

1 Einleitung

1.1 Schlaganfall (Apoplexie)

Der Schlaganfall stellt nach Krebserkrankungen und Schädigungen des Herz-Kreislaufsystems weltweit die dritthäufigste Todesursache dar (Warlow, 1998). Die Möglichkeit, an einem Schlaganfall zu erkranken, nimmt mit steigendem Alter rapide zu. So ist nach einer Untersuchung des statistischen Bundesamtes bei den über 65-jährigen etwa jeder fünfte von einer Apoplexie betroffen. Allerdings ist der Schlaganfall nicht nur als eine typische Alterserkrankung anzusehen, grundsätzlich kann er in jeder Altersgruppe auftreten. In der Gruppe der unter 45-jährigen erkranken immerhin noch drei von tausend Personen an einem Schlaganfall (StBA, 2001).

Ausgelöst wird ein Schlaganfall durch eine räumlich begrenzte Schädigung des Gehirngewebes, die durch Hypoxie oder Gefäßverschluss verursacht wird und zum Zelltod von Neuronen führt. Je nach Schwere der eingetretenen Komplikationen und abhängig von der Lokalisation der Verletzung treten Symptome wie kurzfristige Bewußtlosigkeit, Schwindelgefühle, Einschränkungen des Gesichtsfeldes, vollständige Lähmung einer Körperhälfte, permanenter Verlust der Sprachfähigkeit und Bewußtseinsstörungen auf. Im schwerwiegendsten Fall endet der Schlaganfall mit dem Tode (Easton *et al.*, 1998).

1.1.1 Klassifizierung des Schlaganfalls

Der Schlaganfall kann grob in drei Kategorien eingeteilt werden, wobei eine eindeutige Zuordnung aufgrund der sich überschneidenden Krankheitsbilder oft nur schwer möglich ist.

1.1.1.1 Ischämischer Schlaganfall

Am häufigsten tritt der ischämische Schlaganfall auf. Etwa 80% der Erkrankungen lassen sich diesem Typ zuordnen. Bei einem ischämischen Infarkt ist in den überwiegenden Fällen eine Embolie die Ursache, die von arteriosklerotischen Veränderungen in den großen extrakraniellen Gefäßen wie der *Arteria vertebralis* und der *Arteria carotis interna* bzw. von verschleppten Blutgerinnseln aus dem Herzen (kardiale Embolie) ausgeht (Hademenos *et al.*, 2001). Durch die hiervon ausgelöste Hypoxie werden Teile des Gehirns geschädigt. Eine weitere Gefährdung besteht in der anschließenden Reperfusion dieser Bereiche. Hierbei kann das bereits verletzte Gewebe durch den erhöhten Druck noch weiter geschädigt werden und es kann zu großflächigen Einblutungen kommen (Easton *et al.*, 1998).

1.1.1.2 Hämorrhagischer Schlaganfall

Die zweite Kategorie umfaßt den hämorrhagischen Schlaganfall. Bei diesem Typ treten intrazerebrale Blutungen auf, die durch eine Ruptur der Gehirnarterien bzw. durch Verletzungen der kleinen Gefäße verursacht werden. Ein hämorrhagischer Infarkt kann auch durch Tumore und Gefäßmißbildungen bzw. durch Blutgerinnungsstörungen ausgelöst werden (Greenberg *et al.*, 1995; 1998). Der hämorrhagische Schlaganfall tritt wesentlich seltener auf als der ischämische Infarkt, allerdings liegt die Mortalitätsrate erheblich höher, da durch die Masseneinblutungen größere Hirnareale betroffen sind.

1.1.1.3 Subarachnoidalblutung

Die dritte Klasse beschreibt die Subarachnoidalblutungen. Bei diesem Typ des Schlaganfalls, der am seltensten auftritt, kommt es zu Einblutungen in den Raum zwischen der Arachnoidea und der Hirnoberfläche. Ursachen für eine Subarachnoidalblutung sind in erster Linie genetisch bedingte Mikroaneurysmen oder Angiopathien (Alberts *et al.*, 1997). Auch durch Verletzungen im Schädelbereich kann es zu einer Subarachnoidalblutung kommen.

1.2 Schlaganfall und Bluthochdruck

Nachdem in den vorangegangenen Jahrzehnten eine Abnahme der Zahl der akuten Schlaganfallerkrankungen registriert wurde, kommen kürzlich veröffentlichte epidemiologische Studien zu der Erkenntnis, daß zerebrovaskuläre Erkrankungen in der letzten Zeit wieder erheblich zunehmen. Insbesondere unter der weiblichen Bevölkerung steigt die Anzahl der Infarkte stetig an (Terent *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1996; Perry und Roccella, 1998).

1.2.1 Ursachen eines Schlaganfalls

Der Schlaganfall zählt zu denjenigen Erkrankungen, die multifaktorelle Ursachen haben, wobei die Fülle an möglichen Risikofaktoren die Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen erheblich erschwert. Die Gründe, die die Ausbildung eines Schlaganfalls begünstigen, können in zwei Kategorien eingeteilt werden.

