

3 EINLEITUNG

Bereits eine Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr für 4 bis 5 Minuten reicht aus, um das menschliche Gehirn irreparabel zu schädigen. Die isolierte zerebrale Hypoxie, wie sie bei respiratorischer Insuffizienz oder Kohlenmonoxidvergiftung beobachtet wird, ist von der Ischämie zu unterscheiden, die auf einer Verminderung des Blutflusses als Folge von Gefäßobstruktion oder Kreislaufinsuffizienz beruht. Diese bewirkt neben einer Hypoxie im betroffenen Areal auch einen Mangel an energiereichen Substraten. Der zerebrovaskuläre Insult (Schlaganfall), also eine irreversible zerebrale Schädigung als Folge einer Reduktion der Blutversorgung eines Hirnareals, ist in Industrienationen eine der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität. 1995 starben in der Bundesrepublik Deutschland über 100 000 Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls, davon 36 228 Männer und 64 806 Frauen, entsprechend 8,8% bzw. 13,7% aller Sterbefälle. Damit sind zerebrovaskuläre Erkrankungen nach Krebs und ischämischen Herzkrankheiten die dritthäufigste Todesursache. Nach Schätzungen lagen die direkten Kosten zur Behandlung zerebrovaskulärer Erkrankungen 1994 bei knapp 12,2 Mrd. DM (1). Während in der Prävention insbesondere durch eine Effektivierung der antihypertensiven Therapie Fortschritte gemacht wurden, besteht eines der Hauptziele gegenwärtiger Forschungsvorhaben in der Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten beim Schlaganfall.

Zur Erreichung dieses Ziels ist insbesondere ein Verständnis der Mechanismen, die zur neuronalen Schädigung bzw. zum neuronalen Tod führen, erforderlich. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine genauere Betrachtung zu hypoxieinduzierten Reaktionen von Astrozyten, einer für das neuronale Überleben in vielfältiger Hinsicht wichtigen Zellpopulation im zentralen Nervensystem (ZNS). Schwerpunkte werden dabei auf die astrozytäre Morphologie während der Hypoxie sowie auf die Rolle des Endothelin-Systems als möglichem Mediator von Adaptationsprozessen in Astrozyten gelegt.

3.1 Mechanismen der zerebralen Schädigung durch Hypoxie und Ischämie

Obwohl das menschliche Gehirn nur etwa 2% des gesamten Körpergewichts ausmacht, ist es für ca. 20% des Sauerstoffverbrauchs verantwortlich. Dies verdeutlicht die Bedeutung des oxidativen Metabolismus für Funktion und Überleben der Zellen des ZNS. In Anbetracht dessen überraschen experimentelle Befunde an zerebralen Zellkulturen, die zeigen, dass Astrozyten (2-4), Oligodendrozyten (5) und sogar Neurone (6,7) – in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen – mehrere Stunden in Abwesenheit von Sauerstoff überleben können. Die Identifikation von Eigenschaften eines Milieus, das das Überleben von Neuronen - der anfälligsten dieser drei Zellarten – verlängert, steht dabei im Mittelpunkt des Interesses. Unter der Vielzahl von Faktoren, die den neuronalen Tod infolge von Ischämie oder Hypoxie bedingen, sollen hier einige, in Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtige, erwähnt werden.

3.1.1 Glutamat-Toxizität

Die Freisetzung der Aminosäure Glutamat spielt in der Pathogenese der ischämischen Nervenzellschädigung eine zentrale Rolle (8,9). Glutamat ist ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter, der von Zellen des ZNS gebildet und in den extrazellulären Raum sezerniert wird (10). Während der zerebralen Ischämie kommt es aufgrund des Mangels an Energiereserven zu einer Verminderung der transmembranösen Ionengradienten im ZNS, wobei es insbesondere zu einem Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration kommt (11). Die damit verbundene Depolarisierung stellt für glutamaterge Neurone einen hinreichenden Stimulus zur Sekretion großer Mengen Glutamats dar (12).

Glutamat verstärkt seinerseits die neuronale Depolarisation, was wiederum die Ionenverschiebung zwischen extra- und intrazellulärem Raum verstärkt. Da etwa die Hälfte des ATP-Verbrauchs des ZNS für den transmembranösen Na^+ -Ionen-Transport aufgewendet wird (13), führt die anhaltende Depolarisation mit dem gleichzeitigen Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration zu einer raschen

Erschöpfung der ATP-Reserven, sofern die Möglichkeit zum oxidativen Metabolismus nicht besteht. Außerdem ist die Wiederaufnahme von Glutamat in Zellen Na^+ -abhängig, so dass die Verminderung des transmembranösen Na^+ -Gradienten die Akkumulation extrazellulären Glutamats noch verstärkt (14).

Aufgrund dieser Effekte, die eine exzitationsbedingte Erschöpfung zellulärer Energiereserven mit konsekutivem Zelltod zur Folge haben, wird Glutamat als archetypische Substanz der Gruppe der sogenannten Exzitotoxine zugerechnet (15,16). Die zentrale Rolle des Glutamats wird durch Studien verdeutlicht, bei denen Substanzen zum Einsatz kommen, die die Glutamatwirkung antagonisieren. So haben Glutamat-Rezeptor-Antagonisten in Modellen der zerebralen Ischämie ein deutliches neuroprotektives Potential (17,18), ihr Einsatz beim Menschen wird allerdings durch erhebliche Nebenwirkungen limitiert (19).

3.1.2 Intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung

Die Depolarisation von Zellen, die durch die Effekte des Energiemangels auf Ionen- und Neurotransmitterhomöostase begünstigt wird, führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Zunächst kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und an ionotrope Glutamat-Rezeptoren gekoppelte Kationenkanäle (20). Dies wiederum triggert die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (21). In glutamatergen Neuronen führt dieser Prozess während der Ischämie zur Freisetzung noch größerer Mengen Glutamats. Dadurch wird ein Circulus vitiosus initiiert, der zu einem unkontrollierten Anstieg der Glutamat-Konzentration und zur weiteren Depolarisation von Zellen führt.

