakologische Behandlung
1	C57/BI 6	i.v. Injektion von 100 µl 0,9% NaCl Lösung in die laterale Schwanzvene 1h vor Verschuß der A.cerebri media Kontrollgruppe
2	Gp91phox -/-	i.v. Injektion von 100 µl 0,9% NaCl Lösung in die laterale Schwanzvene 1h vor Verschuß der A.cerebri media Funktionsuntüchtige NADPH-Oxidase
3	C57/BI 6	i.v. Injektion von 40 mg/kg KG Apocynin (Fluka 55539, Deutschland), gelöst in 100µl 5% iger Glucose Lösung in die laterale Schwanzvene 1h vor Verschuß der A.cerebri media Inhibition der NADPH Oxidase
4	C57/BI 6	i.v. Injektion von 4µg/kg KG <i>Clostridium difficile lethal Toxin B</i> (Sigma C-4102, Steinheim) gelöst in 100 µl 0,9% NaCl Lösung in die laterale Schwanzvene 1h vor Verschuß der A.cerebri media Inhibition von Rac 1
5	C57/BI 6	i.p. Injektion von 10 mg/kg KG Atorvastatin (MSD) gelöst in 100 µl 0,9% NaCl Lösung in die laterale Schwanzvene 48 h und 24 h vor Verschuß der A.cerebri media Inhibition von Rac 1

2.3.1 Fluoreszenzspektrophotometrische Bestimmung des Evans-Blau

Extravasats

Bei dem angewandten Verfahren handelt es sich um ein optisches Messverfahren zur Konzentrationsbestimmung fluoreszierender Substanzen anhand ihrer Absorption bzw. Extinktion monochromatischen Lichtes. Farbstoffmoleküle, die durch eine Lichtquelle wie z.B. eine Xenon-Lampe angeregt werden, absorbieren Strahlung einer bestimmten Wellenlänge. Das Xenon-Licht wird durch einen Exzitationsfilter auf eine spezifische Wellenlänge reduziert. Wird die spezifische Wellenlänge von den Farbstoffmolekülen absorbiert, überführt es diese in einen energiereicheren Zustand (Exzitationsstrahlung). Bei der Rückkehr der Moleküle aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand wird die entsprechende Differenzenergie in Form von Photonen freigesetzt, was als Fluoreszenz bezeichnet wird (Haeckel et al., 1989). Erfolgt diese Rückkehr vom angeregten Zustand in den Grundzustand über mittlere Energiezustände, entsteht ein vollständiges Fluoreszenzspektrum (Holleman et al., 1985). Ein Teil der Strahlungsenergie, die von den Molekülen absorbiert wird, geht als Bewegungsenergie verloren. Dies erklärt, dass die Fluoreszenz, die von dem Molekül emittiert wird, eine längere Wellenlänge als die Exzitationsstrahlung hat. Die Intensität der von dem Fluoreszenzspektrophotometer in dem Emissionsspektrum gemessenen Fluoreszenz erlaubt einen Rückschluss auf die Anzahl der in der Probe befindlichen Moleküle und somit eine Bestimmung der Konzentration.

Unmittelbar nach Rückzug des Occlusionfadens aus dem Gefäßlumen wurde den Tieren 7 ml/kg Körpergewicht einer 2 % igen, in 0,9 % isotoner Kochsalz-Lösung gelöster, *Evans blau* Lösung (Firma Sigma, CAS-Registrierung 314-13-6, EC-Nummer 2062425) in die laterale Schwanzvene injiziert. Hiernach wurde die Wunde verschlossen und die Tiere wurden in allen Behandlungsgruppen für die Dauer von 60 Minuten wiederum separat in einzelne Käfige verbracht. Nachdem der intravenös applizierte Farbstoff 60 Minuten im Gefäßsystem zirkulierte, wurden die Tiere erneut mit Hilfe der Betäubungskammer in tiefe Isofluran Narkose versetzt. Unter Aufrechterhaltung der tiefen Isofluran Narkose wurden die Tiere von ventral

thorakotomiert. Nach Einbringung eines Perfusionskatheters mit einem Durchmesser von 0,8 mm in den linken Ventrikel und Inzision des rechten Herzohres, wurde das Gefäßsystem transkardial mit eiskalter, PBS-Lösung druckkonstant mit 130 cm Wassersäule perfundiert, bis farblose Flüssigkeit aus dem rechten Herzohr austrat. Nach rascher Hirnentnahme erfolgte die mediane Separation der Hemisphären, welche hiernach mit Hilfe von flüssigem Stickstoff auf -80°C tiefgefroren und bei ebenfalls -80°C bis zur Analyse gelagert wurden.

Zur Analyse wurden die Hirnhälften in gefrorenem Zustand gewogen und in 1 ml 50% Trichloressigsäure zur Proteinfällung mittels UltraTurax (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) homogenisiert und für 20 Minuten bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Je 500 μl Überstand wurden nun mit 1500 μl Ethanol verdünnt um den Farbstoff zur Fluoreszenzmessung zu stabilisieren. Die Fluoreszenzbestimmung erfolgte mittels Fluoreszenzspektrophotometrie mit einer Anregungswellenlänge von 600 nm und Emissionswellenlänge von 650 nm, die quantitative Auswertung mit Hilfe einer Standardkurve.

Weiterhin visualisierten wir die *Evans Blau* Extravasation an Gewebeschnitten mit Hilfe des Licor Oydessey (Bad Homburg, Deutschland) Infrarotscanners bei einer Anregungswellenlänge von 700 nm.

2.4 Untersuchung der Bluthirnschrankenpermeabilität *in vitro*

Wir untersuchten an isolierten Endothelzellen aus Schweinehirnkapillaren (PBCEC) zum einen die Translokation von Rac 1 sowie des TJ Proteins VE Cadherin unter Zuständen der Normoxie, Hypoxie und Reoxigenierung mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskopes. Durch Färbung der einzelnen Zellkomponenten konnten wir Veränderungen ihrer Lokalisation beobachten. Zur Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (transendothelial electric resistance, TEER) an Monolayern aus PBCEC's unter Einfluss von H_2O_2 und verschiedenen Inhibitoren verwendeten wir das Electric-Cell-Substrate-Impedance-Sensing (ECIS).

2.4.1 Zell Kultur

Die Isolierung von Hirnkapillarendothelzellen wurde erstmals von Bowman et al. beschrieben und beruht auf einer zweistufigen, enzymatischen Freisetzung der Endothelzellen aus der Gefäßmatrix und anschließender Dichtegradienten-Zentrifugation [65]. Im ersten enzymatischen Schritt macht man sich den relativ geringen Anteil von Kollagen in der extrazellulären Matrix des Kapillarrohres zunutze. Mit der unspezifischen Protease Dispase wird die extrazelluläre Matrix fast vollständig abgebaut, während die Blutgefäße, die durch eine kollagenhaltige Basalmembran geschützt sind, unversehrt bleiben. Im zweiten enzymatischen Schritt wird die Basalmembran durch Collagenase-D abgebaut, was zu einer sukzessiven Freisetzung der Endothelzellen führt. Die Endothelzellen aus Schweinehirnkapillaren (porcine brain capillary endothelial cells, PBCEC) wurden zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen in M199 Medium mit 10% normalem Rinder Serum (normal calf serum, NCS), 100µg/ml Penicillin/ Streptomycin und 100U/ml Gentamycin. Die Passage erfolgte an Tag 2. Für die Messung des elektrischen Widerstandes wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen pro well die primären PBCEC`s auf ECIS 8W10E Trägern (Erläuterung siehe 2.4.2.) ausgesäht. Die Träger waren mit Kollagen aus Rattenschwänzen beschichtet.

Für die Messung der Immunfluoreszenz wurden die PBCEC`s auf Kollagen behandelten µ-Schalen (ibidi, München, Deutschland) ausgebreitet. An dem vierten Tag nach der initialen Präparation wurde das Kulturmedium durch M199 mit niedrigem Serumgehalt ersetzt, welches lediglich 2% NCS enthält. Die Versuche wurden am sechsten Tag begonnen.

2.4.2 Effekt von H₂O₂ auf die Funktion von cerebralen Endothelzellen *in*

***vitro* mit Hilfe des Electric Cell-Substrate Impedance Sensing- ECIS**

Zur Messung des transendothelialen Widerstandes (TEER) an konfluenten Monolayern aus Endothelzellen verwendeten wir das ECIS Model 1600R (Applied Biophysics, Troy, New York, USA). Dieses System basiert auf dem physikalischen Prinzip einer Reihenschaltung aus ohmschem Widerstand und eines Kondensators. In derartigen Systemen wird der Zusammenhang zwischen Wechselstrom und Spannung als Impedanz bezeichnet, welche sich

in Abhängigkeit von der Kapazität des Kondensators verändert und dem ohmschen Gesetz $R=U/I$ folgt. Die Anordnung des Instrumentes besteht aus einer Acht-Well-Zell-Kultur Platte (8W10E) die auf dem Grund eines jeden Wells eine Goldelektrode enthält. Ferner ein Lock-In Verstärker mit integriertem Oszillator, einem Relais um zwischen den einzelnen Wells zu wechseln und einem Computer der die Daten aufzeichnet.

Der Kondensator setzt sich aus zwei Goldelektroden zusammen. Jedes Well enthält in der Mitte eine kreisrunde Öffnung von 250 μ m Durchmesser und einer Fläche von $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ welche von dem Endothelmonolayer und einem leitenden Elektolytmedium bedeckt wird, sowie einer großen Zählerelektrode mit einem Durchmesser von ca. 0.15 cm^2 .

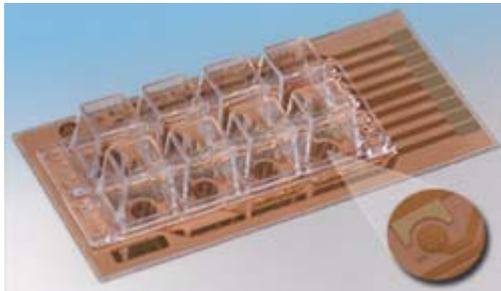


Abb.7 ECIS

Darstellung einer Acht-Well-Zell-Kultur Platte.

Aufgrund der Oberflächendifferenz (~ 300 fach) wird die Gesamtimpedanz des Systems fast ausschließlich durch die Impedanz der kleinen Elektrode bestimmt. Kommt es nun zu Permeabilitätssteigerungen oder –minderungen an dieser kleinen Elektrode, so verändert sich die Impedanz des Monolayers und damit der registrierte transendotheliale Widerstand (TEER) im System.

Kommt es zur Auflockerung des Zellrasens, so sinkt TEER, erhöht sich hingegen der Interzellularkontakt, so steigt TEER.

Wir untersuchten mit Hilfe des ECIS Systems welchen Effekt H_2O_2 auf den TEER hat und welchen Einfluss spezifische Inhibitoren haben. Die Effekte die sich bei der Inkubation mit unterschiedlichen H_2O_2 Konzentrationen in den ersten 18 min ergaben zeigten für $30 \mu\text{mol}$ keinen relevanten TEER-Abfall, wohingegen sich die Zellen nach Inkubation mit $300 \mu\text{mol}$ nicht wieder erholten. In den Versuchen wurden die Zellen in der Folge mit $100 \mu\text{mol}$ H_2O_2 inkubiert.

