Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern,
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Brandt FRCP

Basalmembran- und Integrinveränderungen nach experimentellem Schädelhirntrauma

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angela Müllner

aus
Gräfelfing

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. G.F. Hamann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. N. Plesnila
	Priv. Doz. Dr. med. M. Neumann
	Prof. Dr. med. W. Lange
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2008

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung 4
1.1. Das klinische Problem des Schädelhirntraumas 4
1.2. Das experimentelle Schädelhirntrauma 5
1.2.1. Das diffuse Schädelhirntrauma 6
1.2.2. Das fokale Schädelhirntrauma 7
1.3. Die Blut-Hirn-Schranke 8
1.3.1. Die Extrazelluläre Matrix 9
1.3.2. Die Basalmembran und ihre Struktur 10
1.3.3. Kollagene- Faser oder Netz ? 11
1.4. Integrine - Zellanker in der Basalmembran 14
1.4.1. Struktur 15
1.4.2. Eigenschaften und Besonderheiten der Integrine 19
1.4.3. Integrine und ihre Rolle bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems 21
1.5. Fokus Basalmembranschäden: Was ist bisher bekannt? Vorarbeiten 23
1.5.1. Kollagen 23
1.5.2. Integrine 26
1.6. Fragenkatalog 29
2. Material und Methoden 30
Experimente 31
2.1. Das Tiermodell des Flüssigkeits-Perkussions-Traumas 31
2.1.2. Experimentelles Modell 33
2.2. SDS- PAGE und Western Blot 35
2.2.1.Grundlagen der SDS-PAGE und des Western Blot 35
2.2.2. Kollagen SDS- PAGE und Western Blot 36
2.2.3. Integrin SDS- PAGE und Western Blot 37
2.2.4. Analyse der Western Blots 38
2.3. Immunhistochemie 38
2.3.1. Grundlagen Immunhistochemie 38
2.3.2. Experimente Immunhistochemie 39
2.3.4. Das OPTIMAS-Bildverarbeitungsprogramm für die Immunhistochemie ... 40
2.3.5. Quantifizierung der Integrinimmunhistochemie: Veränderungen der Integrinfläche und Integrinfärbeintensität mittels Video-imaging Mikroskopie 45
2.4. Statistik 46
3. Ergebnisse: 47
3.1. Kollagen 47

3.1.1. SDS-PAGE und Western Blot 47
3.2. Integrine 49
3.2.1. SDS-PAGE und Western Blot 50
3.2.2. Immunhistochemie 51
4. Diskussion 58
4.1. Kollagen 58
4.1.1. Mögliche Ursachen des Kollagen Typ IV Verlustes nach experimentellem milden SHT im Vergleich zu Schadenskaskaden bei fokaler zerebraler Ischämie nach Arteria cerebri media Okklusion 59
4.1.2. Die Verteilung des Kollagen Typ IV Verlustes im Hirnparenchym 63
4.1.3. Bedeutung des Kollagen Typ IV Verlustes für die chemische Signalübermittlung 66
4.2. Integrine 67
4.2.1. Integrine im fokalen zerebralen Ischämiemodel bei der Ratte und der Vergleich zum experimentellen SHT 68
4.2.2. Die Verteilung des Integrin Verlustes 69
4.2.3. Integrine und Matrix Metalloproteinasen 70
4.2.4. Integrine – aktiv beteiligt? 71
4.3. Ausblick in zukünftige Behandlungsstrategien 73
7. Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit 87
8. Danksagung 88
9. Anhang 89
9.1. Verwendetes Material 89
9.1.1. Geräte 89
9.1.2. Verbrauchsmaterial 90
9.2. Lebenslauf 93
9.3. Verzeichnis der Abkürzungen 95

1. Einleitung

1.1. Das klinische Problem des Schädelhirntraumas

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit mikrovaskulären und molekularen Veränderungen nach Schädelhirntrauma (SHT). Trotz technischer Neuerungen und Schutzvorrichtungen (wie beispielsweise Sicherheitsgurt oder Airbag) kam es nicht zu einer Abnahme der Inzdenz bei SHT, da es vor allem durch die Zunahme von gefährlichen Freizeitaktivitäten, wie Motorradfahren, Fahrradfahren, Skifahren, Snowborden, Drachenfliegen, Bungeeseilspringen etc. zu einer Verschiebung der Unfälle aus dem mittlerweile vergleichsweise sicheren Arbeits- und Verkehrsbereich in den Freizeitbereich kommt. Die Definition des SHT ist in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie nachzulesen und aktualisiert unter http://www.dgn.org: Schädelhirntrauma ist ein Oberbegriff für gedeckte beziehungsweise offene Schädelverletzungen mit Gehirnbeteiligung. Seine Einteilung erfolgt nach dem Schweregrad, bezogen auf die Dauer der posttraumatischen Bewusstlosigkeit. *Leichtes* SHT: bis zu dreißig Minuten bewusstseinsgestört bzw. bewusstlos, 13-15 Glasgow Koma Skala (GCS) etwa dreißig Minuten nach Unfallereignis; *moderates* SHT: 9-12 GCS, Bewusstlosigkeit bis zu einer Stunde; *schweres* SHT: 3-8 GCS, Bewusstlosigkeit länger als 24 Stunden und/oder Auftreten von Hirnstammzeichen.

Bei den in eine Akutklinik in Deutschland überwiesenen Patienten mit einem Schädelhirntrauma ist die Gruppe der Patienten mit leichten SHT mit ca. 80-90% am häufigsten vertreten (Inzidenz je nach Studie von 400-600/100.000 Gesamtbevölkerung Deutschlands), Patienten mit moderaten SHT (Inzidenz je nach Studie 40-50/100.000 Gesamtbevölkerung Deutschlands) und Patienten mit schwerem SHT (Inzidenz je nach Studie 15-20/100.000 Gesamtbevölkerung Deutschlands) mit jeweils 5-15% deutlich seltener[4,12,28,100] (DGN 2007 unter http://www.dgn.org).

Daher stellt nicht nur das schwere SHT, sondern resultierend aus der Inzidenz des SHT auch das leichte bis moderate SHT einen erheblichen und sogar noch schwerwiegenderen sozialmedizinischen Kostenfaktor dar. Studien, die sich mit den Symptomen des milden SHT nach unterschiedlichen Zeitpunkten befasst haben, ergaben zwar ein Verschwinden der meisten Symptome drei Monate nach dem

Unfall bezogen auf alle SHT Patienten, wobei die Mehrzahl der Patienten (70-90% aller Patienten je nach Studie) über eine vollständige Genesung berichtete[4,42,100]. Dennoch zeigte eine Untergruppe von Patienten (10-30% aller Patienten mit SHT, davon 75-90% mit leichtem bis moderatem SHT), drei Monate bis Jahre nach SHT noch erhebliche Schwierigkeiten im Alltag[66,109,128]. Der Einstieg dieser Patienten in das Berufsleben verzögert sich oder wird gar unmöglich. Sie leiden vor allem unter Problemen sensorischer (Geruchs-, Geschmacksstörungen, Licht-, Geräuschempfindlichkeit), vegetativer (Übelkeit, RR-Dysregulation, Schwankschwindel usw.), neurasthenischer (depressive Verstimmungen, erhöhte Reizbarkeit, Schlafstörungen usw.) und neuropsychologischer Art (verminderte Auffassungsgabe, Kurzzeitgedächtnisstörungen, Kopfrechnungen usw.). Einige Patienten zeigen zusätzlich Anzeichen eines Schmerzsyndroms mit Nackensteifigkeit und Kopfschmerz[68].

Die Pathophysiologie des SHT ist ähnlich komplex wie seine klinischen Auswirkungen. Durch die Gewalteinwirkung am knöchernden Schädel können je nach Art und Schwere des Traumas unterschiedliche Schadenskaskaden ausgelöst werden, die zu Schädigungen der Nervenzellen, als auch zu Veränderungen des metabolischen Gleichgewichts des Gewebes führen und auf die im folgenden näher eingegangen wird (siehe Kapitel 1.2.). Für das gleichbleibende metabolische Gleichgewicht des Hirngewebes sorgen Versorgungssysteme wie die Blut-Hirn-Schranke, die das zentrale Nervensystem einerseits isolieren, andererseits jedoch auch mit allem Benötigten versorgen.

1.2. Das experimentelle Schädelhirntrauma

Um im Tierexperiment eine möglichst genaue Annäherung an die komplexe Pathophysiologie des menschlichen Gehirnes während eines SHT zu erreichen, gibt es eine Vielfalt von Tiermodellen, die jeweils nur zum Teil die tatsächlichen Begebenheiten widerspiegeln können[79]. Experimentelle Studien zum SHT zeigten bisher die unterschiedlichsten metabolischen und morphologischen Veränderungen und zogen vor allem Ödembildung und Störungen der zerebralen Durchblutung nach sich[82].

Möglicherweise sind hierfür nicht nur das mechanische Trauma mit seinen nachgeschaltenten Schadenskaskaden verantwortlich, sondern zusätzlich ein Faktor, der insbesondere im experimentellen Schlaganfallmodell bereits mehrfach untersucht

wurde: Die mikrovaskuläre Integrität, welche durch eine Zerstörung der Basalmembran angegriffen werden kann (siehe Kapitel 1.3). Ein Verlust ihrer Bestandteile mit gravierenden Folgen wurde beispielsweise in den Mikrogefäßen nach experimentellem ischämischen zerebralen Infarkt beobachtet[52,53,55]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein besonderes Augenmerk auf Schäden im Bereich der kleinen hirnversorgenden Gefäße (im weiteren als Mikrogefäße bezeichnet) gelegt. Viele der dort entstehenden Folgeschäden können konsekutiv auch bleibende Behinderungen der Patienten nach sich ziehen. Diese Mikrogefäßschäden wurden im experimentellen Modell des ischämischen zerebralen Infarktes bereits in unserem Labor erforscht, so daß sich ein Vergleich der bereits beobachteten Mikrogefäßschäden in der experimentellen zerebralen Ischämie mit den möglicherweise im SHT zu beobachtenden Schäden anbot.
Bisher existiert jedoch kein experimentelles SHT-Versuchsmodell, welches das Gesamtspektrum der pathologischen Veränderung wiedergeben könnte, so daß je nach Untersuchungsansatz und Fragestellung ein möglichst passender Versuchsansatz ausgewählt werden muß. Sowohl diffuse (das gesamte Gehirn gleichmässig betreffend), als auch fokale (Teile des Gehirns besonders oder ausschliesslich betreffend) SHT-Modelle werden im Folgenden vorgestellt und diskutiert.

1.2.1. Das diffuse Schädelhirntrauma

Diffuse Gewalteinwirkung auf das Gehirn als Ganzes wie Erschütterungen, das Einwirken von Scherkräften bei Beschleunigung und Abbremsung (nach den Ommaya – Gennarelli Modell[94]) oder übermässiger Druck auf das Gehirn als Folge von Überdruck von Aussen oder Innen (selten bei Tauchern vorkommend) wird als diffuses SHT bezeichnet. Es zieht apoptotische Kaskaden, global ischämische Veränderungen, sowie Ioneneintritte an den Ranvierschen Schnürringen der betroffenen Neuronen mit darauffolgender Zerstörung des Zytoskelettes nach sich[26]. Diese Schäden können je nach Schwere respektive Milde des Traumas unter Umständen schwer zu entdecken sein[83,98].

1.2.2. Das fokale Schädelhirntrauma

Das fokale SHT liegt örtlich begrenzt im Zentrum der mechanischen Krafteinwirkung auf den Schädel bzw. das Gehirn und involviert typischerweise den darunter liegenden Kortex, als auch tiefergelegene Schichten der Basalganglien[44,101]. Dieser Schadenstyp tritt als Kontusion (Hirnhäute bleiben intakt) und Lazeration auf (Hirnhäute werden mitbeschädigt). Meist geht das fokale SHT daher mit Schädelfrakturen und Hämatombildung einher. Fokale Modelle des SHT sind vor allem das kontrollierte Kortex-Impakt-Modell (controlled cortical impact), das geschlossene Schädelhirntrauma durch ein fallendes Gewicht (weight drop closed head injury), das starre Indentationsmodell (rigid indentation injury) sowie das Flüssigkeits-Perkussions-Modell bei starkem Trauma (fluid percussion injury)[79].
Bezogen auf die zerebralen Gefäße manifestieren sich die Veränderungen nach SHT vor allem durch Störungen der zerebralen Durchblutung, Ödembildung und Schäden der Blut-Hirn-Schranke[82].

Die Übergänge zwischen diesen beiden Schadensmodellen sind fliessend. Mit anderen Worten, das diffuse SHT kann auch gemeinsam mit dem fokalen SHT als eine Art Mischform auftreten. Das wird verständlich wenn man die Stärke einer lokalen Krafteinwirkung betrachtet. Vom Grad der Stärke der lokalen Krafteinwirkung (leicht, schwer) und der Art des Gewebes (weich, hart) auf das diese Kraft einwirkt, hängt auch die Übertragung dieser Kraft auf die Umgebung, also das umliegende Gewebe, ab[45]. Hier gibt es unzählige Variablen und daher multiple Mischformen und so bleibt es fraglich, ob ein rein diffuses, oder rein fokales Tiermodell des SHT überhaupt existiert und ob es der Realität in den Notfallstationen der Krankenhäuser entsprechen würde.

In dieser Dissertation wurde das experimentelle Tiermodell des Flüssigkeits-Perkussions-Trauma (FPI) gewählt, das beiden Schadensformen (diffus und fokal) am besten gerecht wird. Im milden experimentellen SHT stellt sich das FPI als Traumamodell des diffusen SHT dar, im schweren experimentellen SHT jedoch überwiegend als fokales Modell, die Übergänge sind von unterschiedlich ausgeprägten Mischformen gekennzeichent. Das FPI enspricht daher einer patientennahen gemischten Pathologie, da hier selten eine rein diffuse oder rein fokale Pathologie zu finden ist. Die traumatische Krafteinwirkung des FPI auf die

Dura des Rattenhirnes wurde in dieser Dissertation entsprechend einem milden bis moderaten experimentellen SHT bei 1,5 atm ausgewählt. Somit ist der Charakter des gewählten Modells zwischen einem diffusen und fokalem experimentellen SHT einzuordnen.
Die vorliegende Arbeit untersucht, wie bereits oben beschrieben, die Frage, ob sich ein mildes SHT auf die Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße auswirkt. Hierbei werden als wichtige Bestandteile der Basalmembran insbesondere deren Hauptbestandteile und funktionellen Einheiten wie z. B. Kollagen Typ IV (siehe 1.3) und Integrine (siehe 1.4) untersucht.

1.3. Die Blut-Hirn-Schranke

Die Homöstase eines Gewebes, das Gleichgewicht zwischen Elektrolyten, Proteinen, Rezeptoren, Botenmolekülen und Zellen, ist insbesondere für das Gehirn von essentieller Bedeutung. Eine Störung dieses Gleichgewichtes kann zu langwierigen Schäden und unkontrollierbaren Schadenskaskaden führen. Daher verfügt das Gehirn über wichtige Barrieren und Schutzsysteme, in die sich die Blut-Hirn-Schranke (blood-brain-barrier = BBB) einfügt. Sie soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Die BBB (Abb. 1) setzt sich aus drei unterschiedlichen Komponenten zusammen: Den interendothelialen Tight-Junktions die den Substrattransfer mitregulieren, den perivaskulären Astrozyten mit ihren Endfüssen sowie Perizyten als parenchymalen Komponente der Gefäße und der Basalmembran, welche sich aus der Basallamina und der Lamina fibroreticularis zusammensetzt. Die Basallamina wiederum wird von den Endothelzellen aufgebaut und besteht aus zwei wesentlichen Anteilen. Einerseits aus der Lamina rara und darunter, basal gelegen, der Lamina densa. Beide haben etwa einen Durchmesser von 20 nm und bestehen hauptsächlich aus den Proteinen Kollagen Typ IV und Laminin, welches mit den extrazellulären Domänen der Integrine vernetzt ist, sowie Entactin (Nidogen) und Proteoglykanen wie Perlecan. Darüber hinaus können weitere Proteine mit den angesprochenen Matrixkomponenten assoziiert sein. Um die Basalmembran zu vervollständigen kommt auf der basalen Seite der Basallamina eine Lamina fibroreticularis hinzu, welche aus einem Netzwerk von retikulären kollagenen Fibrillen aufgebaut ist. Insgesamt hat die Schicht aus Lamina rara, Lamina densa und Lamina fibroreticularis einen Durchmesser von circa 0,6-2 µm und

wird als Basalmembran bezeichnet. Sie ist ein Bestandteil der Extrazellulären Matrix (=EZM) und wird in der vorliegenden Arbeit auf einen möglichen Substanzverlust untersucht werden.

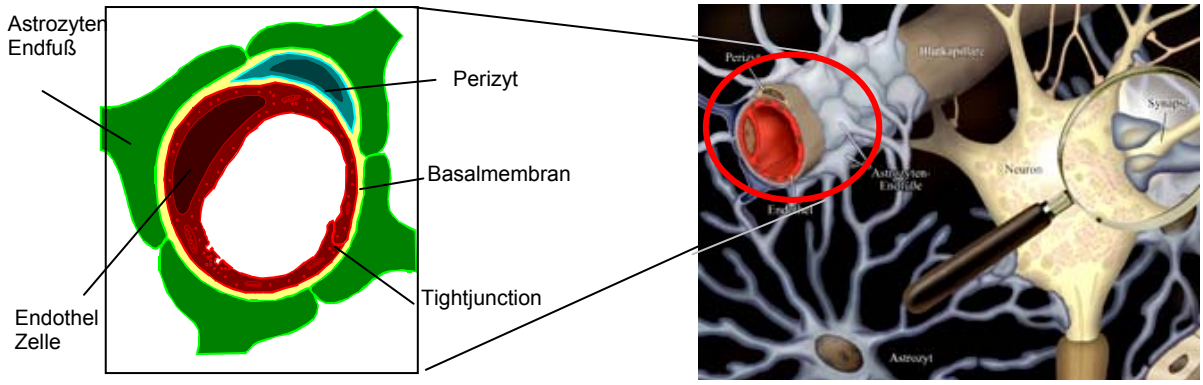


Abbildung1: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke, Kapillare im Querschnitt (rechtes Bild Quelle Uni-Bochum)

1.3.1. Die Extrazelluläre Matrix

Unter der extrazellulären Matrix (Extrazellularmatrix, Interzellularsubstanz, EZM) versteht man diejenigen Anteile Bindegewebes, die zwischen den Zellen im sogenannten Interzellularraum liegen. Die EZM setzt sich aus unterschiedlichen Komponenten zusammen, die in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Grundsubstanz und Fasern. Das Verhältnis der Grundsubstanz zu Faseranteil schwankt je nach Lokalisation ebenso wie der Anteil der extrazellulären Matrix am Gewebe insgesamt, bedingt durch dessen jeweilige Funktion. Die EZM bildet die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befindet. Ihre Komponenten werden von unterschiedlichen Zellen synthetisiert und sezerniert, aber auch extrazellulär oder nach Endozytose intrazellulär abgebaut. Darüber hinaus können, durch die Bindung von Zellen an Komponenten der EZM durch Zellrezeptoren, Expressionen von Genen in den jeweiligen Zellen reguliert werden. Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation sowie der Aufbau, Umbau und Abbau von Gewebe resultieren damit auch aus der wechselseitigen Beeinflussung von EZM und Zellen. So können beispielsweise Moleküle die als strukturgebende Proteine vorliegen unter anderen Bedingungen als Botenstoffe fungieren, wie Kollagen Typ I und II die eine funktionelle Rolle in der Regulation der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen übernehmen[20]. Dieser funktionellen Vielfalt entsprechend ist auch die EZM komplex

organisiert, was am Beispiel von Basalmembranen besonders deutlich wird. Deren makromolekulare Organisation ist an spezialisierte Funktionen als Barrieren oder als Kommunikationsvermittler für Signalmoleküle angepasst [3].

1.3.2. Die Basalmembran und ihre Struktur

Die Basalmembran ist eine etwa 0,6-2 µm dicke Schicht von Proteinen, Glycoproteinen, Glukosaminoglykanen und Proteoglykanen, die von Perizyten und Endothelzellen produziert wird[62,123]. Sie besteht aus einer Doppelmembran, gebildet aus einer Kollagen Typ IV- Entactin (= Nidogen) Polymerschicht, welche zusätzlich durch Laminin und Perlecan vernetzt und mit weitern Glucosaminoglycanen stabilisiert wird (Abb. 2).

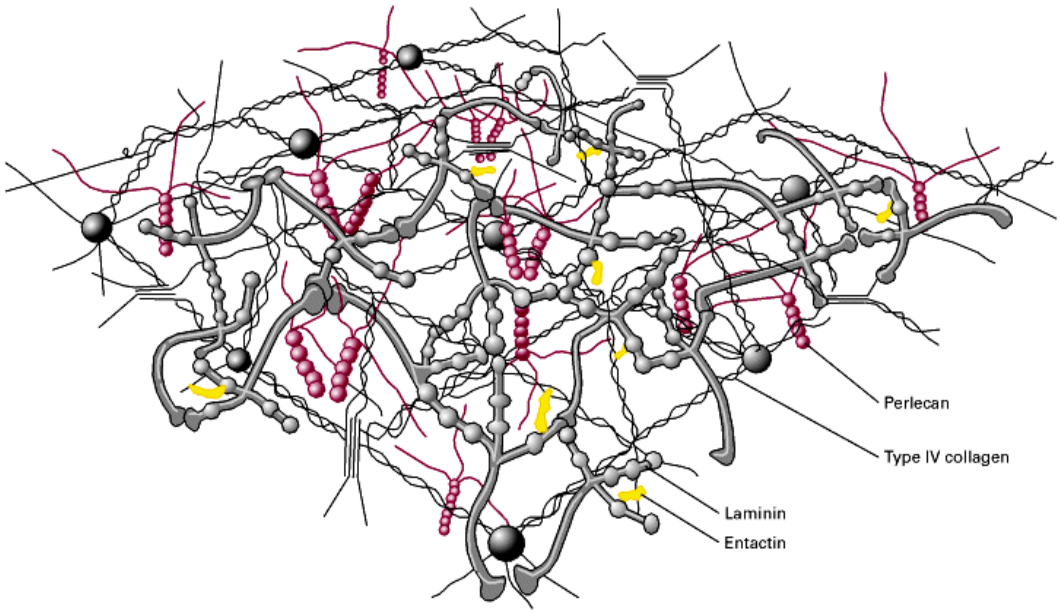


Abbildung 2: Vernetzung von Laminin mit Kollagen Typ-IV mittels Entactin und Perlecan [123].

Aktuell sind 27 verschiedene Kollagentypen bekannt (Typ I bis XXVII), zusätzlich sind mindestens zehn weitere Proteine mit kollagenähnlichen Domänen zu verzeichnen[123]. Unter diesen geht nur Kollagen Typ IV mit Laminin, Entacin und Perlecan diejenige netzartige Verbindung ein, die den Basalmembranen zugrunde liegt, daher wird in dieser Dissertation der Gehalt von Kollagen Typ IV der Mikrogefäße untersucht.

1.3.3. Kollagene- Faser oder Netz ?

Kollagene sind diejenigen unlöslichen fibrösen Proteine der EZM und des Bindegewebes die den Hauptanteil der EZM stellen. Zunächst wurde angenommen, dass Kollagene von Fibroblasten des Bindegewebes sezerniert werden würden. Es stellte sich jedoch heraus, daß Epithelzellen ebenfalls unterschiedliche Kollagene produzieren (siehe Abbildung 3), die alle dem Zweck dienen das Gewebe gegen Dehnungsschäden zu schützen. Zudem gibt es bereits Hinweise auf unterschiedliche Signalfunktionen einzelner Kollagene[91]. Die 27 bekannten Kollagene verbindet die Eigenschaft, dass sie aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind, die man als α-Ketten bezeichnet und die in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden sind. Jede α-Kette wird in Abhängigkeit des Kollagentyps aus 600 bis 3000 Aminosäuren zusammengesetzt und ist mit Domänen ausgestattet, die aus repetitiven Gly-X-Y-Sequenzen aufgebaut sind. Die Kollagen-Ketten der meisten Kollagene verzwirbeln sich und formen lange dünne Kollagenfibrillen (Abbildung 3). Definitionsgemäß werden nur tripelhelikale Moleküle der EZM als Kollagene bezeichnet[95] (Abbildung 4).