1.2.1.1 Umwelteinflüsse und vaskuläre Erkrankungen

Auf der einen Seite spielen verschiedene Umwelteinflüsse und pathologische Zustände eine Rolle, die generell das Risiko einer vaskulären Erkrankung erhöhen. Dazu gehören Nikotinguß und Fettsucht, aber auch Bluthochdruck, Diabetes und Arteriosklerose. Ebenso kann ein vorangegangener kardialer Infarkt das Risiko eines Gehirnschlages um ein Vielfaches

1. Einleitung

erhöhen (Sacco *et al.*, 1997; Wolf, 1998). Da die hier aufgeführten Faktoren bzw. deren Kombinationen für jedes Individuum eine unterschiedlich hohe Gewichtung einnehmen, kann eine allgemeingültige Bewertung bezüglich des Risikos eines Schlaganfalls nur schwer vorgenommen werden.

1.2.1.2 Genetische Prädisposition

In der zweiten Kategorie sind die genetischen Ursachen des Schlaganfalls zusammengefaßt. Neue Erkenntnisse über genetisch bedingte Störungen wurden in erster Linie durch breitgefächerte Populations- und Familienstudien bzw. durch Untersuchungen an Zwillingen gewonnen, die auf eine eindeutige Korrelation zwischen genetischer Prädisposition und dem Auftreten von zerebrovaskulären Schäden hinweisen (Gifford *et al.*, 1966; Marshall, 1971; Hrubec und Robinetto, 1984; Diaz *et al.*, 1986; Welin *et al.*, 1987; Brass *et al.*, 1992; Graffagnino *et al.*, 1994; Liao *et al.*, 1997; Rastenyte *et al.*, 1998). Neben polygenen genetischen Defekten konnten auch eine Reihe von monogenen Krankheiten wie z.B. Sichelzellanämie und zerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CADASIL) identifiziert werden, die die Gefahr eines Schlaganfalls erheblich steigern (Mohr, 1992; Joutel *et al.*, 1996).

1.2.2 Einfluß des Bluthochdruckes auf die Pathogenese des Schlaganfalls

Heute wird allgemein davon ausgegangen, daß Bluthochdruck die Bildung eines Schlaganfalls wesentlich begünstigt. So weisen 70% der von einem Apoplex betroffenen Patienten eine schwere Hypertonie auf (Doyle und Donnan, 1990; Donnan *et al.*, 1994). Diese Daten werden durch Untersuchungen gestützt, wonach ein unbehandelter Bluthochdruck einen der hauptsächlichen Gründe für einen Hirninfarkt darstellt, und die rechtzeitige pharmakologische Senkung des Blutdruckes die Gefahr eines zerebralen Schlaganfalls erheblich reduzieren kann (MacMahon *et al.*, 1990; Hansson *et al.*, 1998; Klungel *et al.*, 1999).

1.2.3 Zerebrovaskuläre Degeneration und die Rolle von Leukozyten

Der Bluthochdruck beeinflusst in erster Linie die Integrität der intrazerebralen Gefäße. Dabei zeigen die mit der Hypertonie einhergehenden degenerativen vaskulären Veränderungen kein diffuses Verteilungsmuster sondern treten in sehr distinkten Bereichen auf, wobei scheinbar intakte Areale direkt an Regionen angrenzen, die fibrinoide Nekrosen aufweisen (Fredriksson *et al.*, 1988).

Untersuchungen an chronisch hypertensiven Tiermodellen zeigten, daß es zu Extravasaten von Plasmabestandteilen aus den Kapillaren in das angrenzende Hirnparenchym kommt

(Nag, 1984). Zusätzlich wird durch den erhöhten intraluminalen Druck verstärkt vaskulärer Stress aufgebaut, der zu einer Erhöhung der Anzahl von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen und damit zu einer gesteigerten Bindung von Leukozyten führt. Im Verlauf der Interaktion zwischen dem Endothel und den Leukozyten kommt es zu verstärkter Ausschüttung von Zytokinen wie IL1 β , IL8 und TNF- α , die die Organisation der *tight junctions* der zerebralen Endothelzellen stören und Permeabilitätserhöhungen induzieren können (Cassatella, 1995; DelMaschio *et al.*, 1996). Im Zuge dieser Veränderungen kann es zu einem Infarkt kommen.

Die erhöhte Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen kann unter Umständen auch die lokale Formation von Thromben induzieren, die ischämische Prozesse auslösen können. Überdies bilden sich im Laufe einer Hypertonie auch Lakunarinfarkte aus, die durch fibrinoide Nekrosen bzw. durch eine damit verbundene Stenose oder eine Okklusion der Gefäße verursacht werden (Johansson, 1999).

1.3 Stroke-prone spontan hypertensive Ratten (SHRSP)

Die Entwicklung von Tiermodellen mit distinkten Krankheitsbildern hat die Aufklärung genetisch bedingter Krankheiten wesentlich vorangetrieben. So ist es möglich, innerhalb von Inzuchtstämmen genetische Charakterisierungen und Mutationsanalysen durchzuführen, die aufgrund der komplexen genetischen Variabilität in den menschlichen Populationen praktisch nicht realisierbar sind.

