

1. Einleitung

1.1. Fortschritte der modernen Neonatologie

Zunehmendes Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge und neue klinische Therapieoptionen führten in den vergangenen Jahren zu deutlich verbesserten Überlebensraten bei sehr kleinen Frühgeborenen. Dies gilt insbesondere für Kinder, welche in der 24.-27. Schwangerschaftswoche zur Welt kommen. Dazu beigetragen haben vor allem die Einführung der Surfactantsubstitution, welche bei unreifem Lungengewebe eine verbesserte Sauerstoffaufnahme ermöglicht, und die antenatale Steroidschubgabe, die die Lungenreifung beschleunigt [1-5]. Sinkende Mortalitätsraten von Frühgeborenen gehen jedoch mit hohen Morbiditätsraten einher, was den Anlass für intensiviertere Forschung gibt [6-8].

Bis zu 12% der Neugeborenen kommen in den entwickelten Ländern vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche zu Welt. Bei ca. 50% der sehr kleinen Frühgeborenen kann eine Schädigung des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden [9]. Langzeitstudien und standardisierte neurologische Untersuchungen von Kindern, welche ein extrem geringes Geburtsgewicht (<1000 g, ELBW, *extremely low birth weight*) zeigen, ergaben neben einer verzögerten psychomotorischen Entwicklung auch vermehrt sensorische Einschränkungen. Besonders das Seh- und Hörvermögen sind betroffen [10, 11]. Zerebrale Anfallsleiden, mentale Retardierung, Autismus und geringere Intelligenzleistungen werden häufiger beobachtet und ziehen oft eine verstärkte schulische Förderung nach sich [11]. Neuere Arbeiten zeigten starke kognitive Defizite bei ehemaligen sehr kleinen Frühgeborenen im frühen Schulalter im Vergleich zu ihren Klassenkameraden [12].

1.2. Sauerstoff

Frühgeborene erhalten in den ersten Stunden ihres Lebens häufig eine unterstützende Therapie mit Sauerstoff. Diese kann, je nach fortgeschrittenem Reifungsgrad des Kindes, Dauer und Konzentration schwere Organschädigungen zur Folge haben. Allein bei der Geburt ist das Neugeborene einem plötzlichen Wechsel des Sauerstoffpartialdrucks ausgesetzt, welcher von intrauterin 25 mmHg auf 70 mmHg ansteigt. Bei zusätzlicher Sauerstofftherapie können akzidentell auch unphysiologisch erhöhte Werte vorkommen [13]. Der physiologische Wechsel dient als Stimulus für postnatale Umstellungen des kardiovaskulären Systems, birgt jedoch, besonders in Kombination mit zusätzlich verabreichtem Sauerstoff, gleichzeitig Gefahren für den

unreifen Organismus [14]. Es gilt als erwiesen, dass Sauerstofftherapie in der Pathogenese der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) und der Retinopathie des Frühgeborenen (*retinopathy of prematurity*, ROP) eine ursächliche Rolle spielt [15, 16].

Bereits 1780 wurde versucht, unzureichende Atmungstätigkeit Neugeborener mit der Gabe hochdosierten Sauerstoffs zu unterstützen, was sich in perfektionierter Form bis in die 60er Jahre des 20. Jahrhunderts fortsetzte [17, 18]. Erst mit der Erforschung von BPD und ROP, ihrer Ursachen und Folgen, kam es zu einem Umdenken und kritischerem Einsatz der therapeutischen Möglichkeiten [19-22]. Es konnte gezeigt werden, dass es unter hyperoxischen Bedingungen, zum Beispiel bei einer Reanimation, zu vermehrter Produktion freier Sauerstoffradikale, verstärktem oxidativen Stress und unmittelbaren Gewebsschäden kommt [23-27].

Während des aeroben Stoffwechsels, bei den Prozessen der Atmungskette in den Mitochondrien, liegt Sauerstoff reduziert in Form von zwei Wassermolekülen vor. Hierfür sind Enzymkomplexe von Cytochromoxidasen notwendig. Bei den enzymatisch katalysierten Prozessen fallen als Nebenprodukte auch reaktive Sauerstoffintermediate an, welche relevante zytotoxische Wirkungen entfalten können, wenn sie verstärkt produziert oder vermindert neutralisiert werden [28, 29]. Als freie Radikale werden Moleküle mit einem oder mehreren unpaarigen Elektronen bezeichnet. Der Begriff *reactive oxygen species* (ROS) oder *reactive oxygen intermediate* (ROI) bezeichnet sowohl Moleküle, die als freie Radikale definiert werden, als auch Moleküle mit oxidierender Fähigkeit bezogen auf Sauerstoff, welche jedoch kein unpaares Elektron aufweisen. Zu diesen freien Radikalen zählen Superoxidanione (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH). Jedes der genannten freien Radikale ist in der Lage, auf unterschiedlichste Weise einen zellulären Schaden zu bewirken. Meist geschieht dies durch Reaktionen mit Seitenketten vielfach ungesättigter Fettsäuren der Membranlipide in Form von Lipidperoxidation. Es entstehen hierbei Lipid-Hydroperoxide, welche als Inhibitoren zellulärer Enzyme wirken oder unmittelbar Proteine und Membranen schädigen. Weiterhin können die freien Sauerstoffradikale direkt zu DNA-Schäden führen [26, 30, 31]. Ebenso wurde eine Beeinflussung der Signaltransduktion über die Aktivierung von NFκB durch reaktive Sauerstoffintermediate beschrieben [32].

Direkte Gewebsschäden werden in Form von interstitiellem und alveolärem Ödem, entzündlicher Infiltration und morphologischen Veränderungen bis hin zur interstitiellen Fibrose in den Lungen beobachtet [26].