Ca^{2+} ist außerdem einer der Hauptmediatoren zellulärer Signaltransduktionsprozesse. So führt die Ca^{2+} -Erhöhung zu einer Aktivierung zellulärer Proteasen und Lipasen (22). Die Aktivierung von Phospholipasen bewirkt die Freisetzung großer Mengen von Fettsäuren wie Arachidonsäure aus Membran-Phospholipiden, was zur Destabilisierung zellulärer Membranen führen kann. Inhibitoren Ca^{2+} -abhängiger Proteasen erwiesen sich in Modellen der zerebralen Ischämie als neuroprotektiv (23). Aufgrund dieser Beobachtungen wird ein

inadäquater Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} als wichtiger Mediator des neuronalen Zelltodes während der Ischämie betrachtet.

3.1.3 *Spreading Depression*

Ein ischämisch geschädigtes Hirnareal kann in eine zentrale nekrotische Region mit fast vollständiger Aufhebung des Blutflusses und eine umgebende Region mit reduzierter, aber zum Überleben des Gewebes zunächst ausreichender Blutversorgung, die als Penumbra bezeichnet wird, eingeteilt werden (24). Bei der Therapie des Schlaganfalls konzentrieren sich therapeutische Bemühungen auf die Erhaltung der Penumbra, da die Zentralregion des ischämischen Areals zumeist irreversibel geschädigt ist. Eine erhebliche Gefährdung der Penumbra geht von Depolarisationswellen aus, die aus der Zentralregion in die Penumbra einstrahlen, was als „*Spreading Depression*“ bezeichnet wird (25).

Die ischämische Zentralregion weist infolge der Aufhebung der Ionengradienten eine deutlich erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration auf. Dagegen ist die extrazelluläre K^+ -Konzentration im Bereich der Penumbra fast normal bei allerdings reduzierter Blutversorgung (26). Die „*Spreading Depression*“ geht von der Interphase zwischen Zentralregion und Penumbra aus (27) und führt zu repetitiven Depolarisationswellen, die zu einer temporären Unerregbarkeit der Zellen im Bereich der Penumbra führen. Diese „Refraktärperiode“ hält so lange an, bis die Ionengradienten wiederhergestellt sind, was eine erneute Depolarisationswelle ermöglicht. Wie in den vorangehenden Abschnitten dargestellt, wirkt sich die Depolarisation durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des extrazellulären Glutamats ungünstig auf das neuronale Überleben aus. Zusätzlich scheint eine Gefahr für das Gewebe im Bereich der Penumbra darin zu liegen, dass durch die wiederholt aufeinanderfolgenden De- und Repolarisationen ein Missverhältnis zwischen Energiebedarf und -versorgung entsteht. Die Folge ist eine langsame Ausdehnung der nekrotischen Region in den Bereich der Penumbra (28). Eine zentrale Rolle bei der Limitierung der *Spreading Depression* scheint Adaptationsprozessen in Astrozyten zuzukommen, die zu einer verstärkten Eliminierung extrazellulären Kaliums führen (25).

3.2 Die Rolle von Astrozyten in der Neuroprotektion bei zerebraler Hypoxie oder Ischämie

Astrozyten stellen eine Hauptpopulation der Gliazellen dar und machen mit bis zu 30% des Gesamtvolumens einen beträchtlichen Teil des zentralen Nervensystems aus (29,30). Es konnte insbesondere in den letzten zwei Jahrzehnten gezeigt werden, dass Astrozyten eine Vielzahl völlig unterschiedlicher Funktionen im zentralen Nervensystem haben. Dazu gehören:

1. die Steuerung der neuronalen Migration im Laufe der Entwicklung des ZNS (31-33),
2. die Produktion neurotropher Faktoren zur Propagierung neuronalen Wachstums sowie neuronaler Verschaltungen (34),
3. die Speicherung von Glykogen als Energiereserve des ZNS (35),
4. die Modulation der Immunantwort im ZNS (36),
5. die Formation von Narbengewebe bei der Reparatur struktureller Defekte des ZNS (37),
6. die Pufferung extrazellulärer Ionen zum Erhalt der neuronalen Erregbarkeit (38, 39)
7. die Aufnahme sowie Sekretion neuroaktiver Substanzen (40-42).

In der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie steht insbesondere die Fähigkeit von Astrozyten, die extrazelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten im Mittelpunkt des Interesses (**Abb. 3-1**). So werden Astrozyten für die wichtigsten Regulatoren der interstitiellen K^+ -Homöostase gehalten, da sie einerseits extrazelluläres Kalium aufnehmen können, andererseits durch intrazelluläre Umverteilung eine räumliche Pufferung lokal erhöhter K^+ -Konzentrationen ermöglichen (43). Wie oben beschrieben, ist die erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration der Hauptdeterminant sowohl der Glutamat-Toxizität als auch der *Spreading Depression* in der Folge der zerebralen Ischämie. Zusätzlich sind Astrozyten auch direkt an der Glutamat-Homöostase beteiligt, da sie in der Lage sind, extrazelluläres Glutamat aufzunehmen (44). Dabei scheinen Astrozyten die für die Eliminierung

extrazellulären Glutamats bedeutendste Zellpopulation des ZNS darzustellen (45,46).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass Astrozyten das neuronale Überleben während der Ischämie verbessern können bzw. eine Einschränkung der Astrozytenfunktion umgekehrt den neuronalen Zelltod begünstigt. Experimente an kultivierten Zellen unterstützen diese Hypothese. So schützt die gleichzeitige Anwesenheit von Astrozyten kultivierte Neurone vor anoxieinduzierter Degeneration (47). Zusätzlich reagieren kultivierte Neurone weniger empfindlich auf die exzitotoxischen Effekte von Glutamat, wenn Astrozyten in der Zellkultur ebenso vorhanden sind (48). Astrozytenarme Zellkulturen des zerebralen Kortex sollen im Vergleich zu gemischten Kulturen eine 100-fach erhöhte Vulnerabilität nach Glutamat-Exposition aufweisen (49). *In vivo* wird ein verbessertes postischämisches neuronales Überleben in Regionen hoher Astrozytendichte beobachtet (50).

