

# 1. Allgemeiner Teil

## 1.1 Das Endothelinsystem

### 1.1.1 Die Entdeckung

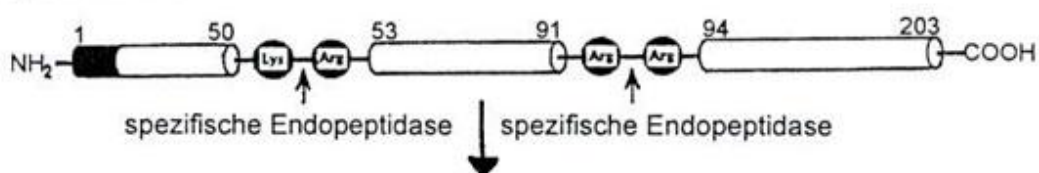
In den Achtziger Jahren wurde nach der Entdeckung von NO als vom Endothel produzierter, vasoaktiver Substanz (Furchgott et Zawadzki 1980, Palmer et al. 1987) vermehrt nach ähnlichen kreislaufwirksamen Substanzen gesucht. Schon 1982 konnte ein EDCF (endothelium-derived constricting factor) nachgewiesen werden, indem bei der Untersuchung des EDRF (endothelium-derived relaxing factor = NO) mittels Zugabe von Kulturüberstand aus Rinderaortenendothelzellen auf isolierte Schweinekoronarien eine unerwartete, langanhaltende Vasokonstriktion beobachtet werden konnte, da der labilere EDRF bereits abgebaut worden war. Aufgrund der Proteasesensitivität des Effekts wurde ein Peptid als Ursache vermutet (Hickey et al. 1985), welches schließlich von Yanagisawa et al. (1988) aus Schweineaortenendothelzellen isoliert und identifiziert werden konnte. Entsprechend seines Ursprungsorts wird es seither Endothelin genannt.

### 1.1.2 Komponenten des Endothelinsystems

Es sind drei verschiedene Endotheline bekannt, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung als Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) bezeichnet werden. Sie bestehen alle aus 21 Aminosäuren mit vier intramolekularen Cysteinresten, die über Disulfidbrücken in Position 1 und 15 sowie 3 und 11 miteinander verbunden sind (Inoue et al. 1989). Dies führt zu der charakteristischen Haarnadelstruktur der Moleküle. Die Endotheline unterscheiden sich nur geringfügig voneinander: ET-2 hat zwei und ET-3 sechs abweichende Aminosäuren im Vergleich zu ET-1. Eine hohe Ähnlichkeit besteht auch zwischen den Endothelinmolekülen verschiedener Spezies (sie sind in Schwein, Katze und Mensch sogar identisch (Itoh et al. 1988)), sowie zu den Sarafotoxinen des Gifts der Schlangenart *Atractaspis engaddensis* (Kloog et Sokolovsky 1989).

Die Gene für die Endothelinisoformen liegen beim Menschen auf den Chromosomen 6 (p23-24), 1 (p34) und 20 (q13.2-13.3) (Arinami et al. 1991). Das ET-1-Gen enthält 5 Exons und 4 Introns, seine gesamte Nucleotidsequenz ist bekannt. Nach der Entfernung der Introns wird die Präproendothelin-mRNA in Präproendothelin-1 translatiert, welches beim Menschen 212 Aminosäuren enthält. Spezifische Endopeptidasen spalten das Präproendothelin an 2 Basenpaaren, so dass Proendothelin-1 (auch als Big-Endothelin-1 bezeichnet) entsteht (Yanagisawa et al. 1988, Masaki et al. 1992). Es besteht beim Menschen aus 38, bei Ratte, Rind und Schwein aus 39 Aminosäuren. Mit Hilfe eines Endothelin-converting-enzymes (ECE) wird das biologisch weitgehend inaktive Proendothelin in seine aktive Form ET-1 umgewandelt.

### Präpro-ET-1



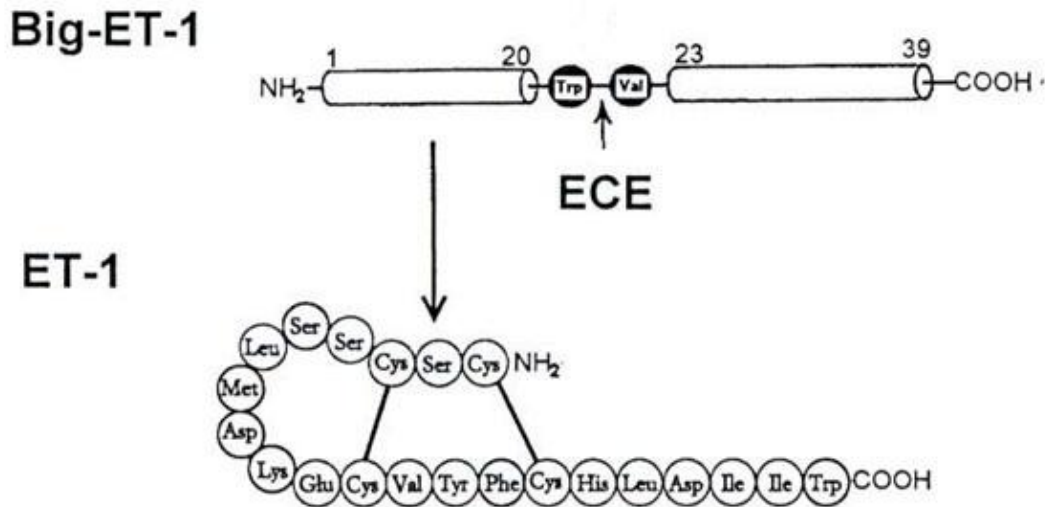


Abb.1 Biosynthese des ET-1. Im Anschluss an die Spaltung des Präpro-ET-1 durch spezifische Endopeptidasen wird Big-ET-1 (=Pro-ET-1) durch das ECE zu reifem ET-1 umgewandelt. (Abb. aus Hocher et al. 1997a)

Es sind verschiedene Isoformen von ECE bekannt. ECE-1 ist eine plasmamembrangebundene Zink-Metalloprotease mit einem pH-Optimum im neutralen Bereich (Xu et al. 1994). Es kommt in diversen Zellen vor, unter anderem in Endothelzellen. Intrazellulär findet man vor allem das ebenfalls membrangebundene ECE-2. Sein pH-Optimum liegt im sauren Bereich, bei neutralem pH ist es weitgehend inaktiv (Emoto et Yanagisawa 1995). Beide ECEs besitzen eine höhere Affinität zu Proendothelin-1 als zu Proendothelin-2, die Affinität zu Proendothelin-3 ist am geringsten. Eine Studie von Yanagisawa et al. (2000) zeigt, dass es noch weitere Enzyme zur Umwandlung von Proendothelin geben muss, da Mäuse, die weder ECE-1 noch ECE-2 exprimieren können, dennoch messbare Mengen reifer Endotheline produzieren. Die Konversion von Proendothelin zu ET durch die ECEs ist essentiell für die biologische Aktivität, eine Hemmung des Enzyms führt zu einem Verlust der blutdrucksteigernden Wirkung von exogen zugeführtem Proendothelin (Matsumura et al. 1990).

ET bindet in Säugetieren an zwei unterschiedlichen Rezeptoren, den Endothelin-A-Rezeptor (ET<sub>A</sub>R) und den Endothelin-B-Rezeptor (ET<sub>B</sub>R). Beide Rezeptoren bestehen aus etwa 400 Aminosäuren mit 7 transmembranen, hydrophoben Helices, einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus, sowie jeweils drei intra- und extrazellulären Loops (Birnbauer et al. 1990). Sie gehören beide zur Familie der rhodopsinartigen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Der ET<sub>A</sub>R bindet ET-1 deutlich stärker als ET-2, ET-3 wird in noch geringerem Maß gebunden. Der ET<sub>B</sub>R bindet alle ET-Peptide mit etwa gleichstarker Affinität (Bax et Saxena 1994).

Nambi et al. fanden 1994 in der Froschart *Xenopus laevis* noch einen weiteren Endothelin-Rezeptortyp, den Endothelin-C-Rezeptor, dessen Existenz in Säugetieren bisher jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

Der Abbau von zirkulierendem Endothelin erfolgt über Endopeptidasen mit saurem pH-Optimum und Endopeptidasen mit neutralem pH-Optimum, welche insbesondere in der Lunge vorkommen (Simonson et Dunn 1993).

### 1.1.3 Vorkommen, Steuerung und Funktion des Endothelinsystems

Endotheline werden in vielen verschiedenen Organen gebildet, wobei die Syntheserate der einzelnen Isopeptide in den einzelnen Organen unterschiedlich ist. ET-1 wird vor allem in Endothelzellen gebildet (Yanagisawa et al. 1988, Masaki et al. 1992), kommt aber auch in Niere, Leber, Lunge, Herz, Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, Nebennieren, Gastrointestinaltrakt, Prostata, Augen, Epidermis und Parathyreoidea vor (Martin et al. 1990, Lee et al. 1990, Masaki et Yanagisawa 1992, Imokawa et al. 1992, Eguchi et al. 1992, Simonson et Dunn 1993, Langenstroer et al. 1993). ET-2 findet man unter anderem in Niere und Darm (Suzuki et al. 1989), und ET-3 wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem und im Darm exprimiert (Matsumoto et al. 1989).

Auch die Verteilung der ET-Rezeptoren differiert von Organ zu Organ. Bei Menschen wird der ET<sub>A</sub>R vor allem in glatter Gefäßmuskulatur, Herz, Lunge, Kolon und Plazenta synthetisiert (Hosoda et al. 1992, Molenaar et al. 1993), während er bei Ratten auch in der Leber nachgewiesen wurde (Jouneaux et al. 1994). Der ET<sub>B</sub>R kommt ebenfalls in der Rattenleber vor, außerdem ist er u.a. auf Endothelzellen, im ZNS, in der Lunge und in der Niere zu finden (Ogawa et al. 1991).

Die Steuerung der Endothelinbildung und Freisetzung erfolgt in der Regel auf der Ebene der Präproendothelin-mRNA Synthese (Yanagisawa et al. 1988). Eine Reihe von Faktoren stimulieren die Endothelinproduktion. Dazu zählen unter anderem:

- Hormone wie Adrenalin (Yanagisawa et al. 1988), Angiotensin II (Barton et al. 1997), ADH (Emori et al. 1991), Cortisol (Kanase et al. 1991a), Insulin (Oliver et al. 1991)
- Peptide wie Zytokine (Kanase et al. 1991b), TGF- $\beta$  (Zoja et al. 1991), EGF (*epidermal growth factor*, Casey et al. 1991), IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*, Matsumoto et al. 1990), Interleukin-1 (Yoshizumi et al. 1990), Endotoxin (Sugiura et al. 1989)
- Blutbestandteile wie oxidiertes LDL (*low density lipoprotein*, Boulanger et al. 1992), Glukose (Yamauchi et al. 1990), Thrombin und Thromboxan A<sub>2</sub> (Zoja et al. 1991)
- Physikalische und chemische Stimuli: Hypoxie (Kourembanas et al. 1991) und Gefäßwandspannung (Milner et al. 1990)
- Pharmaka: Cyclosporin A (Nakahama 1990), FK 506 (Takeda et al. 1999) und CA<sup>2+</sup>-Ionophor A23187 (Yanagisawa et al. 1988)

Als wichtigster Inhibitor der Endothelinsynthese wirkt sein physiologischer Gegenspieler Stickstoffmonoxid (NO). Starker *shear stress* an den Gefäßwänden führt zur Freisetzung von NO, welches intrazellulär die Bildung von cGMP fördert, wodurch dann die ET-1-Expression gehemmt wird (Kuchan et Frangos 1993). Auch andere Faktoren, die die cGMP-Synthese erhöhen, wie z.B. ANP (atriales natriuretisches Peptid) und Prostazykline, hemmen die Bildung von Endothelin (Gray et Webb 1996). ET-1 induziert über den ET<sub>B</sub>R die kalziumabhängige endotheliale NO-Synthase (eNOS) und steigert dadurch selbst die Bildung von NO. ET-1 und NO sind also Teil einer lokalen negativen Rückkopplung (Yanagisawa et al. 1988).

