

ABKÜRZUNGEN

A. dest	Aqua destillatum
Abb.	Abbildung
ABC-Methode	konjugierte Avidin-Biotin-Methode
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
APP	amyloid-precursor-protein
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CCII	controlled cortical impact injury
CNP	2'3'-cyclic nucleotide 3'phosphohydrolase
CPP	cerebraler Perfusionsdruck
CVK	Campus Virchow Klinikum
Cy2	Indocarbocyanin
Cy3	Carbocyanin
d.	Tag/Tage
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminbenzidin
DHBG	(s)-3,5-Dihydroxyphenylglycine
EAAC	excitatory amino acid carrier
EAAT	excitatory amino acid transporter
EDB	Epiduralblutung
Fab	fragment, antigen binding
Fc	fragment crystalline
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLAST	glutamate aspartate transporter
GLT	glutamate transporter
GTRAP	glutamatetransporter-associated-protein
h	Stunde/Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase

ICD	International Classification of Diseases
ICP	intrakranieller Druck
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Inc.	incorporation
J.	Jahr/Jahre
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	mitogen-activated-protein-kinase
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute/Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mm ²	Quadratmillimeter
Mon.	Monat/Monate
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	Anzahl
NF-kappaB	nukleärer Transkriptionsfaktor-kappaB
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
NS	Normalserum
PAC-R	PACAP-Rezeptor
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PAK	Primärantikörper
PBS	puffer based saline
RT	Raumtemperatur
s. (a.)	siehe (auch)
SAB	Subarachnoidalblutung
SAK	Sekundärantikörper
SDB	Subduralblutung
SHT	Schädel-Hirntrauma
sog.	sogenannter/ sogenanntes
Tab.	Tabelle

TBI	traumatic brain injury
TNF	tumor necrosis factor
Ü-Zeit	Überlebenszeit
v. Chr.	vor Christus
VIP	vasoactive intestinal peptide
W	Watt
x0,25 / x0,75	untere Quartile / obere Quartile
ZNS	zentrales Nervensystem
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

1. EINLEITUNG

1.1. Das Schädel-Hirntrauma

Schädel-Hirnverletzungen stellten schon immer eine Herausforderung dar - nicht nur für die moderne Medizin: Bis in das 17. Jahrhundert v. Chr. lassen sich schriftlich fixierte Behandlungskonzepte nachverfolgen. So finden sich schon in dem ägyptischen Papyrus Edwin Smith aus der 17. Dynastie, der Kopie eines verloren gegangenen älteren Textes, Abhandlungen über die Therapie von Schädelverletzungen (Breasted, 1922).

Zweifelsohne erhöhte die Zunahme des motorisierten Verkehrs zu Beginn des letzten Jahrhunderts entscheidend die Inzidenz von Schädel-Hirnverletzungen. So wurden 1910 acht Prozent aller stationär aufgenommenen Unfallopfer wegen eines Schädel-Hirntraumas behandelt (Schück, 1928). 60 Jahre später betrug der Anteil schon 30 Prozent (Franke, 1972).

Jährlich erleiden in Deutschland durchschnittlich 800 Patienten pro 100 000 Einwohner eine Schädel-Hirnverletzung; ein Drittel der Betroffenen ist intensivstationspflichtig und fünf Prozent versterben (Sollmann, 1997). Männer sind durchschnittlich dreimal so häufig wie Frauen betroffen. Der Anteil an Kindern und Jugendlichen unter den Patienten ist besonders hoch, das Schädel-Hirntrauma stellt sogar die häufigste Todesursache junger Erwachsener dar (Sollmann, 1997). Allein in Berlin starben im Jahre 2004 39 Menschen, bei denen die Diagnose intrakranielle Verletzung (ICD-10: S06) als todesursächlich angesehen wurde (Statistisches Jahrbuch Berlin, 2005).