Ein weiterer Mechanismus für protektive Effekte von Astrozyten während der zerebralen Ischämie dürfte in ihrer Fähigkeit zur Regulation der zerebralen Mikrozirkulation liegen. Die astrozytären Zellfortsätze stehen im engen Kontakt mit kapillären Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen der präkapillären Arteriolen (51). In Regionen erhöhter Glutamatkonzentration induzieren Astrozyten eine Vasodilatation mit konsekutiver Erhöhung des zerebralen Blutflusses (52). Eine kürzlich durchgeführte Studie illustriert die Wichtigkeit dieser Astrozytenfunktion für das neuronale Überleben nach Ischämie. Nawashiro *et al.* (53) verwendeten Mäuse, bei denen durch rekombinante Techniken das Gen für GFAP, ein Strukturprotein von Astrozyten, funktionslos ist. Unter anderem weisen diese Tiere verkürzte Astrozytenfortsätze auf, was eine Störung der zerebralen Mikroarchitektur hervorruft (54,55). Während sich die Tiere auf den ersten Blick normal entwickeln (56), weisen sie eine deutlich verminderte Ischämietoleranz auf. Wird bei diesen Tieren durch Okklusion der *Arteria cerebri media* und *carotis communis* zerebrale Ischämie induziert, so sind die resultierenden Infarkt volumina fast 1,7 mal größer als bei Wildtyp-Tieren. Dies scheint durch eine Reduktion des Kollateralblutflusses im ischämischen Gebiet bedingt zu sein. Eine naheliegende Ursache für diese Beobachtungen könnte in einer Kompromittierung der durch Astrozyten vermittelten Vasodilatation kleiner Gefäße liegen.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass Astrozyten eine zentrale Rolle bei der Limitierung der zerebralen Schädigung durch Ischämie spielen, sofern sie morphologisch und funktionell intakt sind. Wie im nächsten Kapitel deutlich werden wird, ist jedoch gerade dies im hypoxisch-ischämischen Gewebe nicht hinreichend erfüllt.

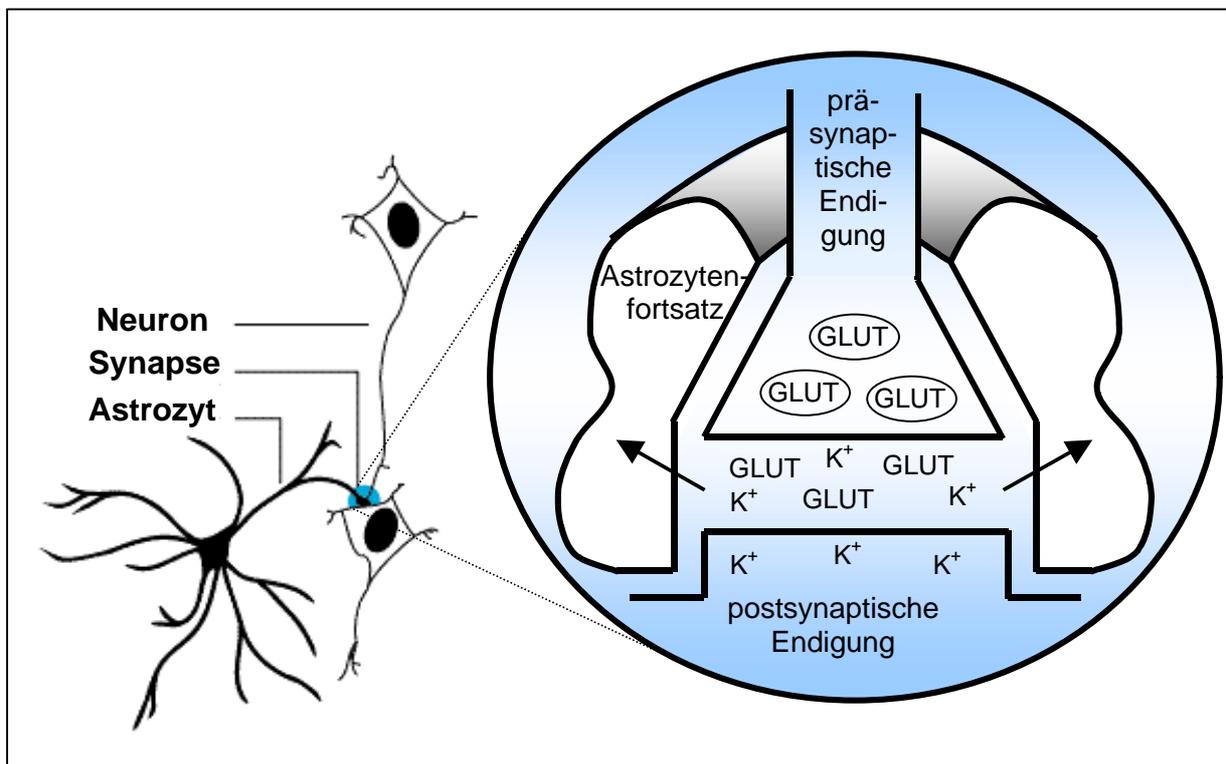


Abb. 3-1 Aufrechterhaltung der extrazellulären Homöostase durch Astrozyten
Astrozytenfortsätze umschneiden den synaptischen Spalt und nehmen extrazelluläres K⁺ und Glutamat (GLUT) auf.

3.3 Auswirkungen der astrozytären Hypoxie auf deren neuroprotektives Potential

Bei der Betrachtung der neuroprotektiven Effekte von Astrozyten während zerebraler Ischämie ist es notwendig zu berücksichtigen, dass auch die Astrozyten selbst der ischämischen Schädigung ausgesetzt sind. So können Astrozyten zwar, vermutlich aufgrund ihrer großen Glykogenreserven, langandauernde hypoxische Perioden überleben (2,57,58), wichtige Astrozytenfunktionen werden jedoch eingeschränkt. An kultivierten Astrozyten wurde beobachtet, dass durch Hypoxie sowohl die Fähigkeit zur Glutamat-Aufnahme beeinträchtigt wird, als auch die Aktivität des für die Glutamat-Elimination wichtigen Enzyms Glutaminsynthetase vermindert wird (59,60). Auch die Eigenschaft, die Ionenhomöostase zu gewährleisten, ist durch die Ischämie eingeschränkt. So beobachtet man unter ischämischen Bedingungen *in vivo* einen Anstieg des spezifischen Membranwiderstandes von Astrozyten, was durch einen Abfall der Membranleitfähigkeit für K^+ zu erklären ist (61).