Die Plasmakonzentration von ET-1 (1pM) und Proendothelin (auch etwa 1pM) liegt deutlich unter der pharmakologisch bedeutsamen Konzentration, bei ET-2 und ET-3 ist sie sogar noch geringer. Endotheline wirken also unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auto- und parakrin und nicht als zirkulierende Hormone im Blutkreislauf (Battistini et al. 1993a).

Bei der Bindung von ET an seinen Rezeptor kommt es zu einer G-Protein gekoppelten Aktivierung der Phospholipase C. Dies führt zu einer Spaltung von Phosphatidylinositol in 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Phosphate, v.a. 1,4,5-Inositol-triphosphat (IP<sub>3</sub>). Das entstandene DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC), während das IP<sub>3</sub> durch Bindung an

seine intrazellulären Rezeptoren zu einem raschen Kalziumeinstrom aus intrazellulären Speichern führt (Simonson et Dunn 1990). Darauf folgt ein lang anhaltender  $\text{Ca}^{2+}$ -influx über Dihydropyridin-sensitive, spannungsabhängige L-Typ Kalziumkanäle (Goto et al. 1989) und vermutlich auch über rezeptorabhängige, unselektive, Dihydropyridin-sensitive Kationenkanäle (Iwamuro et al. 1998). Dieser Kalziumeinstrom kann durch Kalziumkanalblocker verhindert werden und ist somit abhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Iijima et al. 1991). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration hat eine Aktivierung der Phospholipase  $\text{A}_2$  und damit Veränderungen im Arachidonsäuremetabolismus zur Folge (Resink et al. 1990a). Die Aktivierung der PKC führt zu einer Sensibilisierung der kontraktilen Zellbestandteile gegenüber Kalzium und, wahrscheinlich über eine Stimulation des Natriumionen-Protonen Austauschs, zu einer Alkalisierung des Intrazellulärraums (Lonchamp et al. 1991). Des Weiteren wird eine verstärkte Expression wachstumsfördernder Gene wie *c-fos*, *c-myc* und *c-jun* durch die PKC angenommen (Simonson et al. 1989 und 1992).

Endotheline übernehmen in verschiedenen Organen eine Vielzahl von Funktionen.

- Eine der wichtigsten Funktionen ist ihre Rolle bei der Blutdruckregulation. Über den  $\text{ET}_B\text{R}$  wirken Endotheline zunächst vasodilatatorisch durch die Stimulation der NO-Synthase und der Prostacyclin-Synthese. Dann folgt eine länger anhaltende Vasokonstriktion über den  $\text{ET}_A\text{R}$ -vermittelten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in glatten Muskelzellen (Filep et al. 1991, Hirata et al. 1993). Es gibt allerdings auch mehrere Studien, die einen  $\text{ET}_B\text{R}$ -vermittelten vasokonstriktorischen Effekt zeigen (Pollock et Opgenorth 1993, Clozel et Gray 1995). Die Endothelinwirkung auf Gefäße ist demnach abhängig von der Rezeptorverteilung und den unterschiedlichen intrazellulären Effektor-Proteinen. So ist z.B. an menschlichen Koronararterien der  $\text{ET}_B\text{R}$  am Endothel nicht nachweisbar, ET-1 wirkt also als Vasokonstriktor (Russell et al. 1997).

In gesunden Menschen führt eine Blockade der ET-Rezeptoren mit dem unselektiven  $\text{ET}_A/\text{ET}_B$ -Rezeptorantagonist TAK-044 zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks und des totalen peripheren Widerstands (Haynes et al. 1996). Bei der essentiellen Hypertonie des Menschen lässt sich der Blutdruck durch die 6-wöchige Gabe von Bosentan, ebenfalls ein  $\text{ET}_A/\text{ET}_B$ -Rezeptorantagonist, in einem mit ACE-Hemmern vergleichbaren Ausmaß senken (Krum et al. 1998). Auch bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) konnte der Blutdruck mittels kurzzeitiger systemischer Gabe von Bosentan oder dem selektiven  $\text{ET}_A$ -Rezeptorantagonisten BQ-123 signifikant gesenkt werden, was bei den normotensiven Kontrollen nicht der Fall war (Hochoer et al. 1996, Bunting et Widdop 1999). Bei chronischer Applikation von Bosentan lässt sich allerdings keine Blutdrucksenkung mehr nachweisen (Li et al. 1996). Dieser Effekt lässt sich möglicherweise durch eine Abnahme von gegenregulatorischen Mechanismen wie der NO-Synthase oder einer Zunahme der Anzahl an Endothelinrezeptoren bzw. der ET-abhängigen intrazellulären Signaltransduktion erklären.

Auch in anderen experimentellen Hochdruckmodellen ist eine Aktivierung des ET-Systems nachweisbar. Dies gilt vor allem für durch Salzbelastung hervorgerufene Hypertonien wie z.B. Desoxykortikosteronacetat (DOCA) Salz sensitive Ratten (Larivière et al. 1993a und b), DOCA Salz behandelte spontan hypertensive Ratten

(Schiffrin et al. 1995) und Dahl Salz sensitive Ratten (Doucet et al 1996, Ikeda et al. 1999) sowie bei Menschen mit salzsensitiver Hypertonie (Ferri et al. 1997).

Die durch exogen infundiertes Angiotensin II hervorgerufene Blutdrucksteigerung lässt sich mit ET-Rezeptorantagonisten verhindern, was eine ET-1 vermittelte Angiotensin II-Wirkung nahe legt (Rajagopalan et al. 1997). Bei einer endogenen Überexpression von Angiotensin II lässt sich jedoch keine Aktivierung des vaskulären ET-Systems nachweisen (Schiffrin 1999).

Eine verstärkte Aktivierung des Endothelinsystems bei Hypertonie konnte also in einigen Studien nachgewiesen werden (Wagner et al. 1992, Larivière et al. 1993a, Lüscher et Wenzel 1995), während andere Studien keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit normotensiven Kontrollen fanden (Kohno et al. 1990, Ergul et al. 1996).

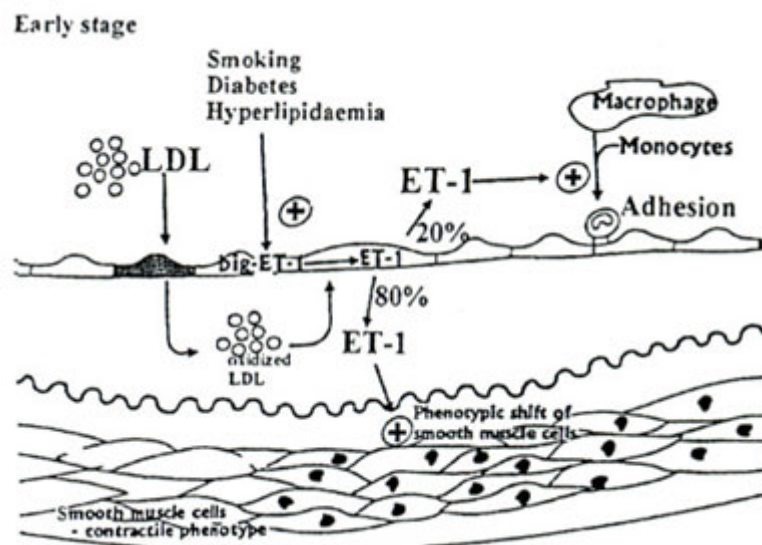
Eine dauerhafte Überexpression von Endothelin-1, z.B. in ET transgenen Tiermodellen, führt nicht wie erwartet zu einer Hypertonie, sondern zu normotensiven Blutdruckwerten (Hochoer et al. 1997b). Im Gegensatz dazu fanden Kurihara et al. (1994) bei heterozygoten ET-1 *knockout* Mäusen eine leichte Erhöhung des arteriellen Blutdrucks, was auf eine prädominante blutdrucksenkende Wirkung von Endothelin-1 hinweisen könnte oder aber auch Folge der durch kraniofaziale Missbildungen bedingten Hypoxie der Tiere sein könnte.

- Auch in der Lunge führt Endothelin zu einer Vasokonstriktion, die durch ET-Rezeptorantagonisten blockiert werden kann (Barman et Pauly 1995). In verschiedenen Tiermodellen konnte die Progression der pulmonalen Hypertonie mit ET<sub>A</sub>R-Antagonisten verlangsamt werden (Miyachi et al. 1993, Okada et al. 1995). Bei Patienten mit pulmonalem Hypertonus konnten erhöhte Mengen von Präpro-ET-1-mRNA und ET-1 in den Endothelzellen der Lungenarterien nachgewiesen werden (Giaid et al. 1993). Verschiedene Studien zeigen eine Senkung des pulmonalarteriellen Drucks und des pulmonalen Gesamtwiderstands sowie eine Verbesserung der Gehstrecke und des subjektiven Befindens unter der Therapie mit dem gemischten Rezeptorantagonist Bosentan (Williamson et al. 2000, Channick et al. 2001, Sitbon et al. 2003). Endothelin wirkt auch konstriktorisch auf die glatte Muskulatur der Bronchien und spielt dadurch eine Rolle beim Asthma bronchiale (Ortega Mateo et al. 1997). Eine Überexpression von ET-1 führt in der Lunge zu einer chronischen Entzündung und einer Lungenfibrose (Hochoer et al. 2000a).
- Die Koronararterien sind neben den Nierengefäßen die Widerstandsgefäße, die am empfindlichsten auf ET reagieren (Clozel et Clozel 1989). Dies führt bei einer vermehrten ET-Ausschüttung zu einer Koronarkonstriktion und damit durch Ischämien (Kurihara et al. 1989, Wang et al. 1994) und Arrhythmien (Ezra et al. 1989, Salvati et al. 1991) zu einer verminderten Herzleistung. Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz spielt das ET-System eine wichtige Rolle. Am Herz wirken niedrige Dosen ET-1 positiv chronotrop und positiv inotrop (Ishikawa et al. 1989, Yomogida et al. 2004), eine Aktivierung des ET-systems scheint zunächst also sinnvoll. Sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen mit Herzinsuffizienz lässt sich eine erhöhte Endothelinbildung und eine vermehrte ET-Rezeptorexpression im Herz nachweisen (Sakai et al. 1996, Tonnessen et al. 1997, Zolk et al. 1999). Dies führt jedoch neben der Kontraktilitätssteigerung auch zu einer auf dem mitogenen Effekt des Endothelins



beruhenden Förderung der kardialen Hypertrophie und des strukturellen *Remodellings* der Herzwand (Mulder et al. 1997). Darüber hinaus führt die bei Herzinsuffizienz erhöhte ET-Konzentration im Plasma zu einer peripheren Vasokonstriktion und damit zu einer Erhöhung der kardialen Nachlast. Zusammen mit der Konstriktion der Koronargefäße verstärken diese Effekte also die Herzinsuffizienz noch. Dies zeigt sich auch in der Korrelation der Plasmaspiegel von ET-1 und der Schwere des Krankheitsbildes gemessen an klinischen und hämodynamischen Parametern (Spieker et al. 2001). Die Behandlung der Herzinsuffizienz mit kombinierten ETR-Antagonisten wie Bosentan oder Tezosentan (Torre-Amione et al. 2003) führte in verschiedenen Studien sowohl bei akuter als auch bei chronischer Gabe zu einer signifikanten Verbesserung der hämodynamischen und pulmonalen Parameter (Wenzel et al. 1998, Sutsch et al. 1998, Mylona et Cleland 1999).