Vor nahezu 30 Jahren gelang es der Gruppe um Okamoto, mit den stroke-prone spontan hypertensiven Ratten (SHRSP) einen Stamm zu etablieren, der in hohem Maße Hypertonie-assoziierte zerebrovaskuläre Symptome aufzeigt. Dieser Stamm ging durch selektive Züchtung aus den Schlaganfall-resistenten spontan hypertensiven Ratten (SHR) hervor (Okamoto *et al.*, 1974).

Beide Rattenstämme bilden in den ersten 12 bis 13 Lebenswochen eine Hypertonie aus, wobei die Männchen einen höheren Blutdruck als die Weibchen aufweisen und damit die entsprechende Situation beim Menschen widerspiegeln (Davidson *et al.*, 1995). Im Laufe der folgenden Monate entwickeln die SHRSP schwere Endorganschäden, die unmittelbar zum Tode führen. Unter diese Erkrankungen fallen vaskuläre Läsionen in der Niere, progressive zerebrovaskuläre Angiopathien und allgemeine endotheliale Dysfunktionen (Saito *et al.*, 1976; McIntyre *et al.*, 1997a). Darüber hinaus treten mit hoher Wahrscheinlichkeit zerebrale Infarkte auf (Nagaoka *et al.*, 1976). Da diese neurologischen Symptome in den SHR trotz des identisch hohen Blutdruckes nicht zu beobachten sind, scheinen sie primär unabhängig vom hypertensiven Phänotyp in Erscheinung zu treten (Volpe *et al.*, 1994).

1.3.1 SHRSP sind ein genetisches Modell für den humanen Schlaganfall

In der Pathogenese des Schlaganfalls zeichnen sich zwischen den SHRSP und den humanen Krankheitsbildern mehrere Parallelen ab. Während sich die Ausbildung der neurologischen Symptome in den Tieren durch eine hohe Kochsalzgabe stark beschleunigt, wirkt sich eine Erhöhung der Aufnahme von Kaliumionen protektiv auf den Gesundheitszustand der Tiere aus (Tobian *et al.*, 1984; Yamori *et al.*, 1984; Volpe *et al.*, 1990). Dieselbe Reaktion auf eine Supplementierung mit Kalium kann auch bei der Behandlung der humanen Krankheitsbilder beobachtet werden (Khaw und Barrett-Connor, 1987; Ascherio *et al.*, 1998).

Histologische Untersuchungen der Gehirne von SHRSP-Tieren zeigten eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen speziell in den zerebralen Gefäßen. In den Gefäßen treten Läsionen auf, die histologisch als fibrinoide Nekrosen beschrieben wurden und ihre Ursache wahrscheinlich in der verstärkten Aktivität von Makrophagen haben (Nagaoka *et al.*, 1979; Ogata *et al.*, 1980; 1982; Yamori, 1989). Derselbe Phänotyp kann auch in einer humanen Form des Schlaganfalls beobachtet werden, die einen monogenen Defekt (CADASIL) als Ursache hat (Tournier-Lasserre *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten werden die SHRSP für eine Vielzahl von Untersuchungen der pathogenetischen Ursachen des Hypertonie-assoziierten Schlaganfalls beim Menschen eingesetzt.

1.3.2 Veränderungen der zerebralen Gefäße in den SHRSP

Im Zuge der näheren Charakterisierung wurden die metabolischen Veränderungen im Gehirn der SHRSP untersucht. Dabei konnte eine signifikante Reduzierung des zerebralen Blutflusses gemessen werden, wobei diese Durchblutungsstörungen bereits zu einem Zeitpunkt auftreten, an dem die Tiere erste neurologische Störungen zeigen, allerdings noch keinen offenen Infarkt aufweisen. Die Reduzierung des Blutflusses ist mit einer geringeren Proteinsyntheserate in den zerebralen Gefäßen verbunden (Mies *et al.*, 1999).

Mit zunehmendem Alter der Tiere treten auch morphologische Veränderungen in den Kapillaren auf. So verändern Perizyten und Astrozyten ihre Form. Die normalerweise filamentösen Perizyten degenerieren, und es kann ein Anschwellen der Zellen beobachtet werden. Auch die Astrozyten schwellen an und bilden sog. *attachment plaques* aus. Im Verlauf dieser Prozesse kommt es zu einer Störung der Permeabilität der Gefäße (Tagami *et al.*, 1990; 1991). Eine veränderte Permeabilität der Blut-Hirnschranke in den Tieren wurde auch von Hazama und Kollegen beobachtet, die niedermolekulare Meerrettichperoxidase für Tracerexperimente einsetzten (1975). Sehr ähnliche morphologische Veränderungen, die ebenfalls eine Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirnschranke induzieren, konnten auch in Meerschweinchen

beobachtet werden, in denen Veränderungen der Blut-Hirnschranke nach Kompression des Rückenmarkes untersucht wurden (Jaeger und Blight, 1997).