Klinisch manifestieren sich diese pathologischen Vorgänge oft bei Intensivpatienten in Form von Tracheobronchitis und ARDS (*adult respiratory distress syndrome*). Bei Frühgeborenen kommt erschwerend hinzu, dass die antioxidativen Systeme noch unzureichend entwickelt sind und bei

Bedarf nur ungenügend hochreguliert werden können [33-36]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass antioxidative Systeme, wie Superoxiddismutase, Vitamin E, β -Karatol und das bedeutendste intrazelluläre Antioxidanz, Glutathionperoxidase, in Geweben und im Serum von Frühgeborenen besonders nach Sauerstofftherapie einen erhöhten Umsatz haben [37-41]. So konnten beispielsweise im Vergleich zu Wiederbelebungen mit Raumluft nach Reanimationen mit 100%igem Sauerstoff im Blut dreifach erhöhte Spiegel oxidierten Glutathions und im Urin vermehrt 8-Hydroxyguanosin, als Marker der mitochondrialen DNA-Oxidation, nachgewiesen werden [42]. Dysregulierte Entzündungsvorgänge, veränderte Expression von Wachstumshormonen und Proteasen, Neigung zur Ausbildung einer BPD (direkte Sauerstofftoxizität) und Entwicklung von ROP (indirekte Sauerstofftoxizität) sind die Folgen.

Bei der Retinopathie des Frühgeborenen kommt es hyperoxiebedingt zu Vasoobliterationen, Gewebshypoxie, fibrösen Vernarbungen und Retraktionen retinaler Strukturen [43, 44]. Neben Volu- und Barotraumatata, fetalen Infektionen und Chorioamnionitiden gilt die Hyperoxie auch als Hauptursache der Bronchopulmonalen Dysplasie [45-48]. Gestützt wird dies von experimentellen Studien, in denen neonatale Ratten unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt wurden und BPD-ähnliche Veränderungen wie Atelektasen, emphysematische Veränderungen sowie Nekrosen der bronchialen Mukosa zeigten [49, 50].

Auch konnte gezeigt werden, dass diese morphologischen Änderungen im Lungengewebe durch den Einsatz von Antioxidanzien sowie durch die Hemmung neutrophiler Leukozyten, welche bei immunologischen Reaktionen neben Elastasen und Stickstoffmonoxid (NO) auch Sauerstoffradikale bilden, mitigiert werden.

Enzymsysteme wie das p-450-System, die Oxidation von Arachidonsäuren zu Katecholaminen oder die Reaktion von Stickstoffmonoxid (NO) zum toxischen Peroxinitrit ($\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$) stellen Quellen reaktiver Radikale dar. Metalle wie Eisen, Kupfer, Chrom oder Mangan können als freie Radikale betrachtet werden, wenn sie unpaarige Elektronen vorweisen. Die größte Bedeutung hierbei kommt dem Eisen zu, welches in freier Form in Plasma und Geweben Frühgeborener verstärkt gefunden wurde und in der Fenton-Reaktion zwischen Superoxidanion und Wasserstoffperoxid die Bildung toxischer Hydroxylradikale katalysieren kann: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ [51].

Zunehmende Bedeutung erlangen auch Thioredoxin und Peroxiredoxin als Antioxidanzien. Thioredoxin ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, dient als Fänger von reaktivem Sauerstoff und anderen freien Radikalen und als Aktivator weiterer antioxidativer

Systeme. Es konnte gezeigt werden, dass Thioredoxin unter verstärkter Sauerstoffexposition vermehrt exprimiert wird [52].

Der therapeutische Einsatz von Sauerstoff kann zu gesteigerter Produktion von Radikalen führen, welche die Kapazität antioxidativer Systeme übersteigt [53]. Dies spricht für die Bedeutsamkeit der Hyperoxie sowie des oxidativen Stresses als kausale Faktoren [54, 55]. Neuere Forschungsergebnisse postulieren auch einen Zusammenhang zwischen verstärktem oxidativen Stress und anderen typischen Krankheitsbildern Frühgeborener, wie Nekrotisierender Enterokolitis (NEC) oder Periventrikulärer Leukomalazie (PVL) und deren mögliche Folgeerkrankung Zerebralparese (CP) [56-59].

Weiterhin konnten Studien belegen, dass neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer oder M. Huntington mit einer verstärkten Präsenz von oxidativem Stress korrelieren [60-62]. Oxidativ bedingte Schäden im zerebralen Kortex und Zerebellum werden für einen beschleunigten Alterungsprozess und Beeinträchtigung des Gedächtnisses und der Motorik mitverantwortlich gemacht [63].

Doch nicht nur Hyperoxie und die damit verbundenen unphysiologisch hohen Konzentrationen von Sauerstoffradikalen haben Einfluss auf den Organismus. Es konnte gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffradikale auch unter physiologischen Bedingungen im Organismus präsent sind und in subtoxischen Dosen die Funktion von Botenstoffen übernehmen und verschiedenste Prozesse, wie Transkription, Genexpression, Apoptose, Zellwachstum und Chemotaxis beeinflussen. Dies geschieht vor allem über Beeinflussung kalziumabhängiger Transkriptionswege, Proteinphosphorylierung, direkte Stimulation von Proteinkinasen und Hemmung von Proteinphosphatasen [25, 64].

Die Effekte der Hyperoxie auf das neonatale Gehirn wecken zunehmend das Interesse der Wissenschaft, da Ischämie, Hypoxie, entzündliche Prozesse und Einflüsse neurotoxischer Substanzen nicht allein für die neuronalen Schädigungen verantwortlich gemacht werden können. Studien belegen eine nicht nur von äußeren Faktoren, wie klinischen Interventionen oder verschiedensten Schädigungsarten, sondern auch vom Reifegrad abhängige Vulnerabilität des zentralen Nervensystems [65]. In Tierversuchen wurden nach Hyperoxie neuronale Degenerationen und bei der kombinierten Therapie mit Hyperoxie und dem Glutathion-Synthese-Inhibitor Buthionin-Sulfoximin (BSO) apoptotische Prozesse nachgewiesen [66-68]. Histologische Studien konnten schließlich belegen, dass es sich bei den durch Hyperoxie bedingten, disseminiert im Hirn auftretenden Zellschäden, vornehmlich um apoptotische Neurodegenerationen handelt [69]. Erhöhte Werte von Stickstoffmonoxid (NO) zeigten sich bei Neugeborenen, die mit 100% Sauerstoff reanimiert wurden. Bindet NO an eisen- oder

kupferhaltige Proteine, so führt dies zur Freisetzung von Metallionen und in Kombination mit Sauerstoff zur Bildung toxischer Radikale [70].