Endothelin spielt auch bei der Entwicklung von Arteriosklerose und Myokardinfarkt eine pathogenetische Rolle. Viele der bekannten Risikofaktoren für Arteriosklerose wie Hyperlipidämie, Diabetes und Rauchen führen zu einer Aktivierung des ET-systems (Martin-Nizard et al. 1991, Boulanger et al. 1992, Haak et al. 1994, Kiowski et al. 1994). Schon vor morphologischen Veränderungen der Gefäße konnte in Ratten mit Hypercholesterinämie ein erhöhter ET-Spiegel nachgewiesen werden (Horio et al. 1991), und bei Menschen mit Arteriosklerose korreliert das Ausmaß der Erkrankung mit der Immunoreaktivität für ET im Plasma und Gewebe der Patienten (Lerman et al. 1991). ET-1 ist ein starkes Chemotaxin für zirkulierende Monozyten und aktiviert Makrophagen, welche zum einen direkt schädigend auf das Endothel wirken, zum anderen Zytokine produzieren (PDGF, IL-1, TNF- $\alpha$ ) die wiederum glatte Muskelzellen zur Migration in die Intima und zur Proliferation anregen (Ross 1990, Haller et al. 1991). Außerdem fördert ET die Einwanderung von Fibroblasten und deren Proliferation (Peacock et al. 1992) sowie die Umwandlung von glatten Muskelzellen vom kontraktilen Typ in den synthetisierenden Typ (Sjolund et al. 1988). Dies geschieht unter anderem durch seine ET<sub>A</sub>R-vermittelten mitogenen Effekte (Weissberg et al. 1990, Resink et al. 1990b, Alberts et al. 1994).



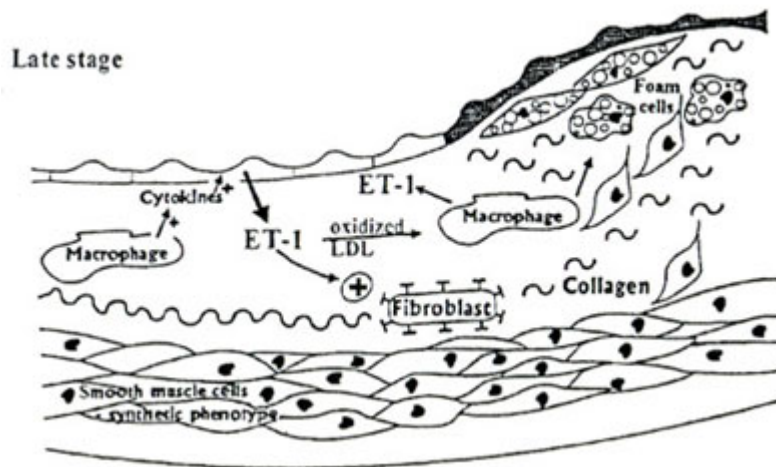


Abb.2 Darstellung der Pathogenese der Atherosklerose und des Einfluss von Endothelin im frühen und im späten Stadium. (Abb. aus Hocher et al. 1997a)

Bei Patienten mit Myokardinfarkt korreliert die 1-Jahres-Überlebensrate stark mit der ET-1 Konzentration im Plasma drei Tage nach dem Infarkt (Omland et al. 1994). In Tiermodellen konnte die Infarktgröße um 40-45% gesenkt werden, wenn vor der Ligatur des Koronargefäßes ein ETR-Antagonist infundiert wurde (Watanabe et al. 1991, Grover et al. 1993). Die ET-1 Freisetzung beim akuten Myokardinfarkt ist durch verschiedene Faktoren wie der Gefäßverletzung, der verminderten Freisetzung von vasodilatatorischen Substanzen, dem verstärkten *Shear stress*, der Thrombinfreisetzung und der Ischämie bedingt (Yoshizumi et al. 1989, Kourembanas et al. 1991, Pearson et al. 1992), was wiederum zu einer Koronarkonstriktion und damit zu einer Verstärkung der Ischämie und Vergrößerung des Infarktareals führt.

Studien haben gezeigt, dass auch die Proliferation der Intima nach koronarangiographischer Intervention durch die Gabe von ETR-Antagonisten verringert werden kann (Lermann et al. 1994, Douglas et al. 1994, Raschack et Stumpf 1996).

- In der Niere kommen beim Menschen normalerweise mRNA von allen drei ET-Isoformen vor, auf Proteinebene lässt sich jedoch nur ET-1 nachweisen. Die Expression von ET-1 und seinen Vorstufen ist bei Gesunden hauptsächlich auf das Endothel der Gefäße und des Glomerulums beschränkt (Hocher et al. 1997a, Miyauchi et Masaki 1999). Bei Nierenerkrankungen mit Proteinurie findet man ET-1 auch in den Nierentubuli (Kohan 1997).

Auch in der Niere findet, wie oben beschrieben, an den Gefäßen eine kurzzeitige ET<sub>B</sub>R-vermittelte Vasodilatation mit anschließender ET<sub>A</sub>R-vermittelter Vasokonstriktion statt. In einigen Gefäßregionen wird der ET<sub>B</sub>R jedoch auch auf der glatten Muskulatur der Gefäße exprimiert und wirkt dort zusätzlich vasokonstriktorisch (Haynes et al. 1995). Insgesamt bewirkt ET in der Niere eine Konstriktion der Arteriolen (v.a. der afferenten) und damit eine Reduktion der glomerulären Durchblutung und Filtrationsrate. Diese Reaktionen sind vor allem ET<sub>A</sub>R vermittelt, eine Aktivierung des ET<sub>B</sub>R bei Menschen und Ratten führt zu einer Zunahme des renalen Blutflusses (Gellai et al. 1997). Der ET<sub>B</sub>R findet sich auch in weiten Teilen des Tubulussystems. Dort führt er wahrscheinlich zu einer tonischen

Inhibition des epithelialen Natriumkanals (eNaC) (Gallego et Ling 1996, Hocher et al. 2000b) und zu einer vermehrten Regeneration von beschädigtem Tubulusepithel (Ong et al 1995). Kleine ET-1-Dosen fördern daher die Natriumexkretion (Marsden et al. 1994), höhere Dosen können allerdings auch zu einer Natriumretention führen (Lopez-Farre et al. 1989).

Bei einer Vielzahl von Nierenerkrankungen wie der diabetischen Nephropathie, der Lupus Nephritis, dem akuten Nierenversagen und v.a. Nierenerkrankungen, welche mit einer Fibrose einhergehen, findet sich eine Aktivierung des Endothelinsystems (Shibouta et al. 1990, Nakamura et al. 1993, Fukui et al. 1993, Tharaux et al. 1999). Auch die nephrotoxische Wirkung von Cyclosporin scheint mit einer Aktivierung des Endothelinsystems zusammenzuhängen und lässt sich durch die Gabe von ET-Rezeptorantagonisten verbessern (Nambi et al. 1990, Fogo et al. 1992, Davis et al. 1994) Die genaue Rolle von Endothelin bei der chronischen Niereninsuffizienz ist unklar, da es sich meist um eine multifaktorielle Genese handelt und einzelne Faktoren daher schwierig zu analysieren sind. In einem Rattenmodell mit 5/6 Nephrektomie führte die Gabe eines selektiven ET<sub>A</sub>R-Antagonisten (FR139317) zu einer Reduktion der Proteinurie, einer Verminderung des glomerulären Schadens und einer Hemmung der Progression der Niereninsuffizienz (Takahashi et al. 1994). Bei Modellen der Nierenarterienstenose wie dem 2-Niere-1-Clip Goldblatt hypertensiven Ratten konnte eine Aktivierung des renalen Endothelinsystems nachgewiesen werden (Diekmann et al. 2000). Eine dauerhafte Überexpression von ET-1, wie bei den auch in dieser Studie verwendeten ET-1 transgenen Mäusen, führt zu einer Glomerulosklerose, einer interstitiellen Fibrose und Nierenzysten (Hocher et al. 1997b). Bei homozygoten 3 Wochen alten Ratten mit einer natürlichen Mutation des ET<sub>B</sub>R-Gens (sl-Mutation) ließ sich neben einer Blutdruckerhöhung gegenüber dem Wildtyp eine durch Amilorid antagonisierbare stark verminderte Natriumausscheidung und eine herabgesetzte GFR bei normaler Nierenmorphologie nachweisen (Hocher et al. 2000b).

- Eine weitere wichtige Funktion der Endotheline besteht in ihren wachstums- und differenzierungsfördernden Eigenschaften. In vitro wurde für viele Zelltypen der proliferative Effekt von ET-1 nachgewiesen (Battistini et al. 1993b, Panettieri et al. 1996, Mazzocci et al. 1997). Auch in vivo spielt dieser Effekt bei der Embryonalentwicklung, aber auch bei der Pathogenese einiger Erkrankungen wie z.B. der Arteriosklerose (Hocher et al. 1997a) eine wichtige Rolle. Durch Studien an transgenen Tieren, bei denen gezielt einzelne Komponenten des ET-systems ausgeschaltet oder überexpimiert wurden, konnten viele interessante Erkenntnisse gewonnen werden. So zeigten ET-1 und ET<sub>A</sub>R *knockout* Mäuse kraniofaziale und kardiovaskuläre Missbildungen (Kurihara et al. 1994, Clouthier et al. 1998). Die Rolle von ET-1 bei der Embryonalentwicklung scheint also hauptsächlich über den ET<sub>A</sub>R vermittelt zu werden. Tiere mit einer Defizienz des ET-3-Gens zeigen ebenso wie ET<sub>B</sub>R *knockout* Mäuse einen Verlust epidermaler Melanozyten und ein aganglionäres Megakolon (Baynash et al. 1994). Auch Patienten mit Morbus Hirschsprung zeigen teilweise Mutationen in den Genen für ET-3 oder den ET<sub>B</sub>R. Die Interaktion zwischen ET-3 und dem ET<sub>B</sub>R scheint also für die Ausbildung des enterischen Nervensystems von großer Bedeutung zu sein (Kruger et al. 2003). Die bei den in dieser Studie verwendeten ET-1 transgenen Mäusen beobachtete Glomerulosklerose, interstitielle



Nierenfibrose und Lungenfibrose lässt sich vermutlich auch auf den mitogenen Effekt der Endotheline zurückführen (Hoher et al. 1997b, Hoher et al. 2000a).

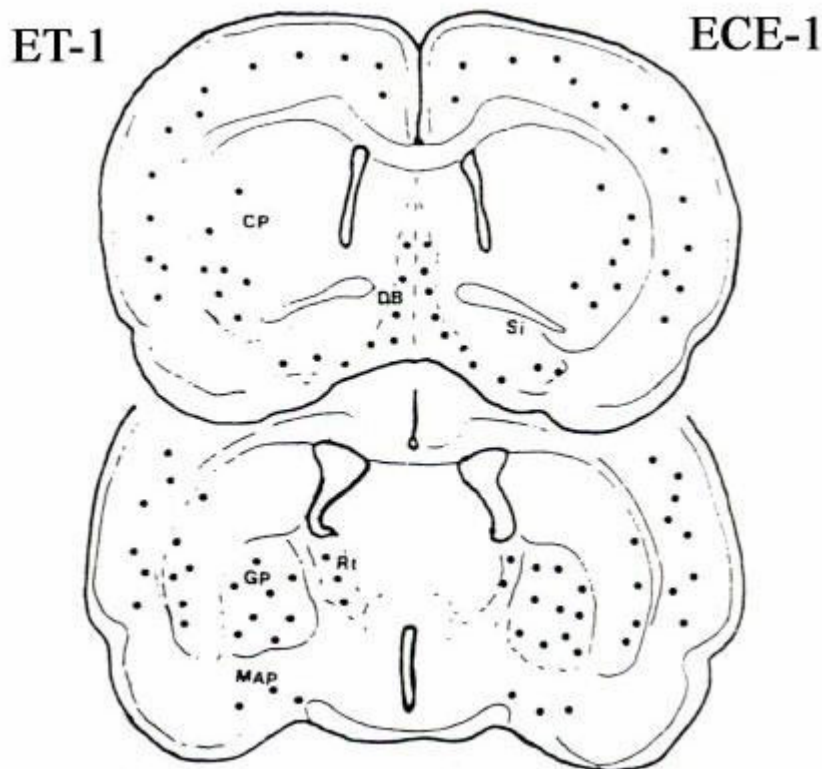
#### 1.1.4 Endothelin im zentralen Nervensystem

Endotheline lassen sich in vielen Regionen des Gehirns nachweisen. Zu diesen zählen unter anderem der Hypothalamus, das Striatum, para- und periventriculäre Regionen, die Amygdala, der Hippocampus, der Nucleus basalis Meynert, die Substantia nigra, die Raphe nuclei, die Purkinjezellen des Cerebellum, der dorsale motorische Kern des Nervus vagus in der Medulla oblongata (Lee et al. 1990, Giaid et al. 1991).