1.3.2.1 Veränderte vasodilatatorische Reaktionen der Gefäße

Die Hinweise auf eine endotheliale Dysfunktion in den zerebralen Gefäßen von SHRSP verdichteten sich durch Untersuchungen von Volpe und Kollegen, die eine reduzierte Antwort der Arterien auf vasodilatierende Substanzen nachweisen konnten (Volpe *et al.*, 1996). Möglicherweise wird dieser Defekt durch eine Verminderung der Menge an endotheliale Stickstoffoxid (NO) in den SHRSP ausgelöst (McIntyre und Dominiczak, 1997a). NO ist einer der hauptsächlichen endogenen Vasodilatoren und wird von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) gebildet (Vane und Botting, 1992). Unerwarteterweise scheint die Menge an eNOS mRNA in den SHRSP jedoch signifikant erhöht zu sein, doch wurden diese zuerst kontrovers erscheinenden Ergebnisse mit einer verstärkten Superoxidationbildung erklärt, die das verfügbare NO verbraucht (Kerr *et al.*, 1999; Bennai *et al.*, 1999).

1.3.3 Genetische Untersuchungen an den SHRSP

F₂ Hybridpopulationen aus Kreuzungen von SHRSP und SHR bzw. SHRSP und WKY wurden für *linkage* Analysen eingesetzt. Das Ziel dieser Untersuchungen lag in der Identifizierung von chromosomalen Bereichen der SHRSP, die mit der Schlaganfallhäufigkeit der Tiere kosegregieren. Bei diesen Untersuchungen wurden mehrere distinkte Regionen gefunden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Gene enthalten, die für den pathogenen Phänotyp verantwortlich sind (Rubattu *et al.*, 1996; Jeffs *et al.*, 1997). Ein solcher *quantitative trait loci* (QTL), in dem möglicherweise Gene liegen, die direkt für die Ausbildung des Schlaganfalls verantwortlich sind, liegt auf dem Chromosom 1. Auf Chromosom 4 und 5 wurden Bereiche eingegrenzt, die vermutlich Gene mit protektiven Eigenschaften bezüglich der Schlaganfallausprägung tragen.

Eines der Gene, die in dem QTL auf Chromosom 5 liegen, wurde als das Atrial Natriuretische Peptid (ANP) identifiziert. ANP ist ein Protein, das natriuretische und diuretische sowie vasodilatatorische Funktionen zeigt (Koller und Goeddel, 1992). Eine Analyse der Nukleotid- und Proteinsequenz in den SHRSP wies Veränderungen im Promotorbereich des ANP-Gens und in der Struktur des Peptids nach. Diese Mutationen resultieren in funktionellen Anomalien in den Tieren. So wird das modifizierte Protein einer veränderten Prozessierung durch zelluläre Proteasen unterzogen, worauf ein alternatives Peptid generiert wird. Die Interaktion dieses Peptids mit dem NPR-A Rezeptor führt zu einer signifikanten Erhöhung der zellulären cGMP Konzentrationen (Rubattu *et al.*, 1999a). Ein Ansteigen des cGMP-Gehaltes wird für eine erhöhte Apoptose von Endothelzellen verantwortlich gemacht (Suenobu *et al.*, 1999).

1. Einleitung

Eine darauf folgende Analyse des ANP Genes in Schlaganfallpatienten identifizierte eine Mutation im kodierenden Bereich. Träger dieses mutierten ANP weisen ein zweifach gesteigertes Risiko auf, einen Schlaganfall zu erleiden (Rubattu *et al.*, 1999b).

1.4 Die Blut-Hirnschranke

Die Entdeckung der Blut-Hirnschranke geht bis ins 19. Jahrhundert zurück. 1887 entdeckte Paul Ehrlich, daß bei intravenöser Injektion von gefärbten Aminen das Gehirn in den Versuchstieren nicht angefärbt wurde (Ehrlich, 1887). Diese Befunde wurden durch weitere Forschergruppen bestätigt und 1913 prägte Edwin Goldmann, ein Schüler Paul Ehrlichs, für dieses Phänomen den Begriff der Blut-Hirnschranke (Goldmann, 1913).

1.4.1 Funktionen der Blut-Hirnschranke

Eine der hauptsächlichen Aufgaben der Blut-Hirnschranke liegt in der Aufrechterhaltung des spezifischen Mikromilieus im Hirnparenchym. Neuronen reagieren sehr empfindlich auf Änderungen ihrer Umgebung, so daß schon kleine pH-Verschiebungen oder Konzentrationschwankungen von Ionen, wie z.B. Kalzium oder Kalium, Schäden an den Neuronen induzieren können (Sattler und Tymanski, 2000).

Darüber hinaus stellt die Blut-Hirnschranke eine hochselektive Barriere dar, die den Eintritt von im Blut gelösten Makromolekülen und Lipiden in das Nervengewebe kontrolliert. Diese Funktionen werden durch einen sehr hohen elektrischen Widerstand und eine geringe transzelluläre Permeabilität ermöglicht (Rubin und Staddon, 1999).