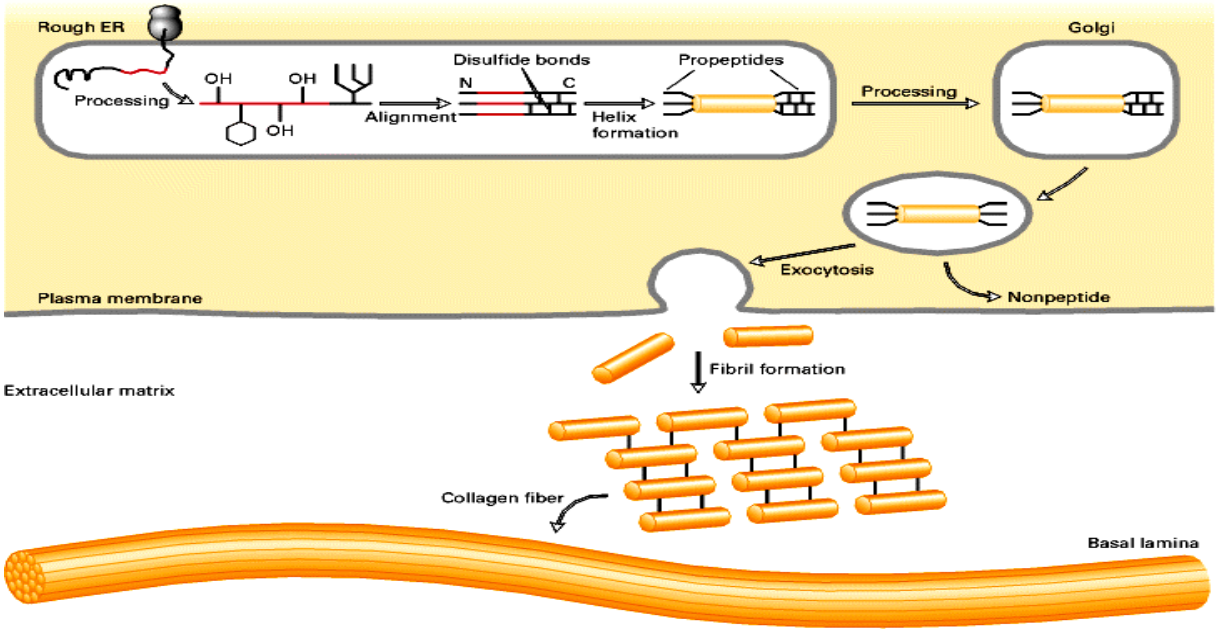


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bildung von fibrillärem Kollagen: Modifikation der Prokollagen-Polypetide im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mittels Hydroxylierung, Glycosylierung, und Disulfid-Bindung zwischen den C-terminalen Propeptiden von drei Prokollagenen, was die Bildung der Tripelhelix vorbereitet. Dieser Prozeß setzt sich reißverschlußartig in Richtung N-terminus fort. Alle Modifikationen finden im rauen ER, Golgi Apparat und Extrazellularraum statt und erlauben eine gleichgerichtete Ausrichtung der Kollagenfasern, um die Helices in 50- nm-diameter Fibrillen zu verpacken oder Kollagen Typ

IV Netzwerke für Basalmembranen herzustellen. Die α-helikale Region wurde in roter Farbe dargestellt (nach [95]).

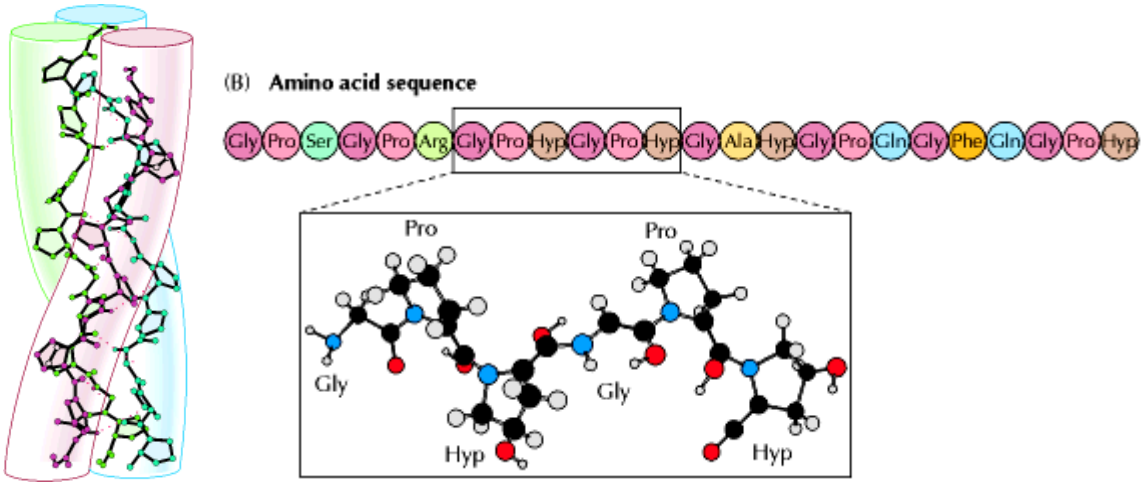


Abbildung 4: A) TripelHelix des Kollagens, B) Gly-X-Y Repetitonen[24]

Kollagen Typ IV selbst besteht aus sechs genetisch verschiedenen Untereinheiten α1-α6, wobei die Isoformen α1 und α2 ubiquitär in menschlichen Basalmembranen vorkommen[95,104] (in der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper gegen Kollagen Typ IV verwendet, welcher die Gesamtkette Kollagen Typ IV, als auch alle Untereinheiten erkennt). Typ IV der Kollagene stellt einen Einzelfall dar, denn als einziges Kollagen formt es ein zweidimensionales Netzwerk und ist Bestandteil aller Basalmembranen des Körpers. Abbildung 5 zeigt die schematische Darstellung der drei Ketten des Kollagen Typ IV die seine Tripelhelix formen.

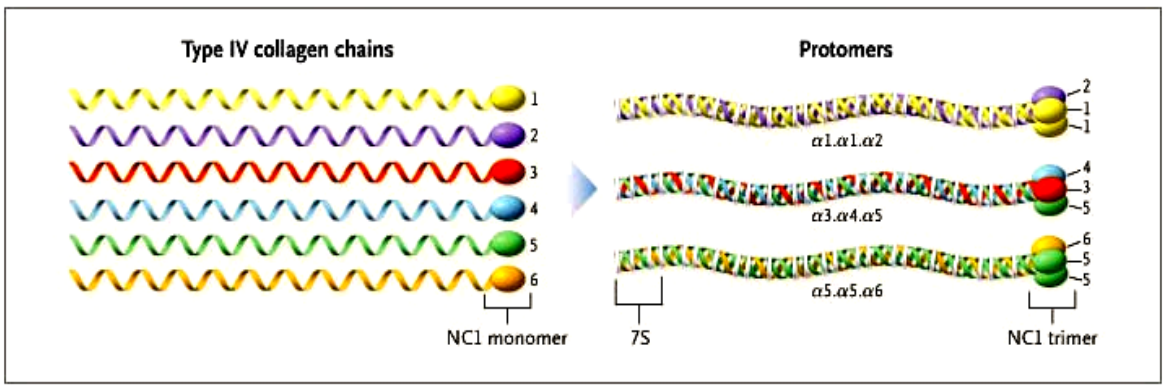


Abbildung 5: Kollagenuntereinheiten von Kollagen Typ IV (nach[59])

Ihre Länge beträgt 400 nm. Sie verfügen über eine nichtkollagene Domäne am N-terminus (NCl-Monomer), sowie eine globulare Domäne am C-terminus. Die tripelhelikale Struktur wird von einigen nichthelikalen Segmenten, die eine freie Biegung im Molekül ermöglichen, unterbrochen[24]. Mittels lateraler Interaktionen mit anderen tripelhelikalen Segmenten und den C-terminalen Domänen kann sich Kollagen Typ IV als einziges Kollagen zu einem Netzwerk mit Laminin verflechten (siehe Abb. 2, sowie Tabelle 1). Folglich ist Kollagen Typ IV das einzige derzeit bekannte Kollagen, welches in der Lage ist, ein Netz mit aussergewöhnlicher elastischer Stabilität zu bilden. Alle anderen bisher bekannten Kollagene treten als Fasern auf (Tabelle 1).

Kollagenklassen	**Typus**	**Gewebe**
Fibrillen formend	I	Die meisten Bindegewebe
	II	Knorpel and Gelenkskapsel
	III	Dehnbare Gewebe (z.B. Haut, Lunge)
	V	Gewebe mit Kollagen I
	XI	Gewebe mit Kollagen II
Fibrillen-assoziiert	IX	Gewebe mit Kollagen II
	XII	Gewebe mit Kollagen I
	XIV	Gewebe mit Kollagen I
	XVI	Viele Gewebe
Netzwerk formend	IV	Basalmembran
Ankerfilamente	VII	Verbindet die Basalmembran mit dem darunterliegenden Gewebe

Tabelle1: Kollagentypen und ihr Vorkommen im Körper

Insbesondere Kollagen Typ IV und Laminin können als Bestandteile der Basalmembran mit Integrin Rezeptoren auf den Zelloberflächen interagieren (Abb. 6).

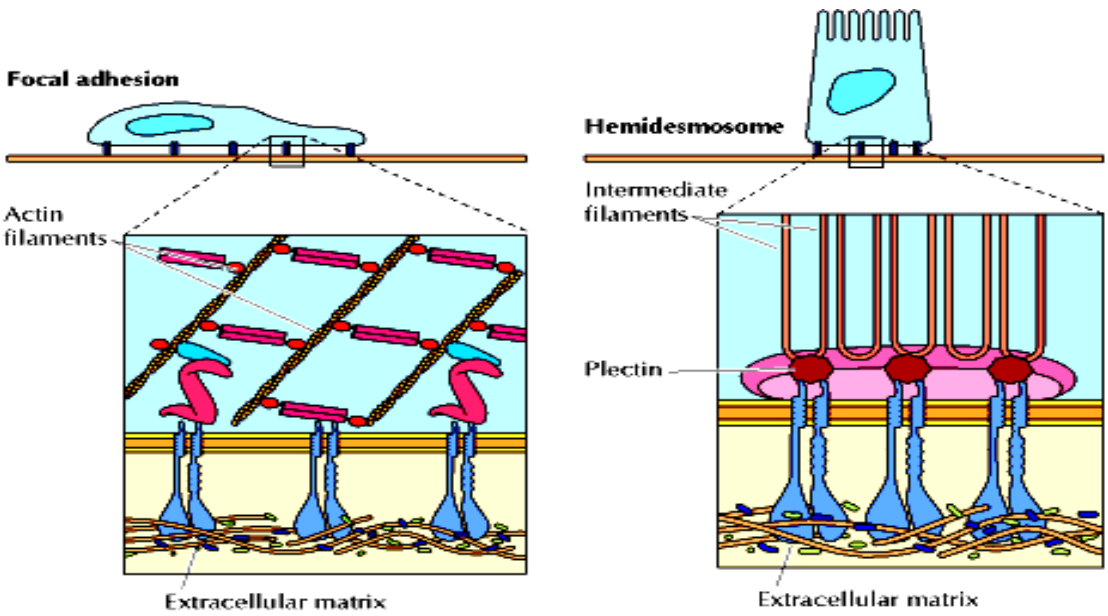


Abbildung 6: Zwei junktionale Verbindungstypen zwischen der EZM und Zelle welche Integrin-vermittelt ablaufen (Integrine = blau eingezeichnete „Zellanker“) [24]

Diese Interaktion zwischen Kollagen Typ IV, Laminin und Integrinen trägt zur Stabilität der zellulären Elemente der BBB (Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten) bei. Sie ist essentiell für die Stabilität von Blutgefäßen als auch die Form des Zytoskelettes. Integrine vermitteln Zelladhäsion, interagieren mit Actin und werden als zweiter Hauptpunkt neben Kollagen Typ IV in dieser Dissertation genauer untersucht.

1.4. Integrine - Zellanker in der Basalmembran

Um zu verstehen wie sich die EZM mit Zellen verbindet und wie sie auf sie einwirken kann, muss man einerseits die extrazellulären Komponenten identifizieren die zelluläre Bindungen eingehen können, andererseits aber auch diejenigen Zelloberflächenmoleküle die Komponenten der EZM binden können. Fast alle Zellen besitzen Rezeptoren, mit denen sie mit der EZM in Kontakt treten. Oft werden dabei verschiedene Adhäsionsproteine, Adapterproteine oder andere adhäsive Proteine benutzt, die selbst Bestandteil der EZM sind und zum einen mit anderen Bestandteilen der Matrix, zum anderen mit den Zellrezeptoren interagieren. Häufig verwendete Rezeptoren, die für die Zelladhäsion große Bedeutung haben, sind Integrine.

1.4.1. Struktur

Die Integrine bilden eine Familie von membranständigen Glykoproteinen und stellen neben Cadherinen, Immunglobulinen und Selektinen eine wichtige Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen (Abb. 7) dar.

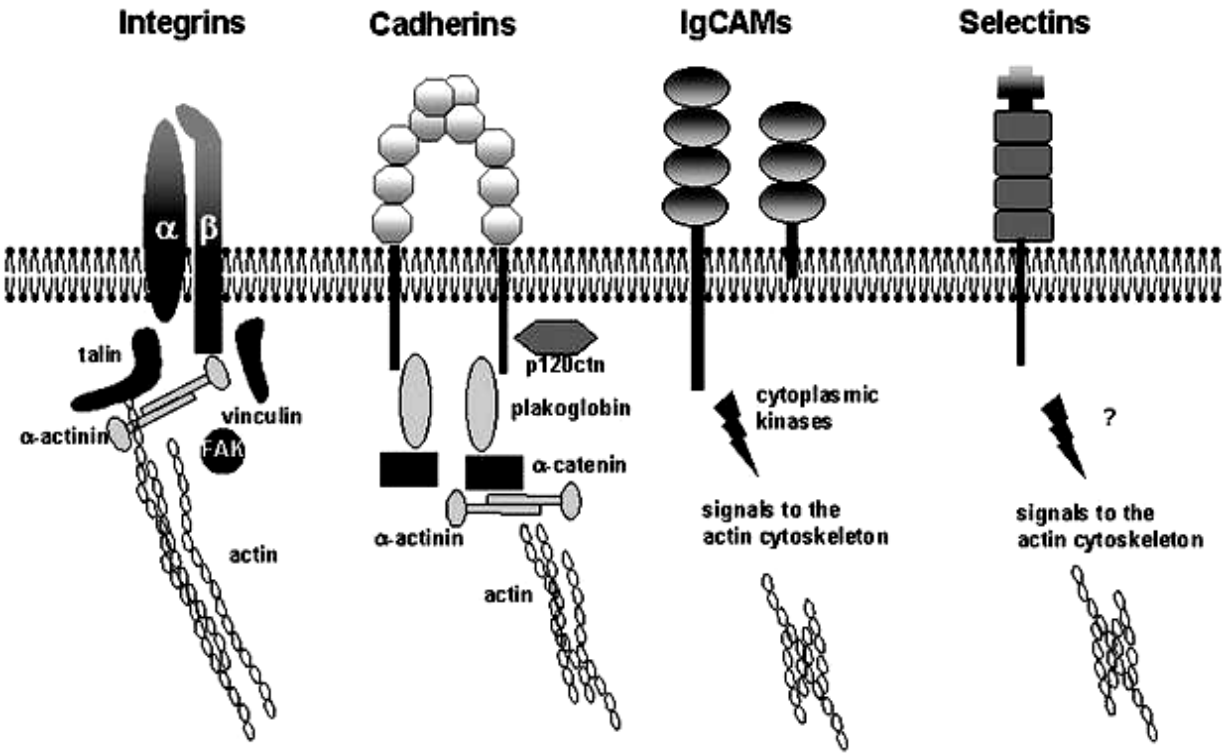


Abbildung 7:
Die 4 Hauptgruppen der Zelladhäsionsmoleküle und ihre Verbindung zum Zytoskelett[56]

Sie sind genauer betrachtet Rezeptorproteine, die die Zellen mit der EZM durch Interaktion mit Liganden auf benachbarten Zellen und der EZM verbinden (Abb. 8) und auf Signale von außen oder dem Zellinneren reagieren.

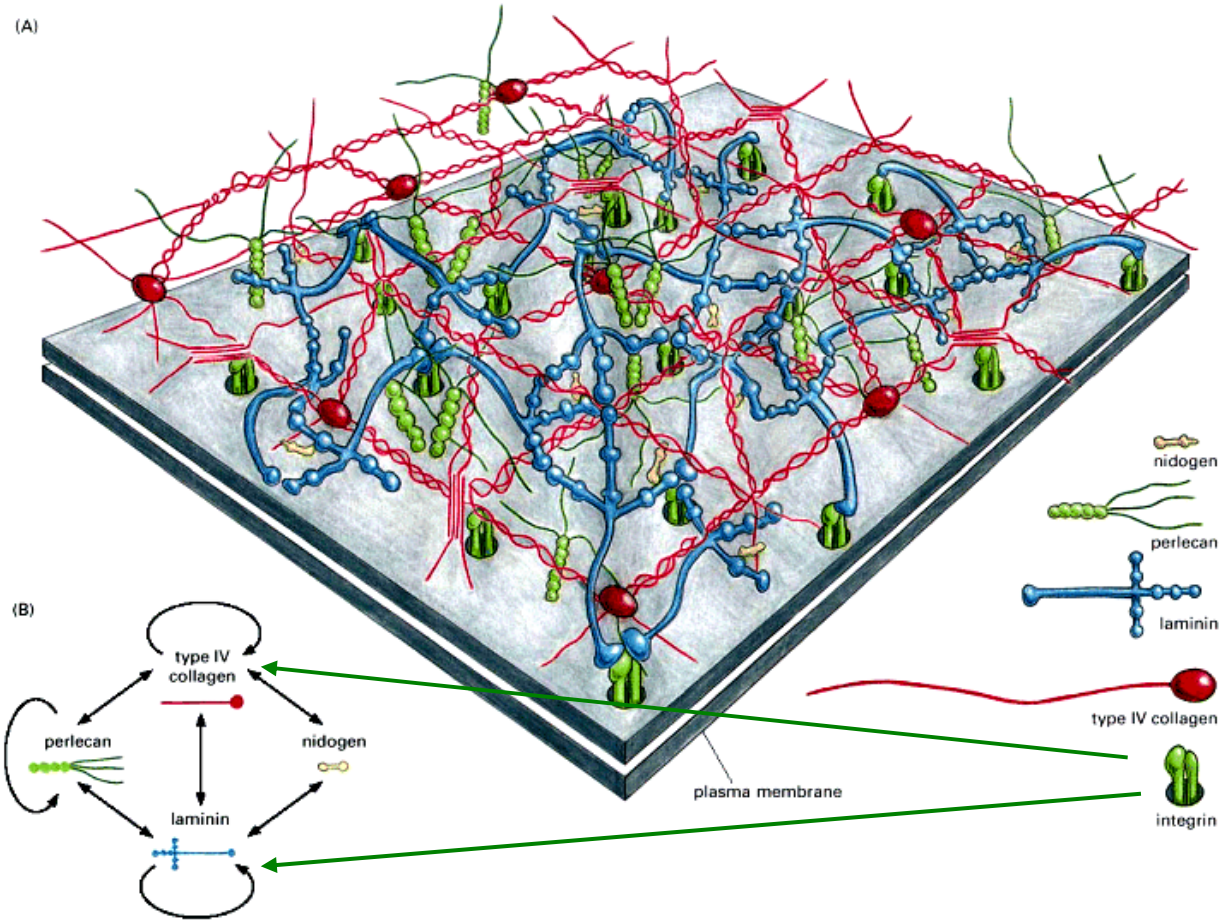


Abbildung 8: (A) Verankerung der Basalmembran mittels Integrinen an der Plasmamembran der Zellen. (B) Pfeile kennzeichnen die direkten Bindungen zwischen den Proteinen (modifiziert nach[123])

Integrine können einerseits zu einer zytoskeletalen Reorganisation führen (besonders wichtig für Zellmigration und Zellausbreitung), andererseits auch die Funktion von Signaltransducern übernehmen, das heißt andere Rezeptoren aktivieren, Genexpressionen regulieren und zu Apoptose oder Proliferation von Zellen beitragen. Auf beide Aspekte wird im Kapitel 1.4.2 und 1.4.3. näher eingegangen.

Ihr Aufbau charakterisiert sie als Heterodimere, bestehend aus zwei miteinander assoziierten Glykoproteinketten: Einer größeren α- und einer kleineren β-Untereinheit, von denen zumeist eine auf den Ca^{++}-Status der Umgebung anspricht und damit ein nicht kovalent gebundenes Heterodimer bildet (Abb. 9). Sie haben zumeist drei Domänen: Eine membrangebundene-, eine extrazelluläre- und, jedoch nicht in allen Fällen, eine zytoplasmatische-Domäne[2,69]. Dadurch sind sie flexibel genug unterschiedliche Konformationen anzunehmen[61].

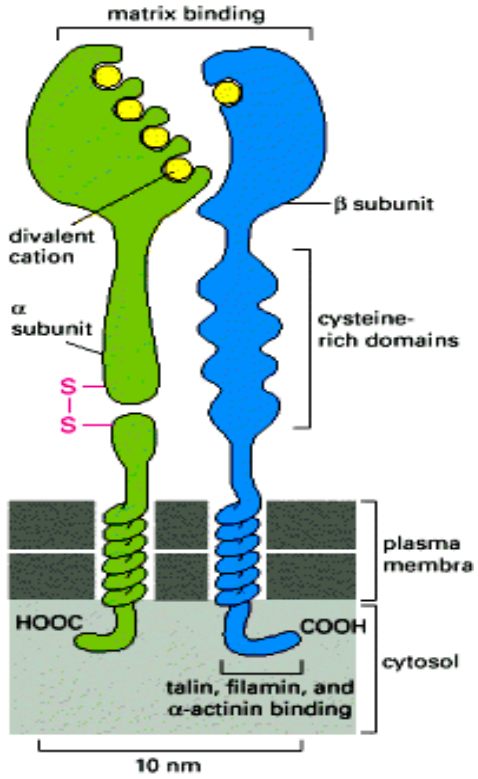


Abbildung 9:
Untereinheiten der Integrinstruktur. Die α-Untereinheit wird als 140,000-Dalton Polypeptidkette hergestellt, die erst später in eine kleinere, transmembrane Domäne und eine große extrazelluläre Domäne gespalten wird, die vier divalente Kationen enthält. Die beiden Domänen werden mit Hilfe einer Disulfidbrücke zusammengehalten[3].

Die Spezifität für die Liganden wird von der Kombination der α- und β-Untereinheiten festgelegt und ist sehr vielfältig. Zu den Liganden zählen unter anderem Elemente der Basalmembran, große EZM Moleküle wie Fibronektin, Tenascin, Laminin, Thrombospondin und vor allem auch Kollagen[31].

Abbildung 6 und 10 zeigen unterschiedliche Verbindungstypen zwischen der EZM und Zellen. In fokalen Adhäsionen sind Bündel von Aktinfilamenten an den β-Untereinheiten der Integrine mittels einer Anzahl von anderen Proteinen z.B. α-Actinin, Talin, und Vinculin verankert.

In Hemidesmosomen wird die Basalmembran mit den Intermediärfilamenten mittels $\alpha_6\beta_4$ Integrin und Plectin verbunden. Diese strukturellen Eigenheiten der Basalmembran, die Beschaffenheit der Kollagen Typ IV-Entactin Polymerschicht, ist ausschlaggebend für die Regulation der Ausbreitung, Klusterbildung und Beweglichkeit der Integrine[3,30].