Es lassen sich alle 3 ET-Gruppen im ZNS nachweisen. Je nach verwendeter Methode unterscheiden sich die Verteilung und Menge des nachgewiesenen Endothelins der einzelnen Untergruppen. Dies liegt wahrscheinlich an unterschiedlichen Antikörperspezifitäten oder Unterschieden in der Assay-Methode. Vor allem Studien mit Radio-Immunoassays kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen (van den Buuse et Webber 2000). ET-3 scheint vor allem in der Hypophyse exprimiert zu werden und macht dort den größten Anteil des gebildeten Endothelins aus (Takahashi et al. 1991, Webber et al. 1998a). Masuo et al. (2003) fanden ET-2 ebenfalls vermehrt in der Hypophyse und in der Medulla oblongata, jedoch auch hier in niedrigeren Mengen als ET-1.

ET-1 wurde im vor allem im Hypothalamus, im Striatum, in epithelialen Zellen des Plexus corioideus und in den Purkinjezellen des Kleinhirns nachgewiesen (Takahashi et al. 1991, Webber et al. 1998a), kommt aber auch in vielen anderen Gehirnregionen vor.

Die Expression von ECEs scheint in etwa an denselben Stellen wie auch die der Endotheline zu erfolgen, wurde aber insgesamt seltener untersucht (Warner et al. 1992, Sluck et al. 1999).



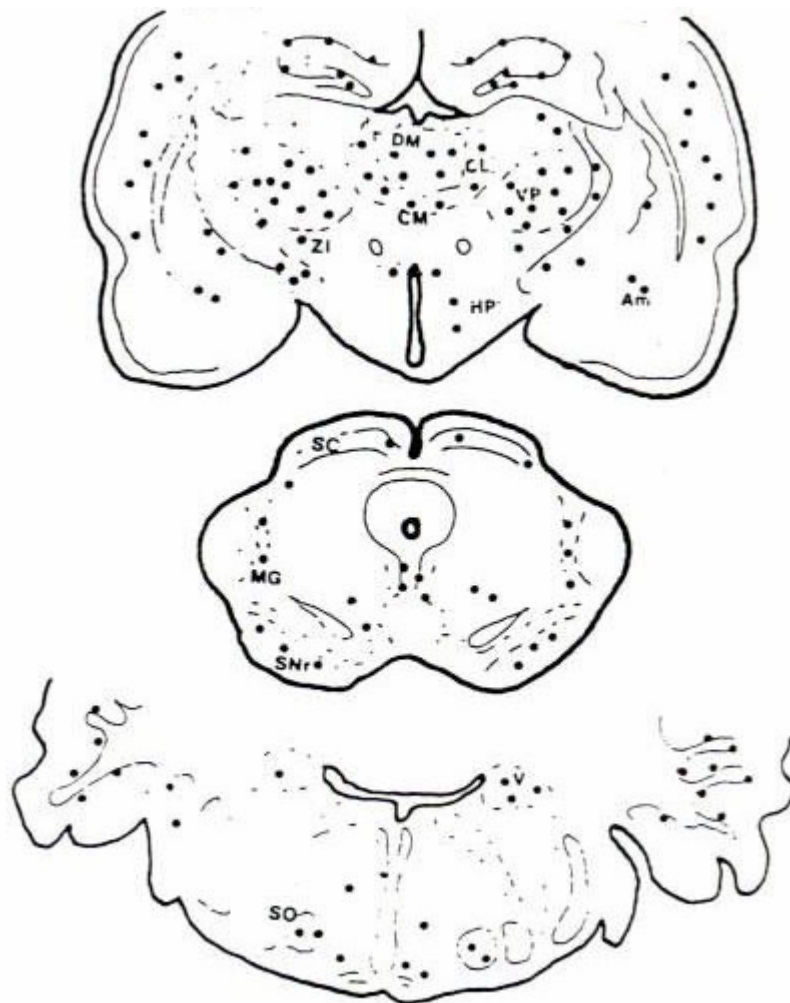


Abb.3 Schematische Darstellung der Verteilung von ET-1 (links) und ECE-1 (rechts) im Rattengehirn, entsprechend der Ergebnisse der Studie von Sluck et al. 1999. Andere Studien fanden ET-1 zusätzlich auch in anderen Gehirnbereichen. (Abb. aus Sluck et al. 1999)

Der vorherrschende ET-Rezeptortyp im Gehirn ist der  $ET_B$ R.  $ET_A$ Rezeptoren finden sich hauptsächlich auf den Endothelzellen der cerebralen Gefäße (Hori et al. 1992, Davenport et al. 1998) und nur in sehr geringen Mengen auf Gliazellen oder Neuronen (Shibata et al. 1997, Schmitt-Ott et al. 1998, Gebke et al. 2000). Eine Ausnahme bildet die Studie von Kurokawa et al., die mit einem ihren Angaben nach selektiven  $ET_A$ R-Antikörper viele Bereiche des Rattengehirns markieren konnte, welche ähnlich verteilt waren wie catecholaminproduzierende Neurone (Kurokawa et al. 1997).

Der  $ET_B$ R wird vor allem auf Gliazellen (Hori et al. 1992, Pagotto et al. 1995, Schmitt-Ott et al. 1998) aber auch auf Neuronen (Yamamoto et al. 1997) exprimiert. Der Rezeptor konnte im Kleinhirn (Hori et al. 1992, Pagotto et al. 1995, Schmitt-Ott et al. 1998), im Diencephalon, Mesencephalon und unteren Hirnstamm (Hori et al. 1992), im Hypothalamus (Yamamoto et al. 1997), im Striatum (Tayag et al. 1996, Webber et al. 1998b) und beim Menschen auch im zerebralen Kortex (Fernandez-Durango et al. 1994) und dem Hippocampus (Williams et al. 1991) nachgewiesen werden.

In einer detaillierten Studie von Kohzuki et al. (1991) mit [ $^{125}$ I]markiertem ET-1 an Ratten zeigte sich die deutlichste Rezeptorbindung in der Purkinjezellschicht des Cerebellums, im

Plexus choroideus und in der Eminentia mediana; eine hohe Dichte im Nucleus supraopticus und paraventricularis, im anterioren und ventromedialen Hypothalamus, in den Corpora mamillaria und dem Bulbus olfactorius; eine mittlere Dichte in Nuclei des Thalamus, im Nucleus praetectalis, - interpeduncularis, - suprachiasmaticus, - reticularis, - nervi hypoglossi, in den Raphe nuclei und im zentralen Grau; eine geringe Dichte im Nucleus caudatus, im Globus pallidus, in der Substantia nigra, im vorderen Hypophysenlappen, im Nucleus praeopticus, in den Colliculi superiores und in der Area postrema. Im Hippocampus wurde nur die Molekularschicht, im Corpus amygdaloideum der basale, mediale Nucleus markiert. Regionen, welche mit der kardiovaskulären Kontrolle zusammenhängen (wie der Nucleus tractus solitarii, Nucleus ambiguus und der dorsale motorische Nucleus des Nervus vagus), wurden nur schwach markiert (Kohzuki et al. 1991).

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird Endothelin hauptsächlich von Neuronen exprimiert (Giaid et al. 1991, Schmitt-Ott et al. 1998, Nakagomi et al. 2000). Es liegt dann in relativ niedrigen Konzentrationen vor und scheint einen neuromodulatorischen Effekt zu haben. Zum Beispiel bewirken ET-1 und ET-3 über den ET<sub>B</sub>R an dopaminergen Nervenendungen im Striatum eine Dopaminausschüttung. Der genaue Wirkungsmechanismus ist allerdings noch unklar, da verschiedene Studien unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von Glutamat (Wirkungshemmung bei Horie et al. 1995, kein Einfluss bei van den Buuse et Webber 2000) und NO (Wirkungshemmung bei einer in vitro Studie von Shibaguchi et al. 1997, kein Einfluss von NO-Synthase-Inhibitoren bei van den Buuse et Webber 2000) erzielt haben. Außerdem lässt sich ein Rückgang der Wirkung bei wiederholter ET-Injektion feststellen (van den Buuse et Webber 2000). Di Nunzio et al. (2002) wiesen einen Rückgang der Norepinephrin-Sekretion im anterioren Hypothalamus durch ET-1 und ET-3 nach. Der Effekt war ET<sub>B</sub>R vermittelt und ließ sich mit Inhibitoren der NO-Synthase, der Guanylatcyclyase, der Proteinkinase G und eines GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten verhindern. Die normale sympathoinhibitorische Wirkung von Norepinephrin in dieser Region wurde also durch ET vermindert, was zu einer Blutdruckerhöhung führte (di Nunzio et al. 2002). ET hat außerdem eine Reihe von neuroendokrinen Effekten durch seine Wirkung auf die Hypophyse. Es lässt sich in den Kerngebieten des Nucleus paraventricularis und supraopticus und allen Bereichen der Hypophyse nachweisen, wobei die häufigere Isoform ET-3 ist und der vorherrschende Rezeptortyp der ET<sub>A</sub>R ist (Nakamura 1993, Webber et al. 1998a). Im Hypophysenhinterlappen führt ET zu einer Ausschüttung von Vasopressin, die wahrscheinlich über ET<sub>A</sub>R vermittelt wird (Ritz et al. 1992, Yasin et al. 1994). Im Vorderlappen bewirkt ET in den meisten Studien eine Hemmung der Prolactinfreisetzung die unabhängig von Dopamin ist (Samson et al. 1990, Domae et al. 1992) und eine Ausschüttung von LH (luteotropes Hormon), TSH (Thyreotropin), GH (Wachstumshormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) (Kanyicska et al. 1991, Samson et al. 1991). Auf die ACTH-Freisetzung nimmt ET Einfluss, indem ET-3 die basale Ausschüttung von CRF reduziert, ET-1 die basale Ausschüttung von ACTH fördert und beide Endotheline die CRF-stimulierte ACTH-Freisetzung reduzieren (Calogero et al. 1994). Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind allerdings je nach verwendeter Methode und Versuchsbedingung unterschiedlich. So ist z.B. bei Experimenten mit dynamischer Perfusion ein stimulierender Effekt von ET-1 auf Prolactin nachweisbar (Samson et al. 1991), und bei Langzeitinkubation mit Dopaminagonisten wurde die stimulierende Wirkung von ET auf Prolactin verstärkt, während die hemmende Komponente durch eine Änderung der Signalübertragung des ET<sub>A</sub>Rs verringert wurde (Kanyicska et al. 1997). Auch eine Erhöhung der GH-, LH- und TSH-

Freisetzung konnte nicht immer nachgewiesen werden (Samson et al. 1990, Lewy et al. 1992).