In jeder Gruppe wurde der TEER unter drei verschiedenen Bedingungen aufgezeichnet:

- Spezifischer Inhibitor ohne H₂O₂
- Ohne spezifischen Inhibitor mit H₂O₂
- Spezifischer Inhibitor und H₂O₂

Wir untersuchten sechs Inhibitoren auf ihre spezifische Wirkung und damit den Einfluss der inhibierten Enzyme auf die Permeabilität der Endothelzellbarriere:

Gruppe	Inhibitor	Kinase/Oxidase
1	PD 98059	P44/42 MAPK resp. ERK 1/2
2	SP 600125	c-jun N-terminal Kinase JNK
3	SB 203580	p 38 MAPK
4	Y 27632	Rho-Kinase
5	Apocynin	NADPH-Oxidase
6	Wortmannin	Phosphoinositid-3-Kinase PI-3

2.4.3 in vitro Ischämie/Reperfusion

Am sechsten Tag nach der initialen Präparation wurde das Medium durch Niedrig-Serum ersetzt (2% NCS) und die Endothelzellen wurden einem Glucosefreien Medium mit Stickstoff ausgesetzt. Danach wurden die Zellen für 8 Stunden mit 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ bei 37°C inkubiert. Die normoxische Kontrollen erhielten 5,5 mmol/L Glucose. Für die Reoxygenierung wurden die Zellen in einen normoxischen Inkubator verbracht. Die Versuche wurden durch die Zugabe einer Phosphat gepuffertem Paraformaldehyd (PFA) Lösung gestoppt. Um eine optimale Anfärbung des Zellinneren zu erreichen wurden die Zellen mit Triton X-100 (0,05%) permeabilisiert und für die Detektion von Rac-1 (Upstate, 1:200), VE-

Cadherin (Santa Cruz, 1:200), g-Aktin (Alexa fluor 488-conjugated DNase I, Invitrogen) oder f-Aktin (Alexa fluor 546-conjugated phalloidin, Invitrogen) gefärbt. Primäre Antikörper wurden mit Hilfe geeigneter Alexa-labeled Zwei-Antikörper (1:300, Invitrogen) markiert. Die Antikörper wurden in Tris-Puffer (pH 7,2) inkubiert, welcher 3% Rinderserum Albumin und 0,5% Tween 20- diese Lösung wurde auch verwendet um die Reaktion zu blocken. Die Aufzeichnung erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Laserscanner Konfokalmikroskopes (LSM 510 META).

2.5 Statistische Analysen

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des ungepaarten Student-T-Tests. Die Werte wurden mittels ANOVA (analysis of variance) für multiple Messungen und nachfolgendem Fischer LSD-Test ausgewertet. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 gp91phox -/- und p47phox-/- Mäuse entwickeln nach fokaler

cerebraler Ischämie kleine Infarkte

Ziel dieses Versuches war es, die Rolle der NADPH-Oxidase für das Ausmaß des neuronalen Gewebeschadens nach fokaler cerebraler Ischämie zu untersuchen und zu prüfen, ob Mäuse, deren gp91phox bzw. p47phox Untereinheit durch genetische Deletion ausgeknockt wurden, durch diesen Defekt ein kleineres Infarktareal aufweisen. Nach 120 min Ischämie und darauf folgenden 22 h Reperfusion wurde der Hirngewebsschaden mit Hilfe der TTC- Färbung bestimmt und mit Hilfe einer planimetrischen Methode berechnet. Wir konnten zeigen, dass das Infarktvolumen sowohl bei gp91phox -/- Mäusen ($43 \pm 10 \text{ mm}^3$) wie auch bei den p47phox-/- Mäusen signifikant kleiner war als in den vergleichbaren rechten Hemisphären der Wild-Typ Kontrollen ($16 \pm 8 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). Überdies war die Ausprägung des cerebralen Ödemes bei den Tieren mit einer funktionsuntüchtigen NADPH-Oxidase signifikant geringer ($16 \pm 8 \text{ mm}^3$ vs WT $45 \pm 10 \text{ mm}^3$).

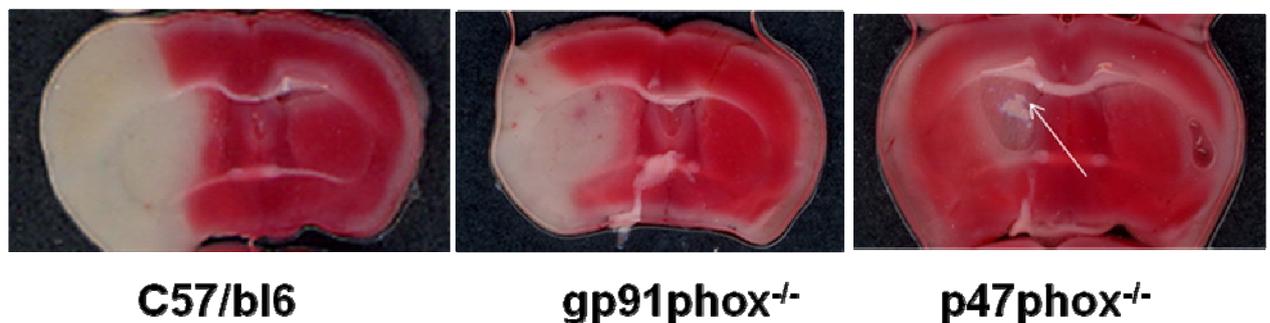


Abb.7.1 Infarktausdehnung

In der Abbildung sind jeweils representative 1 mm dicke Hirnschnitte aus den jeweiligen Gruppen dargestellt, welche jeweils für 10 min in TTC gefärbt wurden. Die deutlich weißen Bereiche stellen das infarzierte Gewebe dar, wo es zu keiner Anfärbung durch das TTC kam. Die roten Bereiche stellen vitales Gewebe dar. Man sieht sehr deutlich, dass die Wildtyp Mäuse wesentlich größere Infarktterritorien aufweisen als die gp91phox-/- Tiere. Die kleinsten Infarkte, lediglich den Bereich der Stammganglien(weißer Pfeil) affektierend zeigen die p47phox-/-Tiere.

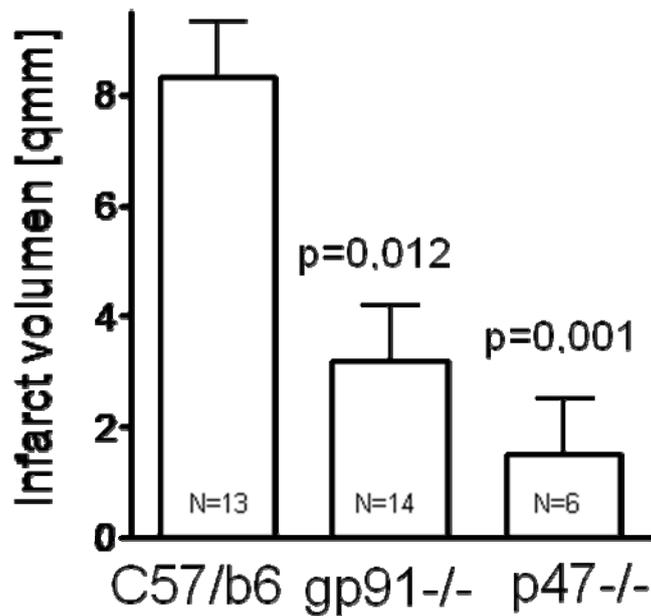


Abb.7.2 Infarktausdehnung quantitativ

In diesem Diagramm sind die Infarkt volumina nach 22 Stunden Reperfusion aufgetragen. Quantifiziert wurden die Daten aus den einzelnen Schnitten durch ein planimetrisches Verfahren. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass die gp91^{-/-} Tiere signifikant ($p < 0.05$) kleinere Infarkte aufweisen als die Wildtypmäuse. Noch deutlicher ist die Reduktion des Infarkt volumens bei den p47^{phox}^{-/-} Tieren ausgeprägt ($p < 0.05$) wo es lediglich im Bereich der Stammganglien zu Infarkten kam, was makroskopisch in Abb.7.1 zu sehen ist.

3.2 Die NADPH-Oxidase ist an der Entstehung des frühen Blut-Hirnschranken Schadens nach cerebraler Ischämie und Reperfusion beteiligt

Das von Evans entwickelte, chirale Hilfsreagenz S-(-)-4-Isopropyl-2-oxazolidon, das für die enantioselektive Synthese von α -substituierten Carbonsäurederivaten verwendet wird, hat in den letzten Jahren immer wieder auch Verwendung bei Untersuchungen der Funktion der Blut-Hirnschranke gefunden. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist dieser Farbstoff im ZNS nicht detektierbar, wohingegen bei gesteigerter Permeabilität das an Albumin gekoppelte *EvansBlau* fluoreszenzspektrophotometrisch nachweisbar ist. Entfernt man nun den zuvor intravenös applizierten Farbstoff durch transkardiale Perfusion aus dem Gefäßsystem, ist ein Nachweis lediglich noch in Geweben möglich wo ein Übertritt von Albumin gebundenem *EvansBlau* ins Parenchym stattfinden konnte. Im Falle des ZNS verhindert eine intakte Bluthirnschranke einen solchen Übertritt, so dass der Nachweis eine quantitative Aussage über das Maß der Barrierepermeabilität zulässt.



Abb.8.1 *EvansBlau* Extavasation

In der Abbildung sieht man exemplarisch ein Maushirn unmittelbar nach der Hirnentnahme und vorangegangener, transkardialer Perfusion mit PBS. Man kann deutlich erkennen, dass es im kortikalen Stromgebiet der rechten Arteria cerebri media zu einem Übertritt von *EvansBlau* kam, wohingegen die kontralaterale Hemisphäre kein Extravasat aufweist.

Wir konnten in unseren Versuchen nachweisen, dass die mit Hilfe der *EvansBlau* Extravasation gemessene Bluthirnschrankenpermeabilität in der

Kontrollgruppe signifikant stärker anstieg, als in der entsprechenden Hemisphäre der gp91phox^{-/-} Mäuse. Die spezifische Inhibition der NADPH-Oxidase durch Apocynin führte ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die frühe Schrankenstörung nach einer Stunde Reperfusion deutlich geringer ausfiel, als in den Wild-Typ Mäusen. Diese Resultate deuten darauf hin, dass der frühe Anstieg der Bluthirnschrankenpermeabilität nach Ischämie und Reperfusion auf eine Aktivierung der lokalen NADPH-Oxidase zurückzuführen ist.

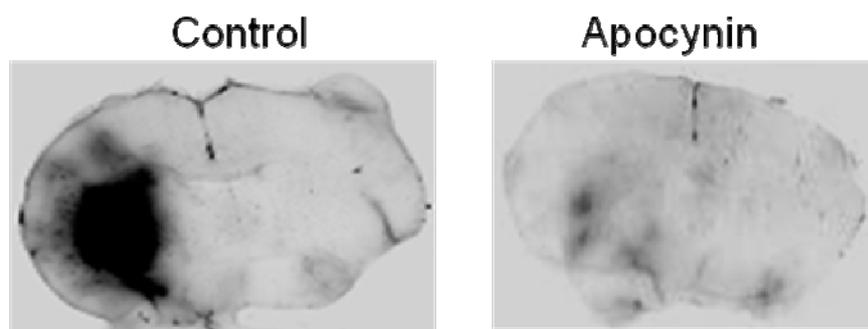


Abb.8.2 Evans Blau Extravasation

In der Darstellung sieht man zwei 1mm dicke Hirnschnitte, die wir zur exemplarischen Veranschaulichung der *Evans Blau* Extravasation mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners aufgenommen haben. Im linken Bild sieht man sehr deutlich, dass es im Bereich der Stammganglien eines unbehandelten Kontrolltieres zu einem massiven Austritt des Farbstoffes in Parenchym kam, wohingegen im rechten Bild, einem mit Apocynin behandelten Tier, kaum *Evans Blau* nachweisbar ist.