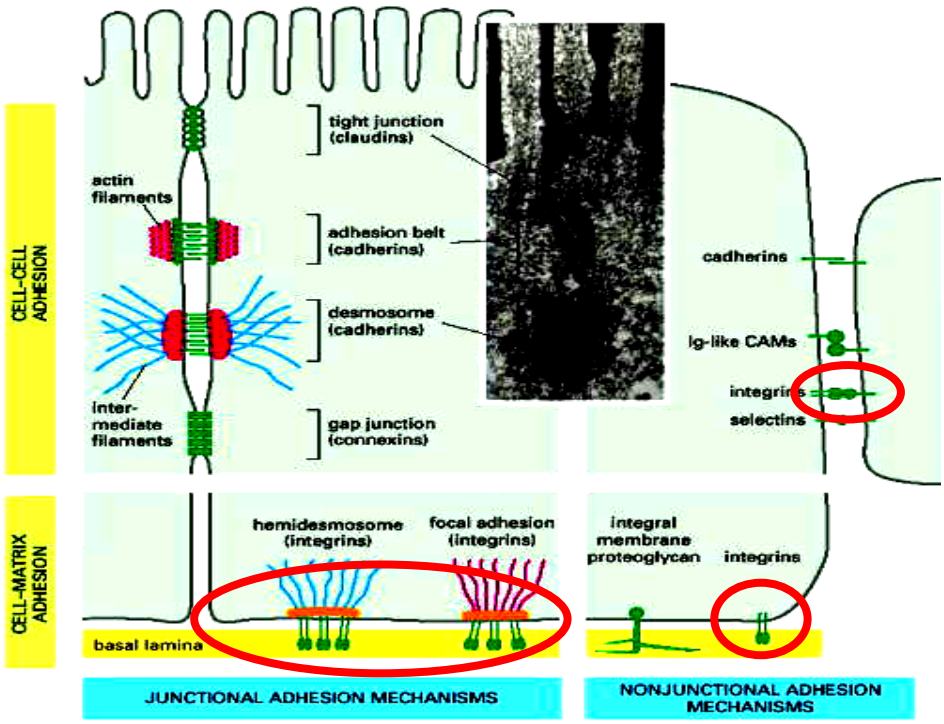


Abbildung 10: Junktionale und non-junktionale Verbindungstypen von Zellen mittels Integrin (Kreise). (Modifiziert nach [3])

.

Die extrazellulären Domänen dieser Transmembranproteine haben Bindungsstellen für Adhäsionsproteine mit dem "RGD"-Erkennungsmerkmal (Arg-Gly-Asp) (RGD-Proteine) wie Fibronectin (bei Fibroblasten), oder "Nicht-RGD Proteine" wie interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs), Kollagene und Laminin (bei Endo- und Epithelzellen), aber auch spezielle Peptidsequenzen wie die Erkennungssequenz von Kollagen oder Laminin. Hierbei erkennen stets α- und β-Untereinheiten des Integrins, die mittels Calcium-Ionen extrazellulär aneinander gebunden sind, gemeinsam eine entsprechende Aminosäure-Bindungssequenz im Proteinanteil der EZM-Komponenten[73] (Übersicht über bekannte Integrinheterodimere, Abb. 11) Im Menschen lassen sich aus insgesamt neun unterschiedlichen β- und 24 α-Untereinheiten eine Vielzahl von Integrinen aufbauen

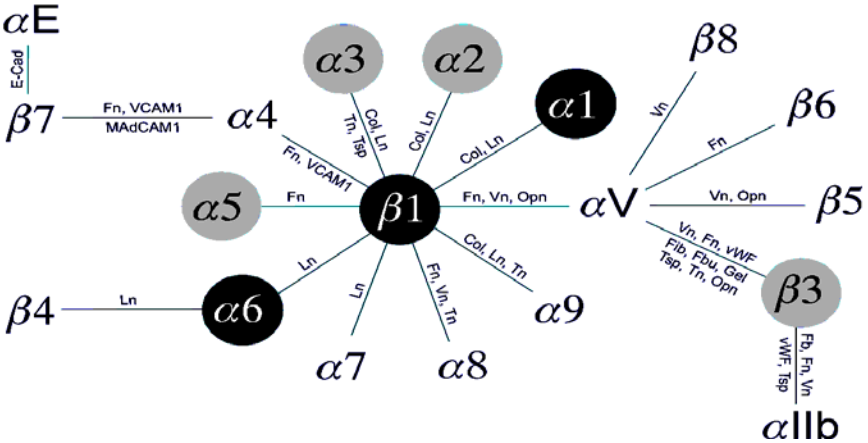


Abbildung 11: Übersicht über bekannte Integrinheterodimere und ihre Bindungspartner.

1.4.2. Eigenschaften und Besonderheiten der Integrine

Mindestens 8 der bisher bekannten Integrine binden Fibronektin, allein 5 Laminin, 5 Kollagene und 2 Kollagen Typ IV[7,11,57,130]. Beispielsweise binden $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ Integrine beide an ein Segment in der C-terminalen Domäne von Kollagen Typ IV; diese Integrine, genauso wie auch das fast überall vorkommende $\alpha_6\beta_1$, binden zudem noch an zwei unterschiedliche Regionen des Laminins, $\alpha_5\beta_1$ bindet Fibronectin (siehe auch Abb. 11). So sind die Integrine α_1, α_6 und β_1 essentiell für den Halt der Gefäßendothelzellen an der Basalmembran der Mikrogefäße des Gehirns und wurden daher für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation ausgewählt[25,26,33,37].

Zudem binden Integrine auch Adhäsionsmoleküle auf anderen Zellen, hierfür muss man jedoch die Untergruppen der β Integrine genauer betrachten. Die β1 Ketten, die mit mindestens 9 unterschiedlichen α Ketten Dimer-Verbindungen eingehen, werden in fast allen Vertebratenzellen gefunden, α5β1 beispielsweise ist ein Fibronektin Rezeptor, α6β1 ein Laminin Rezeptor [43].

Eine Besonderheit zeichnet die β2 Ketten aus, die Dimer-Verbindungen mit 3 Typen von α Ketten eingehen. Sie werden nur auf der Oberfläche von weißen Blutzellen gefunden und sind für die Fähigkeit dieser Zellen, Infektionen abzuwenden essentiell, jedoch weniger leicht in perfundiertem Gewebe nachzuweisen, da sie größtenteils während der Perfusion ausgespült werden. Einer dieser Heterodimere ist αLβ2, es wird auch LFA1 genannt für Lymphozyten-Funktions-assoziiert, ein weiteres αMβ2, das auch Mac1 genannt wird, da es hauptsächlich auf Makrophagen gefunden wird. Die β2 Integrine wie z.B. β2-Integrin-Ligand ICAM erlauben den Leukozyten fest an die Endothelwand zu binden und die Gefäßwand bei Entzündungsgebieten zu durchdringen. Patienten mit einer genetischen Erkrankung, die als Leukozyten-Adhäsions-Defizienz bezeichnet wird, können keine β2 Integrine generieren. Daher fehlt ihnen die gesamte Subfamilie der β2 Integrine und sie leiden an wiederkehrenden bakteriellen Infektionen[35,106].

Wiederum eine Subfamilie bilden die β3 Integrine, die sich auf einer großen Anzahl von Zellen finden, einschließlich Thrombozyten, sie binden unterschiedlichste Matrixproteine wie z.B. Fibrinogen. Die Bindung von Thrombozyten an Fibrinogen ist bei einer β3 Defizienz wie bei der Glanzmann-Thrombasthenie gestört, die Erkrankten bluten exzessiv[108].

Eine der bedeutendsten Fähigkeiten der Integrine ist aber in Wirklichkeit ihre Schwäche, genauer, die Schwäche der einzelnen Bindungskräfte. Der entscheidende Vorteil - und große Unterschied zu Zelloberflächenrezeptoren für Hormone und für andere lösliche Signalmoleküle - besteht in ihrer relativ geringen Affinität zu ihren Liganden (K_a = 10^6- 10^9 liters/mole). Dennoch können Integrine extrem stabile Bindungen von Zellen und EZM hervorrufen. Das erreichen sie mit Hilfe eines Kunstgriffes: Integrine sind für gewöhnlich in einer 10-bis 100-fachen Konzentration im Vergleich zu anderen Liganden auf der Zelloberfläche exprimiert. Dadurch können Integrine mittels Integrinklustern durch ihre gleichzeitige, aber einzeln schwächere Bindung, Zellen einen festen Halt für die Erkundung ihrer Umgebung ermöglichen. Wäre die einzelne Bindung zu stark, könnte die Gefahr bestehen, daß Zellen möglicherweise an einer Stelle festhängen, ein weiteres Ablösen wäre nicht mehr möglich. Bei einer zu schwachen Bindung jedoch könnten Zellen gefährlich lange „Bodenkontakt“ verlieren und dadurch absterben, da ein Kontakt zur EZM für das Überleben von Zellen notwendig ist[14,15]. Somit ist diese Eigenschaft der Integrine letztlich entscheidend für die Entwicklung von Geweben, das Vorwachsen von Gefäßen und alle Reparatur- und Regenerationsvorgänge eines Organismus.

Neben der strukturellen, stabilisierenden Funktion sind Integrine durch Konformationsänderungen auch an der Signalübermittlung beteiligt (in dieser Dissertation nicht untersucht). Wie bereits angesprochen, werden kurze Peptidsequenzen in großen Proteinen von Integrinen erkannt, so z.B. das RGD-Motiv in Fibronektin und Vitronektin[26,107]. Binden diese an die Integrinheterodimere, können intrazelluläre, also zytoplasmatische Domänen der Integrine Kinasen aktivieren und damit Signale über ein komplexes System von zwischengeschalteten Botenmolekülen an die Zelle weitergeben[8,61,111].
Dieser Signalübertragungsweg wird „outside-in signaling“ genannt. Er ist weitaus robuster und schwerer durch Interaktionen zu stören, als der „inside-out signaling“ benannte Weg der Signalregelung der Zelle „von innen heraus“. In Erkrankungen wie der Glanzmann Thrombasthenie oder der Leukzyten-Adhäsions-Defizienz kann dieser gestört sein und führt zu schwersten bakteriellen Infekten und einer darniederliegenen Immunabwehr[60,65,84]. Abbildung 12 zeigt schematisch die involvierten Schlüsselliganden und macht die Konformtionsänderung des beteiligten Integrinheterodimers, das heißt seine scherenartige Öffnung nach innen wie aussen

deutlich. Die Störung im Bereich dieser Konformationsänderung kann jedoch auch so ausgeprägt sein, dass der„inside-out signaling“ Pathway durch das komplette Fehlen der zuständigen Integrine oder das Fehlen von Talin zum Erliegen kommt[35, 115].

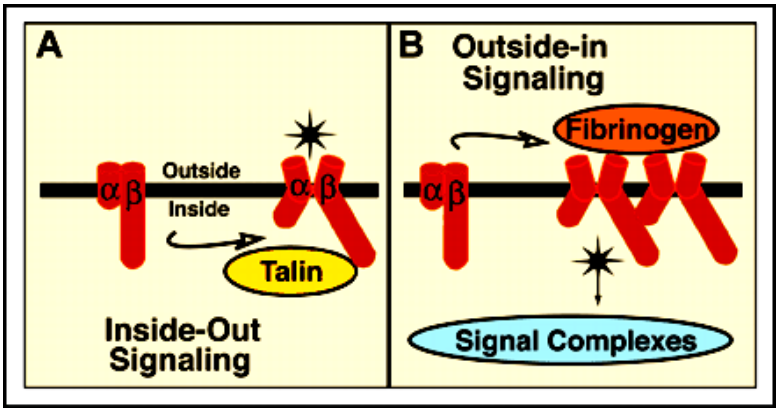


Abbildung 12:
Schema der beidseitigen Signalübertragung der Integrine am Beispiel von αIIbß integrin.
(A) Inside-out signalling: Intrazelluläre Signale stimulieren die Interaktion von Schlüsselliganden wie Talin mit den zytoplasmatischen Integrindomänen. Das führt zu Konformationsänderungen der extrazellulären Domäne, die in einer gesteigerten Bindungsmöglichkeit für adhäsive Liganden wie Fibrinogen resultieren kann.
(B). Outside-in signaling: Extrazelluläre Liganden binden, anfangs reversibel, an das Integrin Heterodimer. Diese Bindung wird zunehmend stärker und führt zu Integrinklustern sowie weiteren Integrin-Konformationsänderungen die an die intrazelluläre Domäne übertragen werden. Das wiederum führt zu Aktivierungen von Kinasen, Adaptoren und Effektoren der Integrin-basierten Signalkomplexe [115].

1.4.3. Integrine und ihre Rolle bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems

Seit der ersten Beschreibung von Integrinen im Jahr 1986, wurde bei einer stetig anwachsenden Anzahl von Krankheiten eine direkte Integrin-Beteiligung an der Pathologie festgestellt[120]. Sobald die natürliche Balance der Integrinmenge und Verteilung gestört wird, kann diese zum krankheitsauslösenden Element werden. Insbesondere das zentrale Nervensystem hat sich als besonders vulnerable Lokalisation für geringe Funktionsänderungen der Integrine gezeigt, da Integrine während einer Entzündungsreaktion (unabhängig von der Grunderkrankung) ein Einwandern von Entzündungszellen durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirngewebe ermöglichen. Leukozytäre wie endotheliale Integrine spielen eine wichtige Rolle für das Anheften, Abrollen und die Transmigration von Leukozyten[35].

Die Integrin-vermittelte Transmigration von Blutleukozyten kann zum krankheitsauslösenden Moment werden, z. B. in Autoimmunerkrankungen des ZNS wie der Multiplen Sklerose[9,13,117]. Bei Neoplasien verändern migrierende entartete Zellen ihr Integrin-Expressionsmuster zur erleichterten Invasion[15,47,48,89].

Auch bei Infektionen des ZNS, seien es virale, bakterielle oder auch parasitäre Infektionen, interagieren die Integrine der Blutleukozyten, sowie endotheliale Integrine, um ein Migrieren von Blutleukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke zu ermöglichen[58]. In der Alzheimerschen Demenz findet sich eine Hochregulation von Integrinen auf Mikroglia und in Plaques[1,32]. Aber auch bei epileptischen Anfällen kann es zu einer Hochregulation von Integrinen (z.B. β1-mRNA in Neuronen und Astrozyten) kommen[40].

Integrine spielen zudem eine lebenswichtige Rolle bei der Heilung von Gefäßschäden. Die subendotheliale Matrix besteht aus einer thrombogenen Oberfläche, die ungeschützt Thrombozytenaggregation und eine Aktivierung des Gerinnungssystems hervorrufen würde. Unter normalen Umständen wird diese Aktivierung durch das Vorhandensein des intakten Endotheliums verhindert, das einen guten Schutz vor thrombotischen Phänomenen und Plasmaproteininfiltration in die vaskuläre Media bietet. Die Fähigkeit von Endothelzellen, sich an der subvaskulären Oberfläche anzuheften und über eventuell exponierte subvaskuläre Strukturen zu proliferieren und sie zu bedecken, gewährleistet die Integrität der Mikrogefäße. An dieser Fähigkeit der Endothelzellen sind Integrine maßgeblich beteiligt, sie ermöglichen die feste Vernetzung der Endothelzellen mit der subendothelialen Matrix, sowie das „Vorwandern“ der Endothelzellen bei möglichen Verletzungen und konsekutiver Freilegung der thrombogenen subendothelialen Matrix[33].

Eigene Vorarbeiten bei experimenteller zerebraler Ischämie in der Ratte (Muellner et al., Daten noch nicht publiziert) zeigten eine mögliche Beteiligung der Integrine am pathophysiologischen ischämischen Geschehen. Ein spezifischer und Gefäßdurchmesser-abhängiger Verlust von vaskulären Integrinen deutete auf eine Größen-spezifische Interaktion zwischen dem Endothelium und der Basalmembran hin (Details siehe Kapitel 1.5.2.1.). Da Integrine und Kollagene entscheidend zum Erhalt der Bluthirnschranke beitragen, stellen sie frühzeitig und sensibel reagierende Parameter dar, um die Integrität der hirnversorgenden Mikrogefäße zu untersuchen. In dieser Dissertation wurden daher mit Kollagen Typ IV korrespondierende Integrine

untersucht (α1 und β1), sowie α6, welches mit dem zweiten Hauptbestandteil der Basalmembran, dem Laminin, interagiert.

1.5. Fokus Basalmembranschäden: Was ist bisher bekannt? Vorarbeiten

1.5.1. Kollagen

1.5.1.1. Ischämie

Die bisherige Forschung hatte nach experimenteller Ischämie mittels Arteria cerebri media Okklusion und Reperfusion (MCAO/R) im Rattenmodell - aber auch in experimentellen Primatenmodellen - ein Schadensmuster gezeigt, wie es bereits im Kapitel 1.2. für das experimentelle SHT besprochen wurde: Schäden der Blut-Hirn-Schranke und dadurch entstehende Ödembildung mit Störungen der zerebralen Durchblutung. Im ischämischen experimentellen Tiermodell fand sich jedoch zusätzlich eine deutliche hämorrhagische Transformierung[52,54,55]. In biochemischen und morphometrischen Analysen konnte dabei gezeigt werden, dass primär die kleinen zerebralen Gefäße (z.B. Arteriolen und Venolen, hier zur Vereinfachung Mikrogefäße genannt) betroffen sind und ein Teil des Blut-Hirn-Schrankenverlustes im Sinne einer Zerstörung der mikrovaskulären Basalmembranen auf einen Verlust von Kollagen Typ IV zurückzuführen ist, das wie bereits oben ausgeführt eines der wichtigsten fibrösen Strukturelemente der Basalmembran ist[54]. Diese Effekte, die auch im experimentellen Ischämiemodell an Primaten nachgewiesen werden konnten, und eine 40-50% Zerstörung der Mikrogefäße nach 3 Stunden Ischämie und 24 Stunden Reperfusion zeigten, sind im Rattenmodell mehrfach bestätigt worden. Da diese Schäden im Primaten nachgewiesen werden konnten, stehen sie als hinweisend auf eine ähnliche, wenn nicht sogar gleichartige Pathogenese im Menschen, deren Ursprung in der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke zu vermuten ist.

Die Integrität der zerebralen Gefäße und mit ihr die Integrität einerseits der Basalmembran, andererseits der Tight-junktions und zellulären Elemente wie der Astrozytenendfüße, gewährt die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Blood-brain-barrier = BBB). Bisher wurden noch keine Untersuchungen zu Auswirkungen

eines experimentellen SHT auf die Bestandteile der Basalmembran dieser Gefäße durchgeführt.
Daher hatten eigene Vorarbeiten in Zusammenarbeit mit Herrn Markus Benz sich unter anderem den Fragen zugewandt, wie sich ein mildes experimentelles SHT auf die Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße auswirkt, welche lokale Verteilung vorliegen würde, sowie der Frage ob ein möglicher Verlust von Kollagen Typ IV vergleichbar wäre mit den Verlusten, die bereits im Ischämiemodell nach Arteria cerebri media Okklusion und Reperfusion (MCAO/R) der Ratte beobachtet wurden.

1.5.1.2. Eigene Vorarbeiten bei leichtem experimentellem Schädelhirntrauma

Die Antworten auf diese Schlüsselfragen wurden bereits mit Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Peter C. Weber, Vorsitzender des Promotionsausschusses Dekanat der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, vorab von der Verfasserin dieser Dissertation veröffentlicht *(A. Muellner, M. Benz, A. Mautes, D. Burggraf, G.F. Hamann; Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat; J.Neurotrauma 2003 Aug; 20(8): 745-54).* Die dort diskutierten Fragen gehören zu den Kernfragen dieser Doktorarbeit .
Es galt zunächst zu klären, ob nach dem experimentellen Flüssigkeits-Perkussions-Modell des SHT Veränderungen der mikrovaskulären Integrität im Rattenhirnparenchym auftreten würden, oder ob das vergleichsweise milde experimentelle SHT gar keine mikrovaskulären Veränderungen nach sich ziehen würde.
Die Ergebnisse dieses Vorversuches zeigten bereits einen deutlichen Basalmembranschaden, sowohl der Mikrogefäßanteil am gefärbten Gewebe, als auch die Mikrogefäßdichte, die in histologischen und morphometrischen Analysen untersucht wurden, zeigten im Bereich des traumatischen Kortex einen signifikanten Abfall gegenüber Kortex-Gewebe der nicht traumatischen Hemisphäre.
24 Stunden nach dem milden Schädelhirntrauma konnte beispielweise eine Reduktion von Kollagen Typ IV als Mikrogefäßanteil im Kortex der traumatischen Seite von 19 ± 4% ($p < 0,009$) gegenüber der nicht traumatischen Seite entdeckt werden. Abbildung 13 zeigt die Auswirkungen des SHT auf die morphologische Architektur der zerebralen Mikrogefäße. Betreffend der Dichte der Mikrogefäße

konnte ebenfalls nur im Kortex der 24-Stunden-Überlebensgruppe eine signifkante Reduktion von 29 ± 6% ($p < 0,02$) beobachtet werden.

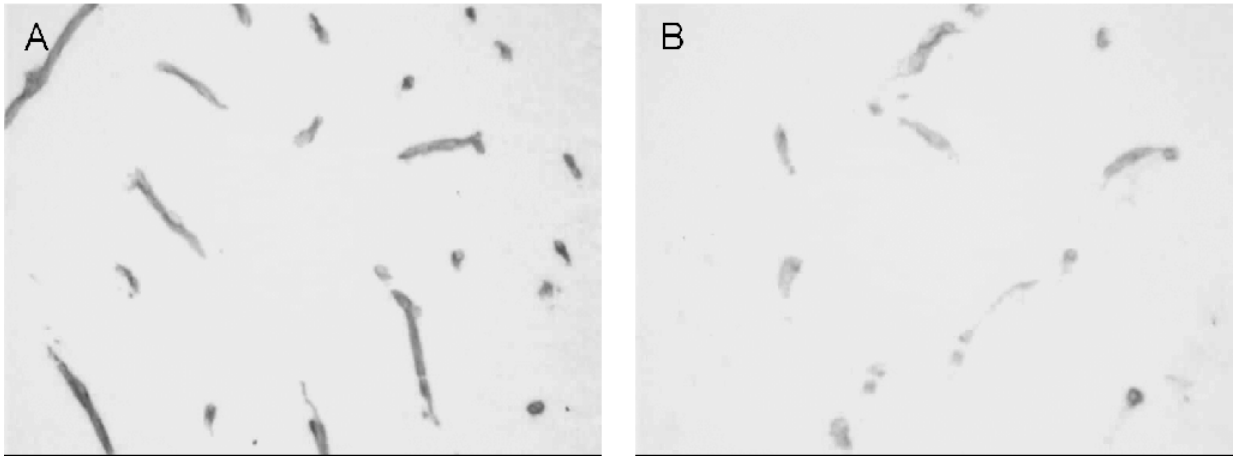


Abbildung 13: Kollagen Typ IV Färbung eines definierten Kortexareals 24 Stunden nach SHT (B) und Kontrolle (A). Deutlich ist die reduzierte Immunoreaktivität für Kollagen Typ IV (das sogenannte Ausbleichen, Bleaching) sowie die zersplitterte Gefäßarchitektur zu erkennen. Vergrößerung = 400x.

Des weiteren stellte sich ein Unterschied in der Reaktion der kortikalen Mikrogefäße und der Mikrogefäße der Basalganglien heraus. Mikrogefäßdichte und Mikrogefäßareal zeigten in der Immunhistochemie und Morphometrie beide eine signifikante Reduktion im traumatischen Kortex verglichen zur nicht traumatischen Gegenseite, jedoch nicht in den Basalganglien, weder der traumatischen noch der nicht traumatischen Seite.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie bei der Ratte nach MCAO/R zeigten einen Verlust von Basalmembran-Antigen[75]. Diese waren vor allem in den Basalganglien nachweisbar und nicht so sehr im ischämischen Kortex, so dass vermutet wurde, leptomeningeale Anastomosen könnten die Kortexregion vor ischämischen Mikrogefäß- und Basalmembranverlusten geschützt haben.