Verantwortlich für Schädel-Hirnverletzungen sind in 72 Prozent Verkehrsunfälle, in zehn Prozent häusliche Unfälle, in acht Prozent Arbeitsunfälle, in sechs Prozent Sportunfälle und in vier Prozent sonstige Unfälle (Sollmann, 1997).

Die Prognose des schweren Schädel-Hirntraumas, bei dem die Patienten definitionsgemäß anhaltend bewusstlos sind, hat sich trotz großer Anstrengungen sowohl in der präklinischen Notfall- als auch in der klinischen Intensivmedizin in den vergangenen zehn Jahren nicht verbessert. Es ist nach wie vor mit hoher Letalität bzw. Langzeitinvalidität behaftet und führt nur in 50 Prozent zu einem guten Outcome mit Wiedereingliederung der Patienten in ein normales Leben (Thomas et al., 2000). Aufgrund dieser Tatsache, aber auch angesichts der hohen sozioökonomischen Folgekosten ist es unerlässlich, experimentell und klinisch weitere Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Therapie des Schädel-Hirntraumas zu gewinnen.

1.2. Einführung

Man differenziert beim Schädel-Hirntrauma zwischen dem primären Hirnschaden und dem sekundären Hirnschaden.

Zu den primären Schädigungen werden die Folgen der direkten mechanischen Gewalteinwirkung wie zum Beispiel die Kontusion gezählt. Dabei scheint es sich um eine funktionelle Störung zu handeln, die sich zu frühen Überlebenszeitpunkten noch nicht morphologisch manifestiert, sondern vielmehr in einer Störung der Zellmembranintegrität (sogenannte „Mechanoporation“) besteht (Graham et al., 2002).

Der Begriff des sekundären Hirnschadens fasst verschiedene pathophysiologische Abläufe der posttraumatischen Frühphase zusammen, die eine Verschlimmerung des primären Schadens bewirken. Hierzu zählt man den durch Kalzium vermittelten Schaden, die vermehrte Bildung von freien Radikalen, Rezeptordysfunktionen, entzündliche Veränderungen, Hypoxie, absolute oder relative Ischämie und Ödembildung Stunden oder Tage nach dem eigentlichen Trauma (Graham et al., 2002). Zwischen den einzelnen pathogenetischen Mechanismen der sekundären Hirnschädigung bestehen zahlreiche und vielfältige Wechselwirkungen.

Die progressiven sekundären Hirnschädigungen bestimmen wesentlich die Prognose von Patienten mit Schädel-Hirntrauma und stellen gleichzeitig den Angriffspunkt für therapeutische Bemühungen dar; klinisch beschränkt sich dies heutzutage vor allem auf die aggressive Vermeidung und Therapie von Hypotonie und Hypoxie. Jedoch gibt es auch hier noch keinen „Goldstandard“ im Sinne der evidence based medicine. So wird beispielsweise die optimale Höhe des cerebralen Perfusionsdruckes (CPP), der sich aus der Subtraktion des intrakraniellen Druckes (ICP) vom mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) errechnet, kontrovers diskutiert. Es gilt in jedem Fall zu bedenken, dass es in der Frühphase nach Schädel-Hirntrauma zu einer strukturellen und funktionellen Schädigung lokaler Gefäße kommt (Daneyemez, 1999). Diese Störung der Blut-Hirn-Schranke könnte mit einem erhöhten Risiko für Gewebseinblutungen verbunden sein. Es gibt derzeit noch keine suffizienten Therapiekonzepte für die Behandlung vieler pathophysiologischer Abläufe nach einem Schädel-Hirntrauma (Thomas et al., 2000).

Einer der Schlüsselmechanismen der sekundären Hirnschädigung ist die Dysregulation der extrazellulären Glutamatkonzentration (Graham et al., 2002).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Konzentration des extrazellulären Glutamats durch energieabhängige, natrium- und kaliumgekoppelte gliale und neuronale Glutamattransporter reguliert (Danbolt et al., 1994; Danbolt, 2001).