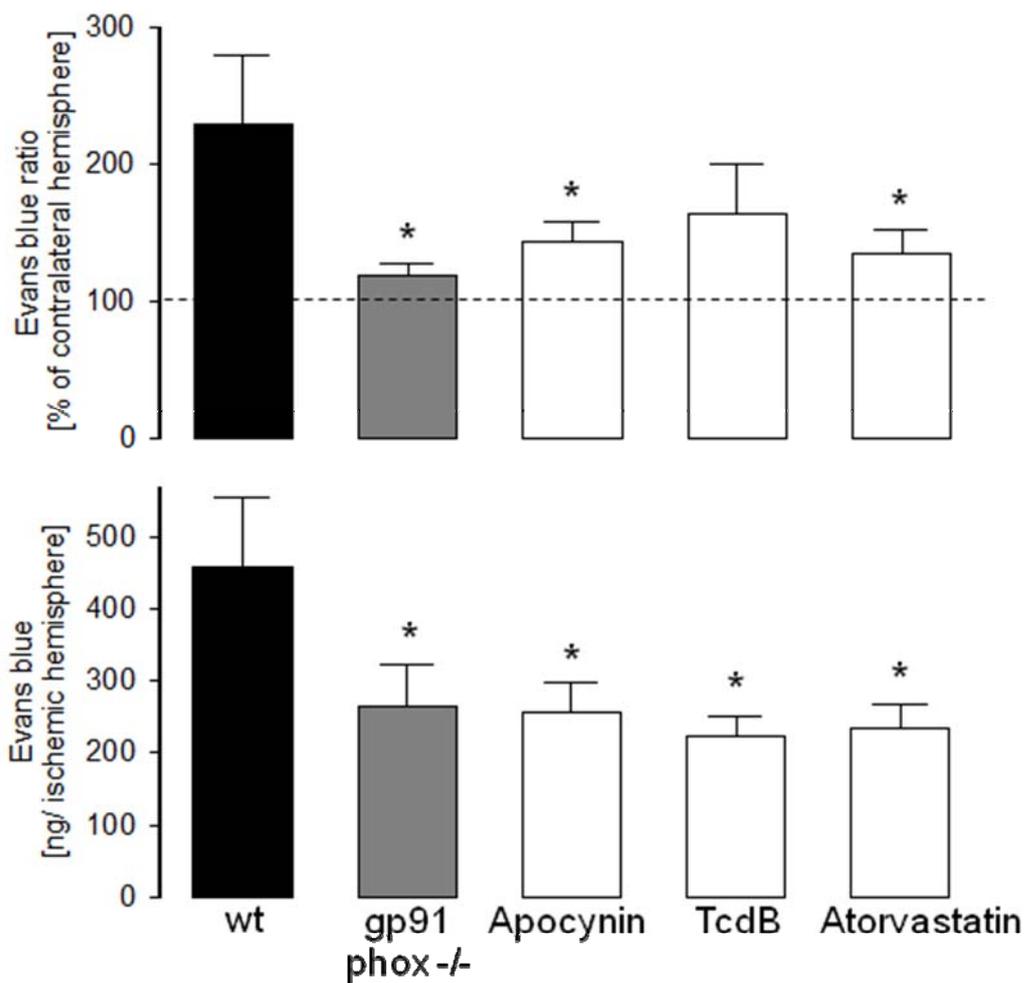


Abb.8.3 Hemmung der frühen Bluthirnschrankenstörung

In der Abbildung ist die statistische Analyse der extravasalen *EvansBlau* Bestimmung mit Hilfe von Fluoreszenzspektrophotometrie dargestellt. Die Daten von c57/BL6 Mäusen (wt) wurden zum Einen den von gp91phox-/- Mäusen gegenübergestellt und zum Anderen den von Tieren, welche vorher mit Apocynin, Clostridium lethal Toxin B (TcdB) oder Atorvastatin behandelt wurden. Das obere Diagramm zeigt das Verhältnis von Extravasat der infarzierten Hemisphäre im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre, im unteren Diagramm ist der absolute *EvansBlau* Gehalt der infarzierten Hemisphäre dargestellt. n=6-8, *p<0.05.

3.3 Rac-1 ist an der Entstehung des frühen Blut-Hirnschranken

Schadens nach cerebraler Ischämie/ Reperfusion beteiligt- *in vivo*

Da die kleine GTPase Rac-1 aus der Ras-Familie an der Aktivierung der NADPH-Oxidase beteiligt ist, wurde das Enzym durch zwei unterschiedliche Inhibitoren blockiert. Die Gruppe 4 erhielt zweimalig den HMG-CoA-Reduktase Inhibitor Atorvastatin intraperitoneal injiziert- 48 h und 24 h vor Ischämie. Den Tieren der Gruppe 5 wurde 1 h vor Ischämie der irreversible GTPase Inhibitor *Clostridium difficile lethal Toxin B* (TcdB) intravenös appliziert. Beide Substanzen erzielten einen ähnlichen Effekt wie Apocynin und reduzierten die Blut-Hirnschrankenpermeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.4 Rac-1 wird durch Hypoxie/ Reoxygenierung aktiviert und transloziert an die Membran- *in vitro*

Da die Aktivierung der NADPH-Oxidase von der Membran Translokation der GTPase Rac-1 direkt abhängig ist, untersuchten wir an kultivierten PBCEC`s, ob dieser Prozess als Reaktion auf Hypoxie und darauf folgende Reoxygenierung stattfindet. Wir konnten zeigen, dass eine kurze Reoxygenierung nach einer Hypoxie, in Endothelzellen, zu einer partiellen Translokation von Rac-1 an die Membran führt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des *in vivo* Versuches, lässt sich die Aussage treffen, dass die Rac-1 maßgeblich an der Aktivierung der NADPH-Oxidase nach transienter Hypoxie und Reoxygenierung beteiligt ist.

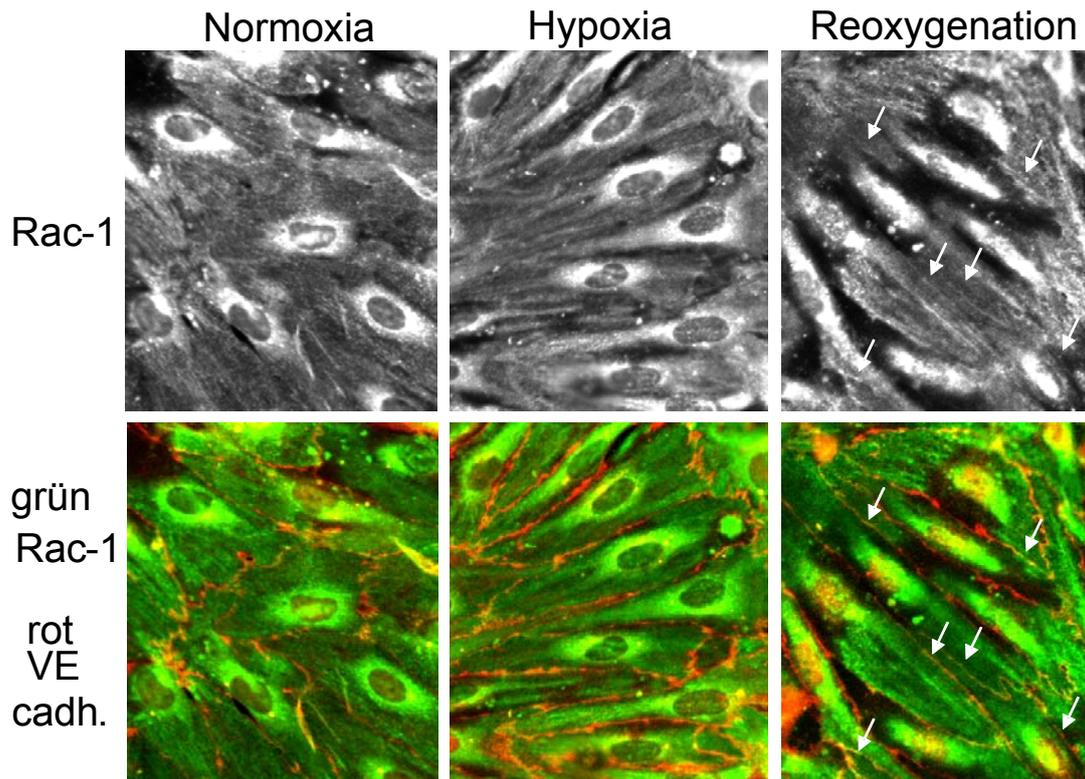


Abb.9. 1 Hypoxie und Reoxygenierung

In der Abbildung sind die Effekte von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Lokalisation der GTPase Rac-1 dargestellt. PBCEC's wurden normoxischen oder hypoxischen Bedingungen, bzw. Hypoxie und Reoxygenierung ausgesetzt mit Hilfe des Konfokalmikroskopes aufgenommen. In der Darstellung sind jeweils representative Bilder zu sehen. Als Marker für die Plasmamembran verwendeten wir VE-Cadherin (rot VE-cadh.) welches in der unteren Reihe rot erscheint. Im rechten unteren Bild ist die membrantranslozierte Rac-1 mit weißen Pfeilen markiert, was im Rahmen der Reoxygenierung als Hinweis auf eine NADPH-Oxidase Aktivierung zu sehen ist.

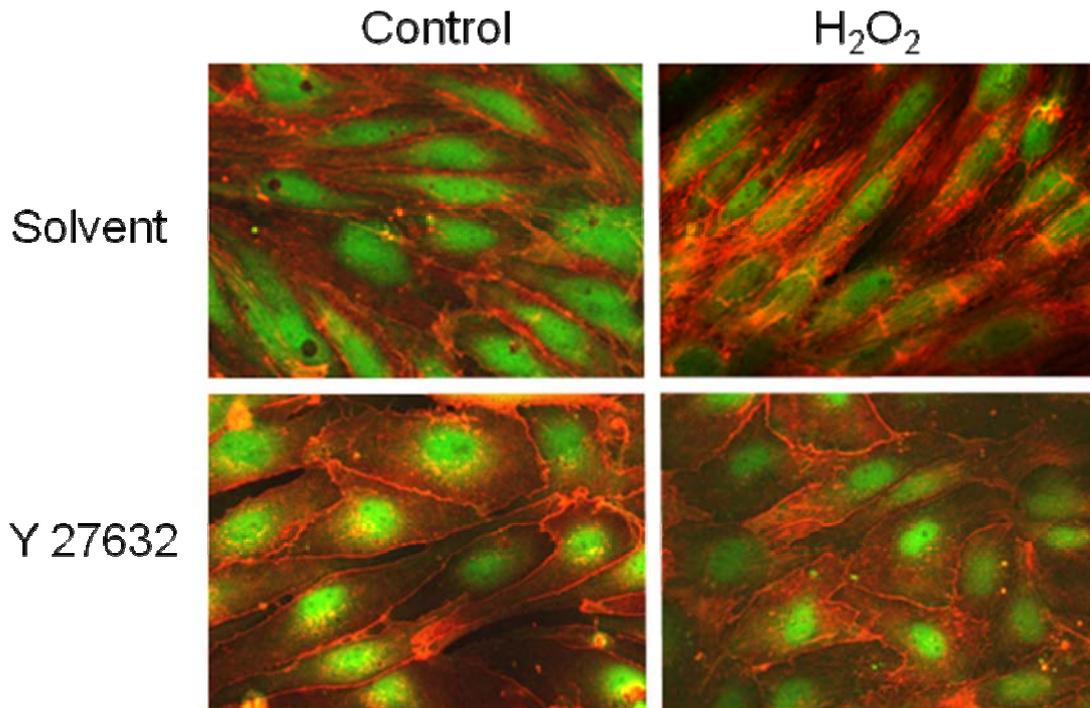


Abb.9.2 Zytoskelett

PBCEC`s wurden mit und ohne (Control) H₂O₂ (100 µmol/L, 15 min) behandelt. In der oberen Reihe ohne in der unteren Reihe mit dem Rho-Inhibitor Y276632(50 µmol/L). In den exemplarischen konfokalmikroskopischen Aufnahmen ist f-Aktin rot gefärbt (Alexa-phalloidin 546 nm) und das g-Aktin grün (mit Alexa fluor 488 konjugierter DNase I).