Ein wichtige Ursache hierfür scheint in Veränderungen der Astrozytenmorphologie nach Hypoxie zu liegen (62). Unter physiologischen Bedingung weisen Astrozyten eine sternförmige Morphologie mit multiplen Zellfortsätzen auf (**Abb. 3-2**). Während zerebraler Hypoxie oder Ischämie kommt es dagegen zu einem zunehmenden Verlust der astrozytären Fortsätze, was bereits 1910 von Alzheimer beschrieben wurde (63) (**Abb. 3-2**). Alzheimer bemerkte, dass Astrozyten durch einen Vorgang, den er „Clasmatodendrosis“ (Disintegration von Fortsätzen) nannte, eine amoeboiden Zellform mit einer deutlichen Reduktion der Zelloberfläche annehmen. Clasmatoendrosis kann im Tiermodell bereits 30 Minuten nach experimentellem Verschluss der *Arteria cerebri media* beobachtet werden (64). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach zerebraler Hypoxie die normalerweise neuronalen Dendriten anliegenden Astrozytenfortsätze nur noch in stark vermindertem Ausmaß nachweisbar sind (65,66). Da der Hauptteil der K^+ -Leitfähigkeit von astrozytären Zellmembranen im Bereich der Zellfortsätze gefunden wird (67), werden diese morphologischen Veränderungen als eine der Hauptursachen für den Anstieg des astrozytären Membranwiderstandes und damit der eingeschränkten Fähigkeit zur Elimination

extrazellulären K^+ nach Hypoxie betrachtet (62). Unklar ist zu diesem Zeitpunkt, ob sich die Clasmotodendrosis auch negativ auf die Eliminierung extrazellulären Glutamats und anderer potentiell schädlicher Substanzen auswirkt.

Eine weitere Folge der Clasmotodendrosis könnte in einer Verminderung der Interaktion zwischen Astrozytenfortsätzen und zerebralen Blutgefäßen liegen. Die durch hohe Glutamatkonzentrationen bedingte astrozytenvermittelte Vasodilatation (52), die wie oben beschrieben einen potentiell wichtigen Mechanismus zur Limitierung des Infarktolumens darstellt, könnte demnach aufgrund des hypoxieinduzierten Verlustes von Astrozytenfortsätzen eingeschränkt sein.

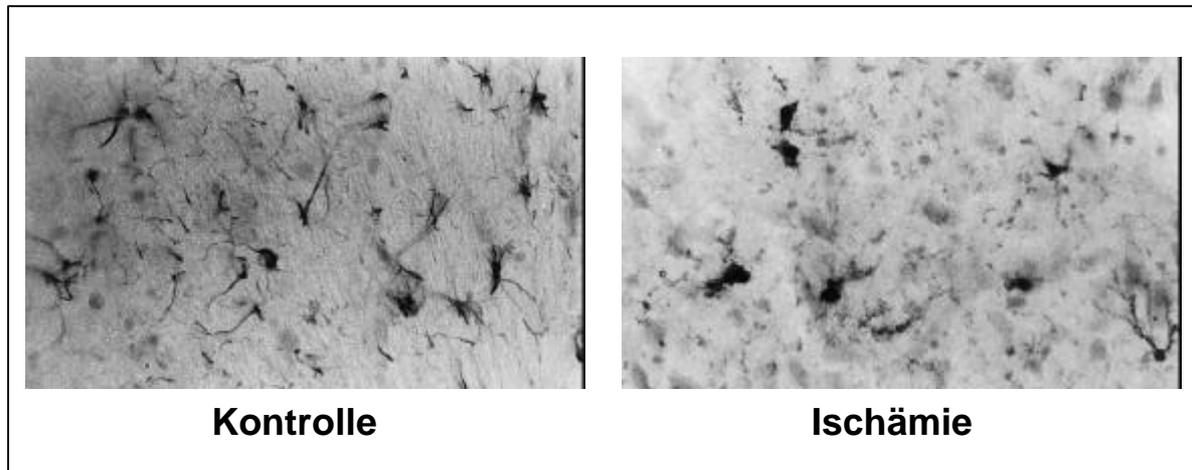


Abb. 3-2 Einfluss von Ischämie auf die astrozytäre Morphologie *in vivo* Die durch einen GFAP-Antikörper angefärbten Astrozyten im ischämischen Areal eines Rattengehirns 2 Stunden nach Okklusion der *Arteria cerebri media* (Ischämie) zeigen im Vergleich mit Astrozyten eines nicht-ischämischen Areals (Kontrolle) einen deutlichen Verlust ihrer zytoplasmatischen Fortsätze. (Adaptiert nach (64))

3.4 Der Einsatz kultivierter Astrozyten zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen der hypoxischen Schädigung

Aufgrund der potentiell wichtigen Rolle der astrozytären Morphologie für deren Funktionsfähigkeit und damit auch für das neuronale Überleben nach zerebraler Ischämie ist eine Identifikation von pathophysiologischen Mechanismen der morphologischen Transformation ischämischer Astrozyten von großer Bedeutung. Da im ZNS eine äußerst komplexe Interaktion verschiedener Zellarten besteht, sind *in-vivo*-Untersuchungen häufig auf deskriptive Aspekte beschränkt und daher für mechanistische Betrachtungen nicht hinreichend. Ein häufig angewandtes experimentelles Hilfsmittel stellt die Isolierung bestimmter Zellarten durch Zellkulturtechniken dar. Vor fast 30 Jahren beschrieben Booher und Sensenbrenner erstmals die Präparation monotypischer Astrozytenkulturen aus Rattenhirnen (68). In Mäusen und Ratten sind Astrozyten zum Zeitpunkt der Geburt noch teilungsfähig, während Neurone bereits postmitotisch sind, was die biologische Basis für die Präparation von Astrozytenkulturen aus Gehirnen neugeborener Ratten bzw. Mäuse darstellt (69). In einer Suspension von Zellen dieser Gehirne sind Neurone vulnerabel und nicht teilungsfähig, während Astrozyten widerstandsfähiger sind und nach Anheftung an den Boden des Kulturgefäßes die Zellteilung bis zur Population der gesamten Kulturschale fortsetzen. Derartig erzeugte Zellkulturen werden im Gegensatz zu klonalen Zelllinien als Primärkulturen bezeichnet.