Der Vergleich der Resultate des experimentellen SHT mit den im fokalen zerebralen Ischämie Modell der Ratte gefundenen Ergebnisse bestätigte die unterschiedliche Reaktion von Basalganglien und Kortex auf eine Schädigung, jedoch war die Reaktion im Fall des SHT im traumatischen Kortex ausgeprägter als in den Basalganglien, die keinen signifikanten Mikrogefäßverlust zeigten und auch keine Abnahme von Basalmembran Antigen.

Eine der entscheidenden Fragestellungen der vorliegenden Arbeit war zu klären, ob mittels Western Blot-Technik eine Bestätigung der beobachteten Basalmembran-Schädigung erfolgen würde, oder vielleicht gegenteilige Ergebnisse vorliegen würden (als Teil der Doktorarbeit ebenfalls bereits vorab veröffentlicht, s.o.).
Zudem sollte die Fragestellung geklärt werden, ob eine Mitbeteiligung der Integrine bei den bereits beobachteten Basalmembranschädigungen im Sinne einer schnellen Antwort oder eventuell sogar aktiven Involvierung zu beobachten wäre, oder ob Integrine gar nicht, respektive erst langsam auf veränderte Umweltbedingungen reagieren würden.

1.5.2. Integrine

1.5.2.1. Ischämie

Eigene Vorarbeiten zu Integrinen in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie bei der Ratte (Muellner et al., bisher nicht publizierte Daten) zeigten zumindest eine mögliche Beteiligung der Integrine am pathophysiologischen ischämischen Geschehen.
Sie untersuchten zunächst die Verteilung der Integrine im gesunden Gehirn der Ratte. So konnte gezeigt werden, dass eine klare Immunoreaktivität vor allem für α1, α6 und β1 Integrin auf Endothelzellen, sowie α4 auf Astrozyten nachzuweisen war, wobei die α6 Immunoreaktivität vermehrt auf größeren Gefäßen (Arteriolen und kleinen Arterien) zu finden war, und α1, β1 Integrin vermehrt auf Kapillaren. Elektronenmikroskopisch konnten diese Integrine sowohl auf der luminalen, als auch der abluminalen Seite der Endothelzellen gefunden werden, wie auch auf Perizyten (siehe Abb. 14; Pfeile).
Zudem wurde ein spezifischer und Gefäßdurchmesser-abhängige Verlust von vaskulären Integrinen in der Ischämie festgestellt (Abb. 15).

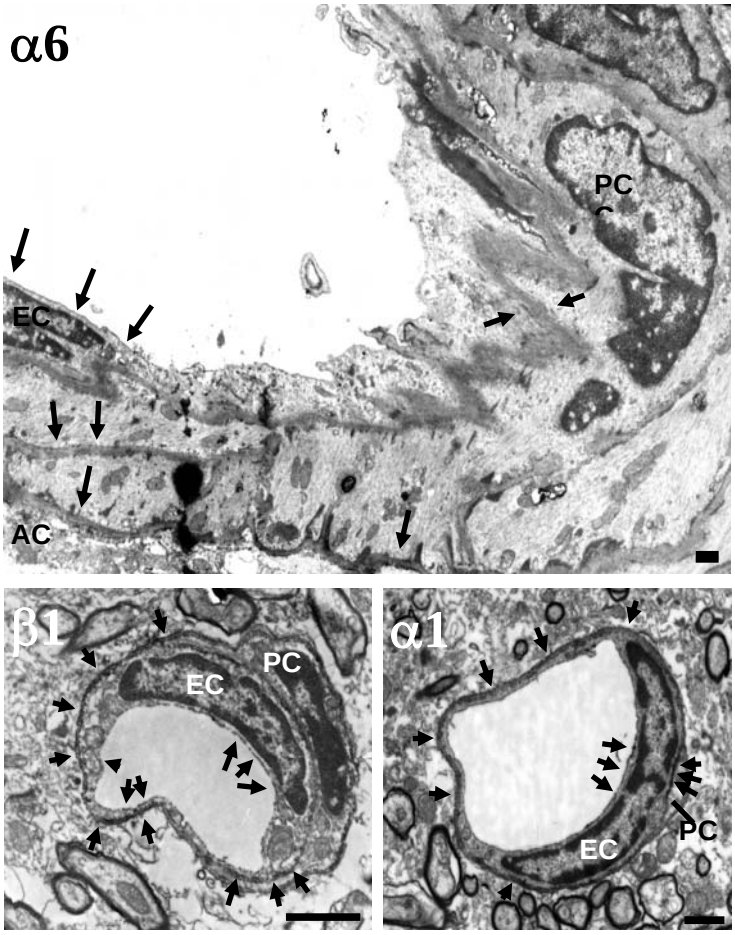


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Lokalisation von Integrin-Untereinheiten im normalen Rattengehirn. Für a1 und β1 wurde auch auf der luminalen Seite des Endotheliums eine klare Immunoreaktivität auf beiden Seiten der Basalmembran gefunden (untere Reihe, Pfeile). In der oberen Reihe ist a6 abgebildet, das sich hauptsächlich in größeren Gefäßen darstellen ließ, hier in einer Arteriole mit der typischen zerklüfteten Basalmembran.

Darstellung der Integrin Immunoreaktivität auf der luminalen Seite der Endothelzelle wie auch auf beiden Seiten der Basalmembran. ***EC*** *Endothelzelle,* ***AC*** *Astrozyt,* ***PC*** *Perizyt. (Scale bars = 1µm).*

Nach zerebraler fokaler Ischämie und Reperfusion von 0, 9 und 24 Stunden sahen wir vor allem eine Reduktion der β1 Integrin-positiven Kapillaren (-43% nach 24 Stunden gegenüber der nicht ischämischen Seite; $p < 0,05$), in den übrigen Gefäßtypen konnte keine Rarefizierung nachgewiesen werden, auch die Färbeintensität der β1-positiven Kapillaren nahm über den gesamten Zeitverlauf signifikant ab (-23% nach 24 Stunden; $p< 0,05$), was auf einen spezifischen Verlust ebendieser Integrinuntereinheit hinwies. Zusätzlich fand sich ein Abfall der α1-Färbeintensität in den Kapillaren, dieser war jedoch nicht ausgeprägt. Eine Reduktion der α6- Färbeintensität war nur bei Gefäßen größer 15µm zu finden (-15% nach 24Stunden, $p < 0,05$).

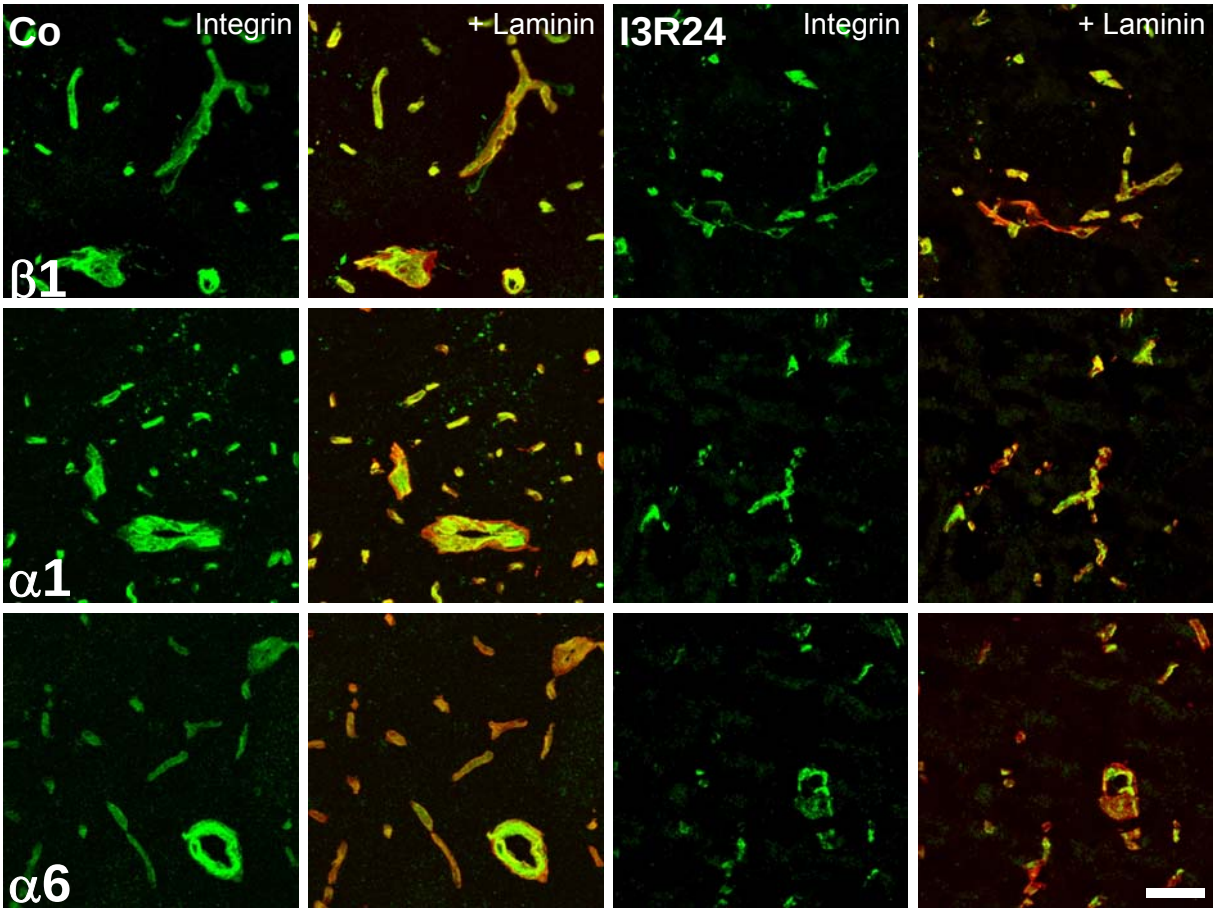


Abbildung 15: Doppelfluoreszenz zur Kolokalisation von Integrinen mit Kollagen Typ IV in den Mikrogefäßen im Schlaganfall der Ratte. Deutlich sichtbarer Verlust von Färbeintensität nach 24h Reperfusion in allen Integrinen. Scalebar 1 µm

Der im fokalen zerebralen Ischämie Modell der Ratte gesehene spezifische und Gefäßdurchmesser-abhängige Verlust von vaskulären Integrinen deutete auf eine Größe-spezifische Interaktion zwischen Endothelium und Basalmembran hin.
Die Areale in denen dieser Verlust gemessen werden konnte, korrespondierten mit dem deutlich morphologisch erkennbaren ischämischen Infarktareal. Bisher wurde jedoch im milden SHT bei Patienten mit deutlichen neuropsychologischen Ausfallserscheinungen nur selten ein Hinweis auf strukturelle Schäden im zerebralen Parenchym gesehen. Daher war fraglich, ob das milde SHT vergleichbare morphologische Veränderungen im Hirnparenchym hervorrufen würde. Von entscheidender Bedeutung war somit die Exprimierung der Integrine als Bestandteile der Basalmembran nach experimentellem SHT zu untersuchen und eventuell vorhandene Veränderungen mit den bereits in der fokalen zerebralen Ischämie gefundenen Veränderungen zu vergleichen. Somit wurde folgender Fragenkatalog erarbeitet:

1.6. Fragenkatalog

Sind die in eigenen Vorarbeiten mittels Immunhistochemie dargestellten Veränderungen des milden experimentellen SHT auf die Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße im Vergleich mit dem fokalen zerebralen Ischämie Model in der Ratte durch Western Blot Technik zu bestätigen oder treten gegenteilige Ergebnisse zutage?

Sind sie am ehesten einem diffusen experimentellen Modell des zerebralen SHT entsprechend oder treten eher fokale Schäden auf?

Ist eine Mitbeteiligung der Integrine bei den bereits beobachteten Basalmembran-schädigungen im Sinne einer schnellen Antwort oder eventuell sogar aktiven Involvierung zu beobachten?

Oder reagieren Integrine nicht, respektive erst sehr verzögert auf veränderte Umweltbedingungen? Mit anderen Worten, gibt es Veränderungen der α1, α 6 und β1-Integrin-Exprimierung bereits 12 Stunden respektive 24 Stunden nach mildem experimentellen SHT? Wären diese Veränderungen vergleichbar mit jenen der fokalen zerebralen Ischämie?

Der Hauptgedanke hinter diesen Untersuchungen ist zu untersuchen, ob der mögliche Verlust mikrovaskulärer Integrität Integrine mitbetrifft, oder sie verschont bleiben. Kommt es also zunächst nur zu einem Substanzverlust der Membran, oder werden bereits essentielle funktionelle Strukturen angegriffen?

Auch hier stellt sich die Frage ob diese möglichen Veränderungen im experimentellen SHT Ähnlichkeiten mit jenen des experimentellen fokalen zerebralen Ischämiemodelles in der Ratte aufweisen, ob es also in beiden Erkrankungen möglicherweise einen gemeinsamen Pathomechanismus bezüglich der Schädigung der BBB gibt ?

Und zuletzt, wären die Integrine vielleicht sogar Hauptakteure, also eventuell involviert in einen Pathomechanismus der Basalmembran-Zerstörung?

2. Material und Methoden

Das experimentelle Schädelhirntrauma welches den im nachfolgenden beschriebenen Untersuchungen zugrunde liegt, wurde im Zeitraum 2000-2001 am Neurochirurgischen Forschungslabor, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar in der Forschungsgruppe von Frau PD Dr. rer. nat. Angelika Mautes durchgeführt. Durch Kooperation mit der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. G.F. Hamann wurde das Hirngewebematerial des Versuchs an uns weitergeleitet.
Es wurden 16 männliche Sprague-Dawley Ratten (270-300g) in drei Gruppen aufgeteilt: 6 Kontrolltiere (Sham), 5 Tiere mit 12 Stunden Überlebensdauer nach Schädelhirntrauma (traumatic brain injury; SHT), sowie 5 Tiere mit 24 Stunden Überlebensdauer nach SHT.
Die Tierexperimente wurden von der Ethikkommission des Homburg/Saarpfalzkreis-(Tierversuchsvorhaben Nr. K110/180-07) in Übereinstimmung mit der European Communities Council Directive genehmigt. Es wurde konsequent darauf geachtet, die Anzahl der benötigten Tiere so gering wie möglich zu halten und zu gewährleisten, dass die Tiere keine Schmerzen erleiden. Daher wurde zunächst nur eine geringe Anzahl von Tieren, die hier verwendete Anzahl von 16 Tieren, als Pilotprojekt geplant. Wider Erwarten waren die Ergebnisse bereits bei dieser kleinen Anzahl von Tieren signifikant, daher wurde ein zweites größeres Projekt nicht mehr durchgeführt (siehe Kapitel Ergebnisse). Alle Tiere wurden in Macrolonkäfigen Typ 2 (26x42x15cm, LxBxH) bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 ± 1°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem 12 Stunden Tag/Nachtzyklus gehalten. Futter und Trinkwasser standen ad libidum zur Verfügung.

Alle weiterführenden Experimente wurden im Zeitraum 2001-2003 an der Neurologischen Klinik und Polikinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Direktor Herr Prof. Dr. med. Th. Brandt, in der Arbeitsgruppe experimentelle Forschung, Schlaganfallforschung unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. G. F. Hamann und unter Übereinstimmung mit den betreffenden Richtlinien und Bestimmungen der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

Experimente

2.1. Das Tiermodell des Flüssigkeits-Perkussions-Traumas

2.1.1.Grundlagen zum verwendeten Tiermodell

Bisher wurden zur Erforschung von Veränderungen bei SHT die unterschiedlichsten Tiermodelle entworfen, um den beim Menschen vermuteten pathophysiologischen Begebenheiten möglichst nahe zu kommen[44,45]. Das in dieser Doktorarbeit verwendete Flüssigkeits-Perkussions-Modell (fluid-percussion-modell; FPI) wird in der Forschung als experimentelles Modell angesehen, das in einem unangetasteten inneren Hirnmilieu relativ unverfälschte Beobachtungen der auf das Gehirn einwirkenden traumatischen Kraft zulässt (Abb. 16) und wird untenstehend kurz methodisch erklärt.

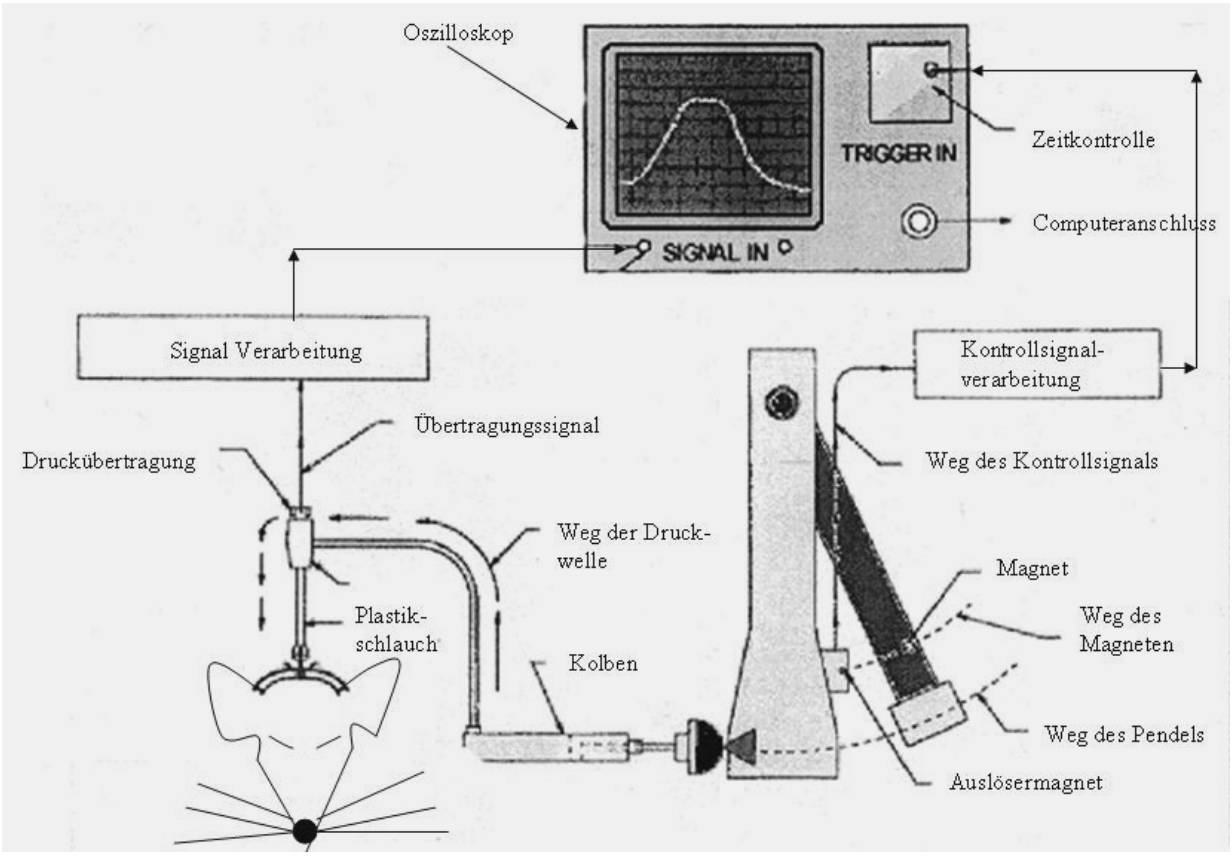


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Flüssigkeits- Perkussions Apparatur

Durch ein kleines Bohrloch im Schädelknochen wird ein mit isotoner Kochsalzlösung gefüllter Schlauch auf die geschlossene Dura aufgesetzt und mit Knochenzement

befestigt. Auf diese Flüssigkeitssäule wird durch ein Pendel ein normierter Schlag gesetzt, die Druckimpulswelle setzt sich durch die Flüssigkeitssäule fort und trifft auf der Dura auf. Diese Druckimpulswelle wird mit einem Oszillograph aufgezeichnet und dokumentiert. Betont werden muss, dass vielmehr die extrakranielle Druckerhöhung gemessen wird und nicht intrakranielle Sonden die Druckerhöhung aufzeichnen, da die Dura intakt gelassen werden soll, um ein geschlossenes intradurales Milieu weiterhin zu gewährleisten. Dieser in der FPI extrakranielle gemessene Druckpuls wurde jedoch als eng mit dem intrakraniell erhöhtem Druck von Lindgren und Rinder[76] korreliert beschrieben (Abb. 17).

Nach Setzen des Traumas wird der Schlauch entfernt und die Wunde wieder verschlossen. Die Dura bleibt während des Experimentes intakt, das Flüssigkeitsinnenmilieu des Hirnes wird nicht verfälscht.

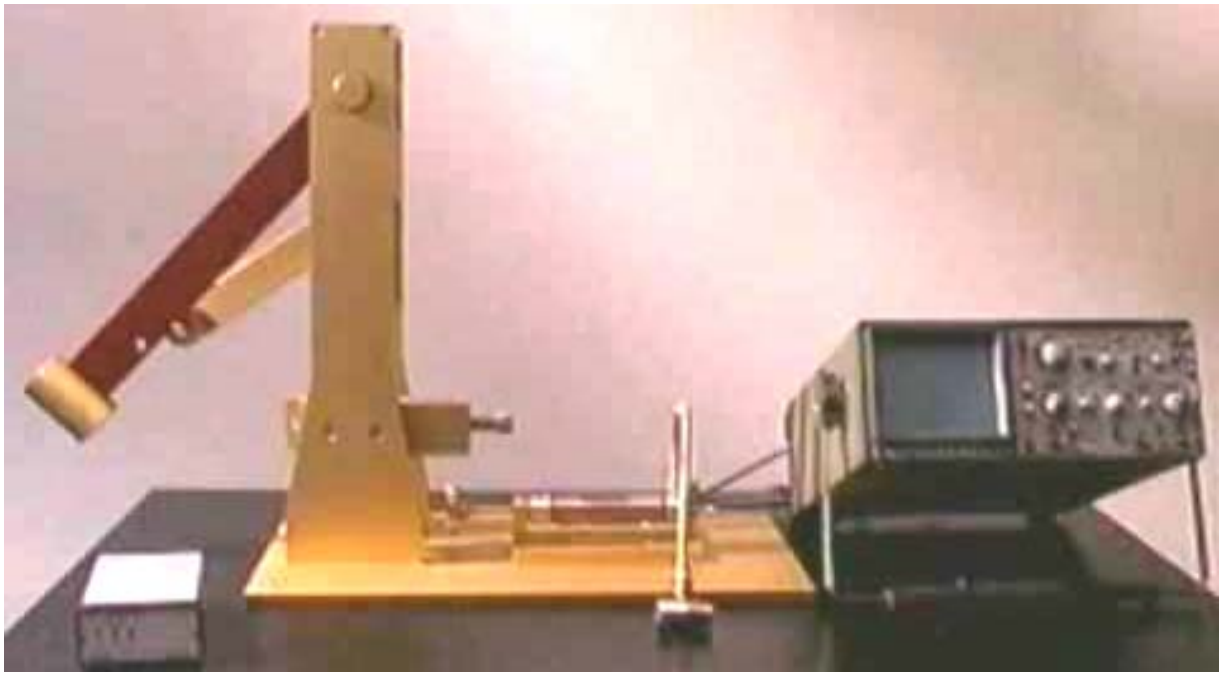


Abbildung 17: Die verwendete Flüssigkeits-Perkussions-Apparatur

2.1.2. Experimentelles Modell

16 männliche Sprague-Dawley Ratten (270-300g) wurden in drei Gruppen aufgeteilt:

- 6 Kontrollen (Sham)
- 5 Tiere mit 12 Stunden Überlebensdauer nach experimentellem SHT
- 5 Tiere mit 24 Stunden Überlebensdauer nach experimentellem SHT

Alle 16 Ratten wurden mit Natrium-Pentobarbital 64mg/kg Körpergewicht intraperitoneal anaesthesiert, die rechte Arteria femoralis freipräpariert und mit einer Kanüle (Polyethylen Katheter, 96mm) arterieller Blutdruck (Transducer Becton Dickinson, GB) und Blutgase kontrolliert, wobei die Körpertemperatur rektal über eine Verweilsonde monitoriert wurde. Sie wurden nicht intubiert und atmeten spontan. Des weiteren wurde auch die rechte Vena femoralis zur Fortführung der Anästhesie präpariert. Die Tiere wurden während der Operation monitorüberwacht, Atemfrequenz und Herzschlag über eine Frequenzelektrode (Philips FE, D) aufgezeichnet.