Es ist zu erkennen, dass die für die Zellkontraktion erforderliche Aktinpolymerisation durch Y276632 blockiert wird.

3.5 ROS führen zu einer gesteigerten Permeabilität von Zellbarrieren aus cerebralen Kapillarendothelzellen

Änderungen der Blut-Hirnschranken Integrität werden durch zahlreiche Mechanismen wie Störung der Gefäßintegrität durch Matrix-Metalloproteinasen, Apoptose von Astrozyten oder der Kontraktion und Ablösung von Endothelzellen verursacht, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten Einfluss nehmen. Da die Arbeit sich in erster Linie auf die frühen Veränderungen der Blut-Hirnschranken Permeabilität konzentriert, postulierten wir, dass dieser Effekt vorrangig auf Endothelzellkontraktion und Abbau der Tight junction`s beruht, und dadurch zu einer Erweiterung des parazellulären Raumes führt. Um die Einflüsse von ROS auf die Permeabilität

darzustellen, untersuchten wir die Wirkungen von H_2O_2 auf die TEER an primären PBCEC`s. In Abhängigkeit von der Menge steigert H_2O_2 die Permeabilität des Monolayers sehr schnell, innerhalb der ersten 20 Minuten und führt weiterhin zu einer Polymerisation des Aktin-Cytoskelettes von PBCEC`s. Die Auswirkungen von Wasserstoffperoxid auf die Integrität der Zellschicht konnte durch Apocynin nicht beeinflusst werden, was wiederum demonstriert, dass der NADPH-Oxidase Inhibitor zu einem späteren Zeitpunkt eingreift.

3.6 Die Rho-Kinase ist an dem ROS-vermittelten Anstieg der

Permeabilität von Zellverbänden aus Kapillarendothelzellen beteiligt

Mit Hilfe des ECIS Systems zeichneten wir die Auswirkung verschiedener pharmakologischer Inhibitoren auf, um zu klären, welche Signaltransduktionsprozesse an der ROS induzierten TEER-Veränderung des Monolayers beteiligt sind. Die Inhibition von p38 MAP Kinase sowie ERK 1/2 blieb ohne Effekt, wohingegen die Blockade der JNK durch SP 600125 die Permeabilitätssteigerung durch H_2O_2 etwas abschwächen konnte.

Im Gegensatz dazu konnten wir mit Hilfe des Phosphoinositid-3-Kinase Inhibitors Wortmannin eine signifikante Absenkung des H_2O_2 induzierten Permeabilitätserhöhung erreichen. Am deutlichsten jedoch war das Resultat der Rho Inhibition durch Y 27632- hier wurde ein Anstieg der Permeabilität komplett blockiert.

Einen weiteren Effekt der Y 27632 Inhibition konnten wir mit Hilfe der Konfokalmikroskopie beobachten- hier zeigte sich, dass die Substanz die H_2O_2 induzierte Aktinpolymerisation verhinderte, welche den letzten Schritt der Endothelzellkontraktion darstellt. Hiermit wird deutlich, dass im Rahmen der Hypoxie, die Aktivierung der Rho-Kinase entscheidend zur Permeabilitätssteigerung von Endothelzellbarrieren beiträgt.

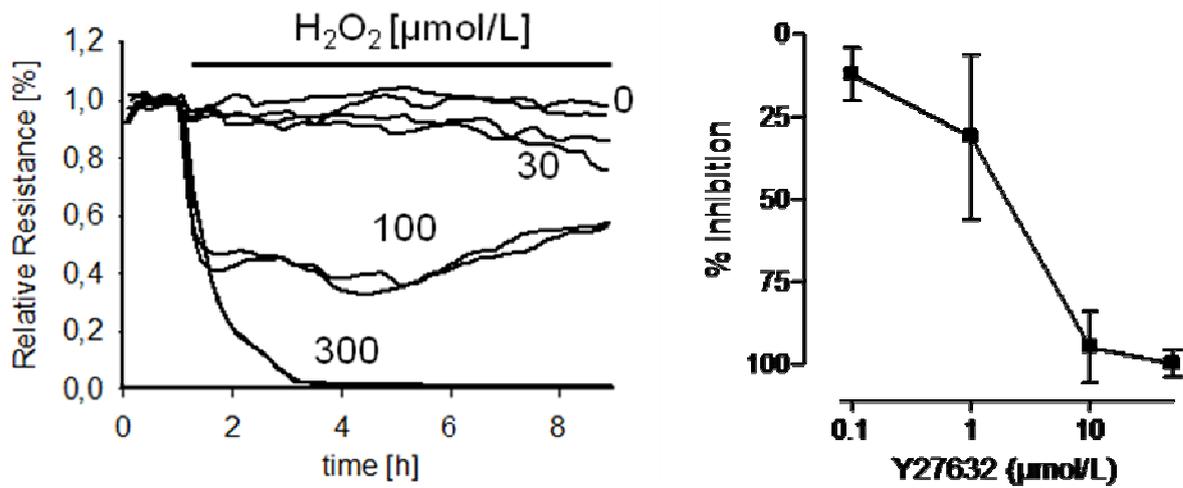


Abb.10.1 Transendothelialer Widerstand

In der linken Abbildung ist zum einen der Transendotheliale Widerstand (TEER) dargestellt und der Abfall in Abhängigkeit von der H₂O₂ Konzentration. In der rechten Abbildung ist die Dosis-Antwort Kurve für die Y27632 Inhibition der H₂O₂ vermittelten Permeabilitätssteigerung aufgetragen. (n=3 pro Kästchen). Bei einer Dosis von 10μmol/L wird eine nahezu 100%ige Blockade der Permeabilitätssteigerung erreicht.

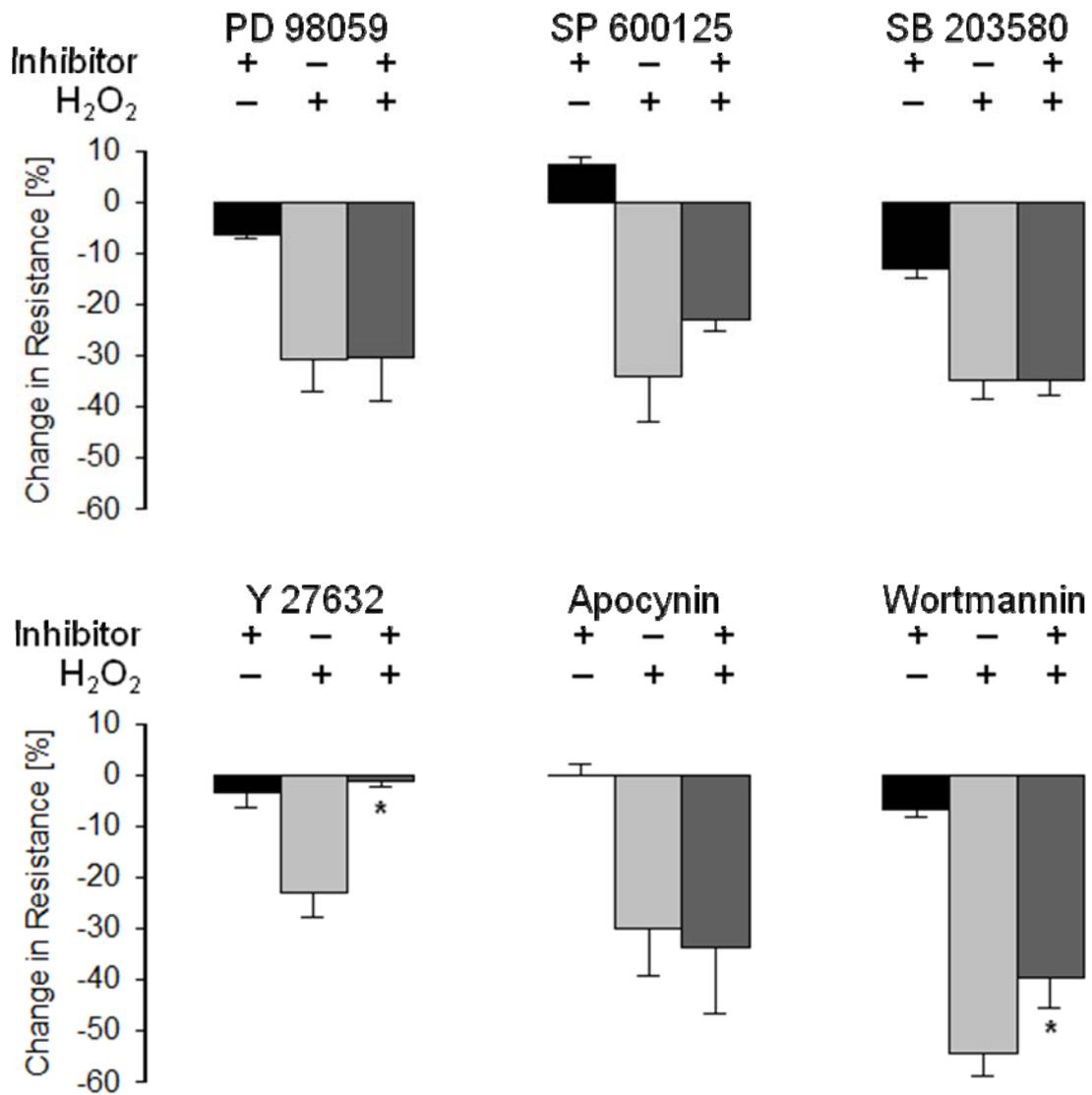


Abb.10.2 Inhibition der Permeabilitätssteigerung

Statistische Analyse der Effekte des ERK 1/2 Inhibitors PD98059 (20µmol/L), des JNK Inhibitors SP600125 (20µmol/L), des p38 MAP-Kinase Inhibitors SB203580 (20µmol/L), des Rho-Kinase Inhibitors Y27632 (50µmol/L), des NADPH-Oxidase Inhibitors Apocynin und des PI-3 Kinase Inhibitors Wortmannin auf den TEER unter dem Einfluss von H₂O₂ (100µmol/L) oder unter Normalbedingungen. Für Y27632 und Wortmannin (20nmol/L) ist eine signifikante Blockade der H₂O₂ vermittelten Permeabilitätssteigerung zu sehen. N=4-6, *p<0.05.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es die Rolle der NADPH-Oxidase im Rahmen der cerebralen Ischämie darzustellen. Wir konnten zeigen, dass insbesondere während der frühen Phase der Reperfusion, die durch NOX 2 generierten Sauerstoffradikale zur Störung der Bluthirnschrankenbarriere beitragen, sowie dass Ausmaß des Hirnödems und der Untergang neuronalen Gewebes durch dieses Enzym beeinflusst werden. Neben diesen Beobachtungen im Tiermodell fanden wir ferner auf zellulärer Ebene Hinweise darauf, dass die Inhibition spezifischer Aktivierungsprozesse der NADPH-Oxidase in Endothelzellen aus Schweinehirnkapillaren zu einer verminderten Störung ihrer Schrankenfunktion führte.