1.3. Botenstoffe

1.3.1. Zytokine, Inflammation und Neurodegeneration

Aufgrund der Korrelation von Hyperoxie und inflammatorischen Prozessen ist die Erforschung involvierter, informationsübermittlender Botenstoffe von besonderer Bedeutung. Diese Zytokine sind definiert als eine Gruppe natürlich vorkommender Polypeptide, die als Mediatoren interzellulärer Kommunikation agieren. Sie spielen in der Entwicklung, bei immunologischen Prozessen und entzündlichen, autoimmunen und traumatischen Reaktionen eine zentrale Rolle. So konnte festgestellt werden, dass Neugeborene, welche nach einem Atemnotsyndrom (*respiratory distress syndrome*, RDS) eine chronische Lungenerkrankung entwickeln, eine verstärkte Entzündungsreaktion vorweisen, welche mit erhöhten Werten von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin IL-1 β , IL-6 und IL-8 einhergeht. Diese verstärkte inflammatorische Zytokinantwort auf Hyperoxie spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen Frühgeborener [71, 72].

Auch wurden Zytokine als Mediatoren und Inhibitoren verschiedenster neurodegenerativer Prozesse beschrieben. So haben sie beispielsweise bedeutende Funktionen bei der Verstärkung, Vermittlung, Hemmung und auch Reparatur zellulärer Schäden. Viele Zytokine werden nur temporär und nur in bestimmten Geweben und Regionen verstärkt exprimiert. Ihre komplexen Funktionsweisen im zentralen Nervensystem ähneln ihrer Wirkungsweise in der Peripherie. Hierbei entfalten sie ihre Wirkung zum Teil in sehr geringen Konzentrationen. Sie führen wahrscheinlich nicht allein, sondern nur im Zusammenspiel mit verschiedenen, sich gegenseitig beeinflussenden anderen Botenstoffen, zu einem Effekt wie dem neuronalen Zelltod [73]. Auch Entzündungen, welche nicht direkt das Hirn betreffen, können über diesen Weg neuronale Degenerationen auslösen. Berichtet wurde dies bei fetalen Erkrankungen z.B. der Nekrotisierenden Enterokolitis, welche mit einer schlechten neurologischen Prognose assoziiert ist sowie im Zusammenhang mit maternalen Erkrankungen wie Amnioninfektionen welche im neonatalen Hirn Schäden der weißen Substanz bedingen können [74-77]. Solche entzündlichen Prozesse könnten durch eine Sauerstoffbehandlung von Frühgeborenen zusätzlich verstärkt werden und zum *fetal inflammatory response syndrome* (FIRS) führen. Während unter

hypoxischen Bedingungen aufgrund der azidotischen, anaeroben Stoffwechsellage oder durch direkten Zelltod vermehrt proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, erfolgt die Schädigung bei Hyperoxie wahrscheinlich in erster Linie aufgrund direkter Sauerstofftoxizität und der Wirkung von Sauerstoffradikalen [78]. Man vermutet, dass durch die Inflammation, bei noch nicht vollständig entwickelter Blut-Hirn-Schranke beim Frühgeborenen, ein verstärkter Zytokinübertritt stattfindet, der eine höhere Vulnerabilität und einen größeren Schaden bewirkt. Nachweislich ist ein erhöhtes Risiko für *neonatal white matter damage* (NWMD), Periventrikuläre Leukomalazie sowie Zerebralparese bekannt [79-81].

Von der Vielzahl der Zytokine, welche an der Vermittlung neurodegenerativer Prozesse beteiligt sind, nehmen die Interleukine IL-1 β und IL-18 vermutlich eine Schlüsselstellung ein und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.3.2. Caspase-1

Das *IL-1 β -converting enzyme* (ICE) ist ein Mitglied der Caspase-Familie und wird auch als Caspase-1 bezeichnet. Caspasen sind Zysteinproteasen, welche bei apoptotischen Prozessen induzierende (Caspase-6, -8, und -9) oder ausführende (Caspase-3 und -7) Funktionen übernehmen oder bei inflammatorischen Verläufen (Caspase-4 und -5) beteiligt sind [82, 83]. Caspase-1 wird unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Zellen, im Hirn vor allem von mikroglialen Zellen aber auch von Neuronen, zunächst als inaktives Vorläuferprotein (45kDa) exprimiert, bevor es nach zweimaliger, interner Spaltung zu einem enzymatisch aktiven Heterodimer komplexiert (10 und 20kDa-Ketten) und die Spaltung der Vorläufermoleküle von IL-1 β und IL-18 in ihre biologisch aktive Formen übernimmt. Durch Oligomerisation des ICE mit seinem Precursor wird ein Autoprozessieren möglich. Es werden fünf verschiedene Isoformen der humanen Caspase-1 unterschieden (α , β , γ , δ , ϵ), welche durch alternatives RNA-Splicing entstehen [84, 85].

Precursorproteine des IL-1 β wurden auch extrazellulär gefunden. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Vorläuferprotein auch unabhängig von ICE die Zelle verlassen kann, um bei extrazellulären Prozessen aktiviert zu werden. Ein Caspase-1 unabhängiger Weg der Spaltung von IL-1 β - und IL-18-Precursor-Proteinen ist die Prozessierung durch die Proteinase-3 (PR-3) [84].

Der Aktivität der Caspase-1 kommt in der Entwicklung neuronaler Schäden infolge ischämischer Hirninfarkte eine besondere Bedeutung zu. Es zeigte sich eine Resistenz gegenüber hypoxisch-ischämischen Bedingungen bei Caspase-1 (-/-) Mäusen. In Experimenten, in denen die Aktivität

der ICE blockiert wurde, fand man signifikant neuroprotektive Effekte, die zum Teil direkt über ein Verhindern apoptotischer Prozesse, zum anderen indirekt über eine reduzierte inflammatorische Reaktionen, erklärt werden [83, 86].

