

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das Expressionsverhalten der glialen Glutamattransporter
EAAT1 und EAAT2 sowie von PACAP nach Schädel-
Hirntrauma des Menschen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Thorsten Weiss
aus Schwäbisch Hall

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. von Deimling
2. Prof. Dr. med. Ch. Bühner
3. Prof. Dr. med. A. Unterberg

Datum der Disputation: 14. Juli 2006

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	9
1.1. Das Schädel-Hirntrauma	9
1.2. Einführung	10
1.3. Glutathomöostase und Glutamattransporter	11
1.3.1. Glutamat	11
1.3.2. Glutamattransporter	12
1.3.2.1. <i>Regulation der Glutamattransporter</i>	13
1.4. PACAP	14
1.5. Störung der Glutathomöostase nach Hirntrauma	15
1.5.1. Exzitotoxizität	15
1.5.2. Die Rolle der Glutamattransporter in der Pathologie des Hirntraumas	16
1.5.3. Die Rolle von PACAP in der Pathologie des Hirntraumas	17
1.5.3.1. <i>Neuroprotektive Wirkungen von PACAP</i>	17
1.6. Zelluläre Reaktionen nach Hirntrauma	18
1.6.1. Astrozyten	18
1.6.2. Oligodendrozyten	18
1.7. Fragestellung der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. Untersuchungsgut	20
2.1.1. Schädel-Hirntrauma: Fälle	20
2.1.2. Gesundheitskontrollen	22
2.2. Lichtmikroskopische Immunhistochemie	23
2.2.1. Prinzip	23
2.2.2. Durchführung der Färbung	24
2.2.3. Verwendete Primärantikörper	24
2.2.3.1. <i>EAAT1</i>	24
2.2.3.2. <i>EAAT2</i>	24
2.2.3.3. <i>PACAP38</i>	25
2.2.3.4. <i>PACAP27</i>	25
2.2.4. Verwendete Normalsera und Sekundärantikörper	25

2.2.5. Negativkontrollen	25
2.3. Fluoreszenzmikroskopische Immunhistochemie	26
2.3.1. Prinzip	26
2.3.2. Durchführung der Färbung (Doppelmarkierung)	26
2.3.3. Verwendete Primärantikörper	27
2.3.3.1. EAAT1	27
2.3.3.2. EAAT2	27
2.3.3.3. PACAP38.....	27
2.3.3.4. PACAP27.....	27
2.3.3.5. GFAP	27
2.3.3.6. CNPase	27
2.3.4. Verwendete Normalsera und Sekundärantikörper	28
2.3.5. Durchgeführte Doppelmarkierungen	28
2.4. Ergänzende Übersichtsfärbung	29
2.5. Auswertung	29
2.5.1. Morphometrie	29
2.5.2. Statistik	30
2.5.3. Lichtmikroskopische Fotografie	31
2.5.4. Fluoreszenzmikroskopische Fotografie	31
2.6. Benutzte Materialien	31
2.6.1. Primärantikörper	31
2.6.2. Sekundärantikörper	32
2.6.3. Normalsera	32
2.6.4. Chemikalien und Reagenzien	32
2.6.5. Technische Geräte und Zubehör zur Durchführung der Färbungen	33
2.6.6. Technische Geräte und Zubehör zur Auswertung der Färbungen	33
3. ERGEBNISSE	34
3.1. Allgemeines	34
3.2. Auswertung der lichtmikroskopischen Ergebnisse	34
3.2.1. Expressionsverlauf von EAAT1	34
3.2.1.1. Kontusion.....	34
3.2.1.2. Perikontusion	35

3.2.2. Expressionsverlauf von EAAT2	36
3.2.2.1. Kontusion	36
3.2.2.2. Perikontusion	37
3.2.3. Expressionsverlauf von PACAP38.....	38
3.2.3.1. Kontusion	38
3.2.3.2. Perikontusion	39
3.2.4. Expressionsverlauf von PACAP27.....	40
3.2.4.1. Kontusion	40
3.2.4.2. Perikontusion	41
3.3. Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse	42
3.3.1. Verhalten von Satellitenzellen nach Hirntrauma.....	42
3.3.1.1. Verhalten der doppelmarkierten Zellen (CNP/EAAT).....	44
3.3.1.2. Verhalten der doppelmarkierten Zellen (CNP/PACAP).....	44
3.3.2. Verhalten von GFAP-positiven Astrozyten nach Hirntrauma	46
3.3.2.1. Verhalten der doppelmarkierten Zellen (GFAP/EAAT).....	46
3.3.2.2. Verhalten der doppelmarkierten Zellen (GFAP/PACAP).....	47
3.3.3. Zusammenfassung der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse.....	49
3.4. Bildmaterial	50
3.4.1. Lichtmikroskopische Aufnahmen.....	50
3.4.2. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.....	52
4. DISKUSSION	56
5. ZUSAMMENFASSUNG	64
6. REFERENZEN	65
7. PUBLIKATIONEN	75
8. DANKSAGUNG	76
9. LEBENS LAUF	77

5. ZUSAMMENFASSUNG

Schwere Schädel-Hirnverletzungen bedeuten für die betroffenen Patienten neben einer hohen Letalität häufig eine langfristig eingeschränkte Lebensqualität und irreversible neurologische Defizite.