Im Folgenden wird nun näher auf die Besonderheiten der Glutathomöostase und deren Regulation durch die Glutamattransporter sowie auf die Folgen einer Störung dieses Gleichgewichtes eingegangen und so ein zentraler Aspekt der progressiven sekundären Schädigung nach Schädel-Hirnverletzungen näher beleuchtet.

1.3. Glutathomöostase und Glutamattransporter

1.3.1. Glutamat

Die Aminosäure L-Glutamat ist der führende exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem der Säugetiere. Glutamat ist im Gehirn wahrscheinlich an nahezu allen physiologischen Abläufen - wie Kognition, Gedächtnis und Lernen - beteiligt (Danbolt, 2001).

Wichtige Aufgaben erfüllt es auch bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (McDonald and Johnston, 1990; Vallano, 1998). So beeinflusst Glutamat das Auswachsen der neuronalen Fortsätze (Pearce et al., 1987; Rajan and Cline, 1998), die GABAerge Aktivität (van den Pol et al., 1998) oder die Migration von Neuronen (Komuro and Rakic, 1993; Rossi and Slater, 1993). Auch in peripheren Organen und Geweben sowie im Endokrinium ist Glutamat ein unverzichtbarer Transmitter. Es entfaltet seine Wirkung über verschiedene Subtypen von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren (O'Shea, 2002; Danbolt, 2001).

Eine Störung der Glutathomöostase ist jedoch auch an vielen pathophysiologischen Zuständen des zentralen Nervensystems beteiligt: Epilepsie, amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, zerebrale Ischämie, Schizophrenie und das Schädel-Hirntrauma sind hier zu nennen (Danbolt, 2001).

Die normale extrazelluläre Glutamatkonzentration liegt im mikromolaren Bereich (1-3 μM), während intrazellulär millimolare Konzentrationen (10-100 mM) vorliegen (Storm-Mathisen et al., 1992). Um dieses Konzentrationsgefälle aufrecht erhalten zu können, bedarf es eines energieabhängigen Transportsystems, das zur Wiederaufnahme des synaptisch freigesetzten Glutamats führt. Die natrium- und kaliumgekoppelten Glutamattransporter sind in der Lage, das intrazelluläre Glutamat auf das 10000-fache

gegenüber dem Extrazellulärraum zu konzentrieren (Kanner and Schuldiner, 1987; Nicholls and Attwell, 1990).

Eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration ist neurotoxisch und führt zum Untergang von Neuronen (Olney, 1969; Choi, 1992; Mukhin et al., 1996). Dies wird als Exzitotoxizität bezeichnet.

1.3.2. Glutamattransporter

Bis jetzt gelang es, fünf „high affinity“-Glutamattransporter zu identifizieren: GLAST/EAAT1 (Storck et al., 1992), GLT-1/EAAT2 (Pines et al., 1992), EAAC1/EAAT3 (Kanai and Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) und EAAT5 (Arriza et al., 1997).

Die humanen Transporter EAAT1 und EAAT2 weisen eine hohe Homologie zu den bei der Ratte als GLAST bzw. GLT-1 bezeichneten Transportern auf (Storck et al., 1992; Pines et al., 1992). Nachfolgend wird zur Vereinfachung, unabhängig von der Spezies, ausschließlich die EAAT (excitatory amino acid transporter) -Nomenklatur benutzt.

EAAT2 ist vorwiegend auf den motorischen Kortex, den Hippocampus und die Basalganglien beschränkt. EAAT1 findet man im Cerebellum, im frontalen Kortex, im Hippocampus sowie den Basalganglien (Lehre et al., 1995).

EAAT3 findet sich vor allem im Hippocampus, im Kleinhirn und in den Basalganglien (Conti et al., 1998; Kugler and Schmitt, 1999), allerdings in einer weit niedrigeren Konzentration als die Erstgenannten (Haugeto et al., 1996). EAAT4 wird von den Purkinje-Zellen des Cerebellums exprimiert (Fairman et al., 1995). EAAT5 wird in spezialisierten Astrozyten (sog. Müller-Glia) der Retina gefunden (Arriza et al., 1997).