Kultivierte Astrozyten weisen ein polygonales, pflastersteinartiges Wachstumsmuster auf (**Abb. 3-3A**), welches lediglich vereinzelt die *in vivo* zu beobachtenden charakteristischen Zellfortsätze zeigt. Daher eignen sich kultivierte Astrozyten auf den ersten Blick nicht für Untersuchungen bezüglich der Astrozytenmorphologie, da sie sich deutlich vom Phänotyp *in vivo* unterscheiden. Eine deutliche morphologische Differenzierung der kultivierten Zellen kann jedoch durch die Substanz Dibutyryl-cAMP (DBcAMP) erreicht werden, was erstmals von Shapiro (70) und Lim *et al.* (71) gezeigt werden konnte. Diese Differenzierung ist durch die Ausbildung zahlreicher Zellfortsätze charakterisiert, was als „*Stellation*“ bezeichnet wird (**Abb. 3-3B**) und

von einer Reihe funktioneller Veränderungen begleitet ist. So exprimieren diese Zellen in hohem Maße Marker astrozytärer Differenzierung, wie *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) oder Glutamin-Synthetase und ähneln damit differenzierten Astrozyten *in vivo* (72,73). Die Wirkung von DBcAMP scheint auf einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu beruhen und damit die noradrenerge Innervation der Astrozyten *in vivo* zu simulieren. Übereinstimmend mit diesem Konzept hat Noradrenalin einen ähnlichen Effekt auf die Morphologie kultivierter Astrozyten wie DBcAMP (74).

In Analogie zur *in vivo* beobachteten Glasmatodendrosis von Astrozyten nach Ischämie oder Hypoxie können DBcAMP-stimulierte, *stellate* Astrozyten durch verschiedene Substanzen in den polygonalen Phänotyp mit nur wenigen Zellfortsätzen überführt werden. So konnte für Thrombin (75), Glutamat (76) und für Endothelin (77,78) gezeigt werden, dass diese Substanzen in der Lage sind, die DBcAMP-induzierte *Stellation* zu verhindern bzw. bereits *stellate* Zellen wieder in den fortsatzarmen Phänotyp zu transformieren. Dagegen ist bisher nicht bekannt, ob die durch Hypoxie *in vivo* induzierte astrozytäre Glasmatodendrosis auch *in vitro* in *stellaten* Astrozyten erzeugt werden kann.

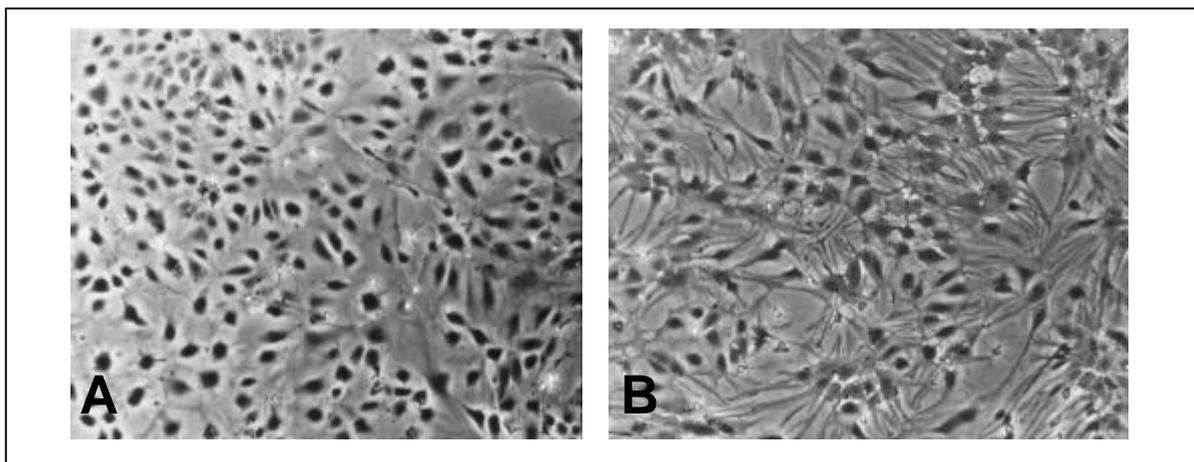


Abb. 3-3 Induktion astrozytärer *Stellation* durch DBcAMP Während Astrozyten in serumfreien Medium ohne Zusätze (A) ein flaches, pflastersteinartiges Wachstumsmuster aufweisen, kommt es durch Behandlung mit 1 mM DBcAMP (B) zur Ausbildung zahlreicher Zellfortsätze (*Stellation*).

3.5 Das Endothelin-System und seine Rolle bei zerebraler Ischämie

3.5.1 Komponenten des Endothelin-Systems

Mitte der 1980er Jahre wurde erstmals ein von kultivierten Endothelzellen gebildeter vasokonstriktorisches Faktor beschrieben (79,80). Yanagisawa et. al. gelang 1988 die Isolierung dieses Faktors aus kultivierten porcinen Endothelzellen (81), der fortan als Endothelin bezeichnet wurde. Endothelin-1 (ET-1) ist ein 21-Aminosäuren-Peptid mit einem hydrophoben C-Terminus und 2 Cystein-Brücken am N-Terminus. Innerhalb eines Jahres nach Entdeckung von ET-1 wurden zwei weitere, strukturell verwandte Peptide identifiziert, die sich in zwei bzw. sechs Aminosäuren unterscheiden und als ET-2 bzw. ET-3 bezeichnet werden (82). Bei der Endothelin-Biosynthese (**Abb. 3-4**) werden zunächst sogenannte Präproendotheline, Proteine mit etwa 200 Aminosäuren, synthetisiert, von denen durch sequentielle proteolytische Spaltung die aktiven Peptide abgespalten werden. In ersten Schritt werden die Präproendotheline an dibasischen Spaltungsstellen durch eine furin-ähnliche Endopeptidase gespalten, wobei die biologisch inaktiven, 37 bis 41 Aminosäuren langen *Big*-Endotheline entstehen. Im nächsten Schritt werden die 21 Aminosäuren langen aktiven Peptide abgespalten. Dieser Schritt wird durch die sogenannten *Endothelin-Converting-Enzyme* (ECEs) katalysiert, die zur Familie der membrangebundenen Zink-Metalloproteasen der Neprilysin-Superfamilie gehören. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten zwei dieser Enzyme identifiziert werden, ECE-1 und ECE-2 (83,84). ECE-1 ist in einer Vielzahl von Zellarten inclusive Endothelzellen vorhanden und besitzt ein Aktivitätsmaximum im neutralen pH-Bereich. ECE-2 wird ebenfalls in verschiedenen Zellarten, mitunter in Neuronen und Astrozyten, gefunden und besitzt ein Aktivitätsmaximum im aziden pH-Bereich (pH 5,8). *In vitro* weisen beide Enzyme eine höhere Affinität für *Big*-ET-1 als für *Big*-ET-2 und *Big*-ET-3 auf. Neben ECE-1 und ECE-2 katalysieren weitere, bisher unidentifizierte Enzyme die *Big*-ET-Spaltung, da genetisch modifizierte Mäuse, die weder ECE-1 noch ECE-2

synthetisieren können, trotzdem signifikante Mengen reifer ET-Peptide produzieren (85).