4.1 ROS und die Pathogenese von Gewebsschäden nach cerebraler

Ischämie

Wie eingangs bereits erwähnt wurde, spielen die von NADPH-Oxidasen generierten ROS eine bedeutende Rolle bei der Entstehung ischämischer Gewebeeinfarkte und dem sogenannten Reperfusionsschaden. Im Rahmen eines ischämischen Hirninfarktes kommt es binnen kurzer Zeit zu einem rapiden Abfall der Glucose und Sauerstoffversorgung im betroffenen Hirnareal, was zu einer verminderten Verfügbarkeit von Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) sowie Membrandepolarisation führt und über weitere Zwischenschritte zur Ca^{2+} Überladung und Nekrose der Neuronen. Wird das zuvor occludierte Gefäß nun wiedereröffnet, so kommt es zu einer Reperfusion des Infarktareals mit Blut und dadurch ebenfalls zu einer Reoxygenierung desselben, wobei der nun zur Verfügung stehende Sauerstoff als Substrat für zahlreiche enzymatische Reaktionen dient. Die hierbei produzierten ROS werden unter physiologischen Bedingungen mit Hilfe der antioxidativen Abwehrmechanismen wie SOD und Gpx detoxifiziert. Im Rahmen der Reperfusion entstehen jedoch aufgrund von inadäquater Wiederaufbereitung und dem hohen Verbrauch jener Antioxidantien im ischämischen Gewebe, toxische Mengen von ROS.

Der als oxidativer Stress bezeichnete Zustand ermöglicht die Modifikation zahlreicher Signaltransduktionsprozesse die wiederum zu Zellnekrose, Apoptose oder Schädigungen der Bluthirnschranke führen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in Neuronen bereits nach 30 Minuten fokaler Ischämie ein rapider Abfall der Expression des Reperaturenzyms APE (apyrimidinic endonuclease) stattfindet [66]. Die APE ist ein konstitutiv, vornehmlich im Nucleus exprimierte Enzym, welches durch Exzision einzelner Basen aus der DNA dazu in der Lage ist, durch Sauerstoffradikale hervorgerufene Veränderungen an der Erbsubstanz zu reparieren. Geht diese Funktion aufgrund verminderter Expression verloren, entstehen irreversible DNA Veränderungen die zur Einleitung des programmierten Zelltodes führen und damit zu einer Vergrößerung des Ischämieschadens.

Den Hauptangriffspunkt der Sauerstoffradikale bilden desweiteren Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise der nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B), von dem angenommen wird, dass er in Abhängigkeit vom Redoxstatus der Zelle reguliert wird [67]. NF- κ B seinerseits induziert in der Zelle zahlreiche Gene und Cytokine, wie die induzierbare NO Synthase (iNOS), die Cyclooxygenase 2 (COX 2) sowie die Matrix- Metalloproteinase-9 (MMP 9) und interzelluläre Adhäsionsmoleküle von denen bekannt ist, dass sie an Permeabilitätsstörungen der Bluthirnschranke und der Ausdehnung des Hirninfarktes durch Zellnekrosen beteiligt sind. So wird ersichtlich, dass die reaktiven Sauerstoffmetabolite durch vielseitige Interaktionen mit den intrazellulären Signaltransduktionsprozessen großen Einfluss auf Integrität der Zelle nehmen. Einleitung der Apoptose, Zellnekrosen sowie Störungen der Bluthirnschrankenpermeabilität sind im Falle des ischämischen Hirninfarktes und des Reperfusionsschadens schwerwiegende Folgen, die den Krankheitsverlauf erheblich mit beeinflussen. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir den Zusammenhang zwischen Aktivierung der NADPH-Oxidase und Blut-Hirnschrankenschaden sowie die damit verbundene Beeinflussung der Infarktausdehnung und Ödembildung.

4.2 Infarktreaktion durch pharmakologische Inhibition der NADPH-

Oxidase

Wir konnten in der vorliegenden Studie zeigen, dass die genetische Deletion der gp91phox Untereinheit den frühen Blut-Hirnschrankenschaden mindert und die Entwicklung eines Ödems nach dem Schlaganfall reduziert. Ebenso führte die spezifische Hemmung der NADPH-Oxidase, wie auch die Inhibition von Rac zu einem vergleichbaren Effekt wie die Deletion der gp91phox. Die Inhibition der NADPH-Oxidase erfolgte durch Apocynin (4-Hydroxy-3-Methoxyacetophenon). Das Extrakt aus der Wurzel von *Picorrhiza kurroa*, einem Kraut welches im Himalaja Gebirge beheimatet ist, ist in der Lage, die ROS Produktion durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu senken und kann damit unter anderem Einfluss auf zahlreiche inflammatorische Prozesse. Es gibt Hinweise, dass Apocynin durch Blockade der Membrantranslokation der p47phox und der p67phox Untereinheit die Assemblierung des NADPH-Oxidase Komplexes verhindern und dadurch die Aktivierung inhibieren [68]. In unserem Tierversuch reduziert die Applikation von Apocynin die Entwicklung eines Blut-Hirnschrankenschadens deutlich und sollte als Option für eine therapeutische Intervention in Betracht gezogen werden.

Weitere Effekte von Pharmaka auf die Blut-Hirnschranke konnten wir für Atorvastatin und *Clostridium difficile lethal Toxin B* (TcdB) zeigen. Es ist bekannt, dass 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase Inhibitoren (HMG-CoA), sogenannte Statine, zahlreiche Einflüsse auf die Eigenschaften von endothelalem Gewebe ausüben [69]. Diese Effekte sind jedoch nicht ausschließlich auf die Cholesterin senkende Wirkung der Statine zurückzuführen, welche durch die Inhibition der Mevalonat Synthese erreicht werden. Vielmehr sind diese Stoffe an der Regulation des Gefäßtonus durch Stickstoffmonoxid (NO) und die Produktion von ROS beteiligt und üben dadurch einen direkten Effekt auf die endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose aus [70]. Es konnte gezeigt werden, dass Atorvastatin die Produktion von ROS, nach Stimulation von aortalen VSMC mit Angiotensin II und dem Epidermalen Wachstumsfaktor EGF, signifikant reduzierte [71]. Als Ursachen für diesen Effekt werden zwei unterschiedlichen Mechanismen

diskutiert: Zum einen wird von Wassmann S. et al. postuliert, dass eine Atorvastatin Therapie zu einer reduzierten Expression der NADPH-Oxidase Untereinheit p22phox führt, welche für die Funktion des Enzymkomplexes essentiell ist [72]. Des Weiteren konnte mehrfach gezeigt werden, dass Atorvastatin die Membran Translokation der GTPase Rac1 hemmt, wodurch es ebenfalls zu einer Blockade der NADPH-Oxidase kommt. Durch diese direkten Interaktionen zwischen Statinen und Komponenten der vaskulären Radikalproduktion, nehmen die HMG CoA Reduktase Inhibitoren weit über ihre Cholesterin senkende Wirkung hinaus, großen Einfluss auf Erkrankungen des kardiovaskulären Formenkreises. Tatsächlich konnte in zahlreichen klinischen Studien gezeigt werden, dass eine Therapie mit Statinen das relative Risiko einen Schlaganfall zu erleiden senkt und im Falle einer Ischämie, der Gewebeschaden geringer ausfällt als ohne Behandlung [73]. Jedoch konzentrierten sich die Bemühungen von Endres et al. in erster Linie auf die Interaktion von Statinen und der endothelialen NO Synthase (eNOS), sowie deren Auswirkungen auf die cerebrale Ischämie. Diese Enzym wird in Endothelzellen konstitutiv exprimiert und bildet aus der Aminosäure L-Arginin den Second messenger NO, nachdem es durch Ca^{2+} und Calmodulin aktiviert wird. Dem Aktivierungsmechanismus der eNOS liegt eine Phosphorylierungskaskade zugrunde an welcher im Wesentlichen die Proteinkinase Akt sowie die PI-3-Kinase beteiligt sind [74]. NO ist ein hochpotenter Vasodilatator und reguliert darüber den regionalen Blutfluss, so dass diesem Gas bei der cerebralen Ischämie eine entscheidende Rolle zukommt [75]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Mäuse mit einer genetischen Deletion der eNOS hypertensiv waren und nach einer transienten Ischämie im Stromgebiet der Arteria cerebri media deutlich größere Infarkte aufwiesen als die Kontrolltiere [76]. Im Falle der neuroprotektiven Wirkung von Statinen läßt sich die Aussage treffen, dass es unter dem Einfluss von HMG-CoA Reduktase Inhibitoren zu einer gesteigerten Expression der eNOS kommt und sich daraus zahlreiche positive Effekte aus der vasodilatierenden Wirkung des NO ergeben [73]. Weitere Effekte der Statine beruhen darauf, dass sie die Isoprenylierung und damit die Funktion von kleinen GTPasen, wie zum Beispiel RhoA hemmen wodurch ebenfalls eine Hochregulation der eNOS erreicht wird [77].

Mit der Applikation von TcdB blockierten wir ebenfalls durch Inhibition der Rac-1 den Aktivierungsprozess der NADPH-Oxidase. Die Toxine A und B sind Virulenzfaktoren des Bakteriums *Clostridium difficile*, welche für die Antibiotika assoziiert pseudomembranöse Colitis verantwortlich sind. Durch Glukosylierung der Aminosäure Threonin an Position 35 der GTPase Rac-1 greift das Toxin nachhaltig in den Aktivierungsprozess der NADPH-Oxidase ein. Durch die Anheftung eines Glucoserestes wird die Translokation der GTPase aus dem Zytosol an die Membran verhindert [78]. Basierend auf diesen Vorkenntnissen postulierten wir, dass TcdB über seinen inhibierenden Effekt bei der NADPH Aktivierung auch auf die Ausbildung des Bluthirnschrankenschadens Einfluss nehmen könnte.

Diese Hypothese wurde durch unsere Untersuchungen im Tiermodell bestätigt da wir zeigen konnten, dass die intravenöse Applikation des Toxins zu einer deutlichen Reduktion des Bluthirnschrankenschadens führt was durch eine verringerte Evans Blue Extravasation belegt wurde. Unsere Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Inhibition der NADPH-Oxidase Aktivierung ein möglicher Mechanismus ist, der für die protektive Wirkung von Statinen verantwortlich ist.