Höhere Konzentrationen von Endothelin führen bei Ratten ET<sub>B</sub>R-vermittelt zu Verhaltensänderungen wie Ataxie, flache Körperhaltung und Drehbewegungen entlang der longitudinalen Körperachse. Diese ließen sich durch Haloperidol (antidopaminerg), Diazepam (anxiolytisch), Nifedipin (Ca-Antagonist) oder Trihexyphenidyl (antimuscarinerg) nicht beeinflussen (Moser et Pelton 1989), waren aber durch L-Arginin hemmbar und wurden durch NO-Synthase-Inhibitoren verstärkt, was eine Beteiligung des NO-Systems anzeigt (D'Amico et al. 1995). Eine weitere Wirkung von zentral injiziertem ET-1 war ein Hypermetabolismus in periventrikulären Bereichen des Nucleus caudatus, im Hippocampus, im Corpus callosum, im lateralen septalen Nucleus, im Cerebellum und im medialen Corpus amygdaloideum (Gross et al. 1992a). Außerdem fand man in den betroffenen Gehirnregionen einen reduzierten Blutfluss, der sich mit ET<sub>A</sub>R-Antagonisten verhindern ließ und unter dem Einfluss von Glutamatfreisetzung, Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zellen und NO-Wirkung auf die Guanylatcylase stand (Gross et al. 1992b, Gross et al. 1994).

Bei sehr hohen ET-Konzentrationen entsteht ein nicht reversibler neurologischer Schaden. Er entsteht jedoch nicht durch direkte neurotoxische Wirkung von Endothelin, sondern eher durch die ET-bedingte Vasokonstriktion mit nachfolgender Ischämie (Nikolov et al. 1993, Westmark et al. 1995, Hughes et al. 2003) und durch die vermehrte Freisetzung von potentiell neurotoxischen Substanzen wie NO und Glutamat (Horie et al. 1995, Shibaguchi et al. 1997).

Bei cerebraler Ischämie und bei Verletzungen von Hirngewebe kommt es zu einem Anstieg der ET-Expression (Gajkowska 1997, Hama et al. 1997). Vor allem in Astrozyten, die unter physiologischen Bedingungen fast kein Endothelin bilden, ist die Expression von ET, von ET-Rezeptoren und die ET-Rezeptorbindung erhöht (Rogers et al. 1997, Gajkowska 1997). Endothelin führt zusätzlich über den ET<sub>B</sub>R an Astrozyten zu deren Aktivierung und zum Rekrutierung von weiteren Astrozyten (Ishikawa et al. 1997, Baba 1998, Rogers et al. 2003). Auch bei Subarachnoidalblutungen (SAB) lässt sich häufig ein erhöhter ET-Spiegel im Liquor nachweisen (Ehrenreich et al. 1992, Wang et al. 1995), obwohl dies nicht in allen Studien der Fall war (Gaetani et al. 1994). ET<sub>A</sub>R-Antagonisten haben sich in vielen Studien als protektiv bezüglich der Verhinderung von Vasospasmen nach SAB, nach Ischämien und nach Verletzungen des Hirngewebes erwiesen (Zuccarello et al. 1994, Hino et al. 1995, Clozel et Watanebe 1997, Sato et Noble 1998).

Die Rolle der Endotheline bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen ist noch nicht ausreichend geklärt. Bei Patienten mit endogener Depression wurde im Liquor eine Reduktion des ET-Levels um ca. 50% nachgewiesen (Hoffman et al. 1989). Bei Parkinson Patienten fand man eine signifikant verringerte ET<sub>B</sub>R-Bindung im Nucleus caudatus (Webber et al. 1998b). Bei Alzheimer Patienten ließ sich ebenfalls ein erniedrigter ET-Spiegel im Liquor nachweisen, der jedoch nicht mit dem Alter, dem Krankheitsbeginn, dem Blutdruck oder dem ET-Plasmaspiegel korrelierte (Yoshizawa et al. 1992). Im Gegensatz dazu fand sich eine vermehrte Expression von ET in reaktiven Astrozyten (Jiang et al. 1993) und in bestimmten Neuronen (Minami et al. 1995). Der ET<sub>B</sub>R ließ sich weniger gut nachweisen, vermutlich als Konsequenz des erhöhten ET-Spiegels (Kohzuki et al. 1995). Das  $\beta$ -Amyloid Protein, welches bei der Alzheimerpathogenese eine Rolle spielt, scheint starke vaskuläre Effekte zu haben, welche über eine ET-Freisetzung vermittelt werden (Crawford et al. 1998).



## 1.2 Die Astroglia

Das zentrale Nervensystem (ZNS) setzt sich aus Neuronen und nicht neuronalen Strukturen, den Gliazellen, zusammen. Die Gliazellen kann man aufgrund ihrer Abstammung und Morphologie in mesodermale Mikroglia und neuroektodermale Makroglia unterteilen. Zur Makroglia gehören Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen. Unter der Makroglia nehmen die Astrozyten eine besondere Stellung ein. Sie stellen mit etwa 30% des Gesamtvolumens des zentralen Nervensystems die Hauptpopulation der Gliazellen dar. Da sie besonders früh auf schädigende Faktoren mit einer sogenannten reaktiven Gliose reagieren, noch bevor sich andere Zellschäden im Gehirn nachweisen lassen, sind sie ein anerkannter Marker für frühe, subklinische Zellschäden im ZNS (O'Callaghan 1988 und 1991).

### 1.2.1 Die Funktion der Astrozyten

Die Astroglia hat eine Vielzahl wichtiger Aufgaben im zentralen Nervensystem, von denen die meisten jedoch bisher nur in vitro erforscht wurden (Kimmelberg 1999). Dies liegt an der Schwierigkeit, in vivo Astrozyten zu identifizieren, was erst seit kurzem, unter Verwendung des GFAP-Promotors zur Markierung der Astrozyten mit fluoreszierenden Proteinen, möglich ist (Kimmelberg 2004). Zu den bisher nachgewiesenen Funktionen zählen:

- Unterstützung von Wachstum, Differenzierung und Regeneration des ZNS (siehe 1.2.2)  
Astrozyten und ihre Vorläuferzellen, darunter v.a. die radiäre Glia, bilden eine Leitschiene für Neurone während der Migration und Ausreifung in der Entwicklungsphase des ZNS (Campbell et Götz 2002). Sie sind in der Lage, größere Mengen an Nervenwachstumsfaktor (NGF), Fibroblastenwachstumsfaktor und ciliary neurotrophic factor zu sezernieren und stimulieren dadurch das Neuronenwachstum (Hatten et Mason 1986, Muller et al. 1995) sowie nach Verletzungen die Regeneration (Gage et al. 1990).
- Beeinflussung der synaptischen Funktion  
Die Synapsen im ZNS werden von Astrozytenzellfortsätzen umschlossen. Sie bewirken zum einen eine elektrische Isolierung gegenüber benachbarten Synapsen (Ventura et Harris 1999), zum anderen sind sie bei der Wiederaufnahme und dem Abbau von Transmittern beteiligt. Sie sind beispielsweise in der Lage, Glutamat (Hertz et al. 1978, Schousboe et al. 1992) und Serotonin (Kimmelberg et Katz 1985) aufzunehmen.  
Durch die Aufnahme von Calcium aus dem synaptischen Spalt könnten Astrozyten darüber hinaus eine Modulation der Transmitterfreisetzung bewirken (Barres 1991).
- Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels und der Homöostase des Gehirns  
Astrozyten sind in der Lage, Glykogen aufzunehmen, selbst zu synthetisieren, zu speichern und wieder abzubauen. Sie haben hierdurch eine wichtige Aufgabe in der Energieversorgung der Nervenzellen und anderer Zellen im ZNS (Magistretti 1988, Pellerin et al. 1997).  
Durch ihre Fähigkeit, extrazelluläres Kalium aufzunehmen und durch intrazelluläre Umverteilung eine Pufferung lokal erhöhter Kaliumkonzentrationen zu ermöglichen, sind Astrozyten von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Homöostase im interstitiellen Flüssigkeitskompartiment (Barres 1991). Dieser Aufgabe dient auch die Fähigkeit, u. a. Ammoniak, Glutamat, freie Radikale, CO<sub>2</sub> und Schwermetalle aufzunehmen, zu verarbeiten und zu speichern (Norenberg et al. 1988).



- Beteiligung an der Bluthirnschranke

Die Zellfortsätze der Astrozyten stehen nicht nur mit Nervenzellen und Synapsen in Kontakt, sondern lagern sich auch an die Basalmembran der Kapillaren im Gehirn. Sie induzieren dabei die Bildung der Bluthirnschranke durch die Endothelzellen (Janzer et Raff 1987, Eng et al. 2000).

- Einfluss auf die Immunantwort im ZNS

Aufgrund ihrer Nähe zu den Kapillaren des Gehirns sind Astrozyten in der Lage, durch Ausschüttung von Zytokinen die Blutzellen direkt zu beeinflussen (Aschner 1998). Sie setzen beispielsweise macrophage colony-stimulating factor (MCSF) und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GMCSF) frei (Raivich et al. 1991) und produzieren IL-1 (Interleukin-1), IL-6 (Interleukin-6), Prostaglandin E und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) (Fontana et al. 1982, Xiao et al. 1996, Dong et Benveniste 2001). Außerdem haben sie durch die Freisetzung von TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) eine immunsupprimierende Wirkung (Eddleston et Mucke 1993, Dong et Benveniste 2001).

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung von Entzündungsreaktionen besteht in der Bildung von Proteasen und Proteaseinhibitoren (Abraham et al. 1993) und von Adhäsionsmolekülen (Bell et Perry 1995).

Astrozyten helfen außerdem mittels ihrer phagozytischen Eigenschaften bei Aufräumprozessen, wie z.B. der Beseitigung von degenerativen Nervenendigungen (Nolan et Brown 1989).

Ob Astrozyten in der Lage sind, MHC-Klasse-II-Moleküle zu exprimieren und damit an der Antigenpräsentation teilzunehmen, ist noch nicht sicher geklärt. Verschiedene Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen (Dong et Benveniste 2001).

- Formation von Narbengewebe zur Reparatur struktureller Defekte

Bei größeren ZNS Verletzungen mit Untergang von Neuronen bilden Astrozyten eine Glianarbe. Sie dient der Aufrechterhaltung der Struktur und des interstitiellen Milieus des Gehirns (Norenberg 1994, Eng et al. 2000).

### 1.2.2 Regionale Unterschiede der Astrozyten

Die Astrozyten wurden 1913 von Ramon y Cajal aufgrund von morphologischen Gesichtspunkten in fibrilläre und protoplasmatische Astroglia eingeteilt. Die fibrilläre Astroglia befindet sich überwiegend in der weißen Substanz und ist durch viele dünne, fibrilläre Fortsätze gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu kommt die protoplasmatische Astroglia vor allem in der grauen Substanz vor, hat einen rundlichen Zelleib mit kürzeren, stärker verzweigten Fortsätzen. Diese Unterschiede finden sich auch in einem unterschiedlichen Aufbau des Zytoskeletts. So ist z.B. der Gehalt an saurem Gliafaserprotein (GFAP= engl.: glial fibrillary acidic protein) bei fibrillären Astrozyten höher als bei protoplasmatischen Astrozyten (Lewis et Cowan 1985).

Neben ihrer Morphologie unterscheiden sich Astrozyten auch in vielen ihrer Eigenschaften wie z.B. Oberflächenantigenen, Rezeptoren, Enzymsystemen usw.. Dies führte dazu, dass es inzwischen eine große Anzahl verschiedener Klassifikationen gibt, wobei die genaue Einteilung auch heute noch Probleme bereitet (Kimmelberg 2004).