Im Folgenden möchte ich ausschließlich auf EAAT1 und EAAT2 eingehen, da diese den größten Anteil an der Glutamatclearance aus dem Extrazellulärraum haben (Rothstein et al., 1996; Haugeto et al., 1996; Amara and Fontana, 2002).

EAAT1 und EAAT2 sind vorwiegend in der astrozytären Plasmamembran zu finden (Chaudhry et al., 1995; Danbolt et al., 1992; Levy et al., 1993; Rothstein et al., 1994). Astrozyten scheinen beide Proteine zu coexprimieren (Lehre et al., 1995).

Für EAAT2 gilt, dass es zwar im reifen zentralen Nervensystem nicht von Neuronen exprimiert wird, wohl aber während der Entwicklung, in Zellkulturen und in pathologisch verändertem Gewebe (Danbolt, 2001).

Eine Variante von EAAT2 wird auch präsynaptisch von Neuronen exprimiert (Schmitt et al., 2002) und scheint damit zur präsynaptischen Aufnahme von Glutamat in Neuronen beizutragen (O'Shea, 2002). Eine andere wichtige Rolle spielen neuronale EAATs auch bei der Aufnahme von Cystein für die Glutathionsynthese (Chen and Swanson, 2003).

1.3.2.1. Regulation der Glutamattransporter

Die Expression und die funktionelle Aktivität der Glutamattransporter wird durch eine Vielzahl endogener Faktoren moduliert, darunter auch von Glutamat und Glutamat-Analoga selbst (O'Shea, 2002).

Auch die Rezeptoren für Glutamat haben Einfluss auf die Exprimierung der Glutamattransporter. So konnte eine erhöhte EAAT-Expression in Astrozytenzellkulturen festgestellt werden, wenn diese mit spezifischen ionotropen- oder metabotropen Glutamatrezeptoragonisten der Gruppe II behandelt wurden (Gegelashvili and Schousboe, 1997; Gegelashvili et al., 2000). Gegensätzlich war das Ergebnis, wenn die Astrozytenkulturen mit DHPG ((S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine), einem Agonisten der metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I mGluR1 und mGluR5, behandelt wurden. Hier zeigte sich eine Downregulation von EAAT1 (Gegelashvili et al., 2000).

Die Glutamattransporter werden auch durch andere Proteine wie zum Beispiel die sogenannten GTRAPs (glutamatetransporter-associated-proteins) beeinflusst. EAAT4 wird beispielsweise durch GTRAP41 und GTRAP48 in seiner Zelloberflächenexpression verstärkt (Jackson et al., 2001). EAAT3 hingegen wird durch GTRAP3-18 negativ moduliert und seine Glutamataufnahmefähigkeit nimmt deutlich ab (Lin et al., 2001). Die Entdeckung neuer regulierender Proteine könnte wertvolle Informationen über die endogene Regulation von EAAT liefern und so ein interessantes Ziel für die pharmakologische Beeinflussung der Glutamathomöostase sein (O'Shea, 2002).

Eine weitere Möglichkeit der EAAT-Aktivitätsregulierung scheinen die Kinasen darzustellen: Proteinkinase C (Davis et al., 1998; Lortet et al., 1999), Proteinkinase A (Lortet et al., 1999) und Phosphatidylinositol 3-Kinase (Sims et al., 2000; Davis et al., 1998; Zeleniaia et al., 2000) erhöhen die Aktivität und/ oder die Zelloberflächenexpression der EAATs. Substanzen, die nicht direkt am Glutamatrezeptor oder am Glutamattransporter angreifen, üben ihre regulatorische Funktion über Kinasen aus. Als Beispiele wären hier der platelet derived growth factor, der epidermal growth factor und der insulin-like growth factor zu nennen (O'Shea, 2002).