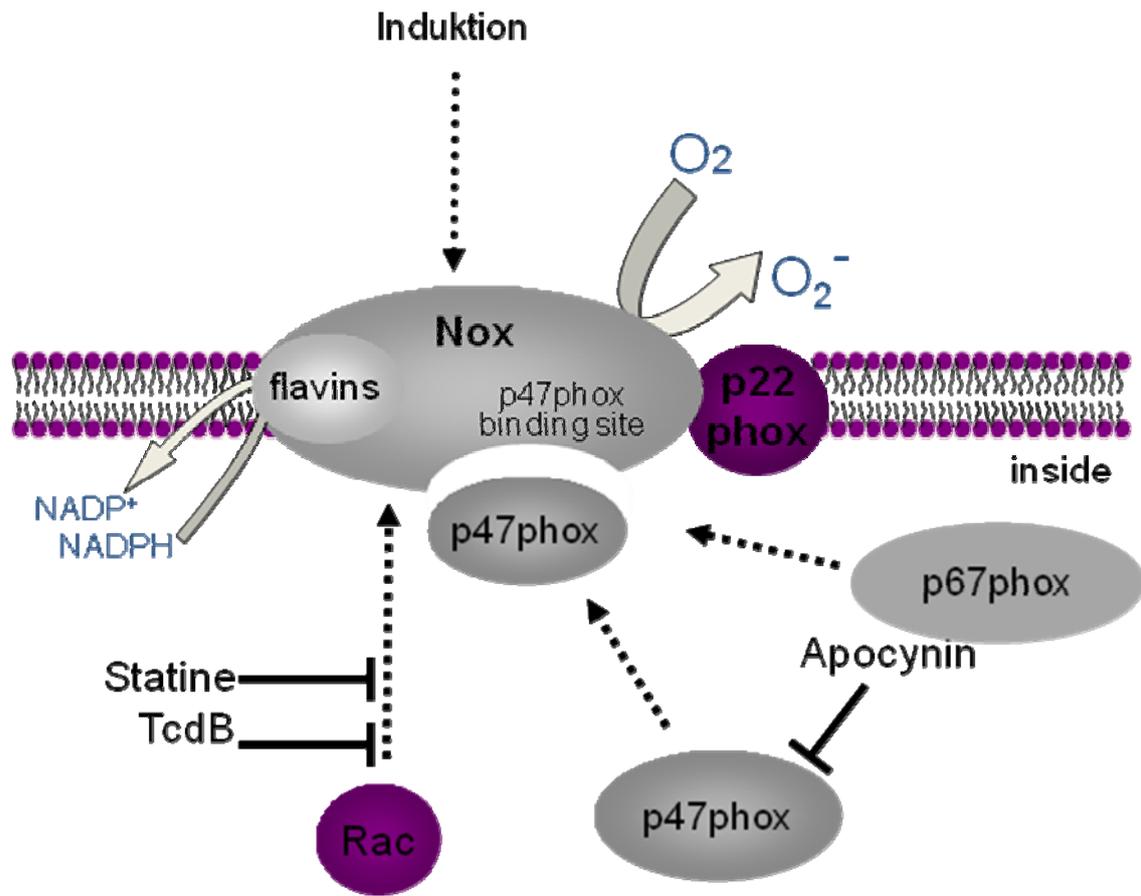


Abb.11 Inhibition der NADPH-Oxidase

Dargestellt ist eine schematische Übersicht der Angriffspunkte der von uns verwendeten NADPH-Oxidase Inhibitoren.

4.3 Die Beteiligung von ROS und Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) am Bluthirnschrankenschaden

Da die Entwicklung eines Hirnödemes im Rahmen einer fokalen cerebralen Ischämie einen wesentlichen Prädiktor für das Überleben des Betroffenen darstellt, ist das Verständnis für die zugrunde liegende Steigerung der Bluthirnschrankenpermeabilität von großer therapeutischer Bedeutung.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Superoxide an der Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Protein Kinasen (MAPK), einer Familie von Serin-Threonin Kinasen beteiligt sind [79,80]. Namentlich handelt es sich um die extracellulär

signal-regulated kinases (ERK's oder p44/42 MAPK), c-jun NH2-terminal kinase (JNK) und die p38 Kinase. Untersuchungen an mikrovaskulären Endothelzellen haben gezeigt, dass die endotheliale Barrierefunktion in erster Linie durch p38 MAPK reguliert wird und nicht durch ERK oder JNK, wohingegen andere Studien darauf hinweisen das ERK1/ERK2 Phosphorylierung nach Superoxidexposition zu einer gesteigerten Durchlässigkeit der Endothelien führt [81,82]. Um die, sich ergebenden Widersprüche darzustellen, welche sich aus mehreren Untersuchungen zahlreicher Arbeitsgruppen ergeben, sollen im Folgenden die unterschiedlichen Untersuchungen diskutiert werden, welche zur Klärung der Permeabilitätssteigerung unter Einfluss von MAPKs durchgeführt wurden.

So beschäftigten sich Kevil et al. mit den Auswirkungen von H₂O₂ Exposition auf die Permeabilität von Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) und die Möglichkeit der Beeinflussung durch den ERK 1/2 Inhibitor PD98059. Hier wurde demonstriert, dass unter dem Einfluss von H₂O₂ eine ERK1/2 vermittelte Phosphorylierung von Occludin stattfindet, was in der Folge zu einem Verlust der ZO1 Bindung führte. Die beobachtete Permeabilitätssteigerung wurde daher auf den Verlust der Membranständigkeit von Occludin zurückgeführt.

Ebenfalls am Beispiel von ERK1/2 zeigten Fischer S. et al. in Porcine Brain derived microvascular endothelial cells (BMEC), dass die Aktivierung der Phospholipase C und der darauf folgende Anstieg der Ca²⁺ Konzentration zu einer ERK1/2 Aktivierung führen [83]. In der Folge kam es zu Translokation der TJ-Proteine ZO1 und ZO2 von der Membran ins Zytosol wodurch die Vernetzung des TJ Proteins Occludin mit dem Cyotskellet aufgehoben wurde. Im Gegensatz hierzu konnten wir in unseren Untersuchungen an Endothelzellen aus Schweinehirnkapillaren (porcine brain capillary endothelial cells, PBCEC) keinen Einfluss von ERK1/2 nach H₂O₂ Exposition auf die parazelluläre Permeabilität feststellen.

Ebenfalls kontroverse Daten wurden von zahlreichen Autoren hinsichtlich der Beteiligung von p38 auf Zelluntergang und Bluthinrschrankenschäden im Rahmen einer cerebralen Ischämie erhoben. Beispielsweise gab eine Studie von Lenmayr et al. Hinweise darauf, dass eine Blockade der p38 Aktivierung durch den spezifischen Inhibitor SB20358, in *in vivo* Studien an Ratten zu

einer gesteigerten Bluthirnschrankenpermeabilität führte, was vorher noch nicht beschrieben wurde [84]. Jedoch konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit SB20358 zwar nicht zu einer Ausdehnung des Schrankenschadens führte, allerdings auch keinen protektiven Effekt aufwies [85]. Diese Eigenschaft konnte in unseren *in vitro* Versuchen bestätigt werden, in denen wir unter SB203580 Inhibition keine signifikanten Veränderungen des transendothelialen Widerstandes nach H₂O₂ Belastung beobachteten. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass die von uns beobachteten Effekte auf spezifische Eigenschaften des Inhibitors zurückzuführen sind, da es für p38 Inhibitoren der zweiten Generation, so für SB239063, Daten gibt, welche durchaus eine protektive Wirkung erzielten [85]. Der dritte eingangs erwähnte Subtyp der MAP Kinasen, JNK, wurde ebenfalls ausführlich auf seine Rolle bei der cerebralen Ischämie untersucht und auch hier ergaben sich nicht kongruente Ergebnisse. Entgegen der im Vorangegangenen zitierten Arbeit von Fischer et al., in der eine Beteiligung der JNK am Reperfusionsschaden ausgeschlossen wurde, stehen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen die durch Inhibition dieser Kinase sowohl Abnahmen des Neuronenschadens, wie auch stabilisierende Effekte auf die Integrität der Bluthirnschranke zeigten [87,88]. Neben den proapoptischen Eigenschaften der JNK welche durch Phosphorylierung seines Downstreammoleküls c-Jun eingeleitet werden, aktivieren sie darüber hinaus Matrix Metalloproteinasen und tragen dadurch zur Bluthirnschrankenschädigung bei. In unseren Versuchen konnten wir ebenfalls zeigen, dass die Barrierestörung nach transienter Hypoxie und Reoxygenierung geringer ausfällt, wenn die JNK vorher mit SP600125, einem spezifischen Inhibitor blockiert wurden.

Einen weiteren neuroprotektiven Nachweis konnten wir für den Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitor Wortmannin erbringen. Kilic et al. untersuchten diesen Inhibitor und seine Auswirkung unter dem Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) und seine Effekte auf die Permeabilität der Bluthirnschranke [89]. Hierbei konnten sie zeigen, dass die Applikation dieses Stoffes zu einer geringeren Schrankenstörung führte, als in den unbehandelten Kontrolltieren. Die von uns durchgeführten Versuche im Zellmodell konnten diese Beobachtungen bestätigen.

In Anbetracht der Vielzahl unterschiedlicher Ergebnisse ist es wichtig, den Aufbau der einzelnen Studien zu vergleichen. Insbesondere die Tatsache, dass jeweils verschiedene Zelltypen als Modell für die Bluthirnschrankenbarriere verwendet wurden, lässt einen direkten Vergleich mit den von uns erhobenen Daten nicht ohne Einschränkung zu. Ebenso ist zu berücksichtigen, dass in den *in vivo* Studien zum einen andersartige Ischämie Modelle zur Anwendung kamen, teils Ratten als Versuchstiere dienten und zum anderen der Nachweis der Bluthirnschrankenstörung auf teilweise, von der unsrigen zu unterscheidende Weise geführt wurde.

Um eine direkte Vergleichbarkeit der MAPK Einflüsse auf die Barrierefunktion von Endothelien in Hirnkapillaren herzustellen, untersuchten wir alle drei Subtypen unter identischen Bedingungen und mit Hilfe der gleichen Zellkultur. Dadurch konnten wir zeigen, dass lediglich die Inhibition von JNK zu einer verminderten Abnahme des parazellulären Widerstandes führte und nehmen daher an, dass diese Kinase im Rahmen der frühen Reperfusion nach Ischämie eine entscheidende Rolle spielt.

Ferner kann man festhalten, dass Reactive Oxygen Species, wie H_2O_2 jeweils den Ausgangspunkt für die dargelegten Aktivierungsvorgänge der MAPK bildeten und daher ein Zusammenhang zur NADPH Oxidase, als Quelle dieser Moleküle zu vermuten ist.

Die Ergebnisse der Hemmung von JNK durch SP 600125, sowie die Inhibition der PI3-Kinase durch Wortmannin führten zu der Erkenntnis, dass diese Kinasen an der Permeabilitätssteigerung beteiligt sind, die unter H_2O_2 Einfluss beobachtet wird.

4.4 Die Beteiligung von ROS und der Rho-Kinase am

Bluthirnschrankenschaden.