### 1.2.3 Das Zytoskelett und seine Funktion bei der reaktiven Gliose

Das Zytoskelett der Astrozyten besteht vor allem aus drei Filamentklassen. Sie werden anhand ihres Durchmessers eingeteilt in Mikrofilamente 6nm, Intermediärfilamente 8-12nm und Mikrotubuli 20nm. Die astrozytären Intermediärfilamente enthalten Vimentin und GFAP. Während Vimentin v.a. in unreifen Gliazellen vorkommt und im reifen Gehirn nur noch in einigen Astrozyten der weißen Substanz nachzuweisen ist (Hutchins et Casagrande 1989), kommt GFAP während der gesamten Gehirnentwicklung vor und nimmt im Laufe der Zeit an Menge zu (Nichols et al. 1993).

#### GFAP

Das saure Gliafaserprotein (engl.: glial fibrillary acidic protein; GFAP) wurde erstmals von Eng et al. 1970 in Multiple Sklerose Plaques nachgewiesen und kurze Zeit später als ein von Astrozyten produziertes Protein identifiziert (Eng et al. 1971). Es bildet den Hauptbestandteil der astrozytären Zytoskelettproteine. Mit immunhistologischen Methoden lässt es sich vor allem in protoplasmatischen Astrozyten der grauen Substanz, in fibrillären Astrozyten der weißen Substanz, in der Bergmannglia des Kleinhirns und in subependymalen Astrozyten nachweisen, wobei eine besonders starke Reaktivität in den Astrozyten der Glia limitans an der Oberfläche des Gehirns zu finden ist (McLendon et Bigner 1994). Mit sensibleren Untersuchungsmethoden lässt sich GFAP auch in anderen Geweben nachweisen, wie z.B. den Kupfferzellen der Leber oder Gliazellen im Plexus myentericus des Darms. Die Stärke der Immunreaktivität korreliert mit dem Gehalt an GFAP, der in der Glia limitans am höchsten ist und von fibrillären zu protoplasmatischen Astrozyten abnimmt (Lewis et Cowan 1985, Graeber et Kreuzberg 1986). Es gibt jedoch auch Zellen, die nach ihrer Morphologie mit anderen Markern (z.B. S100 $\beta$ ) Astrozyten gleichen, die jedoch nicht GFAP positiv sind (Kimelberg 2004).

Das Molekulargewicht von GFAP beträgt speziesabhängig zwischen 48.000 und 51.000 Da. GFAP besteht aus einem wasserlöslichen und einem wasserunlöslichen Anteil, ist insgesamt jedoch nicht wasserlöslich. Es aggregiert und polymerisiert leicht und bildet Faserbündel in den Zellfortsätzen und im zellkernnahen Zytoplasma, was für die Stabilität der zytoplasmatischen Fortsätze wichtig ist (Weinstein et al. 1991). Es ist empfindlich gegenüber neutralen Proteasen. Es ist nicht speziespezifisch, enthält aber speziesabhängige, hochspezifische antigene Epitope. (Zusammenfassende Darstellung zu Struktur, Eigenschaften, Funktion und Metabolismus von GFAP sind zu finden bei Eng 1985, Eng et Ghirnikar 1994, Brenner 1994, Laping et al. 1994, Eng et al. 2000).

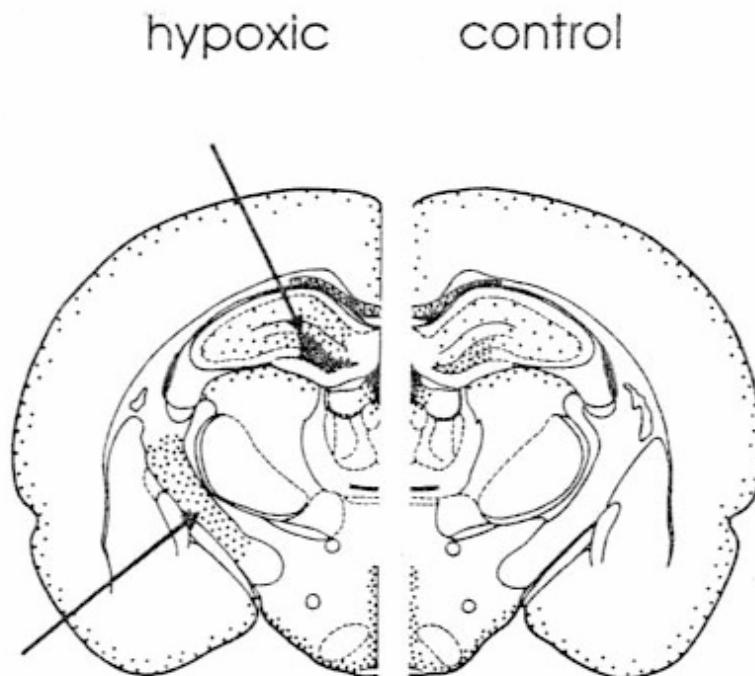
#### Die reaktive Gliose

Im zentralen Nervensystem höherer Vertebraten reagieren Astrozyten auf schädigende Reize wie Verletzungen, Entzündungen, Ödem, genetische Störungen oder Intoxikationen mit einer sogenannten Astrogliose. Die Astrogliose ist gekennzeichnet durch eine Hypertrophie der Astrozyten mit Verbreiterung und Verlängerung der Zellfortsätze. Die Kerne sind oft untypisch geformt, vergrößert und enthalten mehr Chromatin und Nukleoli (Norenberg 1994). In der direkten Umgebung der Läsion kann es zusätzlich zu einer Zellhyperplasie kommen (Miyake et al. 1988, Topp et al. 1989, Eng et al. 2000).

In reaktiven Astrozyten ist die Synthese und der Proteingehalt von GFAP stark erhöht. Dies korreliert mit einer Vermehrung der immunhistochemischen Markierung im Vergleich zu normalen Astrozyten. Allerdings muss eine ausgeprägtere Markierung nicht in jedem Fall mit einem erhöhten Gehalt an GFAP zusammenhängen. Dies ist z.B. bei der EAE, einer

Autoimmunkrankheit, die als experimentelles Model der Multiplen Sklerose verwendet wird, der Fall. Der Grund dafür ist nicht genau bekannt, es wird ein Zusammenhang mit dem Eintritt von Blutsstoffen und dem daraus resultierenden Ödem bei einer Störung der Bluthirnschranke diskutiert. Laut dieser Hypothese führt das Ödem zu einer Dissoziation der ansonsten eng zusammengelagerten Filamentbündel, so dass eine höhere Anzahl von Epitopen für GFAP-Antikörperbindung freigelegt wird (Aquino et al. 1988, Eng et al. 1989). Dennoch ist ein erhöhter Gehalt an GFAP und vor allem die daraus folgende verstärkte Immunreaktion mit GFAP-Antikörpern ein anerkannter, sensitiver und sehr früh reagierender Marker für Neurotoxizität im ZNS. Eine vermehrte GFAP-Reaktion zeigt sich sogar schon, wenn noch kein Zelluntergang nachzuweisen ist, was als „non-neuropathic neurotoxicity“ bezeichnet wird (Brock et O’Callaghan 1987, O’Callaghan 1991). Da eine Zunahme der GFAP-Expression auch physiologischer Weise während des Alterns auftritt, ist es wichtig, dass man die Ergebnisse der GFAP-Messungen mit normalen, altersgleichen Kontrollen vergleicht (Nichols et al. 1993, Eng et al. 2000).

Neuere Studien mit Tieren, denen das GFAP-Gen fehlt (GFAP knock out mutants), haben gezeigt, dass diese Tiere zwar eine normale Entwicklung, Reproduktion und Alter zeigen, aber empfindlicher auf Schädigungen wie z.B. Autoimmune Enzephalomyelitis (Liedtke et al. 1998) oder Rückenmarksverletzungen reagieren (Nawashiro et al 1998). Liedtke et al. (1996) fanden heraus, dass GFAP eine wichtige Rolle für die Architektur der weißen Substanz sowie für die Bluthirnschranke spielt.



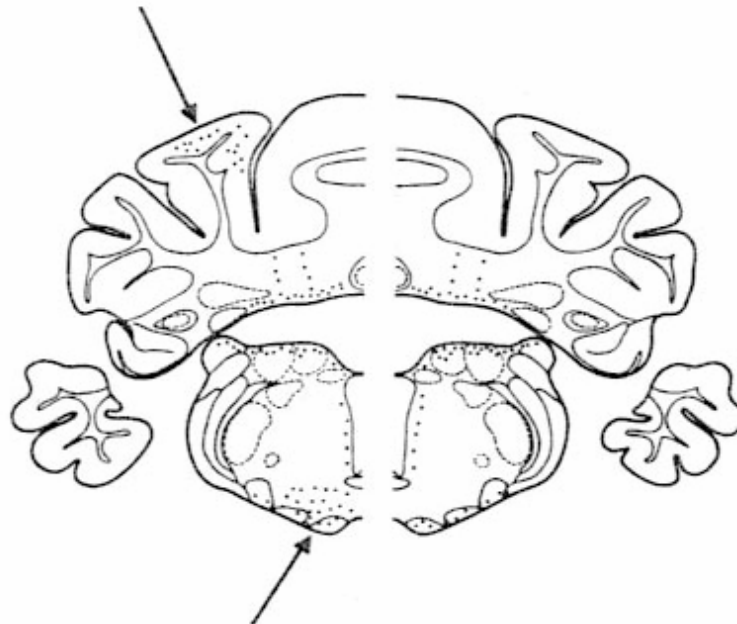


Abb.4 Schematische Darstellung der Verteilung der GFAP-Immunoreaktivität bei 6% hypoxischen Ratten (linke Hemisphäre) und den entsprechenden Kontrolltieren (rechte Hemisphäre). Die hypoxischen Tiere zeigten eine erhöhte Anzahl und Intensität von GFAP-positiven Astrozyten im Hilus dentatus des Hippocampus, in der Capsula interna, im Bereich der Pyramidenbahn und in Teilen des Cerebellums. (Abb. aus Zimmer et al. 1991)

### 1.3 Die Mikroglia

Mikrogliazellen sind die einzigen Gliazellen des ZNS, die nicht neuroektodermalen, sondern mesodermalen Ursprungs sind. Sie machen ungefähr 20% der Gesamtpopulation der Gliazellen des Gehirns aus und sind besonders wichtig für die Immunabwehr im zentralen Nervensystem (Kreutzberg 1995).

Die Abstammung der Mikroglia war lange Zeit umstritten. Während del Rio-Hortega (1932), Kershman (1939) u.a. an einen mesodermalen Ursprung glaubten, nahmen Vertreter anderer Schulen eine neuroektodermale Abstammung an (z.B. Prujis 1927, Rydberg 1932).

Inzwischen haben diverse Studien mit unterschiedlichen Methoden den mesodermalen Ursprung der Mikroglia bewiesen. Zum Beispiel fand Ling (1979) in neonatale Ratten injizierte, kohlenstoffmarkierte Monozyten nach einigen Tagen bis Wochen als Mikroglia im Corpus callosum. Hume et al. (1983) und Perry et al. (1985) gelang es mit Hilfe des makrophagenspezifischen Antikörpers F4/80, Mikroglia in der Retina bzw. im Gehirn anzufärben. Auch andere leukozytenspezifische Antigene (z.B. Perry et Gordon 1987: CD4-Antigen, Ling et al. 1991: MHC-Antigene) konnten auf Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Sie lassen sich ebenso wie Blutmonozyten mit lektinhistochemischen Methoden markieren (Mannoji et al. 1986, Boya et al. 1991).

Im Erwachsenenalter gelangen aufgrund der Bluthirnschranke nur noch wenige Makrophagen ins ZNS.

### 1.3.1 Die Morphologie

Mikrogliazellen können unterschiedliche morphologische Formen annehmen, lassen sich jedoch orientierend in amoeboiden und ramifizierte Mikroglia unterteilen. Zwischen diesen beiden Formen gibt es verschiedene Übergangsformen.