1.3.3. Interleukin-1 β

Der Familie von Interleukin-1 werden derzeit drei verschiedene Liganden (IL-1 α , IL-1 β und der Interleukin-Rezeptor-Antagonist IL-1RA), zwei dazugehörige, membrangebundene Rezeptoren, ein Rezeptorzusatzprotein und verschiedene lösliche Rezeptoren zugeordnet [87, 88]. Die genannten IL-1 α und IL-1 β fungieren in der Peripherie als Agonisten. Im ZNS, insbesondere die Neurodegeneration betreffend, wird IL-1 β eine größere Bedeutung beigemessen [87, 89]. In autoradiographischen Analysen zeigten sich hohe Konzentrationen IL-1-bindender Domänen im ZNS [90]. IL-1 β und IL-1 β -mRNA wurden in Geweben verschiedenster Hirnareale nachgewiesen [91]. Ebenso ist ein schnelles Hochregulieren des normalerweise sehr niedrigen basalen Levels als Antwort auf systemische oder lokale Insulte beschrieben [92-95]. Hierbei zeigt IL-1 β keine direkte Toxizität, verstärkt aber ischämisch, traumatisch oder exitotoxisch bedingte Zellschäden [82, 83]. Der physiologisch vorkommende IL-1RA übernimmt antagonistische Funktionen [96]. Alle bekannten IL-1-Proteine werden als Vorläufermoleküle exprimiert und müssen in einem zweiten Schritt enzymatisch in ihre Wirkform umgewandelt werden. Hierbei ist bemerkenswert, dass die Pro-Form des IL-1 α bereits aktive Eigenschaften besitzt, während der IL-1 β -Precursor erst bei der Prozessierung durch das ICE aktiviert wird [97]. IL-1 α und IL-1 β besitzen jeweils ein Molekulargewicht von 17 kDa und werden auf unterschiedlichen Genorten kodiert. Nach der Spaltung ihrer Vorstufen wird das IL-1 β sezerniert, während IL-1 α membrangebunden verbleibt [91]. Die Vermittlung der Effekte von IL-1 α und IL-1 β setzt ihre Bindung an den löslich oder membrangebunden vorkommenden IL-1 Rezeptor I (IL-1RI) (80kDa) voraus. Für eine erfolgreiche Signaltransduktion muss dieser Komplex anschließend an das membrangebundene *IL-1 receptor accessory protein* (IL-1RAcP) binden [98]. Neben dem IL-1RI wurde ein IL-1RII (auch *IL-1 decoy receptor*, 68kDa) beschrieben, welcher jedoch keine signalvermittelnde intrazelluläre Domäne besitzt und somit wahrscheinlich eine antagonistische Funktion übernimmt [99]. Auch werden für das ZNS weitere, atypische Rezeptoren vermutet, da signifikante IL-1-Effekte bei sehr geringen Konzentrationen von IL-1-Rezeptoren gezeigt werden konnten [100].

Als Quelle des intrazerebral exprimierten IL-1 β gelten die Mikroglia bei der schnellen Immunantwort sowie Astrozyten, welche verzögert nach ca. 24 Stunden bis 3 Tagen mit einer

verstärkten IL-1 β -Produktion reagieren [100]. Die Wirkung des IL-1 β im ZNS ist vielgestaltig. Es ist als Pyrogen involviert in die Vermittlung von Fieber und beteiligt an neuroendokrinen Prozessen, beeinflusst andere Zytokine, Neurotransmitter, Neuropeptide und Neurotrophine und moduliert Langzeitpotenzierungen, synaptische Transmissionen und induziert die Proliferation von Micro- und Astroglia. Weiterhin kann IL-1 β die Permeabilität von Gefäßen steigern und zu verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen führen, was die Effizienz inflammatorischer Reaktionen erhöht [91, 100]. Von besonderer Bedeutung ist die Beteiligung des IL-1 β an neurodegenerativen Prozessen, welche mit Hilfe des experimentellen Einsatzes von IL-1RA und Caspase-Inhibitoren antagonisiert werden konnte [87, 89, 100]. Ebenso sind eine intensiviertere Expression und die verstärkende Wirkung von IL-1 β auf neuronalen Zelltod bei ischämischen und traumatischen Versuchsreihen beschrieben [100, 101]. IL-1 β wird neben IL-18 verantwortlich gemacht für die Erweiterung und Stimulation der Entzündungsreaktion nach ischämischen Insulten, soll bei der Entwicklung von Depressionen nach einem Schlaganfall eine Rolle spielen und übt einen negativen Einfluss auf kognitive Vorgänge aus [101-103].

1.3.4. Interleukin-18

Interleukin-18 wurde erstmals 1989 als *interferon- γ inducing factor* (IGIF) beschrieben [104]. Über die Wirkungen des IL-18 in den verschiedenen Geweben und Organen ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Bezüglich seiner Aminosäuresequenz, der Proteinstruktur und der Abhängigkeit von ICE ist es dem Interleukin-1 β sehr ähnlich [105]. Die Signaltransduktion setzt die Bindung an einen spezifischen IL-18R α als Rezeptor voraus, welcher ursprünglich als IL-1Rrp (*IL-1 receptor related protein*) bezeichnet wurde [106, 107]. IL-18R α ist genetisch und strukturell eng verwandt mit dem IL-1RI, ist ein Mitglied der IL-1-Rezeptor-Familie und geht mit IL-18 eine spezifische, schwach affine Bindung (20-40 nM) ein [84, 106, 108]. Ebenso wie bei der Effektvermittlung von IL-1 β , ist auch bei IL-18 eine zweite Rezeptorkette notwendig. Das *IL-18 receptor accessory protein-like molecule* (AcPL) wird auch als IL-18R β bezeichnet und ähnelt wiederum dem IL-1RAcP [109, 110]. Durch die Bindung von IL-18R β , die nur nach erfolgter Annäherung von IL-18 und dem IL-18R α stattfinden kann, entsteht ein heterodimerer Komplex mit seinem Liganden IL-18 und einer hohen Affinität (600 nM), intrazelluläre Enzyme zu binden und die Signaltransduktion fortzusetzen. In letzter Zeit wurde von bestimmten Spliceformen des IL-18R β in Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und Lebergewebe berichtet, welche, analog zum IL-1RAcP, lösliche Varianten des membranständigen Rezeptors darstellen und als wichtige Regulatoren des IL-18 dienen könnten [111].