Auch PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) ist eine dieser Substanzen und verstärkt über Proteinkinase A und Proteinkinase C die Expression von EAAT1 und EAAT2 (Figiel and Engele, 2000). Dieses Polypeptid steht mit den Glutamattransportern im Zentrum dieser Arbeit und wird deshalb näher erläutert.

1.4. PACAP

PACAP ist ein Mitglied der Sekretin/Glucagon/VIP (vasoactive intestinal peptide)-Familie und gehört zu den regulatorischen Peptiden (Arimura, 1992).

Entdeckt wurde es im Jahre 1989 (Miyata et al., 1989). PACAP wird im gesamten zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert (Jaworski, 2000) und beeinflusst das Aussprossen von Neuriten, am ehesten über Aktivierung der Adenylatcyclase bei kultivierten Neuroblasten der Ratte (Gonzalez et al., 1997), die Produktion von Neuropeptiden und Neurotransmittern (May and Braas, 1995) und die neuronale Proliferation (Lu and Cicco-Bloom, 1997; Villalba et al., 1997). Zusätzlich besitzt PACAP immunmodulatorische Eigenschaften, so wirkt es antiinflammatorisch auf aktivierte Mikroglia (Delgado, 2002). In der Histiogenese des zentralen Nervensystem verstärkt es die Differenzierung kortikaler Neuroblasten (Lu and Cicco-Bloom, 1997) und bewahrt unreife Körnerzellen des Kleinhirns vor dem Untergang (Gonzalez et al., 1997; Vaudry et al., 1999).

Es lassen sich zwei biologisch aktive Formen unterscheiden: PACAP38, die vorherrschende Form im Nervensystem, und PACAP27, welches aus dem alternativen, posttranslationalen Splicen entsteht (Figiel and Engele, 2000).

PACAP, das neuronal freigesetzt wird, entfaltet seine Wirkung über die PACAP-Rezeptoren. Drei verschiedene Rezeptoren wurden bisher beschrieben. Der PAC1-Rezeptor hat die größte Affinität zu PACAP und bindet das verwandte VIP nur schwach, während die anderen beiden Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 eine hohe Affinität für PACAP und VIP aufweisen (Figiel and Engele, 2000). Mehrere Splicevarianten des PAC1-Rezeptors sind beschrieben worden, die mit der Selektivität des Rezeptors für PACAP38 und PACAP27 assoziiert werden (Pantaloni et al., 1996; Pisegna and Wank, 1996; Vaudry et al., 2000).

PACAP kann durch nachfolgende differentielle Aktivierung der Proteinkinase A und C über die erwähnten PAC1-Rezeptoren neben der Expressionserhöhung der Glutaminsynthase eine Steigerung des Glutamattransports und der Expression der

glialen Glutamattransporterproteine EAAT1 und EAAT2 induzieren (Figiel and Engele, 2000).

1.5. Störung der Glutathomöostase nach Hirntrauma

1.5.1. Exzitotoxizität

In mehreren Arbeiten, die verschiedene tierexperimentelle Traumamodelle verwendeten, wurde ein akuter und ausgeprägter posttraumatischer Anstieg der extrazellulären exzitatorischen Aminosäuren, insbesondere des Glutamats, beschrieben (Hagberg et al., 1985; Faden et al., 1989; Katayama et al., 1990; Nilsson et al., 1990; Palmer et al., 1993; Tanaka et al., 1994; Koizumi et al., 1997; van Landeghem et al., 2001). Auch beim Menschen konnten erhöhte Konzentrationen von exzitatorischen Aminosäuren im Liquor von Patienten mit Schädel-Hirntraumata nachgewiesen werden (Zhang et al., 2001). Die erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentrationen sind auf eine vermehrte präsynaptische Freisetzung (Graham et al., 1993; Slusher et al., 1999), eine posttraumatische Depolarisation, eine Störung der energetischen Homöostase und der Ionenhomöostase (Volterra et al., 1994) sowie auf einen posttraumatischen Zelluntergang zurückzuführen. Daneben ist die Wiederaufnahme des Glutamats zum Beispiel in Folge der Inhibierung durch freie Sauerstoffradikale erheblich gestört (Gegelashvili and Schousboe, 1997; Rao et al., 1998; van Landeghem et al., 2001). Hypothetisch könnte es auch zu einer posttraumatischen Umkehr des Glutamattransports kommen (Rossi et al., 2000) - das Vorliegen einer solchen Transportumkehr wurde nach experimentellem Hirntrauma bisher noch nicht untersucht (Rao et al., 2001a; Rao et al., 2001b).