Skalp und Muskulus temporalis der rechten Kopfschwarte wurden zurückgebogen und eine Kraniotomie zwischen Lambda und Bregma (5 mm vom Lambda, 5 mm vom Bregma und 4 mm von der Sagittalnaht entfernt) über dem parietalen Kortex rechts durchgeführt, wobei ein Bohrloch mit 4mm Durchmesser in den Schädelknochen gebohrt wurde. Die Dura wurde dabei intakt gelassen. Diese Operation wurde bei allen Ratten durchgeführt, sowohl bei den 10 Ratten die dem experimentellen SHT unterzogen wurden, wie den nur Sham operierten 6 Kontrolltieren.
Im Folgenden wurde den Tieren der SHT Gruppe ein mit isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl, Temperatur 37°C) gefüllter Polyethylenschlauch (PE350) in das Bohrloch eingebracht und mit Knochenzement (Poly-F Plus Bondex, Dentsply De Trey, D) am Schädelknochen befestigt. Der Polyethylenschlauch wurde mit einem 34cm langen Plexiglaszylinder verbunden, dessen innerer Durchmesser 3,2 mm entsprach (hergestellt im technischen Labor, University of San Francisco) und ebenfalls mit 0,9% NaCl (37°C) gefüllt war. Ein seitlich angebrachtes Pendel wurde wie schon beschrieben (siehe auch Lindgren und Rinder[76)] mit einer vorbestimmten

Höhe von 13 cm sT (sT= supra Trauma) auf die auf der Duraoberfläche aufstehende isotone Kochsalzlösungssäule fallen gelassen und produzierte so eine Druckwelle, welche ein Trauma von 1,5 atm positivem Maximaldruck (durch Vorversuche reproduzierbar ermittelt) auf der Duraoberfläche hervorrief. Die Druckwellenpulse wurden extrakraniell von einem Übertragungsgerät (Transducer, Gould Inc.) gemessen und oszillographisch aufgezeichnet. Es wurde die extrakranielle Druckerhöhung gemessen, da die Dura intakt gelassen werden sollte, um ein geschlossenes intradurales Milieu weiterhin zu gewährleisten, welches mit intrakranielle Sonden verletzt worden wäre. Dieser in der SHT exrakranielle gemessene Druckpuls wurde jedoch als eng mit dem intrakraniell erhöhtem Druck von Lindgren und Rinder[76] korreliert beschrieben.
Nach erfolgter Operation wurde der Polyethylenschlauch entfernt, die Wunde mit 4,0 starken Ethilonfaden verschlossen und die Tiere auf eine unterlegten Inkubator (Intensiv-Pflege Inkubator, Drägerwerke AG, D) gelegt, wo sie bis zum Erwachen weiterhin überwacht wurden. Danach wurden sie in geräumigen Käfigen (26x42x15cm, LxBxH) mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung untergebracht und nach 12h respektive 24h erneut anästhesiert zur cerebralen Perfusion. Die Tiere wurden alle zwei Stunden bezüglich ihres normalen Verhaltens kontrolliert und insbesondere darauf geachtet, ob sie durch Kratzen an der Operationsstelle Hinweise auf Schmerzen zeigten. Dennoch verstarb ein Tier der Sham Gruppe an einer Wundinfektion und daraus resultierender Sepsis und ein Tier der 12 Stunden SHT Gruppe 2 Stunden post OP an einem Herzkreislaufversagen ungeklärter Ursache.

Die übrigen Tiere wurden nach 12 Stunden, respektive 24 Stunden (hier auch Sham) mittels hochdosiertem Phentobarbital anästhesiert. Unmittelbar nach tiefer Narkose der Tiere wurde der Herzbeutel eröffnet, der linke Ventrikel kanüliert und 500 ml 4% Paraformaldehyd (in PBS) mit einer peristaltischen Pumpe und einer Geschwindigkeit von 40ml/min transkardial perfundiert. Das Gehirn wurde in toto entnommen, in eine Stickstoff-Kühlkammer (-20°C) eingebracht, in tissue teck eingebettet und bei -80°C gelagert. Die Semidünnschnitterstellung der einzelnen Hirnschnitte (10 µm dick, coronare Schnittführung) für die immunhistochemische Aufbereitung erfolgte mittels Kryostat (CM3000, Leica) im Labor der experimentellen Schlaganfallforschung, Prof. Dr. med. G. F. Hamann, LMU-München.

2.2. SDS- PAGE und Western Blot

2.2.1.Grundlagen der SDS-PAGE und des Western Blot

2.2.1.1.SDS-PAGE

Die Gel-Elektrophorese dient der Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglicht den schnellen Nachweis zu identifizierender Proteine und deren MW-Bestimmung mittels Trennung von Proteingemischen. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4g SDS pro 1g Protein). Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt, und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, z.B. -Mercaptoethanol, oder Dithiothreitol (DTT), aufgespalten (Auflösen der Quartärstruktur). Dadurch wird gewährleistet, dass nur die Größe (molare Masse) des Proteins als Trennkriterium wirkt. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol.

2.2.1.2. Western Blot

Beim Westernblot (Abb. 18) werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrocellulosemembran) transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Bei diesem Vorgang wird zudem das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteine können renaturieren, wobei diese Renaturierung nicht vollständig sein muss. Dadurch kann es Probleme mit monoklonalen Antikörpern geben, die spezifisch nur ein Epitop des Antigens erkennen, wie in den Integrin Western Blots dieser Arbeit leider geschehen. Des weiteren kann es Probleme mit Restladungen geben. Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkung an die Nitrocellulosemembran gebunden, wobei die Wechselwirkung zwischen Protein und Membran nicht sehr stabil ist. (Das könnte ebenfalls ein Problem des Integrin Western Blots gewesen sein.)

Nach dem elektrophoretischen Transfer von Protein auf Nitrocellulose müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden, da die Antikörper sich sonst an jeder freien Bindungsstelle der Membran anheften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden. Dieses Blockieren freier Bindungsstellen (blocking) wird mit einem nicht für die Antikörper erkennbaren Protein (meist Albumin aus Rinderserum = BSA), aber auch fettfreies Milchpulver, Myoglobin, Hämoglobin und andere Seren) erzielt.
Um die spezifische Bindung von Antikörpern an das Epitop ihres Antigens nachzuweisen, sollte der Antikörper mit einem Enzym gekoppelt sein, das eine Farbreaktion auslösen kann. Ein gebräuchliches Enzym ist hier die Meerrettichperoxydase (horseradish peroxidase; HRP).

2.2.2. Kollagen SDS- PAGE und Western Blot

Alle Schritte der Gewebshomogenisierung und Zentrifugierung wurden bei einer Temperatur von 4°C in einem Kühlraum durchgeführt. Um das benötigte Gewebe zu gewinnen wurde eine in unserer Arbeitsgemeinschaft entwickelte Technik benützt, die wir „Kratz-Western-Blot-Technik“ nennen. Hierbei wird lediglich der Tatsache Rechnung getragen, dass das benötigte Gewebe direkt von den Objektträgern (10 μm dicke koronare Kryoschnitte) abgekratzt wird und somit eine genau das Gewebe der Region analysiert werden kann, dessen Protein und/oder Antigengehalt man bestimmen möchte[54].
Jeweils der Kortex der nicht traumatischen Seite sowie der Kortex der traumatischen Seite wurde abgekratzt und homogenisiert. Auch die Basalganglien der traumatischen sowie die der nicht traumatischen Hemisphäre wurden homogenisiert und gegeneinander verglichen.
Das Hirngewebe wurde in 100µl einer Lösung von 20mM Tris bei einem pH Wert von 7,3, 1mM EDTA und 2% SDS homogenisiert. Um einer Proteindegradierung vorzubeugen, wurden die Proteaseinhibitoren PMSF (100μg/ml), Aprotinin und Leupeptin (jeweils10 μg/ml) hinzugegeben. Die Proben wurden daraufhin sonographisch homogenisiert und für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurden routinemäßig mit einem Bradford Protein Assay (bei dem Rinderserum als Standard benützt wird) bestimmt.
Die Aufsplittung der Proteinmasse in einzelne Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Gleiche Proteinmengen wurden in einem 2fach konzentrierten SDS-PAGE Loading

Puffer (siehe Verbrauchsmaterialien/Lösungen, Puffer) aufgelöst, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, auf ein 7,5% Polyacrylamidgel übertragen und für 2 Stunden bei 100V laufen gelassen. Daraufhin wurden die Proteinen auf eine PVDF (Polyvinyldifluorid) Membran übertragen und für 1 Stunde mit einer konstanten Spannung von 400mA in einem Transfer Puffer (siehe Verbrauchsmaterial/Lösungen Puffer) bei einem pH von 11 geladen. Nach Immobilisation wurden die Membranen mit Ponceau Rot gefärbt, um eine gleiche Mengenverteilung und Laufstärke in allen Linien zu kontrollieren. Die Blots wurden dann mit 3% BSA und 0,2% Tween 20 in TBS bei Raumtemperatur für eine Stunde geblockt um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-Kollagen IV aus Ziege, der in 3% BSA in TBS und einer Verdünnung von 1:1000 verwendet wurde, erfolgte über Nacht bei 4°C. Bei dem Primär-Antikörper handelt es sich um ein gepooltes Antiserum gegen menschliches und Rinder-Kollagen Typ IV aus der Ziege, welches auch mit Kollagen Typ IV der Ratte reagiert und bereits im Ischämie Modell in der Ratte in unserem Labor vielfach eingesetzt wurde.
Am Folgetag wurden die Blots 3malig für 10 Minuten in TBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Kaninchen anti-Ziege (1:100) in TBST inkubiert. Nachdem der Blot 3malig für 10 Minuten mit TBST gewaschen wurde, wurde das Vectastain ABC Kit für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt und nach erneutem Waschen (3 x 10 Minuten in TBST) der Western Blot mit dem ECL Entwicklungs-Kit (siehe Verbrauchsmaterialien/ weitere Reagentien) fertiggestellt.

2.2.3. Integrin SDS- PAGE und Western Blot

Im Wesentlichen wurde die gleiche Vorgehensweise praktiziert wie bereits bei den Kollagenen beschrieben. Auch hier wurden alle Schritte zur Homogenisierung und Zentrifugation bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt und die oben beschriebene Kratz-Technik angewandt. Die gesamte Hemisphäre der traumatischen Seite wurde gegen die gesamte Hemisphäre der nicht traumatischen Seite verglichen. Das Gewebe wurde in einem Puffer bestehend aus 50mM Sukrose, 5mM HEPES pH 7.2 und Proteininhibitoren homogenisiert. Das Homogenat wurde mechanisch zermahlen (40 strokes) für 10min sonographisch homogenisiert und erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100µl 1% SDS gelöst und für 60min bei 100.000g zentrifugiert. Das erneut erreichte Pellet wurde in RIPA (1% Triton-X 100, 1% Na-

Deoxycholat, 0.1% SDS, 0.01 Tris/HCl pH 7.2 and 0.15 M NaCl) gelöst und ein letztes Mal bei 40.000 g für 30 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mittels SDS-PAGE getrennt und bei 4°C auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membranen wurden zunächst mit 3% BSA für 1 Stunde inkubiert und dann mit den anti-Integrin β1, α1 und α6 (1:500) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gele gewaschen und mit dem jeweiligen peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (siehe Verbrauchsmaterial/sekundäre Antikörper; Verdünnung 1:100) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in TBST inkubiert. Nachdem der Blot 3malig für 10 Minuten mit TBST gewaschen wurde, wurde das Vectastain ABC Kit für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt und nach erneutem Waschen (3 x 10 Minuten in TBST) der Western Blot mit dem ECL Entwicklungs-Kit fertiggestellt.

2.2.4. Analyse der Western Blots

Ein optisches Analyseprogramm (Tina, Version 2.08) analysierte die unterschiedlichen Banden mittels optischer Densiometrie (Dichtemessung) und übertrug diese auf eine Dichteskala. (Extinktionsmessung bei 590 nm mit dem Bicinchoninsäure-Mikroprotein-Assay). Es wurde die Relation zwischen der optischen Dichte (OD) der traumatischen und der nicht traumatischen Seite als Mittelwerte ± Standardabweichung berechnet, als Eichung diente Rinder-serumalbumin (BSA).

2.3. Immunhistochemie

2.3.1. Grundlagen Immunhistochemie

Proteine, Polysaccharide und andere Antigen-Strukturen können durch immunhistologische Techniken spezifisch nachgewiesen werden sobald Antikörper (AK) gegen sie gebildet werden können. Als ein Nachweisverfahren der AKs hat sich die Immunhistochemie bewährt, die Aussagen über die morphologische Verteilung des mittels Antikörpers gefärbten Antigens zulässt. Es gibt polyklonale (nicht 100% identische Antikörper, cave Kreuzreaktionen) und monoklonale Antikörper (Vorteil: hohe Spezifität). Immunhistochemische Färbemethoden können direkt mit dem Gewebsantigen oder indirekt über enzymgekoppelte Antikörper erfolgen (Substrat-Chromogenreaktion). Die Avidin-Biotin-Methode bzw. Streptavidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin zur Bildung von

Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundär-AK oder zur Kopplung enzymmarkierten Avidins an biotinylierte Sekundär-AK (labeled avidin biotin technique, LAB/LSAB). Bei der Reaktion bindet das Avidin der A-B-Komplexe oder enzymgekoppeltes Avidin allein an den Sekundär-AK. Als Enzym wird Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase verwendet, die die Umsetzung des löslichen Chromogens zu einem farbigen Substrat (DAB, oder AEC) katalysiert. Diese Technik hat die höchste Sensitivität im Vergleich zu den bisher erwähnten Methoden und ist die in unserem Labor angewandte Technik.

2.3.2. Experimente Immunhistochemie

Um neuronale Schädigungen festzustellen und die genaue Bestimmung der interessierenden Region (Regions of Interest, ROI) mittels morphometrischer Analyse durchführen zu können, wurden direkt korresponierende Schnitte (10μm Abstand zum Kollagen Typ IV gefärbten Schnitt um einen übereinstimmenden Läsionsort zu untersuchen) mit einem monoklonalen Antikörper aus der Maus gegen mikrotubulär assoziiertes Antigen 2 (MAP2) gefärbt. Für die Integrin Färbungen wurden an die MAP2 Schnitte direkt anschließende Schnitte gefärbt, so dass die ROI Bestimmung über MAP2 in allen direkt folgenden Integrinfärbungsschnitten verwendet werden konnte.

Die Objektträger mit den gefrorenen Schnitten wurden für 10 Minuten luftgetrocknet und auf Raumtemperatur erwärmt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Acteon-Chloroform (1:1) fixiert, 5 Minuten in 10 mmol/L Glycerin-PBS (siehe Verbrauchsmaterial/Lösungen, Puffer) gestellt und 3 malig jeweils 5 Minuten mit PBS (siehe Verbrauchsmaterial/Lösungen, Puffer) gewaschen, bevor sie für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Blotto (siehe Verbrauchsmaterial/Lösungen, Puffer) inkubiert wurden, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Die Auswahl der gefärbten Integrin-Subunits, sowie die optimale Verdünnung des verwendeten Antikörpers basiert auf den bereits unter Kapitel 1.5. beschrieben Vorversuchen in der Ischämie. Die Schnitte wurden mit den Primärantikörpern (gegen die Integrin Subunits α1 aus Kaninchen, α6 aus Maus und β1 aus Kaninchen,

siehe Verbrauchsmaterial/primäre Antikörper) in einer Verdünnung von 1:4000 in Reagent Diluent für 2 Stunden bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert.
Am Folgetag wurde der ungebundene Primärantikörper mit PBS 3malig für 5 Minuten von den Schnitten abgewaschen, bevor sie mit den biotinylierten Sekundärantikörpern Anti-Kaninchen, respektive Anti-Maus (siehe Verbrauchsmaterial/sekundäre Antikörper) in einer Verdünnung von 1:100 in einer Lösung aus PBS, 4% Pferdeserum und 10% Tween (1000:15:1) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Für eine Fortführung der Färbung mit der Peroxidase-Technik wurde die Aktivität der endogenen Peroxidasen durch Inkubation mit H2O2 (30% H2O2 1ml/L PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert, um eine unspezifische Anfärbung zu vermeiden.
Zum Inkubieren der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex wurde das Vectastain Elite Kit benützt und die Schnitte für 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte mit Diaminobenzidin (DAB; 0,5 g/l in PBS, siehe Verbrauchsmaterial/ Chemikalien) mit 0,01% H2O2, versetzt mit 0,25 g/l CoCl2 und 0,2 g/l NiSO4 für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Färbung visualisiert. Die Schnitte wurden nochmals gewaschen, in Alkohol und Xylene entfettet und mit Depex Mounting Medium eingedeckelt.

2.3.4. Das OPTIMAS-Bildverarbeitungsprogramm für die Immunhistochemie

OPTIMAS ist ein Bildverarbeitungsprogramm das „den Blick durchs Mikroskop“ analysiert, die unter dem Mikroskop sichtbaren Bilder werden digital aufgenommen und in Pixel umgesetzt. „Ptolemäus“ ist eine eigens erstellte Unterfunktion von OPTIMAS die von Herrn Dr. med. C.U.A. Kloss für die Bedürfnisse der vorliegenden Arbeit (in Absprache mit der Verfasserin dieser Arbeit) wie auch weiterer Arbeiten unseres Labores entwickelt wurde und nicht kommerziell erhältlich ist. „Ptolemäus“ ermöglicht das Auswerten von Färbungen eines Schnittes, dessen Größe über ein mikroskopisches Gesichtsfeld hinausgeht, indem es den gesamten Schnitt mittels einer Aufzeichnungskamera, Mikroskoptisch-Ansteuerung und Verrechungscomputer direkt am Mikroskop digitalisiert. Es erstellt verrechnete Bilder (sog. Karten) nach wählbaren Vorgaben (z.B Gefäßdichte, Färbeintensität etc.), welche mit anderen Karten kombiniert werden können (hier MAP-2 und Kollagen Typ IV Overlay oder MAP-2 und Integrin Overlay).

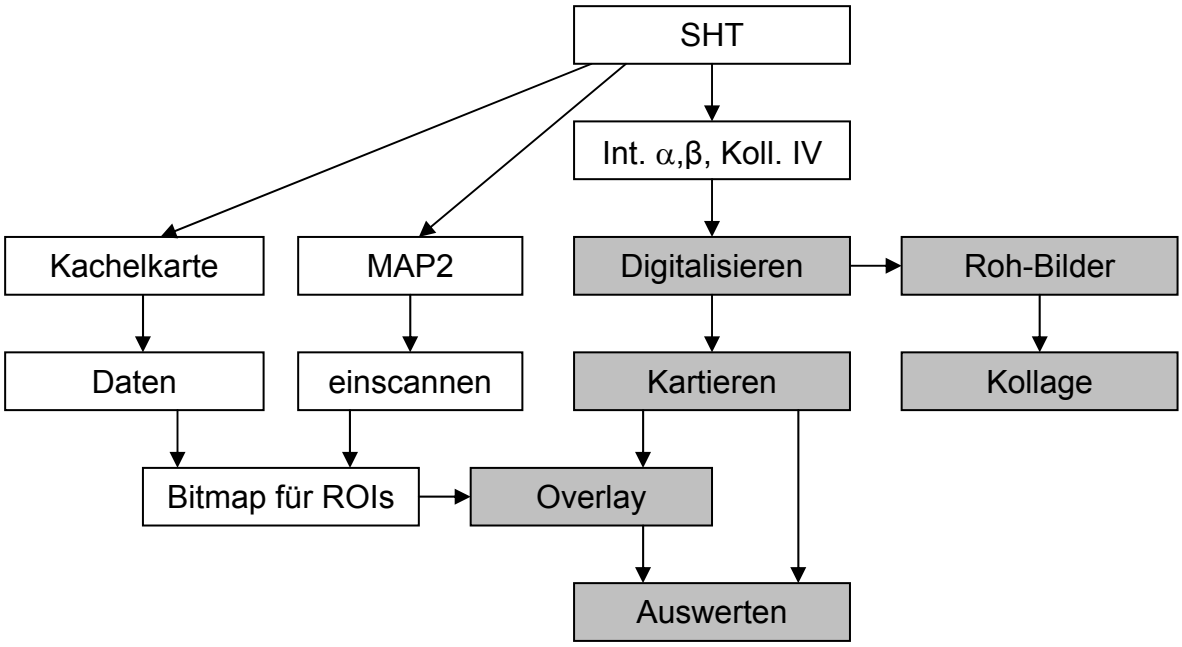


Abbildung 18: Arbeitsschematische Abbildung des Bildprogrammes OPTIMAS-Ptolemäus

Makro 1 - Digitalisieren und Kartieren

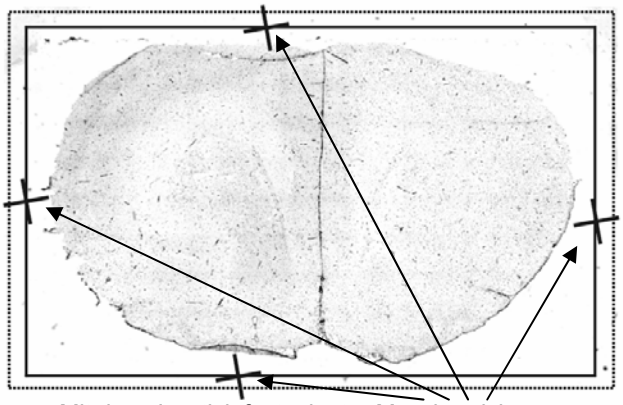
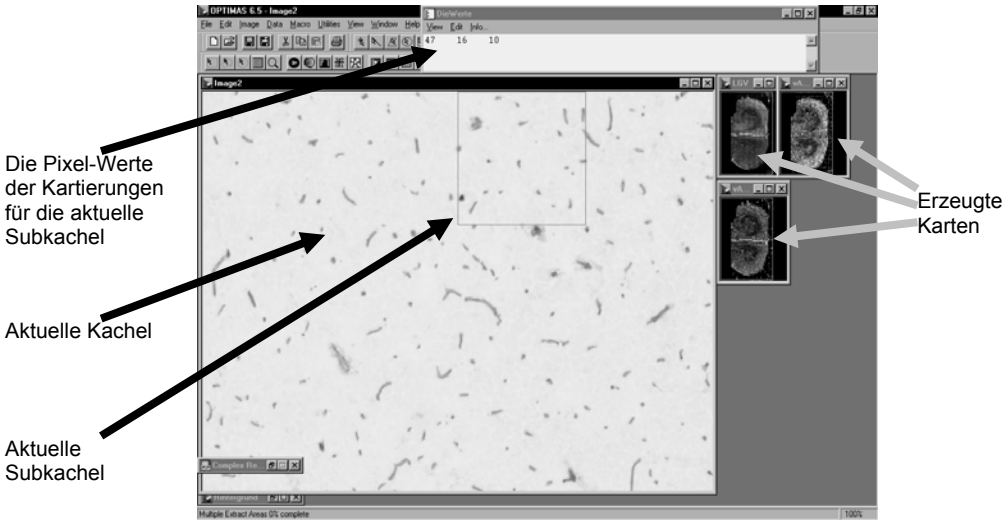


Abbildung 19: Vom immunhistochemisch gefärbten Schnitt werden Kacheln erstellt. Dabei kann einfach nur der Grauwert kartiert werden, was dem gewöhnlichen Blick durch das Mikroskop entspricht. Es können aber auch gleichzeitig Berechnungen, wie z.B. Färbeintensität, Gefäßzahl und Gefäßdichte etc. kartiert werden.