Die Bedeutsamkeit des IL-18 liegt in seiner Fähigkeit, in T-Zellen und Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) die IFN- γ -Produktion zu induzieren. Hiermit grenzt es sich vom IL-1 β ab und spielt in der frühen, unspezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle. Weiterhin geht man von der Existenz einer positiven Rückkopplung aus, in der IFN- γ die Expression der Caspase-1 verstärkt, welche für die Spaltung der IL-1 β - und IL-18-Vorstufen notwendig ist [112]. Die Produktion von IL-18 erfolgt vor allem in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen und wird durch Makrophagen stimulierende Substanzen, wie Lipopolisaccharide, Exotoxine gram-positiver Bakterien und verschiedenste mikrobiologische Produkte stimuliert. Im zentralen Nervensystem wurde IL-18mRNA erstmals durch Culhane und Wildenbaum nachgewiesen. Hier gelten mikrogliale Zellen, aber auch Astrozyten als Quelle des IL-18 [113]. In Experimenten mit IL-18 (-/-) Mäusen und ICE (-/-) Mäusen, welchen die Fähigkeit der Aktivierung des IL-18-Precursorproteins fehlt, fand man eine deutlich geringere IFN- γ -Produktion als Antwort auf inflammatorische Stimuli. Die verstärkte IFN- γ -Produktion kann jedoch nicht allein auf den Effekt des IL-18 zurückgeführt werden. Vielmehr findet sie infolge einer Co-Stimulation durch IL-18, IL-12 sowie mikrobielle Stimulanzen statt [105, 112, 114-116]. IL-12 verstärkt hierbei die Expression des IL-18-Rezeptors. Neben der IFN- γ -Produktion werden, bedingt durch die IL-18-Wirkung, auch IL-1 β , IL-2, IL-8, GM-CSF, TNF α und Fas-Ligand verstärkt sezerniert, eine NF κ B-Aktivierung wurde in T-Helferzellen infolge IL-18-Stimulation nachgewiesen [117, 118]. Die Möglichkeiten der Beeinflussung hängen jedoch generell vom Zusammenwirken mit anderen Zytokinen und von den Zielzellen des IL-18 ab [105, 117, 118]. Im Gegenteil zu anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF, welche in der frühen Phase der Entzündungsreaktion sehr zeitig verstärkt exprimiert werden, wurde für IL-18 berichtet, dass die höchsten Konzentrationen erst mehrere Tage verzögert nach traumatischer Einwirkung auftreten [119, 120].

Interleukin-18 spielt bei Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen, septisch hervorgerufenen myokardialen Veränderungen und bei allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle [121, 122]. Die Beteiligung des IL-18 an entzündlichen Prozessen des zentralen Nervensystems wurde besonders intensiv am Modell der Multiplen Sklerose, an der bakteriellen und viralen Meningitis sowie der fokalen Ischämie untersucht und nachgewiesen [101, 119, 120, 123, 124]. Auch wurden im Liquor HIV-positiver Patienten mit zerebralen opportunistischen Infektionen gesteigerte Konzentrationen des IL-18 nachgewiesen, was seine Bedeutsamkeit in der Verstärkung intrathekalen Immunreaktionen hervorhebt [125].

Die Ursachen der Frühgeburtlichkeit sind vielgestaltig. Der kausale Zusammenhang zwischen intraamniotischen Infektionen und Schäden der weißen Hirnsubstanz sowie der Zerebralparese

gilt als gesichert. Weiterführende Untersuchungen belegen, dass Frühgeburtlichkeit auch mit gesteigerten IL-18-Spiegeln im Nabelschnurblut einhergehen kann [126]. Auf die Regulierung des IL-18 durch reaktive Sauerstoffmoleküle (ROI) weisen neueste Untersuchungen hin, in denen das Stress regulierende *Corticotropin-releasing Hormon* (CRH) über gesteigerte ROI-Produktion zu verstärkter Expression und Sekretion von IL-18 in mikroglialen Zellen führte [127].

Von großer Bedeutung sind Arbeiten, die belegen, dass mikroglial freigesetzte Zytokine wie IL-18 in der Lage sind, neuronale Differenzierungsvorgänge zu hemmen und auch Zelltod in neuronalen Stammzellen auszulösen [128]. Neben diesen direkten neuronalen Schäden wird IL-18 auch für degenerative Prozesse der weißen Substanz verantwortlich gemacht. Bei Untersuchungen am Modell des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens fand man IL-18-Rezeptoren an Astrozyten sowie von IL-18 vermittelte Schäden der periventriculären weißen Substanz [113].

1.3.5. Der gemeinsame Weg der Signalübermittlung von IL-1 β und IL-18

Die Rezeptoren von IL-1 und IL-18 sind nicht nur Mitglieder der proinflammatorischen IL-1-Rezeptor-Familie. Sie sind auch in die übergeordnete Gruppe der *Toll-like-receptors* (TLR) einzuordnen, welche pathogenassoziierte molekulare Strukturen oder proinflammatorische Zytokine erkennen und Homologien im Bereich der zytoplasmatischen Domäne, der *Toll/IL-1R/plant R gene* (TIR) vorweisen [129]. Struktur und Mechanismus der Signalübermittlung haben sich im Laufe der Evolution kaum verändert und die Namensgebung ist somit bedingt durch das häufige Vorkommen in der Tier- und Pflanzenwelt.

Nach erfolgter Bindung der Rezeptor-Ligand-Komplexe von IL-1 β bzw. IL-18 bindet ein als *myelon differentiation factor 88* (MyD88) bekanntes Protein an die zytoplasmatische Toll-Domäne der Rezeptoren. Als Modulator oder Ankerprotein ermöglicht es die Phosphorylierung der IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase 1 (IRAK-1) [84]. Diese stellt eine Serin-Threonin-Kinase dar und bindet an die zytoplasmatische Domäne des IL-1RAcP im Fall von IL-1 β bzw. an den IL-18R β im Fall von IL-18 [84].