Neben den bereits erwähnten MAPK sind im Rahmen der Ischämie und Reperfusion noch weitere endotheliale Enzyme am Bluthirnschrankenschaden beteiligt. Neben der eingangs beschriebenen kleinen GTPase Rac 1, welche an der Aktivierung der NADPH-Oxidase wesentlich beteiligt ist, spielt eine weitere GTPase aus der Ras Familie eine

entscheidende Rolle. Es handelt sich um die Rho-Kinase, die 1996 erstmals als p160-Kinase von Ishizaka et al. identifiziert wurde [90]. Durch Screening von Maus-DNA-Bibliotheken wurden zwei Isoformen der Rho-Kinase, ROCK I und ROCK II, identifiziert. Die Regulation der Genexpression wurde auf die Induktion der Proteinkinase C (PKC)- Signaltransduktionskaskade und anschließender Aktivierung von NF- κ B zurückgeführt [91]. Die Rho-Kinase ist ein Effektor der kleinen GTPase RhoA. RhoA gehört zur Familie der Rho-GTPasen und kann von verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über sogenannte Guanine-Nukleotid-Austausch-Faktoren (Guanine-nucleotide-exchange-factors, GEF) aktiviert werden [92]. Die aktiviert GTP-gebundene RhoA öffnet eine autoinhibitorische Domäne der Rho-Kinase und aktiviert sie dadurch. Die aktivierte Rho-Kinase phosphoryliert zahlreiche Substrate, wie beispielsweise die Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (MLCP). Insbesondere phosphoryliert die Rho-Kinase Proteine, welche die Aktinfilamentierung sowie die Kontraktilität beeinflussen [93]. So führt weiterhin die Kreuzvernetzung des Myosins mit F-Aktin durch Polymerisierung von F-Aktin zur Bildung sogenannter Stressfasern. Im Falle der Endothelzellen führt dieser Prozess zur Kontraktion und damit zur Aufweitung des Interzellularraumes sowie auch zu einer Veränderung des elektrischen Widerstandes dieser Zellschicht. Einen weiteren Einfluss auf Bestandteile des Cytoskelettes nimmt die GTPase Rho A durch Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3K), einer Lipidkinase, die Aktinfilamente und TJ Proteine phosphoryliert. Wir konnten die Annahme, dass die Kontraktion von Endothelzellen der Blut-Hirnschranke zu deren Permeabilitätssteigerung beiträgt bestätigen. Der spezifische Rho Inhibitor Y 27632 führte einerseits zu einer vollständigen Unterdrückung der Permeabilitätssteigerung an Schweinhirnendothelzellen nach H₂O₂ Exposition- und andererseits beobachteten wir unter dem Konfokalmikroskop, dass die Aktin-Polymerisierung, welche durch Rho ausgelöst wird, nach Inhibition deutlich geringer ausfiel. Diese Ergebnisse ergänzen die Erkenntnisse anderer, dass die Inhibition der Rho Kinase protektiv im Rahmen des Schlaganfalles wirkt und zeigen weiterhin den Mechanismus auf, der dieser Wirkung zugrunde liegt [94,95].

4.5 Kontroverse Aspekte zur Entstehung des Blut-

Hirnschrankenschadens nach fokaler cerebraler Ischämie

Die Erkenntnisse dieser Arbeit beleuchten lediglich einen Aspekt der Erkrankung Schlaganfall und müssen daher im Zusammenhang mit den zahlreichen pathophysiologischen Komponenten betrachtet werden. Es nimmt nicht wunder, dass sich aufgrund der Komplexität dieses Krankheitsbildes hierbei nicht nur ergänzende Ergebnisse, sondern durchaus auch widersprüchliche Aussagen und gegenteilige Ansätze finden.

So gibt es beispielsweise hinsichtlich der neuroprotektiven Wirkung von Statinen Überlegungen, die andere Wirkungsmechanismen als die Inhibition der Rac-1 in den Mittelpunkt stellen. So aktiviert das Stoffwechselprodukt Geranylgeranyl der HMG-CoA Reduktase nicht nur die Rac-1 GTPase, sondern auch die Rho-Kinase. Ebenso inhibiert TcdB, durch Glucosylierung der Aminosäure Threonin, ebenfalls die Rho-Kinase. Vor diesem Hintergrund bleibt die Frage offen, ob die von uns beobachteten Effekte auf die Blut-Hirnschrankenpermeabilität auf der Inhibition der NADPH-Oxidase Aktivierung beruhen, oder ob Statine und TcdB die Endothelzellkontraktion blockieren. Einen weiteren Aspekt im Zusammenhang von cerebraler Ischämie und Statinwirkung, stellt deren Einfluss auf die Expression der endothelialen NO Synthase (eNOS) dar. NO ist ein wichtiger Mediator der vaskulären Homöostase und des Blutflusses [96]. Der Verlust von endothelalem NO beeinträchtigt die Endothelfunktion und ist an Vasokonstriktion, Plättchenaggregation, smooth muscle cell Proliferation und Leukozytenadhäsion beteiligt [97]. Es konnte gezeigt werden, dass Knock-out Mäuse mit fehlender eNOS zum einen hypertensiv waren, und zum anderen deutlich größere Infarkte nach fokaler cerebraler Ischämie aufwiesen [98]. Weiterhin senkte die Inhibition von eNOS die cerebrale Durchblutung und begünstigte die Entwicklung von Gewebeschäden nach Ischämie [99]. Endres et al. veröffentlichten daraufhin 1998, dass Statine ihren neuroprotektiven Effekt durch die Induktion der eNOS Expression vermitteln. Durch die Hochregulation von eNOS durch HMG CoA Reduktase Inhibitoren stieg in infarzierten Mäusen der cerebrale Blutfluss, die Infarkte waren kleiner und die Tiere zeigten weniger neurologische Defizite [100]. Es wird also deutlich, dass

es zahlreiche Mechanismen gibt, über die Statine wirken und die in der Summe für die Neuroprotektion verantwortlich sind. Der therapeutische Nutzen steht dabei außer Frage und wird in der Zukunft mit Sicherheit noch weiter an Bedeutung gewinnen. Wesentlich unklarer ist die Studienlage hinsichtlich der pathophysiologischen Abläufe, die zur Aufweitung der Blut-Hirnschranke führen. So kamen Fischer S. et al. zu dem Ergebnis, dass die H_2O_2 induzierte Hyperpermeabilität von Endothelzellen durch eine Ca^{2+} abhängige Aktivierung der p44/42 MAPK verursacht wird und keine Beteiligung von NO Synthasen, PI3-Kinase oder Rho-Kinase vorliegt [101]. Die Tatsache, dass man bei der Suche nach einem Mechanismus derartig kontroverse Resultate erzielt, macht deutlich, dass es sich hierbei um sehr komplexe Zusammenhänge handelt und durchaus weiterer Klärungsbedarf besteht. Auch die Beteiligung von Enzymsystemen wie der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) muß in Betracht gezogen werden. Ebenso wie für die NADPH-Oxidase konnte nachgewiesen werden, dass dieses nukleäre Reparaturenzym an der Ausbildung von Gewebeschäden nach cerebraler Ischämie maßgeblich beteiligt ist und die pharmakologische Inhibition eine mögliche therapeutische Option darstellt [102].

Zusammenfassend konnte diese Arbeit jedoch darlegen, dass insbesondere in der frühen Phase der Reperfusion nach cerebraler Ischämie die Beteiligung der durch NADPH-Oxidase generierten Sauerstoffradikale am Bluthirnschrankenschaden, der Ausbildung des Hirnödems sowie beim Untergang neuronalen Gewebes eine entscheidende Rolle spielt.

Zusammenfassung

Während zerebraler Ischämie und Reperfusion (I/R) kommt es zur Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), von welchen ausgegangen wird, dass sie zum neuronalen Schaden beitragen. NADPH Oxidasen produzieren ROS. Wir untersuchten daher, ob und in welchem Maße NADPH Oxidasen am Gewebeschaden und insbesondere an der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) nach experimenteller I/R beteiligt sind.

Hierfür induzierten wir an Wildtyp und NADPH Oxidase (gp91phox^{-/-}) Knockout Mäusen in An- und Abwesenheit pharmakologischer Inhibitoren eine transiente zerebrale Ischämie mittels Fadenschlusses der Arteria cerebri media (MCAO) für 120 Minuten mit anschließender Reperfusion. Das Infarktvolume nach 24 Stunden war bei den Tieren mit fehlender funktioneller NADPH Oxidase (gp91phox^{-/-}) bzw. (p47phox^{-/-}) deutlich kleiner als in der Gruppe der Wildtyp Mäuse (TTC Färbung). I/R erhöhte bei den Wildtyp Mäusen im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre die BHS Permeabilität für Evans Blue innerhalb der ersten Stunde nach Ischämie signifikant. Apocynin, ein NADPH Oxidase Inhibitor schwächte diesen Effekt dosisabhängig signifikant ab. In der Gruppe der gp91phox Knockout-Tieren war dieser protektive Effekt auf die BHS Permeabilität noch ausgeprägter. In Schweinehirnendothelzellen (PBEC) induzierten wir durch I/R eine Translokation des NADPH Oxidase Aktivators Rac-1 an die Membran. Die deutliche Reduktion des BHS Schadens nach Hemmung von Rac-1 durch Clostridium difficile lethal Toxin B (TcdB) und Atorvastatin weist darauf hin, dass dies die Folge der Inhibition der NADPH Oxidase Aktivierung war. Die Stimulation von PBEC mit H₂O₂ steigerte die Permeabilität, was durch die Inhibition der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase oder c-Jun N-terminale Kinase abgeschwächt werden konnte. Die Inhibition der Extracellular-regulated Kinase 1/2 oder p38 mitogen-activated-protein Kinase hatte dagegen keinen Effekt. Jedoch konnte die Inhibition von Rho eine ROS induzierte Steigerung der Permeabilität sowie eine ROS induzierte Polymerisation des Zytoskelett vollkommen unterbinden. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die Aktivierung der NADPH Oxidase ein zentraler Bestandteil der Pathophysiologie des ischämischen Infarktes ist und liefern darüber hinaus

eine Erklärung für die positiven Effekte der Statintherapie beim Schlaganfall des Menschen. Die direkte Hemmung der NADPH Oxidase stellt ein vielversprechendes Prinzip in der Akuttherapie des ischämischen Infarktes dar.

Summary

Cerebral ischemia/reperfusion is associated with reactive oxygen species (ROS) generation, and NADPH oxidases are important sources of ROS. We hypothesized that NADPH oxidases mediate blood-brain-barrier (BBB) disruption and contribute to tissue damage in ischemia/reperfusion. Ischemia was induced by filament occlusion of the middle cerebral artery in mice for 2 hours followed by reperfusion. BBB permeability was measured by Evans blue extravasation. Monolayer permeability was determined from transendothelial electrical resistance of cultured porcine brain capillary endothelial cells.

BBB permeability was increased in the ischemic hemisphere 1 hour after reperfusion. In NADPH oxidase- knockout (gp91phox^{-/-}) mice, middle cerebral artery occlusion-induced BBB disruption and lesion volume were largely attenuated compared with those in wild type mice. Also in p47phox^{-/-} mice we observed a large reduction of the infarct lesion volume. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin prevented BBB damage. In porcine brain capillary endothelial cells, hypoxia/reoxygenation induced translocation of the NADPH oxidase activator Rac-1 to the membrane. In vivo inhibition of Rac-1 by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor atorvastatin or Clostridium difficile lethal toxin B also prevented the ischemia/reperfusion-induced BBB disruption. Stimulation of porcine brain capillary endothelial cells with H₂O₂ increased permeability, an effect attenuated by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase or c-Jun N-terminal kinase but not blockade of the extracellular signal-regulated kinase-1/2 or p38 mitogen-activated protein kinase. Inhibition of Rho kinase completely prevented the ROS-induced increase in permeability and the ROS induced polymerization of the actin cytoskeleton.

Activation of Rac and subsequently of the gp91phox containing NADPH oxidase promotes cerebral ROS formation, which then leads to Rho kinase-mediated endothelial cell contraction and disruption of the BBB. Inhibition of NADPH oxidase is a promising approach to reduce brain injury after stroke.