Eine exzessive Aktivierung der Glutamatrezeptoren führt zu Nervenzellschädigungen bis hin zum irreversiblen Untergang. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Exzitotoxizität“ (Olney, 1969; Choi, 1992; Mukhin et al., 1996). Vermittelt wird die Exzitotoxizität über ionotrope NMDA-Rezeptoren (Schubert and Piasecki, 2001). Daneben kommt es auch bei der Aktivierung der metabotropen Rezeptoren der Gruppe I zu einer verstärkten Nervenzellschädigung nach Trauma oder Ischämie, während die Aktivierung der Gruppe II- und Gruppe III-Rezeptoren eher neuroprotektiv wirkt (Allen et al., 1999).

Die Mechanismen, die letztendlich zum exzitotoxischen Untergang von Zellen führen, sind komplex und umfassen unter anderem einen intrazellulären Kalziumanstieg, die Aktivierung von potenziell destruktiven biochemischen Abläufen (z. B. Aktivierung von Kinasen, Lipasen und Proteasen), die Entstehung von freien Radikalen, das Anlaufen der inflammatorischen Kaskaden und Genaktivierungen (O'Shea, 2002).

Eine weitere Erklärung für die nervenzellschädigende Wirkung des Glutamats gibt die Hypothese der „oxidativen Glutamattoxizität“. Hohe extrazelluläre Glutamatkonzentrationen inhibieren den Cystein/Glutamat-Antiporter, sodass die Aufnahme von Cystein und konsekutiv die Glutathionsynthese stark vermindert wird. Infolge des oxidativen Stresses kommt es zum Zelluntergang (Schubert and Piasecki, 2001).

1.5.2. Die Rolle der Glutamattransporter in der Pathologie des Hirntraumas

Um die Frage zu klären, welche Rolle die glialen Glutamattransporter in der Pathologie des Schädel-Hirntraumas spielen, war es sinnvoll, sie zunächst auszuschalten, um dann die Folgen der Inaktivierung untersuchen zu können.

Rothstein et al. inhibierten pharmakologisch in Zellkulturen die Transporter und konnten eine ausgeprägte Nervenzellschädigung feststellen (Rothstein et al., 1993). An Mäusen, bei denen die glialen Glutamattransporter selektiv inhibiert wurden, konnte man neurodegenerative Veränderungen, motorische Defizite und epileptische Anfälle beobachten (Rothstein et al., 1996).

EAAT1- bzw. EAAT2-Defizienz in Mäusen erhöht die Vulnerabilität bezüglich des Sekundärschadens nach Hirntrauma (Tanaka et al., 1997; Watase et al., 1998). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die funktionelle Ausschaltung durch antisense-Oligodeoxynukleotide von EAAT2 den hippocampalen Nervenzellschaden nach CCII (controlled cortical impact injury) vergrößert (Rao et al., 2001a). Während die Ausschaltung von EAAT2 eine Verschlechterung des neurologischen Outcomes in einem experimentellen Ischämiemodell bewirkte, hatte die Ausschaltung des neuronalen Glutamattransporters EAAC1 keine Auswirkung (Rao et al., 2001b).