Eine Kachel entspricht einem einzelnen Kamerabild. Die Kachel wird weiter in Subkacheln und Pixel unterteilt. Das Makro steuert die Aufzeichnungskamera und das Mikroskop über eine Mikroskoptisch-Ansteuerung automatisch an. Die so erzeugten Kacheln werden im Microsoft Bitmap-Format abgespeichert.

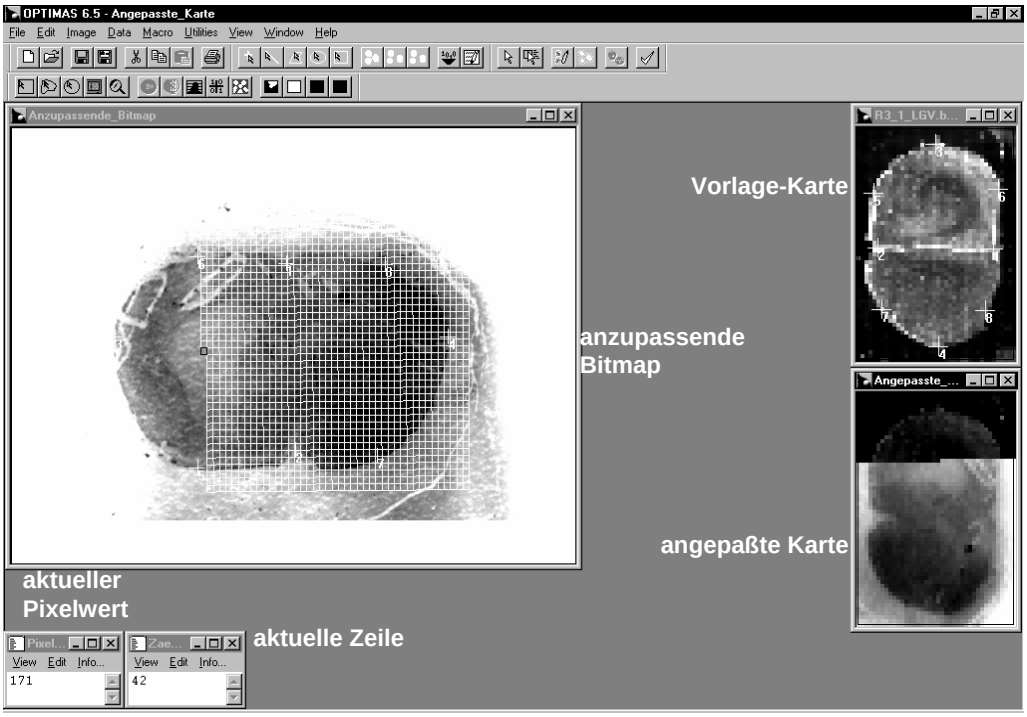
Makro 2 –Kartenerzeugung

Abbildung 20: Eine Gesamtkarte wird von den Kacheln erstellt.



Makro 3 - Bitmap anpassen

Abbildung 21: Dieses Makro passt zwei Karten aneinander an. Die Formate werden so aneinander angepasst, dass Position,Orientierung,Verzerrungen und die Auflösung angeglichen werden können. Es entsteht eine sogenannte orthotope Karte.



Makro 4 - Auswertung

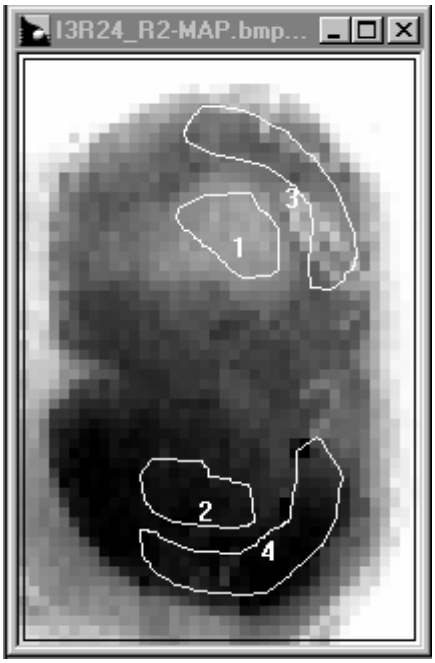


*Abbildung 22: Das Makro ermöglicht es in einer Karte Auswertungsregionen (**R**egions **o**f **I**nterest, ROI) zu definieren, diese ROIs auf eine andere orthotope Karte zu übertragen und hier die mittleren PIXEL-Werte in den ROIs zu berechnen. Abb : ROI 1-Traumaareal im Kortex, ROI 2-gespeigeltes Areal im Kortex der Gegenseite, ROI 3- Basalganglien des Traumaseite, ROI-4 gespiegeltes Areal der Basalganglien der Gegenseite.*

Folgende Parameter wurden gemessen:

1. Der **logarithmische Grauwert** gibt die Licht-Extinktion an und ist damit der Farbstoffkonzentration direkt proportional. Er gibt die Menge eines Farbstoffes im Schnitt vor allem semi-quantitativ wieder.

2. Die **Flächenzahl mit variablen Schwellenwert** pro Kacheleinheit ermöglicht die Identifikation eines genauen Farbschwellenwertes und der Größe der Flächen. Der variable Schwellenwert ist insbesondere bei inhomogenen Hintergrund einem fixen Schwellenwert vorzuziehen. Nachteilig ist, dass auch Schmutz bei sehr schwacher Färbung als Fläche berechnet wird. Die einzelnen Pixel-Werte geben quantitativ die Flächenzahl wieder.

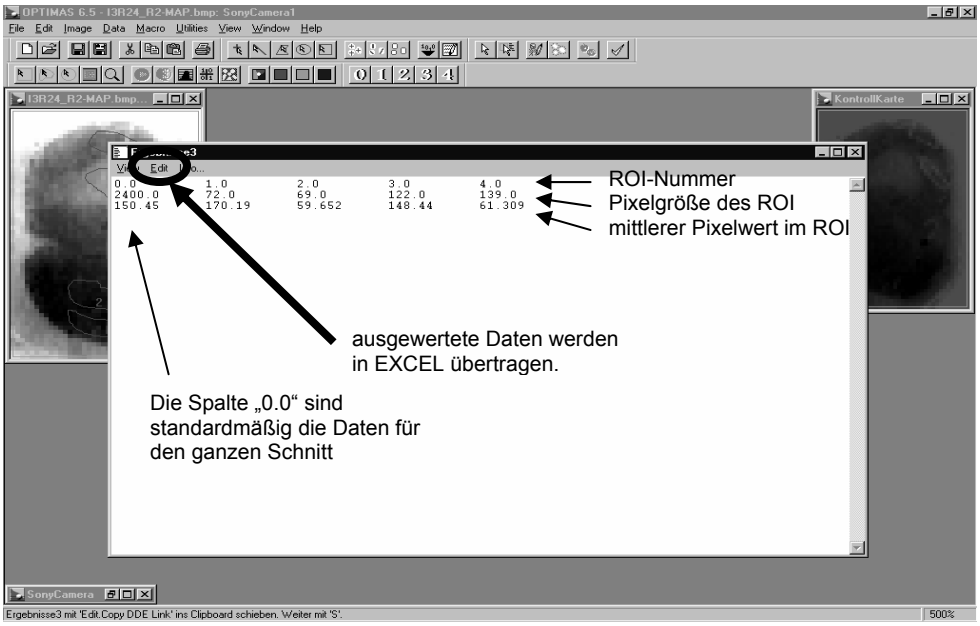
3. Der **Grauwert (Mittelwert)** stellt die einfachste Kartierung dar. Es wird eine Karte erstellt, wie es auch durchs Mikroskop gesehen wird, allerdings ohne Gesichtsfeldeinschränkung.

4. Der **Grauwert (Mittelwert-Standardabweichung)** stellt eine einfache semiquantitative Kartierung für besonders kleine Strukturen dar (z.B. Mikroglia).

5. Die **Flächenzahl mit fixem Schwellenwert** unterdrückt bei homogenen Färbungen verschmutzte Stellen.

6. Der **prozentuale Anteil der Flächen (fester Schwellenwert)** benutzt letztgenannten Parameter für eine prozentuale Flächenberechnung. Für jede Berechnung wird für jedes Pixel der Karte ein Wert zwischen 0 und 255 errechnet, je nach Färbung variiert die Bedeutung (hier z.B. Kollagengehalt oder Gefäßzahldichte).

Abbildung 23: Die gemessenen Daten wurden in EXCEL übertragen und ausgewertet.



2.3.5. Quantifizierung der Integrinimmunhistochemie: Veränderungen der Integrinfläche und Integrinfärbeintensität mittels Video-imaging Mikroskopie

Die Quantifizierung der Integrinimmunhistochemie im experimentellen SHT wurde nach der gleichen Methode durchgeführt wie die Quantifizierung der Mikrogefäßschäden im experimentellen zerebralen Ischämiemodell: Um die Intensität der Integrinfärbung pro Kachel (Integrinintensität), sowie des Prozentsatzes des mit Integrinfärbung markierten Gewebes (Integrinfläche) zu quantifizieren, wurden die interessierenden Regionen (Regions of interest, ROIs) wie folgt festgelegt:
Vier direkt aufeinander folgende Hirnschnitte wurden gefärbt: Nr.1: MAP2, Nr.2 Integrin α1, Nr.3 Integrin α6, Nr.4 Integrin β1.
Zunächst wurde der MAP2 gefärbte Schnitt mittels eines konventionellen Flachbildscanners digitalisiert und die ROIs (Kortex der Traumaseite und Kortex der nicht traumatischen Seite, sowie sie Basalganglien beider Seiten) mit dem OPTIMAS 6.5 Bildanalysesystem, wie bereits von Pfefferkorn beschrieben[99], eingezeichnet. Die Auswahl der ROIs erfolgte nach dem stereotaktischen Gehirnatlas der Ratte von Paxinos und Watson[96].
Zusätzlich wurde ein Verhältnis zwischen dem gesamten Kortexareal der Traumaseite und der gegenüberliegenden nicht traumatischen Seite gebildet. Dieses Verhältnis wurde als Maß für das Ödem (Trauma) oder die Schrumpfung (Färbung) des Gehirns genommen und zur Korrektur der primären Messungen verwendet. Das gleiche Vorgehen wurde auch für die Basalganglien verwendet, um von Trauma-Ursprung entfernte Areale mit der Frage eines systemischen Schadens auszuwerten. Somit entstand eine ROI-Maske, wie unter dem Abschnitt Methoden „Das OPTIMAS Bildverarbeitungsprogramm für die Immunhistochemie“ bereits beschrieben.
Um Abweichungen in der Übereinstimmung mit den ROI Masken zu minimieren, wurden direkt aufeinander folgende Hirnschnitte verwendet. Diese wurden in einem Zeiss Axiophot Mikroskop unter 50-facher Vergrößerung mittels einer Sony Power HAD 3CCD Farb-Videokamera digitalisiert, in OPTIMAS importiert, und dort mit den ROI Masken verrechnet und angepasst. Die Ergebnisse der Messungen wurden in EXCEL exportiert und abgespeichert.

2.4. Statistik

Die statistsche Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Sigma Plot Statistik-Rechenprogrammes 2.0 (Systat Software, Erkrath, D). Zur Beurteilung der Daten wurden Varianzanalysen für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese, also kein statistisch nachweisbarer Unterschied der untersuchten Daten, wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% abgelehnt. Die histomorphometrischen Daten wurden, da die parametrischen Vorraussetzungen bei einer Gruppenstärke von insgesamt 16 Tieren nicht erfüllt waren, per Kruskal-Wallis-Test mittels ANOVA on Ranks analysiert. Zudem wurde der Intergruppenvergleich mittels Mann-Whitney-U Test verglichen, nachfolgende Paarvergleiche mit dem Student-Newman-Keuls Test durchgeführt. Wenn nicht anders bezeichnet sind in der Folge die Daten als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) in der prozentualen Angabe gegenüber der nicht-traumatischen Seite angegeben.

3. Ergebnisse:

3.1. Kollagen

Die wichtigsten Vorarbeiten sowie das Ergebnis des Western Blot zur Expression von Kollagen nach experimentellem SHT wurden bereits in der Veröffentlichung *Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat. Muellner A, Benz M, Kloss CU, Mautes A, Burggraf D, Hamann GF. J Neurotrauma. 2003 Aug; 20(8): 745-54* publiziert. Die Vorabveröffentlichung wurde genehmigt von Herrn Prof. Dr. med. Peter C. Weber, Vorsitzender des Promotionsausschusses Dekanat der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Grundlage der vorliegenden Arbeit ist der von der Erstellerin dieser Arbeit (Angela Muellner) und von Herrn Markus Benz beobachtete tatsächliche Verlust des Basalmembranbestandteils Kollagen Typ IV nach dem milden bis moderatem Schädelhirntrauma in der Ratte, den wir in der Immunhistochemie und morphometrischen Analysen des Hirngewebes entdecken konnten (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.5.1.).
Dieses Ergebnis war in zweifacher Hinsicht bemerkenswert. Einerseits handelt es sich bei dem verwendeten Schädelhirntrauma-Model eher um ein diffuses Trauma, das aber umschriebene Veränderungen der zerebralen Mikrogefäße hervorgerufen hatte. Andererseits geschah dies nicht im (vorher durch den eher diffusen Charakter des Traumas vermuteten) Bereich der Basalganglien, sondern im Bereich des Kortex der traumatischen Seite.
Eine der unmittelbar in diese Doktorarbeit übergehenden Fragestellungen war nun zu klären, ob im Western Blot eine Bestätigung des beobachteten Basalmembran-Schadens erfolgen würde, oder sich die vorherige Beobachtung als nicht beständig erweisen würde.

3.1.1. SDS-PAGE und Western Blot

Im Kollagen Typ IV Western Blot fanden sich bei 140 kDa, 120 kDa sowie 50kDA drei Banden. Zur Testung welche der drei Banden Kollagen Typ IV zuzuordnen ist, wurden rekombinante MMPs (MMP 2 und MMP 9) hinzugegeben. Sinn dieser

Differenzierung war, eine eventuelle Reduktion einer der drei Banden zur die Aktivität der MMPs (insbesondere von MMP 9) zu erreichen, und damit festzustellen welche Bande das als Substrat der MMPs bekannte Kollagen Typ IV enthält, das heißt MMP-sensitiv ist (siehe auch[112]). Dabei erwies sich die mittlere Bande als MMP-sensitive Bande und damit als Kollagen Typ IV Bande. Die Methodik der Kollagen Typ IV Bandenbestimmung wurde als Paper bei Neurological research eingereicht und akzeptiert (Martin Liebetrau, Dorothe Burggraf, Christine Büscher, Wolfgang Linz, Gerhard F. Hamann. Ramipril prevents extracellular matrix accumulation in cerebral microvessels. Neurological research, in Press).

Bei dem Vergleich der Western Blot Banden bestätigte sich der immunhistochemisch und morphometrisch beobachtete signifikante Verlust des Basalmembranantigens Kollagen Typ IV der Mikrogefäße. Diese Bestätigung betraf das Areal des traumatischen Kortex (ROI 1) der 24-Stunden-Überlebensgruppe, die Beobachtung des Verlustes von Kollagen Typ IV im Kortexareal konnte dadurch erhärtet werden.

Wie auch bereits in der Immunhistochemie beobachtet, fand sich jedoch kein Kollagen Typ IV Verlust in den Basalganglien, das heißt auch dieses Ergebnis konnte bestätigt und erhärtet werden.

Die Reduktion des Kollagen Typ IV Gehaltes war im ROI 1 (Kortexareal der traumatischen Seite) 31 ± 6% ($p < 0,03$, Abb 24 und 25) gegenüber ROI 2 (gespiegeltes Kortexareal auf der nicht-traumatischen Seite).

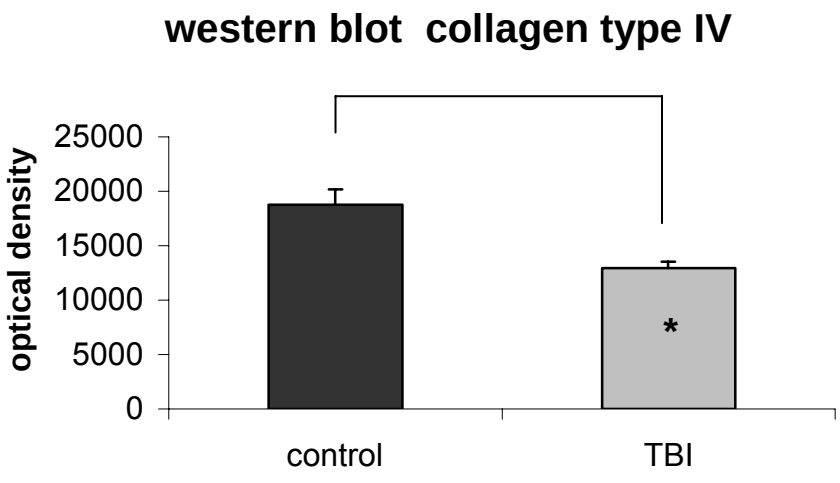


Abbildung 24: Westernblot des Kortex nach 24h. Es zeigte sich ein signifikanter Verlust des Kollagen Typ IV Gehaltes im Traumaareal ($p<0,03$). Originalabbildung aus[87].

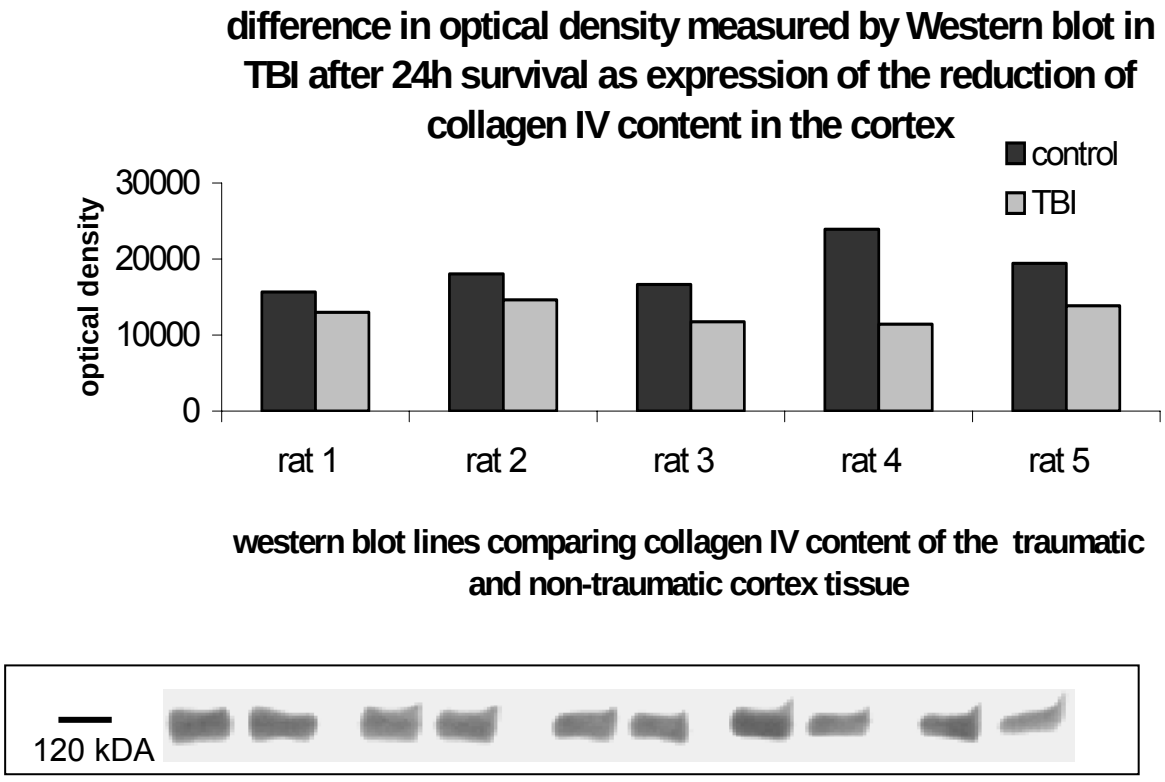


Abbildung 25: Einzelmessungen der Kortexareale der 24-Stunden-Überlebensgruppe und ihre Western Blot Banden (Originalabbildung aus[87])

3.2. Integrine

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Doktorarbeit sollte eine genauere Untersuchung der α1, α6 und β1- Integrine im diffusen und moderaten (1,5 atm Flüssigkeits-Perkussions-Trauma = FPI) Schädelhirntrauma der Ratte sein, und die folgenden Fragestellungen behandeln:

1. Gibt es Veränderungen der α1, α6 und β1-Integrin-Exprimierung nach moderatem experimentellem SHT mittels FPI?
2. Wären diese Veränderungen vergleichbar mit jenen in der Ischämie?
3. Wäre eine ursächliche Beteiligung an Veränderungen der Basalmembran denkbar?

In Vorarbeiten zu Integrinveränderungen im fokalen zerebralen Ischämiemodell bei der Ratte nach MCAO/R (Arteria cerebri media Okklusion und Reperfusion) hatte

sich ein spezifischer Verlust von vaskulären Integrinen gezeigt (siehe auch Kapitel 1.5.2.1.). Dieser spezifische und Gefäßdurchmesser-abhängige Verlust von vaskulären Integrinen deutete auf eine Größe-spezifische Interaktion zwischen dem Endothelium und der Basalmembran hin.

3.2.1. SDS-PAGE und Western Blot

Die Auswertung der Integrin Western Blots gestaltete sich extrem schwierig. Eine konsequente Reproduzierbarkeit der wenigen Western Blots, die überhaupt Banden zeigten, war trotz wiederholter Versuche nicht zu erreichen (danach war leider das Gewebsmaterial, das zur Verfügung stand, aufgebraucht).
Man kann zwar im nachhinein vermuten, dass die in der darauf folgenden Immunhistochemie gefundenen Ergebnisse bestätigt wurden oder ihnen zumindest nicht widersprachen, soweit man bei den innerhalb der Banden schwankenden Werten überhaupt von Werten ausgehen konnte, eine sichere Aussage war jedoch nicht möglich.
Ein ähnliches Problem war bereits bei den Integrin Western Blots im fokalen zerebralen experimentellen Ischämiemodell bei der Ratte aufgetreten, so dass davon auszugehen ist, dass diese Technik in Bezug auf die Integrine so nicht durchführbar ist, oder mit großen Proteinmengen durchgeführt werden müsste, was jedoch eine Konzentration auf kleinere ROIs fast unmöglich machen würde. Die in den Vorarbeiten der bei Ischämie durchgeführten Western-Blots hatten nach 18 Versuchen zunächst Ergebnisse geliefert (siehe Abbildung 26), bei erneuter Wiederholung war dann jedoch wieder keine sicher zuzuordnenden Banden zu sehen. Eventuell sind aber auch die zum Zeitpunkt der Untersuchung vorhandenen Antikörper nicht wirklich im Western Blot anwendbar, *obwohl* diese Anwendungsform im Beiblatt beschrieben war.