Die Familie der humanen IRAK-Proteine umfasst neben IRAK-1 noch weitere Mitglieder. IRAK-2 und IRAK-M besitzen keine Kinasefunktion wie IRAK-1 und sind nicht an der Signalübermittlung von IL-1 β und IL-18 beteiligt. IRAK-4 ist eine aktive Proteinkinase und besitzt die Fähigkeit, Signalwege für NF κ B und MAPK zu aktivieren. Wie IRAK-1 ist auch IRAK-4 zur Autophosphorylierung fähig. In der Kette der Signalübermittlung von IL-1 β und

IL-18 fungiert IRAK-4 oberhalb von IRAK-1. IRAK-4 kann ein Fehlen von IRAK-1 nicht kompensieren und dient möglicherweise der Aktivierung von IRAK-1. Hierbei ist IRAK-1 das Substrat für IRAK-4 und wird phosphoryliert. IRAK-4 assoziiert nur vorübergehend mit dem IRAK-1-TRAF-6-Komplex. Experimente haben jedoch gezeigt, dass es für die Vermittlung des IL-1 β - und IL-18-Signals eine Schlüsselrolle übernimmt. So zeigten IRAK-1 (-/-) Mäuse eine schwere Beeinträchtigung, jedoch keine vollständige Unterdrückung der IL-1-Antwort [130]. Bei IRAK-4 (-/-) Mäusen blieben die IL-1- bzw. die IL-18-Antwort vollständig aus. IRAK-4 ist somit wesentlich verantwortlich für die vollständige Signaltransduktion dieser beiden Zytokine [129].

Nach seiner Phosphorylierung dissoziiert IRAK-1 vom Rezeptorkomplex und assoziiert mit einem weiteren zytoplasmatischen Protein, dem TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF-6) [131]. TRAF-6 führt zur Aktivierung der I κ B-Kinasen IKK-1 und IKK-2 [132]. Das phosphorylierte I κ B wird über einen Ubiquitin-abhängigen Weg abgebaut, wobei das NF κ B freigesetzt wird, in den Zellkern eindringen kann und dort die Transkription beeinflusst. Die Beteiligung von Caspase-1 und der Caspase-1 abhängigen Interleukine an der Aktivierung von NF κ B konnte am Modell der fokalen zerebralen Ischämie nachgewiesen werden. Eine frühe NF κ B-Aktivierung ist bei Caspase-1 defizienten Mäusen nicht beobachtet worden [133]. Neben NF κ B werden auch p38 mitogen aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK), Jun-N-terminale Kinasen (JNK's) und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 aktiviert und damit weitere Signalwege ausgelöst. IL-1 β und IL-18 aktivieren somit meist Proteinkinasen, welche Serin- und Threoninresiduen phosphorylieren. Dies resultiert auch in der Phosphorylierung von Tyrosinresiduen oberhalb des Signalweges liegender MAP-Kinasen - die Vielfältigkeit der möglichen Wege und Beeinflussung ist bisher noch nicht vollständig geklärt [84].

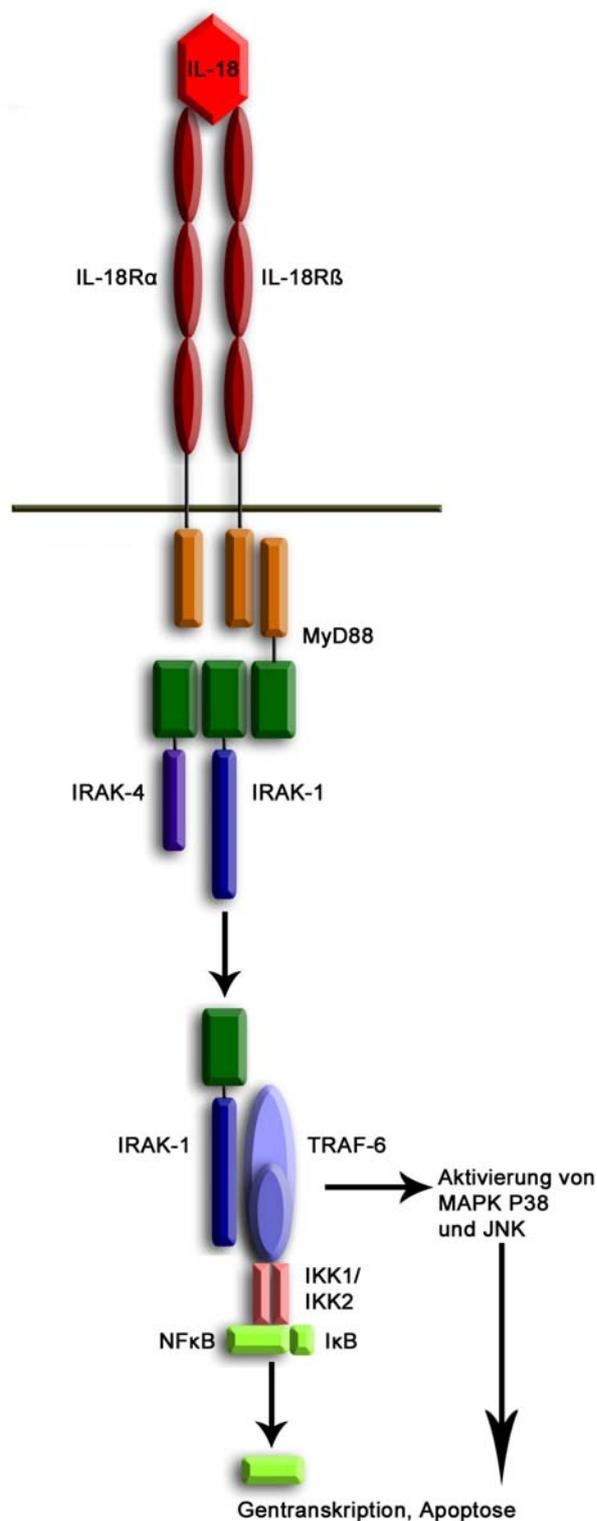


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung der Proteinkaskade für die Signaltransduktion des Interleukin-18.

Nach Bindung des Liganden IL-18 an seinen Rezeptor wird eine intrazelluläre Proteinkaskade aktiviert, welche in letzter Konsequenz die Gentranskription moduliert und apoptotische Prozesse auslösen kann. Die Signalkette für Interleukin-1 β unterscheidet sich nur anhand der spezifischen Rezeptorketten IL-1RI und IL-1RAcP, nachfolgende Schritte der Transduktion entsprechen der des IL-18.