Die ins ZNS eingewanderten Makrophagen werden zunächst zu amoeboiden Mikrogliazellen (Hailer et al. 1997). Diese sind rund oder irregulär geformt mit einem runden Zellkern (Del Rio-Hortega 1932). Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur amoeboiden Fortbewegung und Phagozytose aus, weshalb das Zytoplasma reich an rauhem und glattem endoplasmatischem Retikulum, Lysosomen und Vakuolen ist (Ling et Wong 1993). Sie sind vor allem in der weißen Substanz des unreifen Gehirns zu finden (Flaris et al. 1993).

Nachdem die amoeboiden Mikrogliazellen im ZNS die typische Verteilung in nicht-überlappende Felder eingenommen haben, wandeln sie sich in ramifizierte Mikroglia um. Sie bekommen zwei bis drei Äste, die sich in eine Vielzahl feiner Fortsätze aufzweigen (Perry and Gordon 1988). Diese Umwandlung ist mit einer Reorganisation der Mikrotubuli assoziiert, die daraufhin ein stabileres, weniger dynamisches Netzwerk bilden. Ramifizierte Mikroglia ist in der Lage, Flüssigkeiten durch Pinozytose aufzunehmen, zeigt jedoch wenig bis keine Phagozytose (Ransom et Thomas 1991). Daher enthält sie im Vergleich zu amoeboider Mikroglia nur einen kleinen Golgi-Apparat, weniger rauhes endoplasmatisches Retikulum und weniger Lysosomen (Ling et Wong 1993). Ramifizierte Mikroglia kommt postnatal sowohl in der grauen, als auch in der weißen Substanz vor (Flaris et al. 1993).

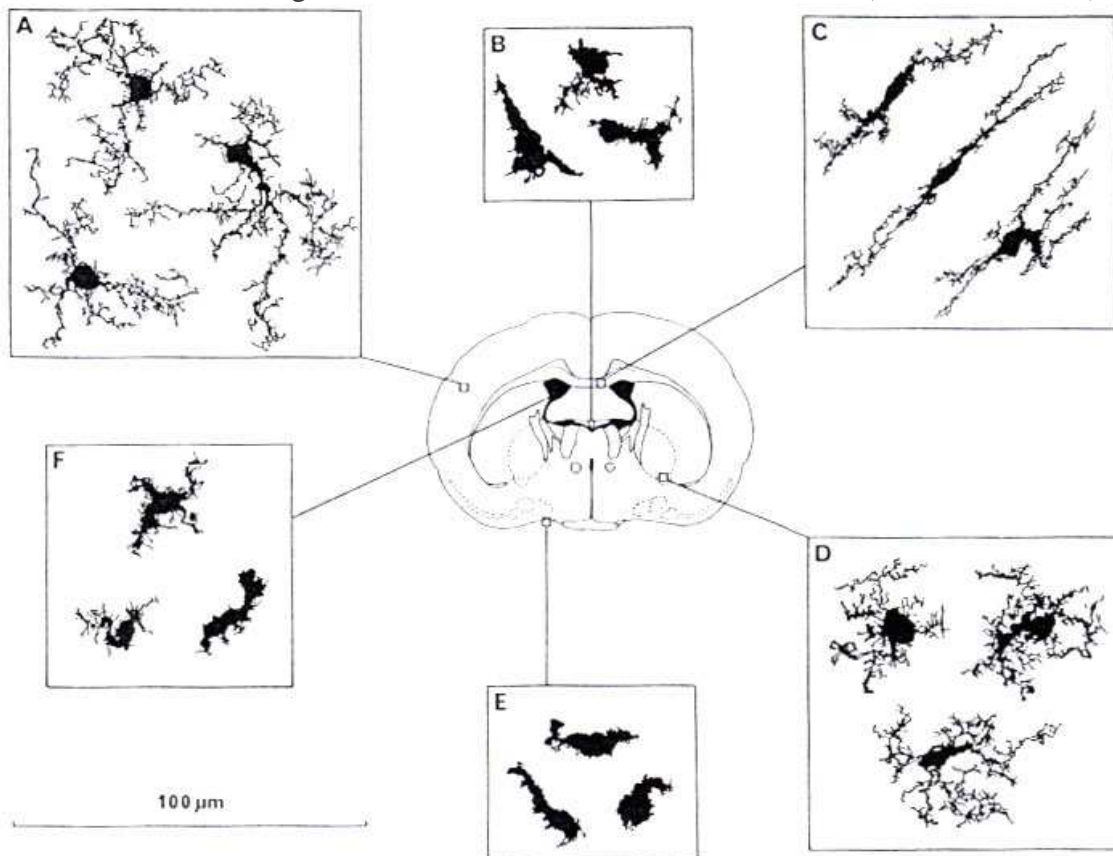


Abb.5 Schematische Darstellung der Mikrogliamorphologie und -verteilung von F4/80-markierten coronaren Schnitten des Mäusegehirns.

A Kortex, B Subfornikalorgan, C Corpus callosum, D Basalganglien, E Leptomeningen, F Plexus choroideus.



Mikrogliazellen außerhalb der Bluthirnschranke (B,E,F) sind weniger verzweigt. Zellen im Hirnparenchym sind stärker verzweigt, mit einem radiären Muster im Bereich der grauen Substanz (A,D) und longitudinal-gestrecktem Muster im Bereich der weißen Substanz (C). (Abb. aus Gordon et al. 1992)

Für die Umwandlung von amoeboider Mikroglia in die ramifizierte Form sind verschiedene Faktoren von Bedeutung, deren genaue Aufgabe und Zusammenspiel noch nicht geklärt sind. Die meisten Studien hierzu erfolgten bisher *in vitro*, und eine *in vivo* Bestätigung steht oft noch aus. Den größten und wichtigsten Einfluss auf die Ramifizierung haben die Astrozyten (Rezaie et Male 2001). Sie sezernieren sowohl lösliche [z.B. macrophage colony-stimulating factor (Raivich et al. 1991, Liu et al. 1994), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Fujita et al. 1996)] als auch unlösliche Faktoren (Tanaka et Maeda 1996), die zur Umwandlung führen. Auch Bestandteile der extrazellulären Matrix, die auf Astrozyten vorhanden sind, wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Thrombospondin, führen zur Ramifizierung (Chamak et Mallat 1991, Tanaka et al. 1999).

Außerdem scheint die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle zu spielen, da viele Substanzen, die im Blut vorkommen (z.B. Serumfaktoren, Glyzin, Serin, Insulin, hohe Glukosekonzentration u.a.), *in vitro* eine Differenzierung der Mikrogliazellen verhindern (Fujita et al. 1996, Tanaka et al. 1998).

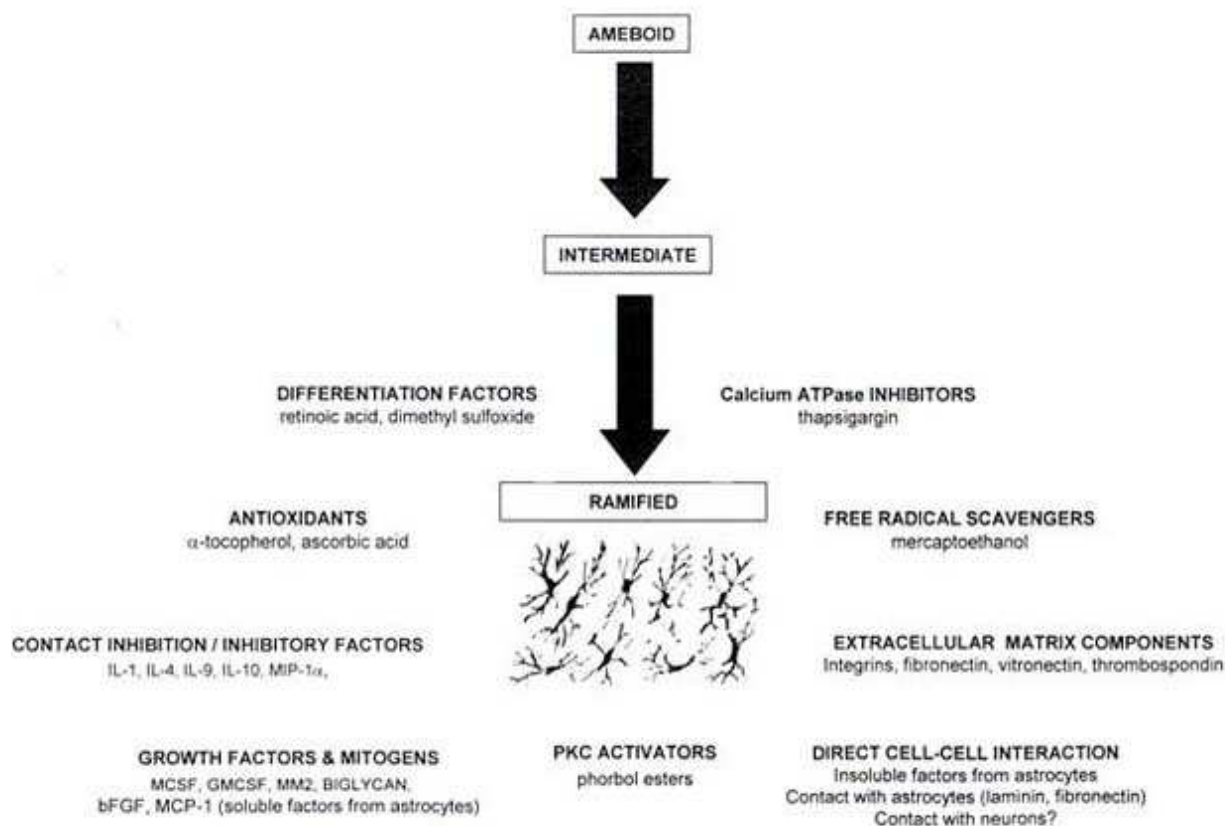


Abb.6 Faktoren, die eine Ramifizierung von Mikrogliazellen induzieren. (Abb. aus Rezaie et Male 2001)

### 1.3.2 Die Funktion der Mikroglia

Ramifizierte Mikroglia wird auch als ruhende Mikroglia bezeichnet. Sie bilden durch ihre Verteilung in eng aneinanderliegende, aber nicht überlappende Felder ein Netzwerk aus antigenpräsentierenden Zellen zur Immunüberwachung (Banati 2003). Rezaie et Male (2001) vergleichen diese Verteilung mit der Revierverteilung von Adlern: die Abhängigkeit von dem nur limitiert vorhandenen Futter/Wachstumsfaktorangebot verhindert, dass sich zu viele Adler/Mikrogliazellen an einem Ort aufhalten können. Als Wachstumsfaktoren kommen vor allem die bereits oben genannten, auch zur Ramifizierung führenden Faktoren in Frage, jedoch auch andere wie z.B. Zytokine (MM2; Giulian et al. 1991), Biglykan (Kikuchi et al. 1995) und basic FGF (Tanaka et Maeda 1996, DiPucchio et al. 1996). Auch von Mikrogliazellen selbst sezernierte, kontaktinhibitorische Faktoren tragen wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung der Zellverteilung bei.

Bei Schädigung des ZNS werden die Mikrogliazellen in der Umgebung aktiviert. Sie wandeln sich dabei von der ramifizierten Form wieder in die amoeboid Form um. In Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung werden die Mikrogliazellen unterschiedlich stark aktiviert. Bei einem subletalen neuronalen Schaden hypertrophieren sie zunächst und steigern die Sekretion bestimmter Zytokine, ohne sich jedoch vollständig in phagozytierende Zellen umzuwandeln. Erst bei einer letalen Schädigung wandeln sie sich komplett in amoeboid bewegliche, phagozytierende Zellen um (Streit et Kreutzberg 1988).