Um die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen zu gewährleisten, existieren eine Reihe von Transportern, die Glukose, Sauerstoff oder Aminosäuren über die Barriere transportieren (Davson und Segal, 1996).

1.4.2 Aufbau der Blut-Hirnschranke

Die Blut-Hirnschranke wird von den Kapillargefäßen des Hirns gebildet. Diese Kapillaren sind mit einer kontinuierlichen Endothelzellschicht ausgekleidet. Im Gegensatz zu den großen intrakraniellen Blutgefäßen und den Arteriolen sind sie jedoch nicht mit einer vaskulären Muskelschicht ummantelt. Im abluminalen Bereich sitzen die Endothelzellen auf einer Basallamina auf.

Neben den Endothelzellen sind auch Astrozyten und Perizyten für die Formation der Blut-Hirnschranke notwendig (Beck *et al.*, 1984; Arthur *et al.*, 1987; Bertossi *et al.*, 1999). Astrozyten stellen den Hauptteil der Gliaelemente dar und treten über ihre Endfüße mit den Kapil-

1. Einleitung

laren in Kontakt. Über diesen Kontakt werden Signale an die Endothelzellen übermittelt (Abbott *et al.* 1989).

Perizyten, oder auch Rouget Zellen, sind perivaskuläre Zellen, die ebenfalls mit den Endothelzellen in Verbindung treten (Weibel, 1974). Als einzige perivaskuläre Zellen liegen sie innerhalb der Basallamina der Mikrogefäße. *In vitro* Untersuchungen lassen vermuten, daß die Perizyten direkt an der Bildung der Basallamina involviert sind. Daneben können sie auch den Transport über die Blut-Hirnschranke beeinflussen (für einen Überblick: Balabanov und Dore-Duffy, 1998; Alt und Lawrenson, 2001).

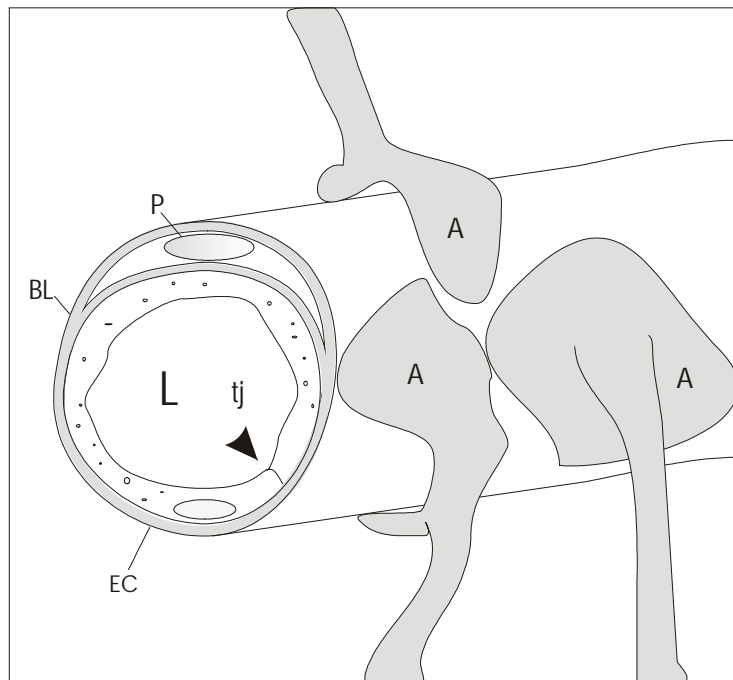


Abb. 1.1: Schema der Blut-Hirnschranke.

Die Perizyten (P) werden von der Basallamina (BL) eingeschlossen und sind eng mit den Endothelzellen (EC) assoziiert. Astrozyten binden mit ihren Endfüßen (A) an die äußere Seite der Basallamina. Der parazelluläre Spalt zwischen Endothelzellen wird durch *tight junctions* (tj, Pfeil) verschlossen. L: Lumen (verändert nach Abbott *et al.* 1989).

1.5 Tight Junctions

Für die speziellen Barriereigenschaften der Blut-Hirnschranke sind im wesentlichen Strukturen verantwortlich, die als *tight junctions* bezeichnet werden (Reese und Karnovsky, 1967; Nabeshima *et al.*, 1975; van Deurs und Koehler, 1979; Mollgard und Saunders, 1986). *Tight junctions* sind membranständige Proteinkomplexe, die den parazellulären Zwischenraum

1. Einleitung

zwischen Zellen verschließen. Sie bilden ein ebenmäßiges Netzwerk von Strängen aus (Abb. 1.2), die sich an den Membranen der Endothelzellen entlangziehen (Brightman und Reese, 1969). Neben den *tight junctions* existieren noch weitere interzelluläre Komplexe. Hierzu gehören *complexus adhaerentes*, *adherens junctions* und *gap junctions* (Schmelz, 1994; Dejana *et al.*, 1996; Denker und Nigam, 1998; Madara, 1998; Stevenson und Keon, 1998; Fanning *et al.*, 1999).