Neben den primär mechanischen, therapeutisch nicht beeinflussbaren Hirnschädigungen spielen die progressiven sekundären Hirnschädigungen eine wesentliche Rolle für die Prognose der Patienten. Hierzu gehört auch die massive Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration, die neurotoxisch ist und zum exzitotoxischem Untergang von Neuronen führt. Die extrazelluläre Glutamatkonzentration wird durch gliale Glutamattransporter, zu denen EAAT1 und EAAT2 gehören, reguliert.

Das Peptid PACAP scheint eine neuroprotektive Funktion über verschiedene Angriffspunkte wie die Expressionssteigerung der glialen Glutamattransporter und die antiinflammatorische Wirkung auf Gliazellen auszuüben.

Wir haben in dieser Arbeit immunhistochemisch das Expressionsverhalten von EAAT1, EAAT2, PACAP38 und PACAP27 morphometrisch im zeitlichen Verlauf nach humanem Schädel-Hirntrauma bestimmt. Mittels Immunfluoreszenz führten wir Doppelmarkierungen mit GFAP als Astrozytenmarker und CNP als Oligodendrozytenmarker an ausgewählten Fällen durch.

Zusammenfassend fanden wir einen Expressionsrückgang für EAAT1 und EAAT2 im Kontusions- und Perikontusionsgebiet. Dieser Rückgang war im Perikontusionsgebiet deutlich geringer ausgeprägt als im Kontusionsgebiet. Die Expression von EAAT2 war stärker vermindert als die von EAAT1. PACAP38 und PACAP27 erschienen differentiell exprimiert: Während im Kontusionsgebiet PACAP exprimierende Zellen vermindert waren, war die Anzahl PACAP-positiver Zellen in der Perikontusionszone stark über Kontrollniveau erhöht. Dies könnte einer Form der neuroprotektiven Gegenregulation entsprechen, mit konsekutiver Expressionssteigerung der glialen Glutamattransporter. Auf zellulärer Ebene konnten wir eine Expression von PACAP und EAAT in Oligodendrozyten und Astrozyten zeigen.

Unsere Ergebnisse weisen auf mögliche neue Ansatzpunkte zur Neuroprotektion hin. Zukünftige tierexperimentelle Untersuchungen sollten die Frage klären, ob eine pharmakologische Beeinflussung des posttraumatischen Glutamattransportes, zum Beispiel durch Applikation von exogenem PACAP, neuroprotektiv ist.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Weiss
Geburtstag und -ort: 06.03.1977 in Schwäbisch Hall
Familienstand: ledig
Wohnsitz: Stralauer Allee 17 E; 10245 Berlin

Schulbildung:

09/1984 – 06/1997 Schulbildung mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst:

09/1997 – 09/1998 Rettungshelfer beim Deutschen Roten Kreuz Kreisverband Schwäbisch Hall – Crailsheim

Hochschulausbildung:

10/1998 - 08/2000 Humboldt-Universität zu Berlin
Vorklinisches Studium
10/2000 - 04/2004 Humboldt-Universität zu Berlin
Klinisches Studium, davon ein Freisemester zur Fertigstellung der Laborarbeiten im Rahmen der Promotion
04/2004 – 03/2005 Praktisches Jahr

Approbation:

22. Juni 2005

Promotion:

Oktober 2001 bis September 2006 Institut für Neuropathologie,
Direktor: Prof. Dr. A. von Deimling,
Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum

Publikationen:

van Landeghem FK, Weiss T, Gaus V, et al. (Abstract, 2002)
Expression of glutamate transporter proteins in human and experimental traumatic brain injury.
Acta Neuropathol., Vol 104 (No 5): 574.

van Landeghem FK, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A (accepted, Juli 2006)
Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes following human traumatic brain injury.
Journal of Neurotrauma

Berufstätigkeit:

seit Juni 2005 Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie im Unfallkrankenhaus Berlin (Chefarzt Prof. Dr. med. W. Schaffartzik)