In Säugetieren wurden bisher zwei ET-Rezeptoren, der ET_A-Rezeptor (ET_AR) und der ET_B-Rezeptor (ET_BR), identifiziert (86,87). Beide Rezeptoren besitzen 7 Transmembran-Domänen mit jeweils 22 bis 26 hydrophoben Aminosäuren in ihren etwa 400 Aminosäuren langen Sequenzen. Der ET_AR hat hohe, subnanomolare Affinität für ET-1 und ET-2 und eine deutlich geringere Affinität für ET-3. Dagegen besitzt der ET_BR für alle drei Endotheline ähnlich hohe Affinität. Die Rezeptor-Bindung führt zu einer Aktivierung von G-Proteinen, was unterschiedliche intrazelluläre Ereignisse, wie die Aktivierung der Phospholipase-C, einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und die Induktion von *Immediate-Early-Genes*, nach sich zieht (88).

Die Regulation der Endothelin-Produktion erfolgt in den meisten Zellarten auf der Ebene der Synthese, insbesondere der Präproendothelin-Transkription. So wird die Präpro-ET-1-mRNA in verschiedenen Zellarten durch TGF-β, TNF-α, Interleukine, Insulin, Noradrenalin, Angiotensin-II und Thrombin heraufreguliert. Dagegen führen NO, Prostazyklin und ANP zu einer Reduktion der Präpro-ET-1-mRNA in Endothelzellen (89).

Die Konzentration von ET-1 im Plasma beträgt in den meisten Spezies etwa 1 pM, was deutlich unterhalb pharmakologisch bedeutsamer Konzentrationen liegt. Die Konzentrationen zirkulierender *Big*-Endotheline liegen ebenfalls bei ca. 1 pM und Plasma-ET-2 und -ET-3 werden in noch niedrigeren Konzentrationen gefunden (90). Daher wirken Endotheline unter physiologischen Bedingungen nicht als zirkulierende Hormone, sondern als auto- bzw. parakrine Faktoren.