Die *tight junctions* sind am apikalen Ende angeordnet und bilden mit den darunterliegenden *adherens junctions* eine Einheit, die auch als der apikale Junction Komplex bezeichnet wird (Edens und Parkos, 2000).

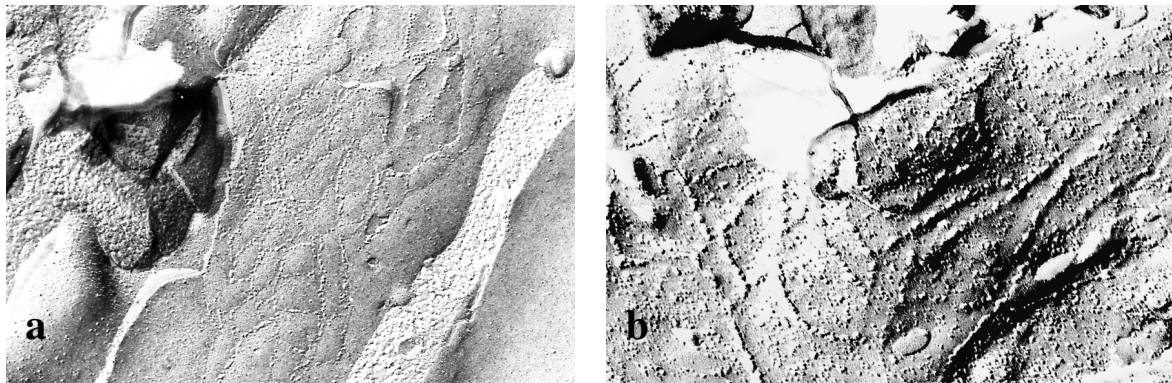


Abb. 1.2: *Tight junction*-Stränge.

Gefrierbruch-Elektronenmikroskopische Abbildung von *tight junction*-Strängen in Kapillaren des zerebralen Kortex. Nach dem Bruch der Membran ist die Verteilung der *tight junction*-Partikel auf der extrazellulären Seite (E-face, a) und der inneren Seite der Membran (P-face, b) erkennbar. Vergrößerung 1:90.000 (aus Lippoldt *et al.* 2000).

1.5.1 Molekulare Zusammensetzung der *tight junctions*

Erst die Entwicklung sensitiver molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden ermöglichte die Isolierung von *tight junction*-spezifischen bzw. *tight junction*-assoziierten Proteinen und erlaubte tiefere Einblicke in deren molekularen Aufbau.

1.5.1.1 Zonula occludens Proteine

Erste Erkenntnisse wurden durch die Entdeckung der submembranen Proteine *Zonula occludens-1* (ZO-1) (Stevenson *et al.*, 1986; Balda und Anderson, 1993), ZO-2 (Jesaitis und Goodenough, 1994) und ZO-3/p130 (Balda *et al.*, 1993; Haskins *et al.*, 1998) gewonnen. Diese Proteine gehören zur Gruppe der MAGUK Proteine, der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen, und stellen die Verbindung der *tight junction* Proteine zum Zytoskelett her. Die

1. Einleitung

Mitglieder der MAGUK-Familie enthalten eine Region, die eine inaktive Guanylatkinasedomäne enthält (Kistner *et al.*, 1995; Haskins *et al.* 1998). Zusätzlich tragen MAGUK-Proteine eine SH3-Domäne und eine PDZ-Domäne (Fanning *et al.*, 1996). Die SH3-Domäne ermöglicht die Bindung von Signalmolekülen. Überdies erfolgt durch diese Domäne die Anbindung an das Zytoskelett. Über PDZ-Domänen werden karboxyterminale zytoplasmatische Enden transmembraner Proteine gebunden (Kim *et al.*, 1995; Songyang *et al.*, 1997).

1.5.1.2 Occludin

Das erste Transmembranprotein wurde 1993 durch Furuse und Kollegen identifiziert und als Occludin bezeichnet (Furuse *et al.*, 1993). Die Vermutung, daß es sich bei Occludin um jenes gesuchte Protein handelt, das für die charakteristischen Eigenschaften der *tight junctions* verantwortlich ist, mußte bald der Erkenntnis weichen, daß auch Occludin-defiziente Mäuse noch in der Lage sind, *tight junctions* zu bilden (Saitou *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, daß Occludin an der Regulation der Permeabilität der *tight junctions* beteiligt ist (Hirase *et al.*, 2001). Die Bindung zwischen Occludin und ZO-1 erfolgt über die GUK-Domäne (Furuse *et al.*, 1994; Itoh *et al.*, 1999).

1.5.1.3 Claudine

Einige Jahre später wurde die Familie der Claudine entdeckt (Furuse *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1999; Tsukita *et al.*, 1999). Die Claudine weisen, identisch zu Occludin, vier transmembrane Domänen auf und scheinen tatsächlich für die Barriereigenschaften der *tight junctions* verantwortlich zu sein (Tsukita und Furuse, 2000; Tsukita *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen belegen, daß die spezifische Kombination einzelner Claudine für die unterschiedliche Permeabilität der *tight junctions* in den verschiedenen Geweben verantwortlich ist (Furuse *et al.*, 2001). So werden in den Endothelzellen der Blut-Hirnschranke Claudin-1 und Claudin-5 exprimiert (Liebner *et al.*, 2000a; b; Lippoldt *et al.*, 2000a).