1.4. IL-18 Bindungsprotein

Das *IL-18 binding protein* (IL-18BP, 38kDa) stellt einen extrazellulären, löslichen Rezeptor dar, welcher auch unter physiologischen Umständen im ZNS exprimiert und sezerniert wird. IL-18BP bindet IL-18 mit hoher Affinität (Dissoziationskonstante 400pM), vermittelt jedoch aufgrund des Fehlens einer transmembranaen Komponente kein Signal, blockiert somit die biologische Aktivität des IL-18 und übernimmt vermutlich eine ähnliche Funktion wie der IL-1RII für die Signalübermittlung beim IL-1 [134, 135]. Auch weist es im Gegensatz zu allen anderen bekannten Mitgliedern der IL-1-Rezeptorfamilie, welche jeweils drei Immunglobulinähnliche Domänen besitzen, nur eine solche Domäne auf. Die besondere Bedeutung des IL-18-BP liegt in der Herunterregulation der frühen Phase der Immunantwort durch Verhindern der IL-18 vermittelten verstärkten IFN- γ -Produktion durch T-Helferzellen [108]. Verstärkte Expression von IL-18BP findet man in immunologisch aktiven Organen. Unterschieden werden, durch alternatives Splicing gebildete, vier Isotypen des humanen und zwei Formen des murinen IL-18BP [134]. Die Neutralisierung des IL-18 kann jedoch nur dann erfolgen, wenn die Immunglobulinkomponente erhalten ist, wie zum Beispiel beim humanen IL-18BP_a und IL-18BP_c [84]. Bemerkenswert hierbei ist die Fähigkeit des humanen IL-18BP, sowohl humanes als auch murines IL-18 zu neutralisieren [105]. Die Regulierung der IL-18BP-Genexpression ist noch nicht bekannt, vermutlich findet sie IFN- γ vermittelt statt.

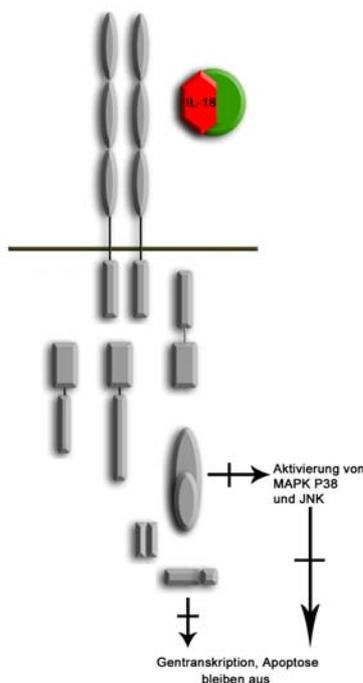


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der Wirkung des IL-18-Bindungsproteins entsprechend Abbildung 1.1.. IL-18BP fungiert als hochaffiner Fänger und neutralisiert so die Wirkung des IL-18. Mit fehlender Ligand-Rezeptor-Bindung bleibt die Aktivierung der intrazellulären Proteinkette aus. Die Signalübermittlung wird unterbrochen.

1.5. Die Phase des beschleunigten Hirnwachstums

Das Gehirn entwickelt sich in der prä- als auch postnatalen Zeit nicht kontinuierlich in der gleichen Geschwindigkeit. Bemerkenswert ist eine Phase des besonders schnell voranschreitenden Wachstums, welche bei verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindet. Beschrieben wurde diese Phase erstmals von Dobbing und Sands als *brain growth spurt period*. Sie ist definiert durch forcierte Zelldifferenzierung und -migration, Synaptogenese aber auch physiologische Apoptose [136-138]. In dieser Periode ist das noch unreife Gehirn verstärkt vulnerabel gegenüber exogenen Einflüssen. Temporäre Hypoxämie-Ischämie, Traumata oder das Einwirken pharmakologischer Substanzen wie Anästhetika oder Antikonvulsiva stellen potenziell schädigende Faktoren dar und können einen pathologisch verstärkten neuronalen Zelluntergang bewirken [139-141]. Beim Menschen vollzieht sich die Periode des rapiden Hirnwachstums vom Beginn des letzten Trimesters der Schwangerschaft bis zum dritten Lebensmonat. Die höchste Geschwindigkeit von Wachstum, Umsatz und Differenzierung und damit auch die vulnerable Phase fallen auf den Zeitraum der Geburt. Ratten hingegen zeigen das schnellste Hirnwachstum in den ersten zwei postnatalen Lebenswochen, wobei Maximalwerte zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag erreicht werden. Für jede Spezies lässt sich eine individuelle Kurve erstellen. Tiermodelle, welche für die Erforschung von Phänomenen genutzt werden, die im Zeitrahmen des *brain growth spurt* stattfinden, müssen dies berücksichtigen und in der jeweiligen ontogenetisch entsprechenden Periode stattfinden, um vergleichbar zu sein.