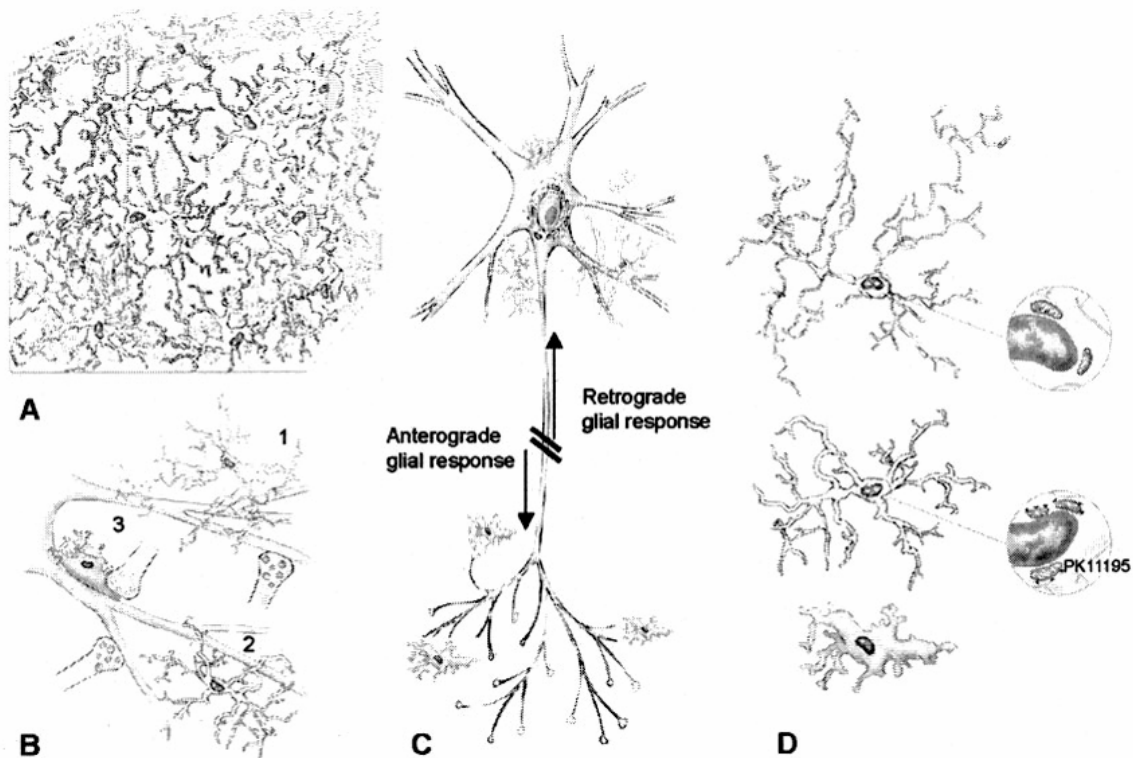


Abb.7 A) Ruhende Mikroglia bilden ein Netzwerk aus immunüberwachenden Zellen im gesamten ZNS. B) Bei Aktivierung verändert sie ihre ramifizierte Morphologie (1,2), sie proliferieren und verwandeln sich zunehmend in Gewebemakrophagen. Sie beteiligen sich dann beim "synaptic stripping" von verletzten Neuronen (3). C) Mikroglia-Aktivierung erfolgt an verletzten Neuronen in antero- und retrograder Richtung. D) Die Verwandlung vom ruhenden zum aktivierten Zustand wird von der Expression der PK11195 Bindungsstelle begleitet. Eine Markierung dieser Bindungsstelle mit C-11 kann zum in vivo Nachweis einer Aktivierung mit Hilfe eines PET genutzt werden. (Abb. aus Banati 2003)

Aktivierte Mikroglia ist in der Lage, zu proliferieren und zum Ort einer ZNS-Schädigung zu wandern (Kreutzberg 1996). Die Proliferation erfolgt unter dem Einfluss von mitogenen Substanzen wie z.B. dem bereits erwähnten MCSF und GMCSF, aber auch bestimmten Interleukinen (3,4,5) (Suzumura et al. 1994, Kloss et al. 1997). Nach neuronaler Schädigung erhöhen die Mikrogliazellen ihre Sensibilität gegenüber MCSF und GMCSF durch vermehrte Expression der entsprechenden Rezeptoren (Raivich et al. 1991). Es hängt also unter anderem von der Menge des exprimierten MCSF und GMCSF sowie von der Anzahl der vorhandenen Rezeptoren ab, ob eine Mikrogliazelle proliferiert oder im ramifizierten Zustand bleibt.

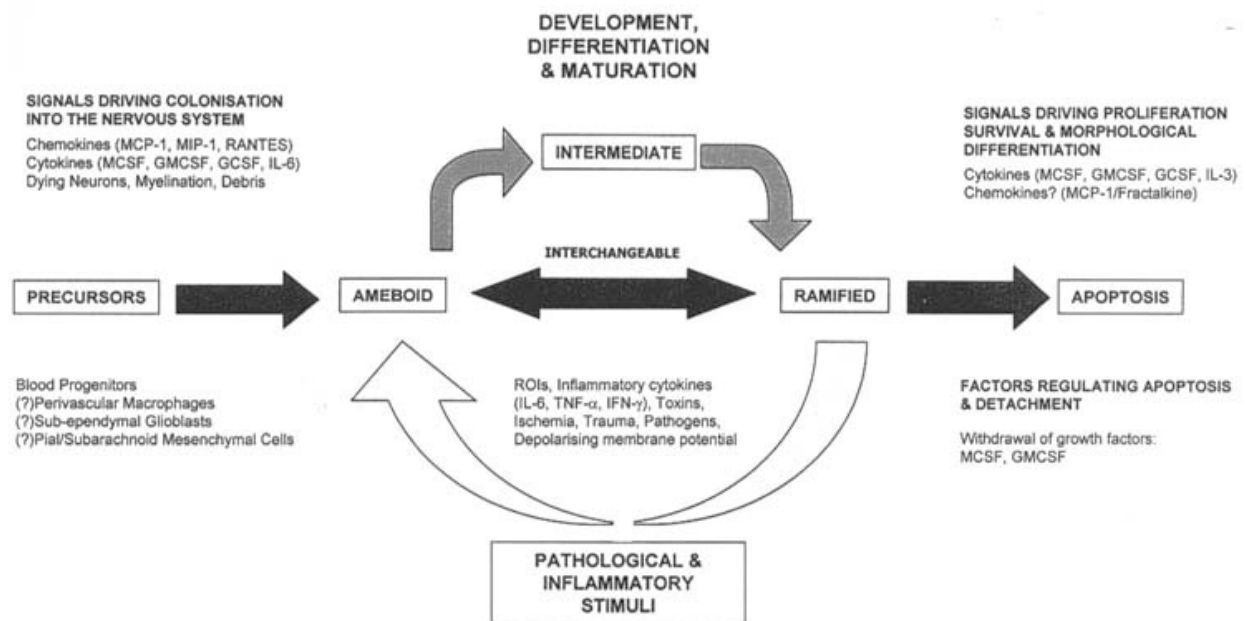


Abb.8 Faktoren, die zur Kolonisation, Differenzierung, Aktivierung und Apoptose von Mikroglia führen. (Abb. aus Rezaie et Male 2001)

Die Migration zum geschädigten ZNS-Bereich erfolgt innerhalb der Mikrogliazelle durch eine Kombination aus Aktinpolymerisation, -depolymerisation, Vernetzung der Aktinfilamente untereinander sowie der Interaktion mit Myosin (Allen et al. 1998). Dies befähigt die Zelle unter anderem zur Ausbildung von Pseudopodien und Lamellipoden zur Fortbewegung (Stossel 1993). Des Weiteren sind Mikrogliazellen in der Lage, Enzyme zu produzieren, welche extrazelluläre Matrix zersetzen und dadurch eine Fortbewegung im Gewebe erst ermöglichen. Zu diesen Enzymen gehören verschiedene Matrix-Metalloproteinasen [in vitro: MMP-1,2,3 und 9 (Maeda et Sobel 1996)], ein Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (Nakajima et al. 1992) und andere. Für die Migration sind jedoch auch Interaktionen mit Matrixproteinen und der Kontakt zu anderen ZNS-Zellen von Bedeutung. Dazu dient die Expression von Adhäsionsrezeptoren wie Integrinen und Cadherinen (Huttenlocher et al. 1998). Diese interagieren vor allem mit Laminin, einer Komponente der extrazellulären Matrix im Gehirn, und mit astrozytären Substraten (Chamak et Mallat 1991).

Wichtigster auslösender und leitender Faktor für die Migration von Mikrogliazellen sind eine Reihe von chemischen Botenstoffen. Dazu zählen unter anderem  $\beta$ -Amyloid Peptid (Davis et al. 1992, Maeda et al. 1997, Nakai et al. 1998), Komplement 5a (Nolte et al. 1996, Faff et al. 1996), TGF- $\beta$  (Yao et al. 1990), NGF (Gilad et Gilad 1995), LPS (Yang et al. 1996),

neuronaler PAF (Aihara et al. 2000), epidermal growth factor (Heppner et al. 1998), neuronaler MCSF (Du Yan et al. 1997), Substanz P (Maeda et al. 1997), catatonic antimicrobial protein 37 (=CAP37, Pereira et al. 2003) und die Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-8, IL-10 und RANTES (Cross et Woodrooffe 1999). Je mehr dieser Substanzen bei einer ZNS-Verletzung oder -Entzündung akkumulieren, desto schneller erfolgt die Migration zum Ort der Schädigung und desto mehr Mikrogliazellen werden angelockt. Rezaie et Male (2001) vergleichen dieses Verhalten mit dem von Geiern, die sich an einer Futterquelle sammeln.

Die Aufgabe der Mikrogliazellen bei einer ZNS-Schädigung ist neben der Phagozytose von abgestorbenen Nervenzellen und Fremdstoffen die Sekretion von bestimmten zytotoxischen und zytoprotektiven Substanzen. Dadurch sind sie an der Regulation von de- und regenerativen Prozessen beteiligt. Sie bilden sowohl proinflammatorische, z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, als auch antiinflammatorische Zytokine, wie z.B. TGF- $\beta$  und IL-10 (Xiao et al. 1996). Des Weiteren produzieren sie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen und Quinolinsäure, die zytotoxisch wirken und bei Infektionen Mikroorganismen und infizierte ZNS-Zellen zerstören können (Chao et al. 1995). Allerdings können durch diese Verbindungen auch gesunde Neurone angegriffen werden, was bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Parkinson eine Rolle spielen könnte (Liu et Hong 2003).

Im gesunden, immunkompetenten Gehirn ist die Sekretion von zytotoxischen Substanzen durch Mikrogliazellen jedoch streng kontrolliert, so dass eine Zerstörung gesunder Neurone normalerweise nicht vorkommt (Kreutzberg 1996).

Zu den zytoprotektiven Substanzen, die von Mikrogliazellen produziert werden, zählen unter anderem NGF- $\beta$  (Elkabes et al. 1996), bFGF (basic fibroblast growth factor; Shimojo et al. 1991) und TGF- $\beta$ 1 (Kiefer et al 1995). Sie fördern die Regeneration der Neurone und die Bildung einer Glianarbe.

Durch die Expression von MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Molekülen sind Mikrogliazellen an der Antigenpräsentation beteiligt (Streit et al. 1989). Außerdem exprimieren sie Komplementrezeptoren (z.B. CR 3, Graeber et al. 1988) und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Bell et Perry 1995) und B7 (De Simone et al. 1995), die an der Migration von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten in geschädigtes Hirngewebe und an der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten beteiligt sind.

Aufgrund der nach innen gerichteten Kaliumkanäle sowie durch ATP sind Mikrogliazellen in der Lage, selbst auf kleinste Schwankungen der extrazellulären Kaliumkonzentration und damit des sie umgebenden Milieus sehr schnell zu reagieren (Kettenman et al. 1993).

Der Nachweis von aktivierter Mikroglia ist daher ein diagnostisch wertvoller Parameter für den Nachweis von ZNS-Schäden und -Krankheiten sowie deren Verteilung (Banati 2003).