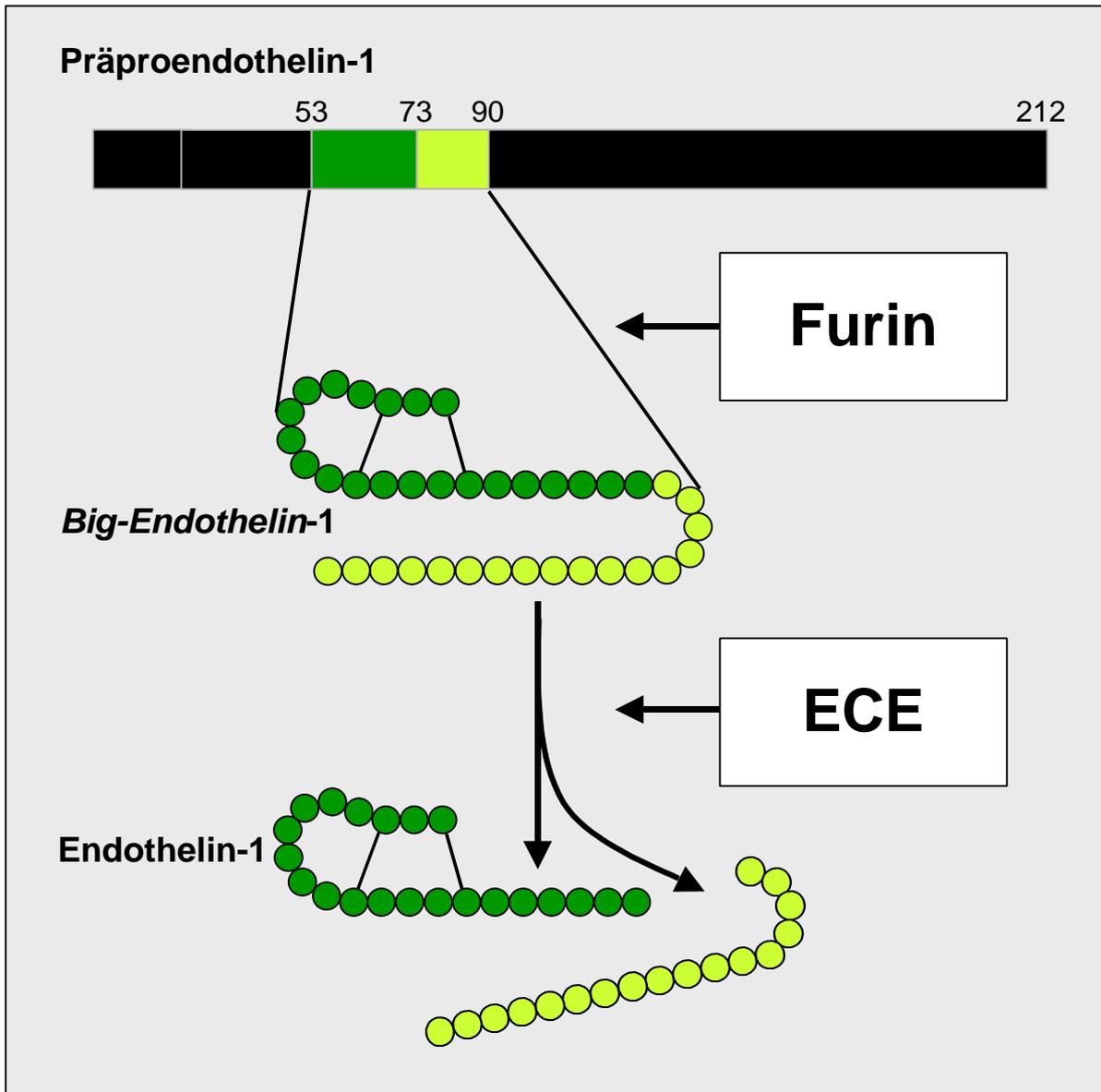


Abb. 3-4 Endothelin-Biosynthese am Beispiel des humanen Endothelin-1

3.5.2 Die physiologische und pathophysiologische Rolle der Endotheline

3.5.2.1 Erkenntnisse aus Modellen genetischer ET-Defizienz

Die physiologische Rolle der Endotheline während der Embryonalentwicklung wurde insbesondere durch gezieltes Ausschalten einzelner Komponenten des Endothelin-Systems in genetisch modifizierten *Knockout*-Mäusen definiert. ET-1- und ET_AR-*Knockout*-Mäuse weisen kraniofaziale und kardiovaskuläre Malformationen auf (91,92), während ET-3- und ET_BR-defiziente Tiere neben dem Verlust epidermaler Melanozyten eine Dilatation des proximalen Kolons als Folge einer intestinalen Aganglionose zeigen (93). Interessanterweise findet sich eine Kombination dieser beiden Phänotypen in ECE-1-*Knockout*-Mäusen (94). Diese Beobachtungen weisen auf eine Rolle des ET-Systems während der Embryonalentwicklung hin. Das Auftreten von Mutationen in den Genen für ET_BR und ET-3 bei Patienten mit multigener Hirschsprung-Erkrankung, die in ähnlicher Weise im frühen Lebensalter durch proximale Dilatation des Kolons auffällig werden, unterstreicht die speziesübergreifende Relevanz dieser Befunde.

3.5.2.2 Erkenntnisse aus Modellen der pharmakologischen Blockade des ET-Systems

Jenseits seiner Bedeutung bei der Embryonalentwicklung werden dem Endothelin-System in unterschiedlichen Zellarten und Organsystemen vielfältige Rollen zugeschrieben. Die pharmakologische Blockade der ET-Signaltransduktion durch Endothelin-Rezeptor-Antagonisten stellt eine wesentliche Strategie zur Aufklärung der physiologischen Funktion der Endotheline dar. Die ersten ET-Rezeptor-Antagonisten waren peptidartige Substanzen mit Strukturanalogie zu einzelnen Abschnitten des reifen ET-Peptids (**Tab. 3-1**). Während diese Substanzen aufgrund der hohen Spezifität und des rationalen Designs für *in-vitro*-Studien geeignet sind, besteht für die Anwendung im Tiermodell bzw. am Menschen das Problem der

fehlenden oralen Bioverfügbarkeit. Aus diesem Grunde konzentrierten sich pharmazeutische Unternehmen zunehmend auf die Entwicklung oral verfügbarer, nicht-peptidartiger ET-Rezeptor-Antagonisten. Die erste Substanz dieser Gruppe war Ro462005 (Hoffmann-LaRoche), das in der Lage war, die Bindung von [¹²⁵I]-ET-1 an glatte Gefäßmuskelzellen (hauptsächlich ET_AR) und aortale Endothelzellen (ET_BR) mit IC₅₀-Werten von 220 nM bzw. 1000 nM zu inhibieren (95). Wenig später wurde das wesentlich potentere Ro470203 (Bosentan) synthetisiert (96). In der Folge wurden weitere, oral bioverfügbare ET-Rezeptor-Antagonisten synthetisiert, die in **Tab. 3-1** zusammengefasst sind.

	Peptidartig	Nicht-Peptidartig
ET _A R-Antagonist	BQ123, FR139317, TTA788	LU135252, PD156707, PD176856, Ro611790, SB234551
ET _B R-Antagonist	BQ788, IRL2500, RES7011	RES 11491, Ro468443
ET _A R/ET _B R -Antagonist	PD142893, PD145065, TAK044	LU224332, PD160672, PD160874, Ro462005, Ro470203 (Bosentan), Ro610612 (Tezosentan), SB209670, SB217242

Tabelle 3-1 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

3.5.2.3 Endothelin bei arterieller und pulmonaler Hypertonie

Die ET-1-Konzentration in der Gefäßwand ist mehr als 100-fach gegenüber dem Plasmaspiegel erhöht, was auf der basalseitigen Sekretion des Peptids durch Endothelzellen beruht (97). Die Aktivierung von ET_AR auf glatten Muskelzellen der *Tunica media* führt zur Vasokonstriktion (86). Dagegen bewirkt eine Aktivierung des ET_BR auf Endothelzellen über die Freisetzung von NO und Prostazyklin eine

Vasodilatation (98,99). So ist das ET-System in Blutgefäßen einerseits über die Menge aktiven ET-Peptids und andererseits über das $ET_A R:ET_B R$ -Verhältnis an der Regulation des Vasotonus beteiligt.

Folglich war die Rolle des Endothelins bei arterieller und pulmonaler Hypertonie Gegenstand umfangreicher Untersuchungen. Hypertensive Patienten mit Nieren- oder Gefäßerkrankungen weisen deutlich erhöhte ET-Plasmaspiegel auf, was auf eine verminderte *Clearance* bzw. erhöhte lokale Produktion des Peptids bei diesen Hypertonieformen hinweist (90). Als indirekter Hinweis auf eine Beteiligung des ET-Systems bei essentieller Hypertonie ist das Ergebnis einer prospektiven, multizentrischen, plazebokontrollierten Studie an Patienten mit arterieller Hypertonie zu werten. Bei einer Behandlung für vier Wochen mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan kam es zu einer Senkung des diastolischen Blutdrucks um 5,7 mmHg. Diese Senkung ist mit der durch den ACE-Hemmer Enalapril verursachten vergleichbar (100).