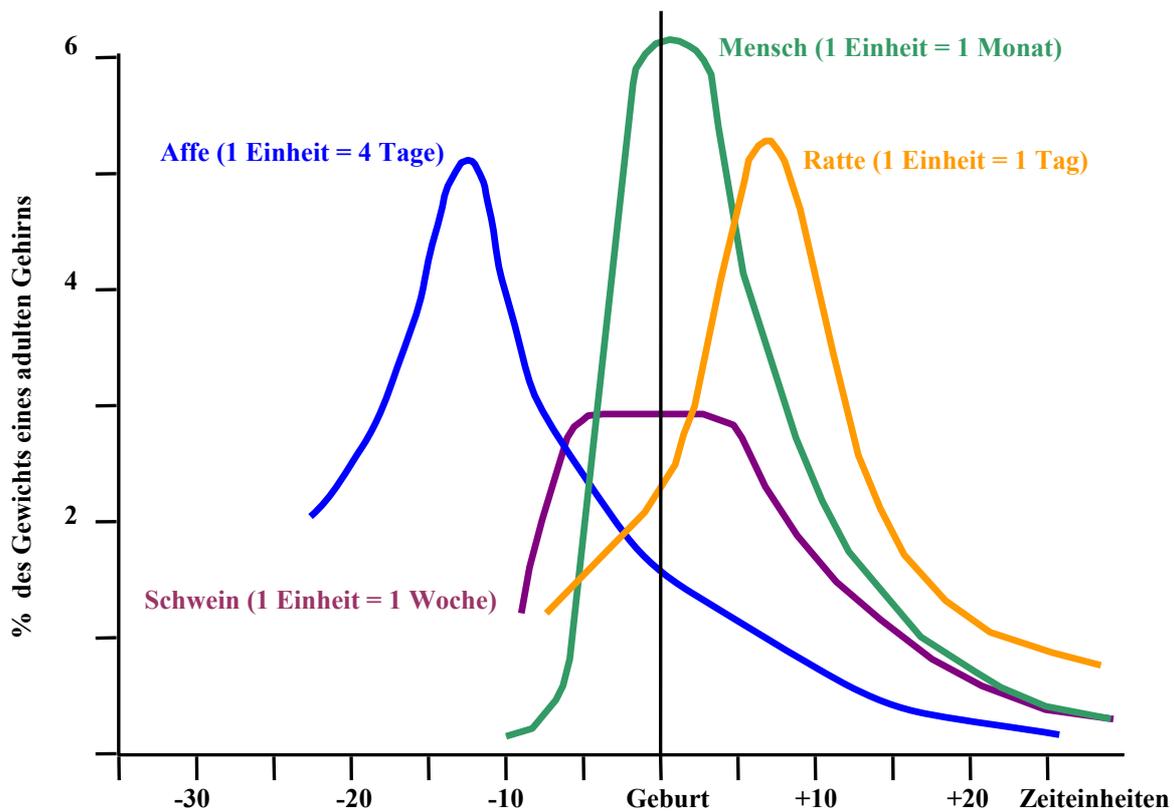


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung von Geschwindigkeit der Hirnentwicklung in Abhängigkeit vom Alter – *Brain growth spurt period*. Hohe Wachstumsgeschwindigkeiten korrelieren mit hoher Vulnerabilität [138].

1.6. Der programmierte Zelltod

Die Differenzierung unterschiedlicher Gewebe und Organe in der Wachstumsphase hängt, wie der Erhalt und die Involution verschiedener Organe, von physiologischen und pathologischen Einflüssen, von Prozessen der Zellproliferation und –differenzierung ab. Vor allem in der Embryonalentwicklung sind weitere Mechanismen notwendig, in denen körpereigene Zellen kontrolliert eliminiert werden. Dies wird als Apoptose bezeichnet. Apoptose ist im Gegensatz zu nekrotischen Vorgängen, welche oft mit inflammatorischen Prozessen einhergehen, ein durch biologische Faktoren stimulierter Vorgang des endogenen Zelltods. Bei der Apoptose sterben in einem sonst gesunden Organ einzelne Zellen ab. Im Gewebe findet sich ein disseminierter Zelltod. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der es früh zu einer Zellschwellung und erst spät zum

DNA-Verlust kommt, ist die Apoptose ein energieabhängiger Vorgang mit gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese. Es kommt zunächst zu einer Kondensation von Nukleo- und Zellplasma und einer frühen Fragmentation der DNA. Abbauprodukte der Zelle werden in apoptotischen Körperchen abgeschnürt, welche von Makrophagen abgeräumt werden [142].

Die Hirnreifung ist geprägt von Proliferation, Differenzierung und physiologischer Apoptose. Es finden sich die gleichen morphologischen Veränderungen wie in anderen Zellen des Körpers [143]. Die Auslöser apoptotischer Prozesse sind unterschiedlicher Art: Neben zelleigenen internen Auslösern werden exogene Stressoren, vor allem oxidativer Stress, diskutiert. Sie wählen zunächst verschiedene Signalwege und führen über die Aktivierung der gleichen Effektoren zum kontrollierten Zelltod. Diese Auslöser gehören zur weiter oben bereits beschriebenen Proteinfamilie der Caspasen und sind sowohl in extrinsisch als auch intrinsisch hervorgerufene apoptotische Wege involviert. Bedeutende Funktion kommt der Effektor-caspase-3 zu, welche nach ihrer Aktivierung so genannte Todessubstanzen spaltet, die dann in Prozesse wie Zellzyklus und DNA-Reparatur eingreifen und über eine DNA-Fragmentierung den kontrollierten Zelltod einleiten. Die Caspase-3 wird daher als Charakteristikum für apoptotische Prozesse angesehen [144]. Verschiedene Proteinkinasen werden aktiviert und nehmen Einfluss auf Transkriptionsfaktoren, welche schließlich auf Transkriptionsebene die Produktion proapoptotischer Substanzen regulieren.

1.7. Zentrale Fragestellung

Tierexperimentelle Arbeiten legen den Verdacht nahe, dass ein Überangebot von Sauerstoff auch im neonatalen, humanen Gehirn eine verstärkte Neurodegeneration hervorruft. Welchen Einfluss inflammatorische Zytokine im Modell der Hyperoxie haben, ist nicht hinreichend geklärt.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der beiden Caspase-1 abhängigen Zytokine IL-1 β und IL-18 auf die hyperoxie-vermittelte Neurodegeneration im unreifen Gehirn von Nagetieren innerhalb der ersten Lebenswoche. In histologischen Arbeiten wird das Vorkommen von IL-18, IL-18R α und Caspase-3 im neonatalen Rattenhirn auch unter hyperoxischen Bedingungen erarbeitet. Anhand molekularbiologischer Verfahren wird das Verhalten der Genexpression von Caspase-1, IL-1 β , IL-18 und IL-18R α im Hyperoxiemodell geprüft.

Effekte einer pharmakologischen Unterbrechung der Signalübermittlung von IL-18 mit Hilfe des IL-18BP werden in histologischen Arbeiten gezeigt. Versuche mit IRAK-4 defizienten Mäusen ermöglichen die Beurteilung der gemeinsamen Wirkung von IL-1 β und IL-18 auf der Suche nach möglichen Angriffspunkten zur Inhibition der Caspase-1 vermittelten Signaltransduktionskaskade.