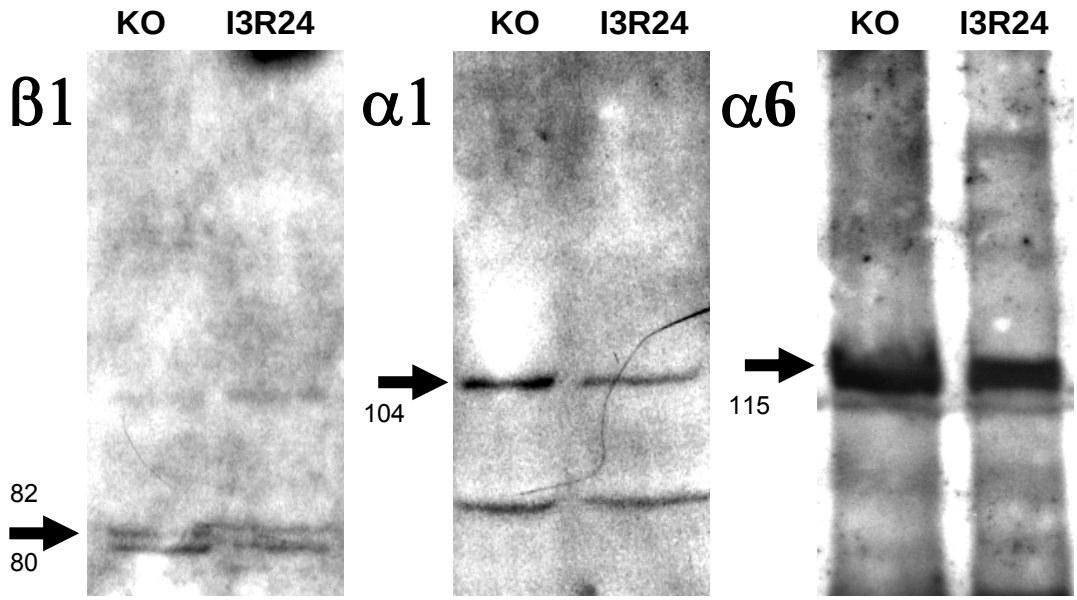


Abbildung 26: Vorarbeiten in der Ischämie: Western Blot Banden der ischämischen ROIs mit spezifischen Antiseren gegen Integrin α1, α6 und β1. Für alle drei Integrine konnten entsprechende Banden gefunden werde, die Doppelbande für β1 Integrin entspricht unterschiedlichen Glycosylierungsformen. KO= Kontrollseite, I3R24= Ischämieareal nach 24h Reperfusion. Man erkennt in allen Integrinunterarten eine deutliche Abnahme der Integrinsubunits im ischämischen Gewebe (p< 0,05 für alle drei Integrin Subunits). Leider war die Reproduktionsmöglichkeit bereits in der Ischämie stark eingeschränkt und im SHT dann nicht mehr vorhanden.

Die Western Blots der Integrine im FPI-Modell des SHT sind stark verzogen, schwach und kaum aussagekräftig. Hauptprobleme könnten zu wenig Material sein, eine nicht vollständige Renaturierung der untersuchten Proteine, oder mangelnde Membranbindung durch noch vorhandene Restladung, die sich nicht unterbinden ließ.
Somit musste die immunhistochemische Aufarbeitung der Fragestellungen weitere Aufschlüsse zu den Integrinen liefern.

3.2.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Auswertung der Integrine mittels OPTIMAS zeigte in allen drei untersuchten Integrinsubgruppen signifikante Reduktionen. Es wurden die mit dem jeweiligen Integrinantikörper gefärbte Fläche und die Färbeintensität des mit dem jeweiligen Integrinantikörper gefärbten Areals gemessen:

Alpha 1 Integrin:

Die mit α1-Integrin Antikörper durchgeführte Immunhistochemie zeigte von allen drei untersuchten Integrinsubgruppen die stärkste Reduktion: Die angefärbte maximale Integrinfläche nahm sowohl in der 12-Stunden-Überlebensgruppe, als auch in der 24-Stunden-Überlebensgruppe signifikant ab. Die 12-Stunden-Gruppe erfuhr eine Reduktion der maximalen α1 Integrinfläche um 8 ± 2% ($p < 0,01$, Abbildung 27), die 24-Stunden-Gruppe sogar eine Reduktion der maximalen α1-Integrinfläche um 13± 2% ($p < 0,001$). In den Basalganglien konnte keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden, ebenso zeigte sich keine Reduktion der α1 Integrinfläche in Kortex oder Basalganglien der Sham-Kontrolltiere.

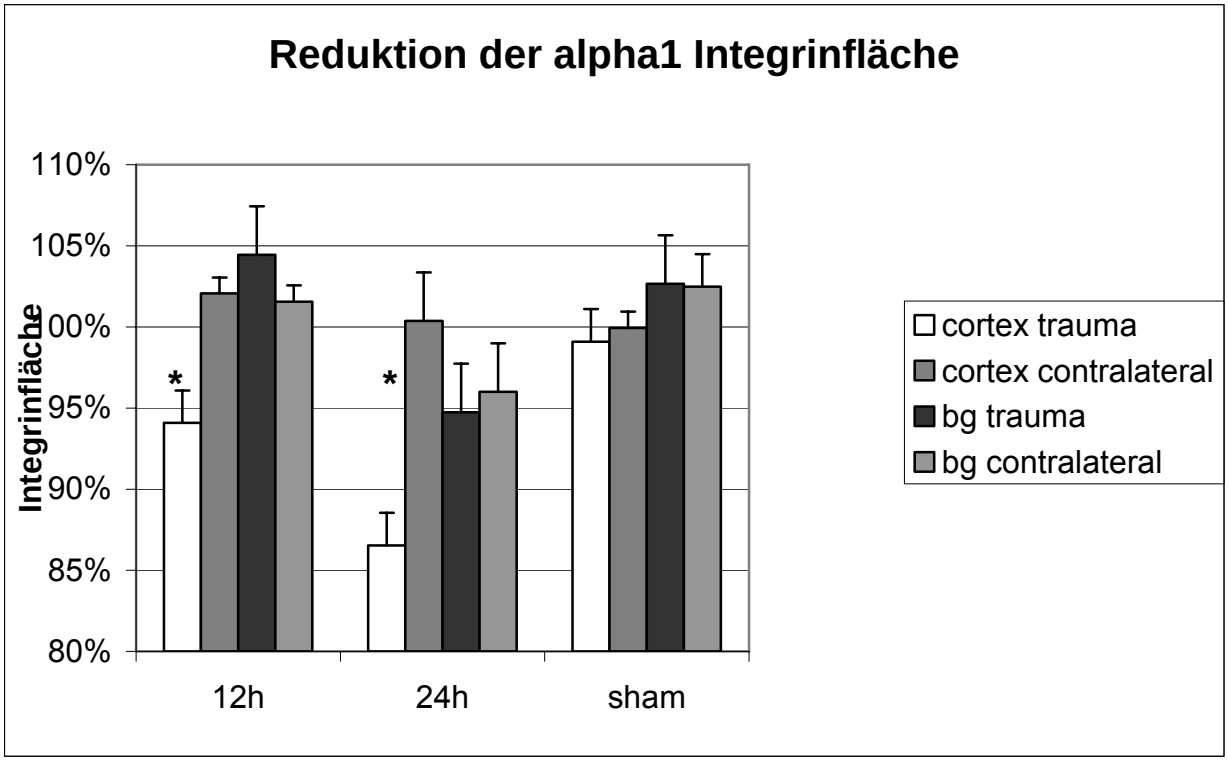


Abbildung 27: Nach SHT mit 12h (n=4) als auch nach 24h (n=5) Überlebenszeit kam es zu einer signifikanten Abnahme der α1 Integrinfläche im Kortex (12h $p < 0,01$; 24h $p < 0,001$), jedoch nicht in den Basalganglien.

Die ebenfalls untersuchte α1 Integrinfärbeintensität nahm in einem vergleichbarem Maß signifikant ab (Abb 28), in der 12-Stunden-Überlebensgruppe um 8 ± 1% ($p < 0,01$), in der 24-Stunden-Überlebensgruppe um 14 ± 2% ($p < 0,01$).

Auch hier konnte in den Basalganglien keine signifikante Reduktion der α1 Integrinfärbeintensität nachgewiesen werden, wie auch im Kortex und den Basalganglien der Sham-Kontrolltiere.

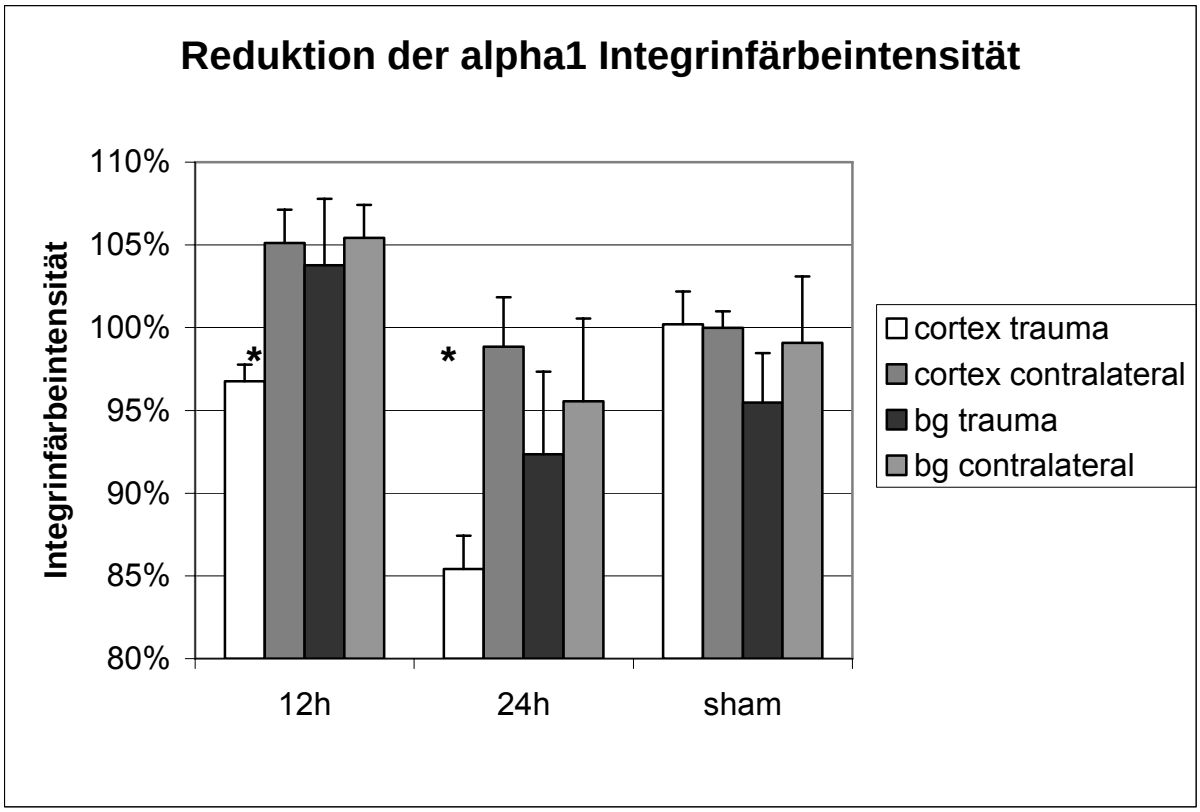


Abbildung 28: Nach SHT mit 12h als auch nach 24h Überlebenszeit kam es zu einer signifikanten Abnahme der Intensität der α1 Integrinfärbung im Kortex (p jeweils < 0,01), jedoch nicht in den Basalganglien

Alpha 6 Integrin:

Die mit α6-Integrin angefärbte Fläche nahm in der 24-Stunden-Überlebensgruppe signifikant ab. Die 12-Stunden-Überlebensgruppe zeigte einen Trend zur Reduktion der Integrinfläche um 7 ± 3% (p = 0,08, Abb 29), die 24-Stunden-Gruppe eine signifikante Reduktion der α6-Integrinfläche um 8 ± 2% (p < 0,05). In den Basalganglien konnte keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden, ebenso zeigte sich keine Reduktion der α6 Integrinfläche in Kortex oder Basalganglien der Sham-Kontrolltiere.

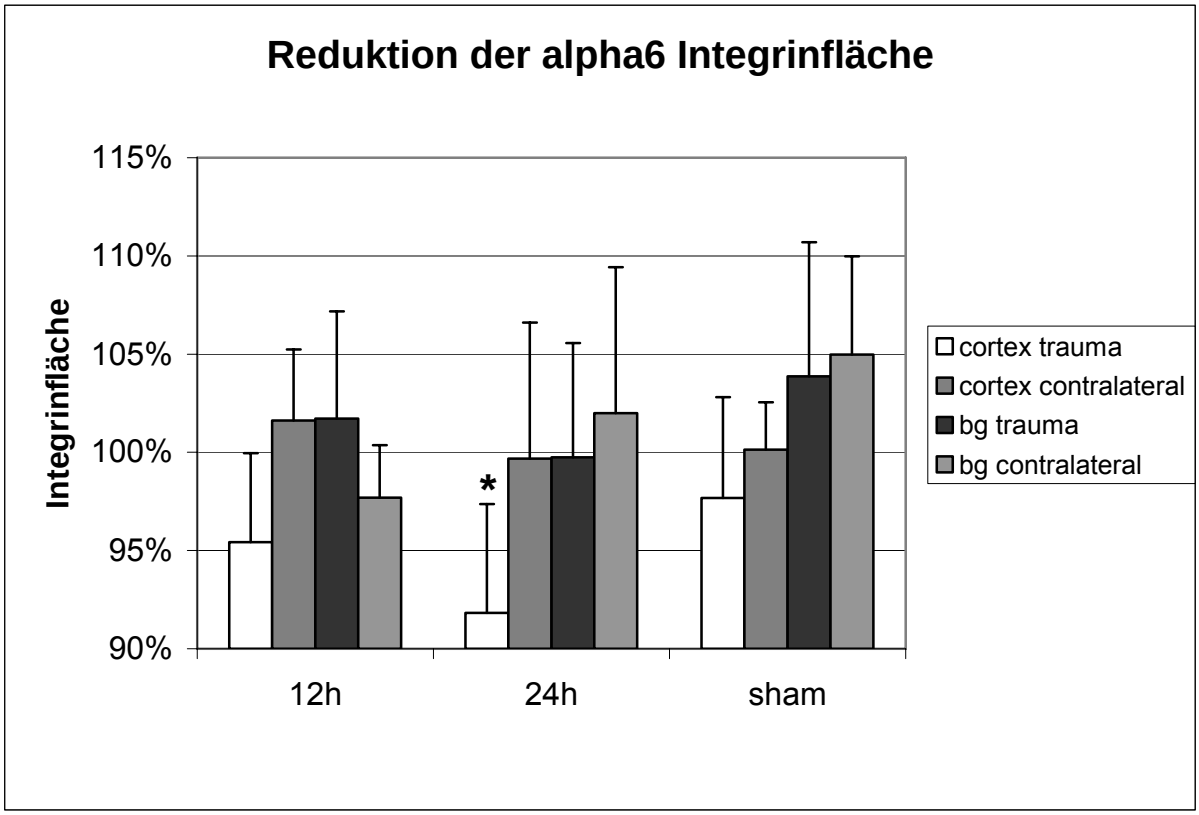


Abbildung 29: Nach SHT kam es nach 12h Überlebenszeit zu einem Trend (p = 0,08) und nach 24h zu einer signifikanten Abnahme (p < 0,05) der α6 Integrinfläche im Kortex, jedoch nicht in den Basalganglien

Die Färbeintensität des α6-Integrins zeigte in der 12-Stunden-Überlebensgruppe bereits einen Trend von 3 ± 2% (p = 0,3) Reduktion und wurde in der 24-Stunden-Überlebensgruppe signifikant mit 7 ± 1% (p < 0,05) Reduktion (Abb 30). Auch hier konnte in den Basalganglien keine signifikante Reduktion der α6 Integrinfärbeintensität nachgewiesen werden, wie auch im Kortex und den Basalganglien der Sham-Kontrolltiere.

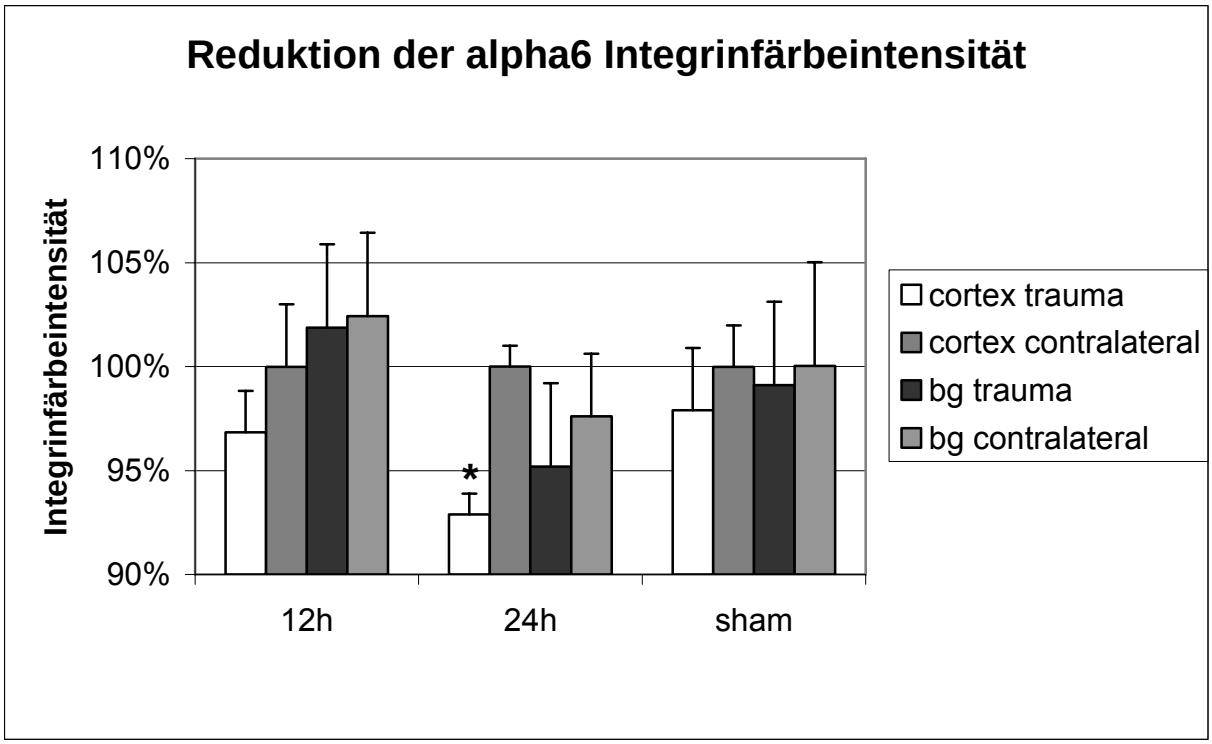


Abbildung 30: Nach SHT kam es nach 12h Überlebenszeit zu einem Trend (p = 0,3) und nach 24h (p < 0,05) zu einer signifikanten Abnahme der Färbeintensität von α6-Integrin im Kortex, jedoch nicht in den Basalganglien.

Beta 1 Integrin:

Im Verlauf von 24h nahm die mit β1-Integrin angefärbte Fläche signifikant ab. Die 12-Stunden-Überlebensgruppe zeigte einen Trend zur Reduktion der maximalen Integrinfläche um 4 ± 3% (p = 0,09, Abb 31), die 24-Stunden-Gruppe eine signifikante Reduktion der maximalen ß1-Integrinfläche um 12 ± 2% (p < 0,009). Wie in den α-Integringruppen kam es auch hier zu keinen messbaren Veränderungen in den Basalganglien. Die Sham-Kontrollgruppe zeigte keine Veränderungen.

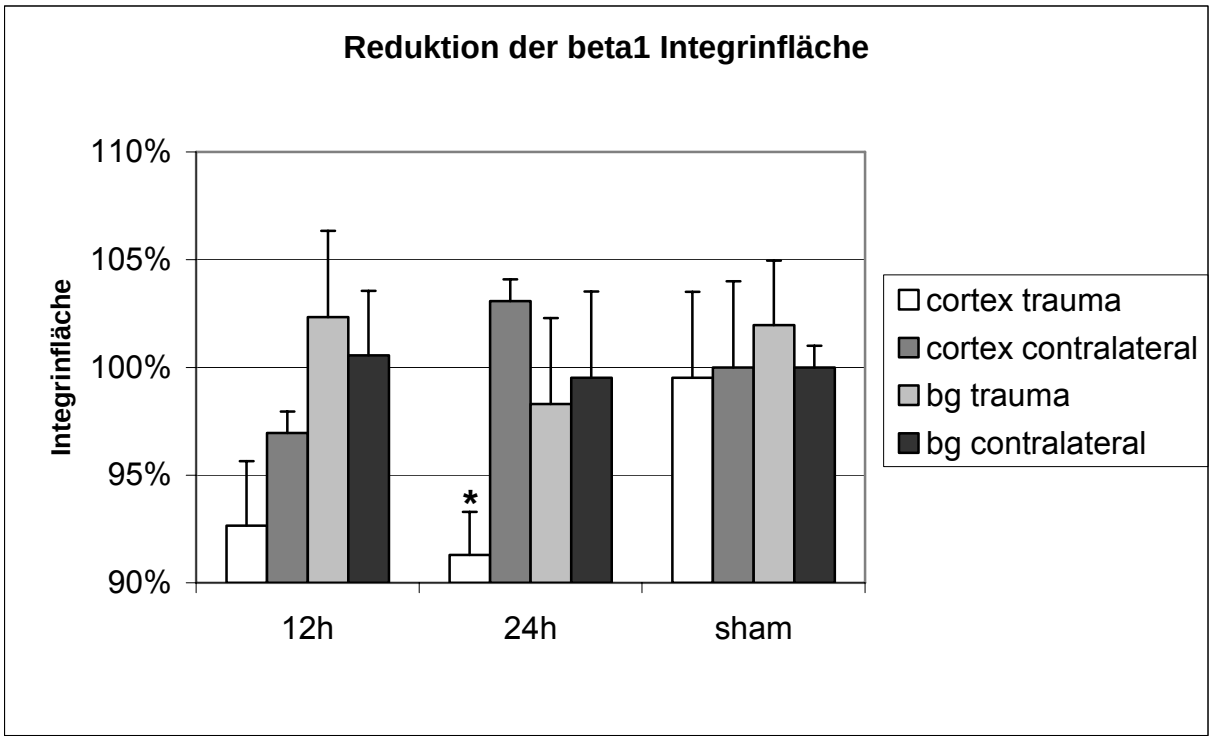


Abbildung 31: Reduktion der β1 Integrinfläche im Kortex nach 24h SHT-Überlebenszeit (p = 0,009), nach 12h Überlebenszeit bereits als Trend (p = 0,09) zu sehen.

Die Färbeintensität der β1-Integrinfärbung zeigte in der 12-Stunden-Überlebensgruppe nach SHT mit einem Trend von 3 ± 2% (p = 0,3) bereits eine Abnahme, in der 24-Stunden-Überlebensgruppe dann eine signifikante Reduktion um 10 ± 3% (p < 0,05, Abb 32). Auch hier konnte in den Basalganglien keine signifikante Reduktion der β1 Integrinfärbeintensität nachgewiesen werden, wie auch im Kortex und den Basalganglien der Sham-Kontrolltiere.