Ähnlich wie im systemischen Gefäßbett induziert ET auch im Lungengefäßbett eine Vasokonstriktion, die durch ET-Rezeptorantagonisten blockiert werden kann (101). Patienten mit pulmonaler Hypertonie weisen erhöhte Mengen von Präpro-ET-1-mRNA und ET-1-Peptid in pulmonalarteriellen Endothelzellen auf (102). In verschiedenen Tiermodellen wird die Progression einer pulmonalen Hypertonie durch $ET_A R$ -Antagonisten verlangsamt (103,104). Bei Patienten mit primärer bzw. sklerodermie-assoziiierter pulmonaler Hypertonie führt die intravenöse Gabe des dualen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Bosentan zu einer akuten Reduktion des pulmonalarteriellen Druckes sowie des pulmonalen Gesamtwiderstandes (105). Eine kürzlich veröffentlichte randomisierte und plazebo-kontrollierte Studie an 35 Patienten zeigte nach 16-wöchiger oraler Therapie mit Bosentan neben einer Verbesserung der hämodynamischen Parameter auch eine verlängerte Gehstrecke sowie eine Verminderung der subjektiv empfundenen Dyspnoe (106). Ähnliche Ergebnisse konnten in der wesentlich größeren multizentrischen BREATHE-1-Studie (*Bosentan: Randomized Trial of Endothelin Receptor Antagonist Therapy*) an 213 Patienten mit pulmonaler Hypertonie beobachtet werden. Hier führte die Behandlung mit Bosentan im Vergleich zu Plazebo zu einer Verlängerung der Gehstrecke sowie zu einer signifikanten Verzögerung der klinischen Progression (G. Simonneau, *European Society of Cardiology Annual Congress 2001*).

3.5.2.4 Endothelin bei Herzinsuffizienz

Auch bei der Herzinsuffizienz scheint dem Endothelin-System eine pathogenetische Rolle zuzukommen. Hier dürfte einerseits die ET-induzierte Vasokonstriktion verbunden mit einer Erhöhung der kardialen Nachlast relevant sein. So sind die zirkulierenden ET-1-Spiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht und korrelieren mit der Schwere des Krankheitsbildes gemessen an hämodynamischen und klinischen Parametern (107). Andererseits scheint das ET-System jedoch auch direkte Wirkungen auf den Herzmuskel auszuüben. So wird im insuffizienten Herzmuskel sowohl im Tiermodell als auch an humanen Präparaten eine Aktivierung des Endothelin-Systems in Form einer erhöhten Expression von ET-1 und ET-Rezeptoren beobachtet (108-110). Dies dürfte die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie sowie das strukturelle *Remodelling* der Herzwand begünstigen (111). Entsprechend verbessert die Infusion des dualen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Bosentan die systemischen und pulmonalen hämodynamischen Parameter bei herzinsuffizienten Patienten sowohl bei akuter als auch bei chronischer Behandlung (112-114). Eine klinische Studie (*Research on Endothelin Antagonists in Chronic Heart Failure* [REACH-1]) untersuchte den Einfluss einer oralen Langzeitbehandlung mit Bosentan auf klinische Ereignisse bei chronischer Herzinsuffizienz (115). Obwohl sich ein positiver Einfluss auf Symptome und Hospitalisierung zeigte, musste die Studie aufgrund von reversiblen Anstiegen der Leber-Transaminasen unter der vergleichsweise hohen Bosentan-Dosis (500 mg zweimal täglich) vorzeitig abgebrochen werden. Die gegenwärtig durchgeführte ENABLE-Studie (*ENdothelin Antagonist Bosentan for Lowering cardiac Events in heart failure*) verwendet bei ähnlichem Studiendesign eine geringere Dosis des Medikaments. Neben diesen Studien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz, wurde in der RITZ-2-Studie (*Randomized Intravenous Tezosentan Study*) die Effektivität einer kombinierten Endothelin-Rezeptor-Blockade bei akut dekompensierter Herzinsuffizienz durch intravenöse Gabe von Tezosentan getestet. Hier kam es in der Tezosentan-Gruppe neben einer signifikanten Zunahme des kardialen Index und einer Reduktion des pulmonal-kapillären Verschlussdrucks auch zu einer deutlichen Verbesserung des

Dyspnoe-Scores (G. Torre-Amione, 50. Jahrestagung des *American College of Cardiology*, März 2001).

3.5.2.5 Das Endothelin-System bei zerebraler Hypoxie oder Ischämie

Während sich das Interesse in den späten 1980er Jahren auf ET als vasoaktives Peptid konzentrierte, zeigten Studien in darauffolgenden Jahren, dass die Komponenten des ET-Systems in vielen extravaskulären Geweben – so auch im ZNS - vorhanden sind, was weitere Funktionen des Peptids nahelegt (116-118). Unter physiologischen Bedingungen wird im ZNS Präproendothelin-1-mRNA, die prozessierenden Enzyme ECE-1 und ECE-2 sowie immunreaktives ET-1 hauptsächlich in Neuronen gefunden (119-122). Astrozyten dagegen produzieren unter physiologischen Bedingungen scheinbar keine reifen Endotheline. Es finden sich jedoch in Astrozyten die mRNAs für beide ET-Rezeptoren und ET-Bindungsstellen an der Zelloberfläche, wobei der ET_BR in deutlich größerer Dichte vorhanden ist als der ET_AR (120,121,123-126). In Tiermodellen zerebraler Ischämie wurde jedoch beobachtet, dass Astrozyten im geschädigten Gewebe bereits relativ früh beginnen, reifes Endothelin zu produzieren. So findet man nach zerebraler Hypoxie oder Ischämie sowohl Präpro-ET-1-mRNA als auch das reife ET-1 Peptid in Regionen neuronaler Schädigung (127-129). Dies geht mit einer Verminderung der ET-Rezeptor-Dichte bereits eine Stunde nach Reperfusion einher (127). Dagegen zeigt sich ein deutlicher Anstieg der ET-Rezeptor-Dichte nach 4 bis 7 Tagen (130), der wahrscheinlich durch astrozytäre Proliferation bedingt ist.

Kultivierte Astrozyten weisen im Gegensatz zu Astrozyten *in vivo* bereits eine Basisexpression von ET-1 auf (131). Auch ET-3 konnte in kultivierten Astrozyten nachgewiesen werden (132). In Überständen hypoxischer Astrozytenkulturen finden sich im Vergleich zu normoxischen Kulturen erhöhte ET-Spiegel (133), was von einer Verminderung der Messenger-RNAs (mRNAs) für den ET_AR und ET_BR begleitet wird (131). Während diese Ergebnisse in niedrig differenzierten Astrozytenkulturen erhoben wurden, ist nicht bekannt, wie sich Hypoxie auf die ET-System-Expression in DBcAMP-behandelten, höher differenzierten Astrozyten auswirkt.