1.5.1.4 Junctional Adhesion Molecule

1998 wurde das erste Mitglied der Familie der Junctional Adhesion Molecules (JAM-1) entdeckt (Martin-Padura *et al.*, 1998). Diese Proteine gehören zur Immunglobulin Superfamilie und sind ebenfalls in der *tight junction* Region lokalisiert. JAM-1 bindet über ein PDZ-Motiv an ZO-1 und Cingulin (Bazzoni *et al.*, 2000). Transfektionsexperimente mit JAM-1 zeigten, daß das Protein die parazelluläre Permeabilität erhöhen und eine Translokation von Occludin an die *tight junction* Region induzieren kann (Dejana *et al.*, 2000). Überdies ist JAM-1 für die Transmigration von Leukozyten durch Endothelzellen verantwortlich (Martin-Padura *et al.*,

1998). Inzwischen wurden zwei weitere Mitglieder identifiziert, Jam-2 und Jam-3 (Palmeri *et al.*, 2000; Aurrand-Lions *et al.*, 2001).

1.5.1.5 Weitere perijunktionale Proteine

Zwei weitere *tight junction*-assoziierte Proteine sind 7H6 (Zhong *et al.*, 1994) und Cingulin (Citi *et al.*, 1989). Während Cingulin nur in Zellen nachgewiesen werden konnte, die *tight junctions* ausbilden, ist die Verteilung von 7H6 nicht an das Auftreten von *tight junctions* gekoppelt (Citi *et al.*, 1991). Auch verschiedene Proteinkinase C (PKC) Isoformen und die $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ und $G\alpha_s$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine sind in den Aufbau und die Aufrechterhaltung der *tight junctions* eingebunden (Clarke *et al.*, 2000; Mullin *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 2001).

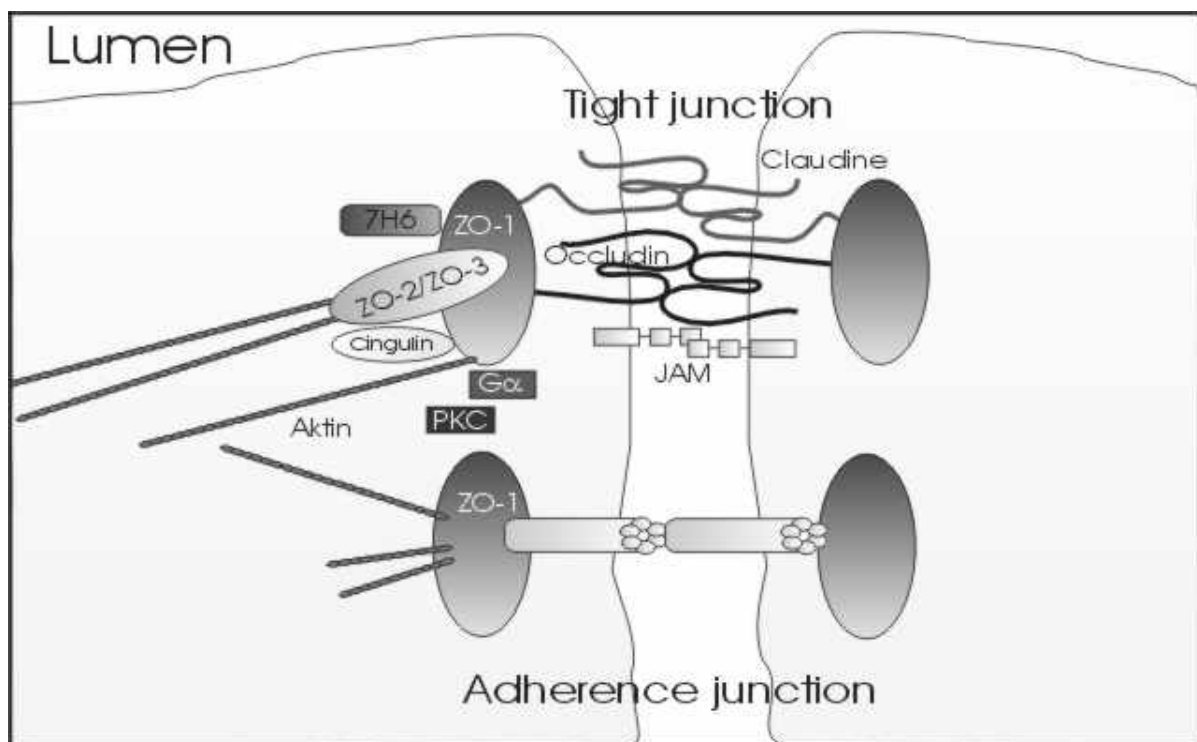


Abb. 1.3: Schema der *tight* und *adherens junctions*.