Die Ergebnisse dieser Studien unterstreichen den neuroprotektiven Stellenwert der Aufrechterhaltung eines suffizienten Glutamattransportes nach experimentellem Hirntrauma.

1.5.3. Die Rolle von PACAP in der Pathologie des Hirntraumas

1.5.3.1. Neuroprotektive Wirkungen von PACAP

In vitro schwächen PACAP38 und PACAP27 die glutamatinduzierte verzögerte Neurotoxizität in retinalen Nervenzellkulturen ab (Shoge et al., 1999).

Bei der Untersuchung von Rattenhirnen nach Okklusion der Arteria cerebri media konnte gezeigt werden, dass das Infarktareal nach Gabe von PACAP38 deutlich verkleinert war (Reglodi et al., 2000). Eine weitere in-vivo-Studie zeigte eine signifikante Dichteabnahme von amyloid-precursor-Protein (APP, als Marker für gestörten axonalen Transport) im cerebrospinalen Trakt nach intraventrikulärer Injektion von PACAP. Zuvor wurden Ratten einem TBI-Model (traumatic brain injury), welches durch Beschleunigungseinwirkung einen diffusen axonalen Schaden induziert, unterzogen. Dies wird als neuroprotektiver Effekt in Hinblick auf den axonalen Schaden gewertet (Farkas et al., 2004).

Seine neuroprotektiven Wirkungen scheint PACAP, zumindest in Teilen, über das Neurotrophin BDNF (brain-derived neurotrophic factor) zu vermitteln. Für diese Hypothese spricht, dass schon geringe Dosen von PACAP38 ausreichen, um zellschützend zu wirken - allerdings nur, solange die Zellkulturen nicht mit einem neutralisierenden Antikörper gegen BDNF inkubiert sind (Frechilla et al., 2001). Ein anderer Ansatz sind die immunmodulatorischen Eigenschaften von PACAP. Es inhibiert die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie TNFalpha, IL-1beta, IL-6, IL-12 und NO (Stickoxid) in aktivierten Mikrogliazellen. Dies geschieht über eine Hemmung der Transkriptionsaktivität von NF-kappaB (Delgado, 2002). Ferner scheint PACAP die Produktion des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 zu stimulieren (Delgado et al., 2002; Delgado et al., 2003). Für die Hypoxie, welche auch konsekutiv im Rahmen des Schädel-Hirntraumas auftreten kann, konnte gezeigt werden, dass PACAP die inflammatorische Aktivierung der Mikroglia vermindert und cocultivierte PC12-Zellen (neuronale Zellen einer Phäochromozytomzelllinie der Ratte) vor mikroglialer Neurotoxizität geschützt werden (Suk et al., 2004). Als möglichen molekularen Angriffspunkt von PACAP sehen die Autoren die p38 MAPK (mitogen-activated-protein kinase) an.

1.6. Zelluläre Reaktionen nach Hirntrauma

Als wesentliche zytologische Reaktion auf ein Trauma kann die gliale Reaktion angesehen werden, diese Zellen sind im ZNS 10- bis 50-mal häufiger als Nervenzellen. Man unterscheidet zwischen Makro- und Mikroglia. Zur Makroglia werden neben Astrozyten und Oligodendrozyten noch Ependymzellen gezählt. Da in dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenz das Verhalten von GFAP (glial fibrillary acidic protein)-positiven Astrozyten und CNP (cyclic nucleotide phosphohydrolase)-positiven Oligodendrozyten untersucht wird, soll auf diese beiden Zelltypen näher eingegangen werden.

1.6.1. Astrozyten

Astrozyten verdanken ihren Namen ihrem sternförmigen Aussehen. Es werden zwei morphologische Hauptformen unterschieden. Fibrilläre Astrozyten weisen lange Fortsätze auf und sind überwiegend in der weißen Substanz zu finden. Protoplasmatische Astrozyten haben kurze Fortsätze und sind bevorzugt in der grauen Substanz lokalisiert. Immunhistochemisch sind Astrozyten durch die Expression der Intermediärfilamente Vimentin (bei undifferenzierten Astrozyten) und GFAP (bei differenzierten Astrozyten) charakterisiert (Thomas, 1998).