Literaturverzeichnis

1. Eschenfelder ChC *Hamostaseologie*. 2006 Nov;26(4):298-308.
2. Clark WM et al. *Stroke*, 2000 Apr;31(4):811-6
3. Katsura K. et al. 1994, 17, 991 – 996, *Biochem. Soc. Trans*
4. Nehls et al. 1989, 9, 376 – 376, *J cereb Blood Flow Metab*
5. Rosenberg GA *Prog Cardiovasc Dis*. 1999 Nov-Dec;42(3):209-16
6. Zhao et al. 1994, 152, 349 – 350, *Acta. Physiol. Scand*
7. Yang et al. 1994, 25, 165 – 170 *Stroke*
8. Kondo T. et al. 1997, 17, 4180 – 4189, *J. Neurosci*
9. Dugan LL. et al., 1994, 35, 17 – 21, *Ann. Neurol*
10. Fujimura M. et al. 1998, 18, 1239 – 1247, *J.Cereb.Blood.Flow.Metab*
11. Hossmann KA. et al. 1994, 36, 557 – 565 *Ann. Neurol*
12. Astrup J. et al. 1981, 12, 723 – 725, *Stroke*
13. Sobey et al., *Stroke* 1997;28; 2290 – 5
14. Ushio-Fukai M. et al., *J Biol. Chem*. 1999;274;22 699 – 704
15. Roos et al. *Blood* 1996; 87 ; 1663 – 1681
16. Cai H et al., *Circ. Res*. 2000; 87; 840 – 4
17. Fukai T. et al. *Cardiovasc. Res*. 2002; 55 ; 239 – 49
18. Pennathur S et al. *J. Clin. Invest*. 2001; 107 , 853 – 60
19. Yu JW et al. *Biol. Pharm. Bull*. 2001; 24 ; 1053 – 19
20. Brandes et al. *Cardio. Res*. 2005; 65 ; 16 – 27
21. Krause *Jpn. J. Infect. Dis*. 2004; 57 ; 28 – 29
22. W.M. Nauseef *Cell Biol* 2004 ; 122 ; 277 – 291
23. Kuribayashi F et al. *EMBO J* 2002; 21 ; 6312 – 20
24. Cross et al. *Biochem. J*. 2000; 349 ; 113 – 117
25. Han CH et al. *J Biol Chem* 1998; 273 ; 16663 – 8
26. Abo A. et al. *Nature* 1991 ; 353 ; 668 – 70
27. Dana R. et al. *J Biol Chem* 1998; 273 ; 441 – 5
28. Groemping Y et al. *Cell* 2003 ; 113 ;343 – 55
29. Sumimoto et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 ; 91 ; 5345 – 5349
30. Ago T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003 ; 100 ; 4474 – 9
31. Hata K. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997 ; 241 ; 226 – 31
32. Diekmann D. et al. *Science* 1994 ; 265 ; 531 – 3
33. Banfi et al. *Science* 2000 ; 287 ; 138 – 142
34. Suh et al. *Nature* 1999; 401 ; 79 – 82
35. Geiszt et al. *J Biol Chem* 2003; 278 ; 20006 – 12
36. Paffenholz et al. *Genes dev* 2004 ;18 ; 486 – 491
37. Banfi et al. *J. Biol. Chem*. 2004

38. Geiszt et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97 ; 8010 – 8014
39. Banfi et al. *J. Biol. Chem* 2001; 276 ; 37594 – 37601
40. Moreno et al. *N. Engl. J. Med.* 2002 ; 347 ; 95 – 102
41. Geiszt et al. *FASEB J.* 2003; 17 ; 1502 – 1504
42. Lassegue et al. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2003 ; 285 ; R277 – 97
43. Sorescu D et al. *Circulation* 2002 ; 105 ; 1429 – 35
44. Krause et al. *Jpn. J. Infect. Dis* 2004 ; 57 ; S28 – 29
45. Gorlach A. et al. *Circ Res* 2000 ; 87 ; 26 – 32
46. Rey FE et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ; 22; 1962 – 71
47. Lassegue et al. *Circ Res* 2001; 88 ; 888 – 94
48. Griendling KK et al. *Hypertension* 1997 ; 29 ; 366 – 73
49. Marumo T et al. *Circulation* 1997 ; 96 ; 2361 – 7
50. Thannickal VJ et al. *FASEB J* 2000; 14 ; 1741 – 8
51. Doanes AM et al. *Biochem Mol Biol Int* 1998 ; 45 ; 279 – 87
52. Sobue, K. et al *Neurosci. Res.* 1999 35, 155-164
53. Takeichi M et al. *Curr Opin Cell Biol* 1995 ; 842 ; 277 – 286
54. Yap AS et al. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997 ; 13 ; 119 - 146
55. Furuse M. et al *J Cell Biol* 1993; 123 ; 1777 – 1788
56. Furuse M. et al *J Cell Biol* 1998; 143 ; 391 – 401
57. Belayev L. et al. *Brain Res* 1996; 739 ; 88 – 96
58. Albayrak S. et al. *Acta Neuropathol* 1997 ; 94 ; 158 – 163
59. Abbruscato TJ et al. *J Pharamcol Exp Ther.* 1999 ; 289 ; 668 – 675
60. Kimura C. et al. *Am J Physiol* 2000; 279 ; H2310 – H2318
61. Yang Y. et al. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006
62. Miller et al. 1999 *J. Neuroviro.* 5, 570-578
63. Bolton et al. *Neuroscience* 1998, 86, 1245-1257
64. Betz et al. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994 ; 14 ; 29 – 37
65. Bowman et al. *In Vitro.* 1981 Apr;17(4):353-62.
66. Fujimra et al. 1999 *J cerbr Blood Flow M* ; 19 ; 495 – 501
67. Dalton et al. 1999 *Annu Rev Pharmacol Toxicol* ; 39 ; 67 – 101
68. Stolk et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 Jul;11(1):95-102.).
69. Treasure CB et al. *N Engl J Med* 1995 ; 332 ; 481 – 487
70. Harrison DG *Clin Cardiol* 1997 ; 20 ; II – 11 – II – 17
71. Wagner AH et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jan;20(1):61-9
72. Wassmann S. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Feb 1;22(2):300-5.
73. Endres M. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 ; 8880 – 8885
74. Dimmeler et al. *Nature* 1999; 399; 601 –5
75. Samdani et al. *Stroke* 28; 1283 –1288
76. Huang P. et al. *Nature* 1995; 377; 239 –242
77. Wolfrum et al *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24; 1842 –7

78. Genth et al. *J Biol Chem* 1999; 274; 29050 –6
79. Fialkow et al., *J. Biol.Chem.*1994, 269, 31234 –42
80. Guyton et al. *Cancer Res*, 1996, 56, 3480 – 5
81. Usatyuk and Natarajan, *J.Biol.Chem.* 2004, 279, 11789 -97
82. Kevil et al. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279, C21 -3
83. Fischer et al. *Eur. J. Cell. Biol.* 2005, 84, 687 – 97
84. Lenmayr et al. *Acta Neurol Scand* 2003; 108; 339-345
85. Barone et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296;312-321
86. Lo et al. *J Neurosci Res*;2002;69;1-9)
87. Juan et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29;713-718
88. Kilic et al. *FASEB*; 2006;20;E307-314
89. Ishizaka et al. *EMBO J.* 1996 Apr 15;15(8):1885-93
90. Hiroki et al. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37,537 -46
91. Wettschurek and Offermanns *J Mol Med*, 2002, 80, 629 -38
92. Riento and Ridley *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, 2003, 4, 446 -56
93. Rikitake et al. *Stroke.* 2005 Oct;36(10):2251-7.
94. Shin HK et al. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 May;27(5):998-1009.
95. Fleming I. et al. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Jan;31(1):5-14
96. Ignarro, L. et al. 1990; *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 30; 535 – 560
97. Huang P. et al. 1996; *J cerb Blood Flow Metab*; 16; 981 –987
98. Huang Z. et al. 1994; *Science*; 265; 1883 –1885
99. Endres et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1998; 95; 8880 –8885
100. Fischer S. et al. 2005, *European Journal of Cell Biology*; 84; 687 –697
101. Endres et al. 1997; *Journal Cereb Blood Flow Metab*; 17; 1143 –1151

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf P. Brandes für die exzellente Betreuung in den vergangenen Jahren herzlichst danken.

Durch seine direkte, engagierte und zugleich humorvolle Art die ich kennenlernen durfte, hat er nicht nur meine Begeisterung für die medizinische Grundlagenforschung als Solche geweckt, sondern er hat mir zudem auch vorgelebt, dass Begriffe wie Ehrlichkeit und Loyalität die unverzichtbare Basis einer erfolgreichen Zusammenarbeit darstellen. Darüber hinaus habe ich ihn auch als Privatmensch kennen und überaus schätzen gelernt und werde den freundschaftlichen und wissenschaftlichen Kontakt auch in Zukunft pflegen.

In gleichem Maße zu Dank verpflichtet fühle ich mich Herrn Dr. Timo Kahles. Timo war aufgrund seiner Akribie und seines Einsatzes für unser Projekt nicht nur der ideale Betreuer hinsichtlich der Doktorarbeit, sondern er war auch immer dann zur Stelle, wenn die Motivation mal wieder eine Talsohle durchschritt und die Durststrecken all zu lang wurden. Dann war er es, der es verstand mein ungeduldiges und manchmal verbissenes Wesen zu beruhigen, die Kräfte zu sammeln und positiv nach vorne zu blicken. Dieses sehr freundschaftliche Verhältnis war ein wichtiger Aspekt für das Gelingen dieser Arbeit und weiterhin ein persönlicher Gewinn. Vielen Dank Timo.

Im Institut für Kardiovaskuläre Physiologie bedanke ich mich ferner bei den Medizinisch technischen Assistentinnen Tanja Schönfelder, Tanja Maraczek, Katalin Palfi und Susanne Schütz die mir beim Erlernen der technischen Grundlagen immer eine große und geduldige Hilfe waren.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle der NADPH-Oxidase bei der Blut-Hirn-Schrankenstörung nach experimenteller cerebraler Ischämie in der Maus“

in dem

Institut für Kardiovaskuläre Physiologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr.med. R.P. Brandes mit Unterstützung durch Dr.med. T.Kahles ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Stoke, 2007 Nov;38(11):3000-6. Epub 2007 Oct 4.
NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke.

Frankfurt/Main, 2008

Peter Lüdike

Lebenslauf

Name, Vorname: Lüdike, Peter
Geboren: 08.07.1980 in Marbach am Neckar

Wohnhaft: Luisenstrasse 19, 60316 Frankfurt/Main

Nationalität: Deutsch

Familienstand: Ledig

Schule/ Zivildienst/ Studium:

1987-1991 Grundschule Beilstein/ Württemberg

1991-2000 Herzog-Christoph Gymnasium Beilstein/ Abitur

2000-2001 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund-Heilbronn
Abteilung Rettungsdienst/ Ausbildung zum Rettungssanitäter

2001-2008 Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt/Main

2003 Ärztliche Vorprüfung/ Physikum

2007 Praktisches Jahr

Chirurgie	Kasturba Medical College Mangalore/Indien
Neurologie	Universitätsklinikum Frankfurt/Main
Innere Medizin	Universitätsklinikum Frankfurt/Main
	Universitätsspital Zürich

2008 2. Ärztliche Prüfung

2008 Promotion 09. Juli

 Titel der Arbeit: Die Rolle der NADPH-Oxidase bei der
Bluthirnschrankenstörung nach experimenteller cerebraler Ischämie in
der Maus

Veröffentlichungen:

Stroke, 2007 Nov;38(11):3000-6. Epub 2007 Oct 4.

NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke.

Timo Kahles, MD; Peter Luedike; Matthias Endres, MD; Hans-Joachim Galla, PhD; Helmuth Steinmetz, MD; Rudi Busse, MD; Tobias Neumann-Haefelin, MD Ralf P. Brandes, MD

Peter Lüdike