Die *tight junctions* sind an der apikalen Seite der Zellmembran lokalisiert. Die Transmembranproteine Occludin und Claudin sind über ZO-1 mit dem Zytoskelett verbunden. Eine nähere Beschreibung befindet sich im Text (Abgewandelt nach Mitic *et al.*, 2000).

1.5.2 Funktionen der *tight junctions*

1.5.2.1 Polarisierung der Zellmembran

Die *tight junctions* üben zwei verschiedene Aufgaben aus. Zum einen sind sie für eine Polarisierung der Zellmembran verantwortlich, indem sie eine intramembrane Diffusionsbarriere ausbilden (*fence* Funktion), die ein Vermischen von apikalen und basolateralen Membranproteinen verhindert (van Meer und Simons, 1986; Cereijido *et al.*, 1998). Die Polarisierung der Membran der Blut-Hirnschrankenendothelzellen läßt sich z.B. anhand der asymmetrischen Verteilung des Transporters verfolgen, der für den Glukosetransport ins Gehirn verantwortlich ist. Glukose ist der Hauptenergielieferant für das Gehirn, und der Transport muß sorgfältig reguliert werden, um eine kontinuierliche Versorgung der Neuronen zu gewährleisten. Verantwortlich für den Glukosetransport über die Blut-Hirnschranke ist der Glukose-1 Transporter (GLUT1), der die in den zerebralen Endothelzellen überwiegend vorkommende Isoform darstellt (Mueckler *et al.*, 1985; Bell *et al.*, 1990). Beim Menschen findet sich eine drei- bis vierfach höhere Anzahl des Transporters an der luminalen Seite der Membran (Cornford *et al.*, 1994; 1998). Über die Bedeutung dieser intramembranen Verteilung herrscht allerdings noch Unklarheit, da in den Endothelzellen von Nagern eine genau entgegengesetzt ausgerichtete Verteilung mit einem Überschuß an GLUT1 auf der abluminalen Seite beobachtet wurde (Farrell und Pardridge, 1991; Pardridge, 1993).

1.5.2.2 Regulation der parazellulären Diffusion

Die zweite Aufgabe der *tight junctions* besteht in der Regulation der parazellulären Diffusion von Ionen und kleinen hydrophoben Verbindungen. Dies geschieht durch das Ausbilden einer Barriere, die den ungerichteten Transport durch den parazellulären Raum verhindert und nur eine selektive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten erlaubt (Madara, 1998). Diese Aufgabe der *tight junctions* wird auch als *gate* Funktion beschrieben.

Die kontrollierte Diffusion von geladenen Teilchen äußert sich auch in einem veränderten transendothelialen Widerstand des Blut-Hirnschrankenendothels. Während z.B. in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) Widerstandswerte um 6 bis 40 Ω/cm^2 gemessen werden, liegen die Widerstandswerte in den zerebralen Piagefäßen bei 1000 bis 2000 Ω/cm^2 (Crone *et al.*, 1982; 1981; Butt *et al.*, 1990; Marcus *et al.*, 1997; 1996).

1.6 Zielsetzung

Der Schlaganfall stellt eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt dar. Obwohl in den letzten Jahren durch genetische Studien eine Vielzahl von Mutationen identifiziert wurden, deren Träger ein erhöhtes Schlaganfallrisiko aufweisen, sind die Mechanismen, die auf molekularer Ebene ablaufen, weitestgehend unbekannt.

Mit der Etablierung der SHRSP, die spontan einen Hirninfarkt ausbilden, steht ein genetisches Modell zur Verfügung, das die Erforschung der zellulären Mechanismen des Schlaganfalls erlaubt.

Diese Arbeit beruht auf der Hypothese, daß es in den Tieren bereits vor dem Auftreten der neurologischen Symptome zu langsamen Veränderungen innerhalb der Blut-Hirnschrankengefäße kommt, die letztendlich die Ausprägung des Schlaganfalls begünstigen. Um die genetischen Abläufe zu identifizieren, die für die Veränderungen verantwortlich sind, sollten die Genexpressionsprofile der Blut-Hirnschrankkapillaren von jungen SHRSP, die noch keine neurologischen Schäden aufwiesen, mit denen gleichaltriger, Schlaganfall-resistente SHR verglichen werden. Folgende Problemstellungen sollten dabei bearbeitet werden:

- Eine geeignete Methode zur Anreicherung von Blut-Hirnschrankengefäßen und anschließender RNA-Isolierung sollte etabliert werden.
- Durch eine subtraktive cDNA-Hybridisierung sollten Genfragmente isoliert werden, deren Expression bereits in den asymptomatischen SHRSP verändert ist.
- In einem zweiten Ansatz sollten mit Hilfe einer Rattenhirn-cDNA-Bank hochdichte cDNA-Filter hergestellt werden, um die Expressionsprofile von SHRSP und SHR zu vergleichen.
- Die differentielle Expression der identifizierten Gene aus der Subtraktion und der Filterhybridisierung sollte durch quantitative RT-PCR verifiziert werden.
- Differentiell exprimierte Genfragmente aus der Subtraktion sollten durch RACE-PCR vollständig kloniert werden.