Die Aufgaben der Astrozyten sind vielfältig und Gegenstand der aktuellen Forschung. Unter anderem werden phagozytische Aktivität, Produktion von neurotrophen Substanzen, die Induktion der Blut-Hirn-Schranke, eine Rolle als Leitzellen für migrierende Neurone, Aufrechterhaltung des Wasser- und Ionenhaushaltes des Interstitiums, Modulation der synaptischen Aktivität, Aufnahme von Glutamat und Konvertierung zu Glutamin mit anschließender Freisetzung diskutiert (Thomas, 1998; Simard and Nedergaard, 2004) . Astrozyten gelten als Schlüsselzellen in der Clearance von Glutamat via Glutamattransporter aus dem Extrazellulärraum.

1.6.2. Oligodendrozyten

Die meisten Oligodendrozyten sind in der weißen Substanz lokalisiert. Die Oligodendrozyten in der grauen Substanz befinden sich bevorzugt in der Umgebung von Neuronen und werden deshalb als Satellitenzellen bezeichnet. Schon Cajal hypothetisierte eine symbiotische Beziehung zwischen Neuronen und Oligodendrozyten

(Cajal SR y, 1911). Analog zu ihren Gegenstücken in der weißen Substanz exprimieren Satellitenzellen basisches Myelinprotein und myelinassoziiertes Glykoprotein (Ludwin, 1984). Nach Cuprizone-induzierter Demyelinisation ermöglichen Satellitenzellen die Remyelinisation von Axonen in der grauen Substanz (Ludwin, 1979). Frühere in-vitro-Studien legen eine neuroprotektive Funktion der in der grauen Substanz liegenden Oligodendrozyten nahe (Dai et al., 2001; Dai et al., 2003; Gonzalez et al., 1990). Studien belegen das Vorhandensein von EAAT1, EAAT2 und EAAT3 mRNA (Kondo et al., 1995) und Protein (Domercq et al., 1999) in kultivierten Ratten-Oligodendrozyten der weißen Substanz. Eine Expression von EAAT1 und EAAT2 durch kultivierte fetale, humane Oligodendrozyten der weißen Substanz zeigten Pitt et al (Pitt et al., 2003).

1.7. Fragestellung der Arbeit

Die glialen Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 spielen eine zentrale Rolle bei der Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum. Gerade nach Schädel-Hirnverletzungen ist Glutamat dort massiv erhöht und trägt wahrscheinlich maßgeblich zu den sekundären Hirnschädigungen bei. Diese beeinflussen die Prognose des Patienten wesentlich und stellen gleichzeitig den zentralen Angriffspunkt für ärztliche Bemühungen nach Schädel-Hirntrauma dar.

Dehalb wird in dieser Arbeit immunhistochemisch das Expressionsverhalten der glialen Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 sowie der regulierenden Peptide PACAP38 und PACAP27 nach humanem Schädel-Hirntrauma im zeitlichen Verlauf und im Vergleich mit Kontrollen beschrieben.

Zusätzlich wurden an exemplarischen Fällen Doppelmarkierungen von EAAT1, EAAT2, PACAP38 und PACAP27 jeweils mit GFAP und CNP in der Immunfluoreszenz durchgeführt, um die Korrelation von Proteinexpression und der zellulären Reaktionen im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zu Kontrollen zu beschreiben.

Möglicherweise können zukünftig aus diesen und anderen Ergebnissen weitere Erkenntnisse über eine mögliche Beeinflussung der Glutamathomöostase gewonnen und diese in der klinischen Medizin zum Nutzen schädel-hirnverletzter Patienten praktisch umgesetzt werden.