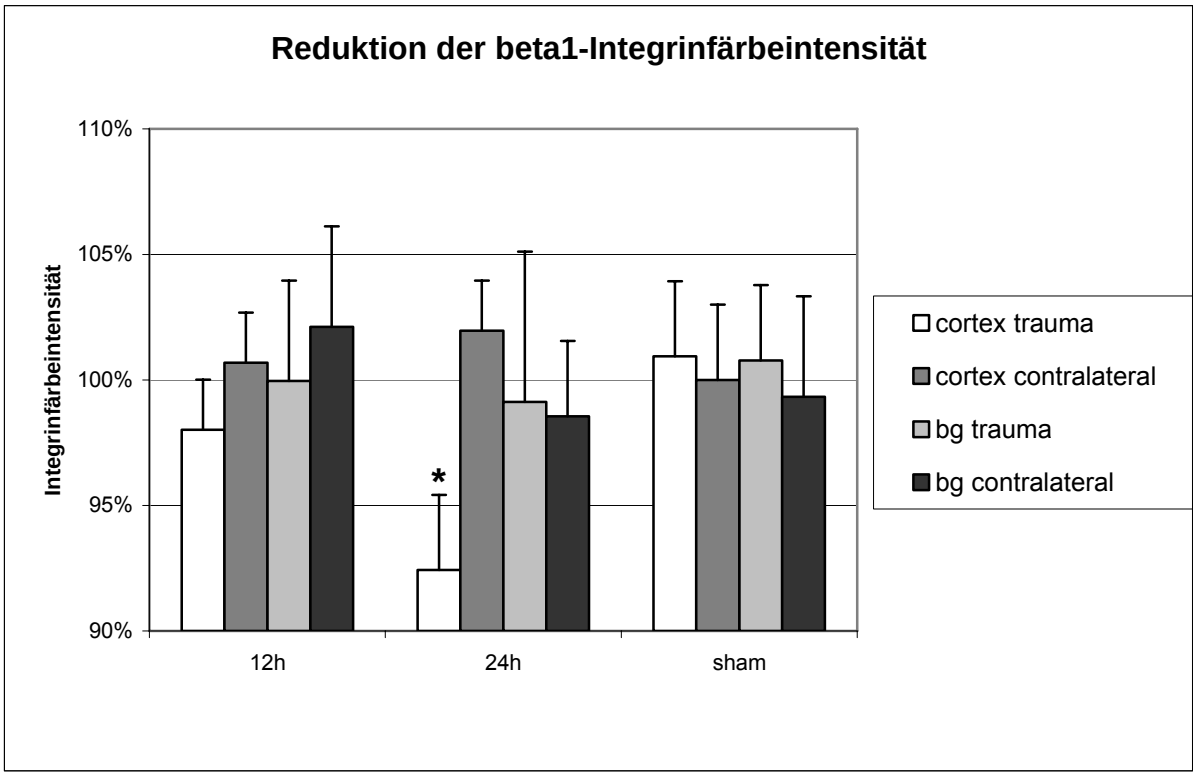


Abbildung 32: Nach 12h Überlebenszeit post-SHT zeigte sich bereits ein Trend (p = 0,3) und nach 24h eine signifikante (p < 0,05) Abnahme der β1 Integrinintensität im Kortex, jedoch nicht in den Basalganglien

4. Diskussion

Jedes Gewebe von Menschen, Tieren und zum Teil auch Pflanzen ist mehr als nur eine Ansammlung von Zellen, es besteht aus einem komplexen Gefüge von extrazellulärem Raum (der extrazellulären Matrix, EZM) und in ihm eingebetteten Zellen die mit der EZM in stetem Informations- und Stoffaustausch stehen. An der Grenze zwischen extra- und intrazellulärem Raum befindet sich die Basalmembran mit ihren Bestandteilen und Verankerungen, mit deren Untersuchung sich die vorliegende Arbeit befasst. Die Basalmembran wurde bisher unterschätzt, sowohl in Bezug auf ihre Wirkung auf Zellverhalten und Überlebensfähigkeit der Zellen, als auch in Bezug auf ihre Signalwirkung. Man nahm bisher an, dass die EZM hauptsächlich als relativ unempfindliches Baugerüst zur Stabilisierung der physikalischen Struktur von Geweben dienen würde. Immer deutlicher wird jedoch, dass sie eine weitaus aktivere und wichtigere Rolle bei der Regulierung von Zellüberlebenszeiten, Zellreifung und Differenzierung, Migration, Form und Funktion spielt, als man es bisher für möglich gehalten hatte.
Es ist daher ein Ziel dieser Arbeit im experimentellen Versuchsansatz des milden Schädelhirntraumas (SHT), einen der Hauptbestandteile der Basalmembran insbesondere der Mikrogefäße des Gehirns, das Kollagen Typ IV, als auch einen der Hauptankerpunkte von Zellen und Signalübermittler an dieser Basalmembran zu untersuchen, die Integrine. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf diejenigen Integrine gelegt, die als Kollagen Typ IV erkennende Integrinuntereinheiten identifiziert wurden, β1 und α1 Integrine, sowie das Laminin erkennende α6 Integrin als weiteres wichtiges Integrin der Basalmembran.

4.1. Kollagen

Die vorliegende Arbeit baut auf Vorarbeiten der Verfasserin dieser Arbeit sowie von Herrn Markus Benz auf, die in immunhistochemischen und morphologischen Analysen der zerebralen Mikrogefäße nach milden bis moderatem SHT in der Ratte einen deutlichen Verlust von Kollagen Typ IV in den Mikrogefäßen des Kortex der Traumaseite dokumentiert hatten. Diese Ergebnisse der Kollagen Immunhistochemie-Vorarbeiten wurden nun von der Western Blot Analyse zusätzlich reproduziert und erhärtet ($p < 0,05$). Somit konnte zum ersten Mal ein gravierender

Substanzverlust der Basalmembran im milden Schädelhirntraumamodell der Ratte gezeigt werden. Dieser Substanzverlust der Basalmembran weist auf eine über den bekannten diffusen Axonschaden, oder die bereits durch das Trauma entstandene Schädigungen hinausreichende Pathologie hin. Basalmembranschäden können sich in unterschiedlichster Weise und langsam manifestieren. Daher stehen sie möglicherweise medikamentösen Therapieversuchen nach SHT offen. Die vorliegende Arbeit konnte nun erstmalig einen deutlichen Basalmembran-Substanzverlust im experimentellem Versuchsmodell des SHT zeigen. Die Tatsache, dass dieser Substanzverlust bereits im - bisher als „leichtes SHT ohne Schädigung des ZNS“ bezeichneten – milden SHT aufzuweisen war, weist auf die pathophysiologisch Bedeutung dieses Ergebnisses hin. Es liegen also durchaus morphologische Korrelate im milden SHT vor, die selbst mit technischen Hilfsmitteln unsichtbar bleiben können: In der vorliegendenen Arbeit wurde ein Verlust von Kollagen Typ IV, als Indikator eines Basalmembranschadens, im Western Blot als Trend bereits 12 Stunden nach mildem experimentellen SHT sichtbar und manifestierte sich nach 24 Stunden. Als morphologisches Korrelat wurden die bereits im fokalen zerebralen Ischämiemodell bei der Ratte nach MCAO beobachteten typischen „Ausbleichungen“ der Mikrogefäße im Sinne einer niedrigeren Färbeintensität für Kollagen Typ IV beobachtet, ebenso zeigten sich deutliche Mikroläsionen an den Gefäßen.

Dieser Verlust eines der bedeutendsten Bestandteile der Basalmembran bedeutet die Durchlässigkeit der natürlichen Schutzbarriere des Gehirnes und eine konkrete Bedrohung für das umliegende Gewebe. Die verlorene Stabilität der Basalmembran ist schädlich für die Integrität des Gefäßnetzes der Mikrogefäße, welches zur konstanten Sauerstoffversorgung des Gehirns benötigt wird. Es stellt sich nun jedoch die Frage nach der Ursache des Verlustes.

4.1.1. Mögliche Ursachen des Kollagen Typ IV Verlustes nach experimentellem milden SHT im Vergleich zu Schadenskaskaden bei fokaler zerebraler Ischämie nach Arteria cerebri media Okklusion

Kurz zusammengefasst kommt es im Hirnparenchym nach einer zerebralen Ischämie primär zu einer Zellschädigung durch Übererregung, der Exzitotoxizität, die über Stunden anhält. Diese Schadenskaskade führt zu einer Akkumulation von Kalzium und damit zu einer Verstärkung der zytoplasmatischen und nukleären Zellvorgänge,

wie der Aktivierung proteolytischer Enzyme, die das Zytoskelett schädigen. Freie Radikale triggern und verstärken zusätzlich Inflammation und Apoptose[29](Abb. 33).

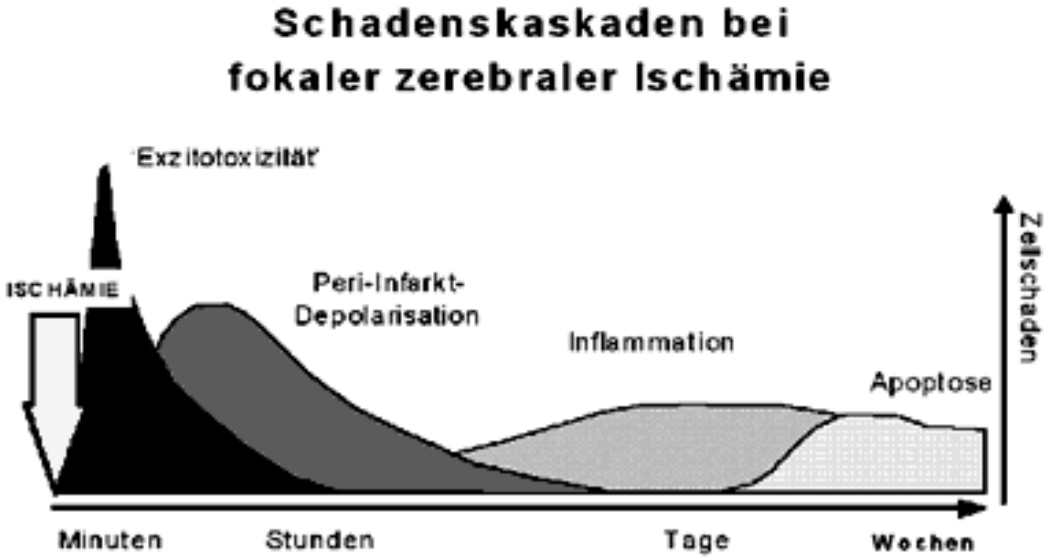


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Schadenskaskaden bei fokaler zerebraler Ischämie[29]

Betrachtet man insbesondere die proteolytischen Mechanismen genauer, so fallen im ischämischen Gehirn vor allem drei Hauptmechanismen der Proteolyse ins Auge[54,97].

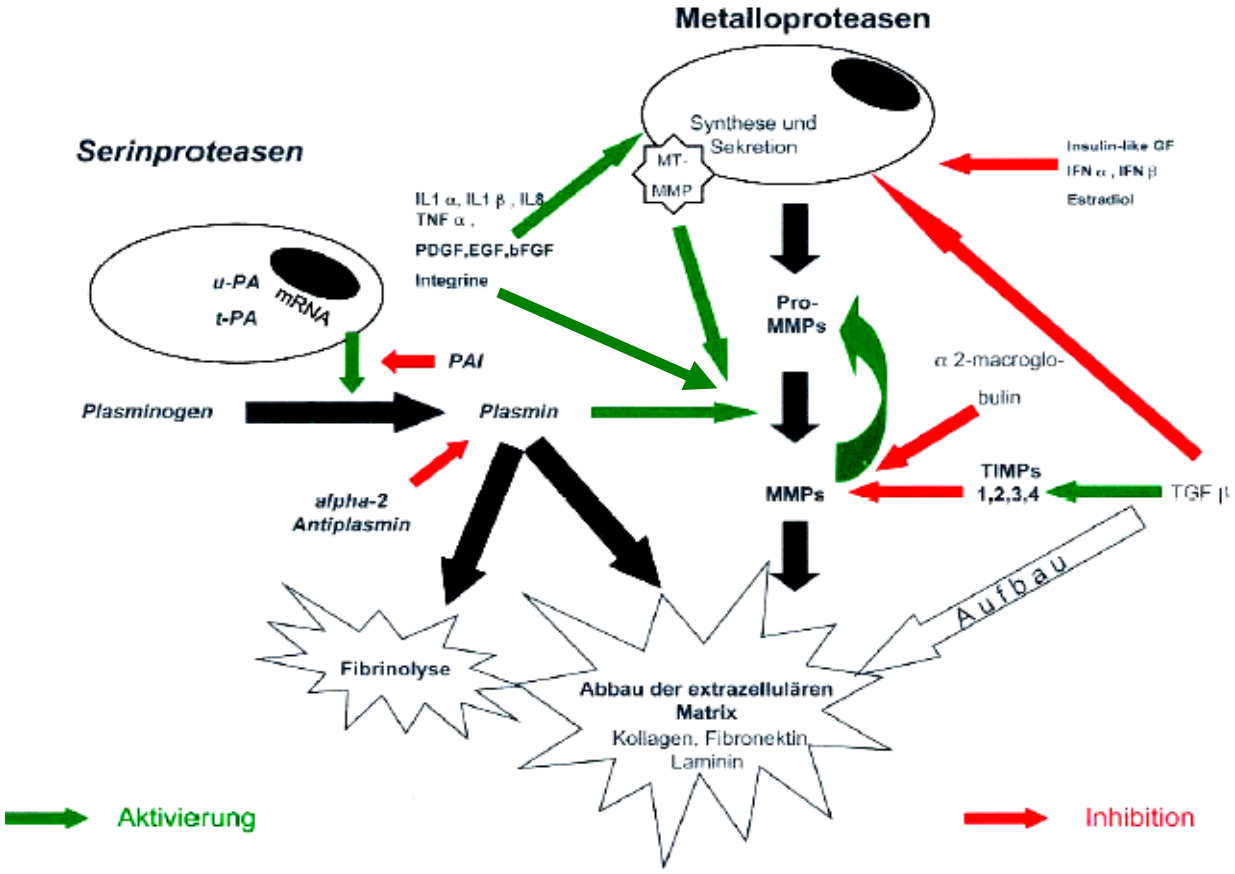
Die drei Hauptmechanismen der Proteolyse im experimentellen Schlaganfallmodell

1. Der erste Pathomechanismus der Proteolyse ist das **Plasminogen-Plasmin System** (1), und wird vor allem durch Endothelzellen entwickelt. Sie produzieren Gewebsplasminogenaktivator (tissue plasminogen activator, tPA), um Gefäßwandthrombosen zu verhindern. Zusätzlich produzieren sie aber auch Plasminogenaktivator-Inhibitor um unerwünschten fibrinolytischen Effekten entgegenzuwirken[74,75,99]. Wie viele andere Proteasen so wird auch Plasminogen als inaktive Vorläufersubstanz zellulär sezerniert und ist im Blut reichlich vorhanden. Vor Ort wird es dann von Plasminogenaktivatoren gespalten und so die aktive Serinprotease Plasmin zur Thrombolyse freigesetzt.

Normalerweise wird die Aktivierung von Proteasen durch ein sensibles System überwacht: Zunächst erfolgt eine lokale Aktivierung, dann kann eine Bindung an

Rezeptoren eine lokale Aktivität gewährleisten (wie zum Beispiel Urokinase-ähnlicher Plasminogen Aktivator = uPA, der an Rezeptoren von wachsenden Axonen und der Spitze von migrierenden Zellen zu finden ist), und zuletzt noch die Sekretion von Inhibitoren (am Beispiel der Serinproteasen genannt Serpine) die Wirkung der Proteasen wieder aufheben.

Abbildung 34: Pathophysiologie und Interaktionen der Hauptwege der Proteolyse (modifiziert nach [127])



Dadurch sollen die positiven Effekte der Proteolyse gewährleistet werden, wie einerseits einen Weg durch die EZM zu bahnen, andererseits eine Ablösung der Zellen von ihrer Matrix zu unterstützen um Migration überhaupt erst zu ermöglichen, ohne zu einer Auflösung des Parenchymes zu führen.

Im Fall eines Traumas jedoch kann dieses System sich gegen das zu schützende Gewebe wenden und so zum Beispiel bis dahin versteckte „kryptische“ Bindungsstellen an Proteinen freisetzen, die unkontrolliert eine zerstörerische Wirkung entfalten können. Durch das Plasminogen-Plasmin-System kann somit nicht

nur selbsttätig eine Schädigung der mikrovaskulären Integrität erfolgen, sondern weitere Mechanismen wie bis dato verborgene Schadenskaskaden durch weitere Proteinaktivierung angestossen werden.

Obwohl das Plasminogen-Plasmin System nicht direkt Kollagen Typ IV spalten kann, so aktiviert es doch unter anderem via Integrine die Matrix Metalloproteasen[74,99] (Abb 34, grüner Pfeil).

2. Diese **Matrix Metalloproteasen** (2) stellen den zweiten Pathomechanismus dar, der zur Zerstörung der Basalmembran, und somit zum Verlust von Kollagen Typ IV mit Vernichtung der vaskulären Integrität führen kann[41]. Beispielsweise induziert die Bindung von α2β1 Integrin die Sekretion von proMMP-2, wahrscheinlich über den MMP-2-Aktivierungskomplex MT1-MMP/TIMP-2[85]. Gemeinsam mit den Serinproteasen bauen sie Matrixbestandteile wie Kollagen, Laminin und Fibronektin ab. Einige von ihnen sind dabei hochspezifisch, so wie die Kollagenasen MMP-9 und MMP-2, welche Kollagen Typ IV angreifen (siehe unten). Im Verlauf kommt es zu einem Basalmembranverlust, der so ausgeprägt sein kann, dass die Bluthirnschranke zusammenbricht. Entzündungsvorgänge und entferntere Zellschädigung können weiter fortschreiten. Die Bildung von freien Radikalen, Sauerstoffmangel und Konzentrationserhöhung von Kalzium führt über Integrinaktivierung und direkte Signalwirkung von Bestandteilen der EZM zur Expression von proinflammatorischen Genen, so dass proinflammatorische Proteine gebildet werden und eine lokale Entzündungsreaktion vermitteln. Daraufhin wandern neutrophile Granulozyten in das Gewebe ein, denen Makrophagen und Monozyten folgen.

3. Daraus resultiert eine weitere Schadenskaskade, die einwandernden Granulozyten setzen Zytokine wie IL16 (LCF), EMAP II, AIF-1und BMP-6 frei, und unterhalten eine fortschreitende **Entzündungsreaktion** (3) mit weiterem Gewebsuntergang. Enzyme werden freigesetzt, die die Gefäßwand weiter zersetzen und somit für den dritten Zerstörungsmechanismus verantwortlich zeichnen[10,114].

Diese Entzündungsreaktionen setzen Minuten bis Stunden nach dem initialen Ereignis ein. Lokale Gliazellen werden sechs bis acht Stunden nach Beginn der Minderdurchblutung aktiviert, Makrophagen und Monozyten stellen nach fünf bis sieben Tagen den dominanten Zelltyp im ischämischen Hirnparenchym dar. Bei Hemmung der Neutrophilenmigration kann der zusätzliche Schaden, der durch die Inflammation hervorgerufen wird, reduziert werden. Das Gleiche geschieht, wenn Botenstoffe oder Rezeptoren, die Entzündungsreaktionen steuern, blockiert

werden[5,22]. Die Art der Schädigung erfolgt wahrscheinlich auf mehrfachem Wege. Einerseits kann ödematöse Schwellung des umgebenden Gewebes der Mikrogefässe deren Lumen bereits einschränken, oder auch bereits ödematös aufgeschwollene geschädigte Endothelzellen zu einer Einschränkung der Mirkozirkulation führen. Des weiteren können sich im Blut befindliche Leukozyten im Mikrogefässlumen „verkeilen“ und durch „capillary plugging“ die Mikrozirkulation weiter verschlechtern[122]. Entzündungszellen wie aktivierte Gliazellen produzieren zudem toxische Mediatoren wie NO, Sauerstoffradikale und sog. Prostanoide, die zur Zellschädigung beitragen. Auch apoptotische Prozesse können durch aktivierte Mikrogliazellen induziert werden.

Sind diese drei Haupt-Mechanismen der Proteolyse erst einmal angelaufen (1. Plasminogen-Plasmin System, 2. Matrix Metalloproteasen, 3. Inflammation), so sind sie nur schwer wieder zu stoppen, die Basalmembran wird unaufhaltsam vernichtet[27,54]. Ein Fortschreiten des Mikrogefäßschadens ist zu erwarten und führt wiederum zu erneuten Entzündungsreaktionen, ein Circulus vitiosus entsteht und kann weite Teile des Hirnparenchymes betreffen, welches primär unversehrt geblieben war, jedoch im Sekundärschaden zugrunde geht.

Hervorzuheben ist, dass die Schweregrade dieser gerade beschriebenen Reaktionen und Zerstörungsmechanismen der Basalmembran in ihrer Ausprägung abhängig von der Schwere der initialen Schädigung sind. Auch die durch den Basalmembranschaden entstehenden Mikrogefäßschäden sind hier keine Ausnahme.

4.1.2. Die Verteilung des Kollagen Typ IV Verlustes im Hirnparenchym

Morphologische Studien zeigten ein unterschiedlich gestaltetes Netzwerk der Mikrogefäße, eine unterschiedliche mikrovaskuläre Organisation der Kortexareale verglichen mit der Organisation der Basalganglien[93]. Das kortikale Mikrogefäßnetzwerk besteht aus parallel angeordneten Hauptversorgungsarteriolen und wird von kleineren Ästen gekreuzt, die ein komplexes Netzwerk formen. Im Gegensatz dazu weisen die Basalganglien eher ein baumartiges Gefäßbett auf, was im fokalen zerebralen Ischämiemodell bei der Ratte sehr eindruckvoll von Ohtake et al. 2004 dreidimensional rekonstruiert worden ist (siehe Abbildung 35).

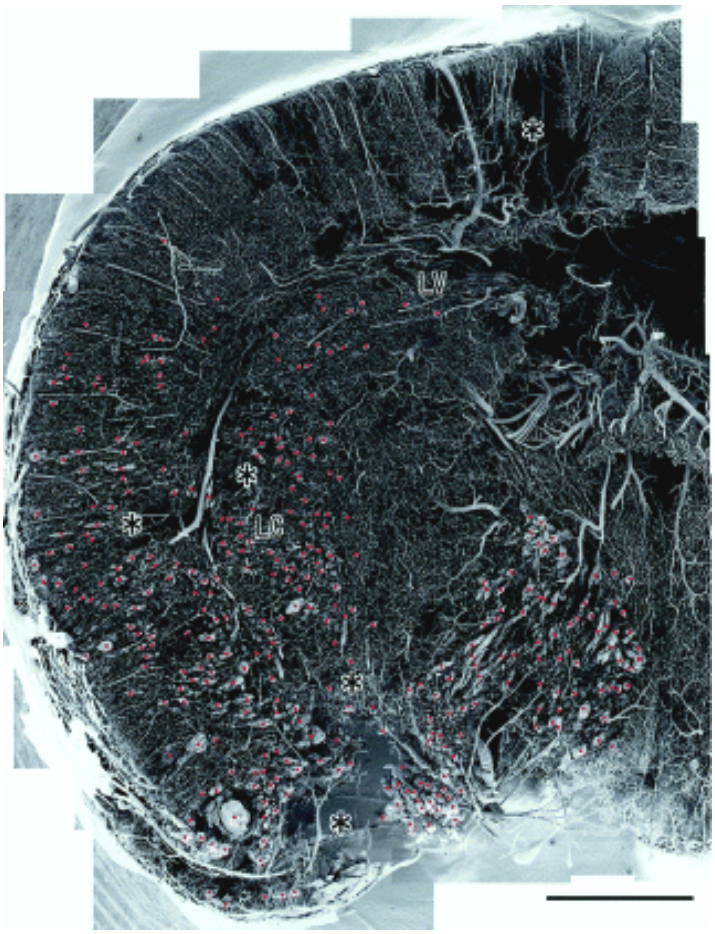


Abbildung 35:
Darstellung des Mikrogefäßnetzes der Hirnhemisphäre einer Ratte. Deutlich erkennbar die unterschiedliche Anordnung der hirnversorgenden Gefäße. Während sich die kortikalen Gefäßäste von der Hirnoberfläche zu den Basalganglien hin und umgekehrt eher strahlenkranzartig ausrichten, sowie leptomeningeale Anastomosen auf der Hirnoberfläche zu erkennen sind, zeigt sich im Bereich der Basalganglien (Kreis) ein baum- oder netzartiges, ungeordneteres Bild [93]

Der Hauptteil des vorgefundenen Verlustes von Kollagen Typ IV im fokalen zerebralen ischämischen Schadensmodel bei der Ratte (arteria cerebri media occlusion and reperfusion = MCAO/R) war vor allem in den Basalganglien nachweisbar und nicht so sehr im ischämischen Kortex., so dass vermutet wurde, leptomeningeale Anastomosen könnten die Kortexregion vor ischämischen Mikrogefäß- und Basalmembranverlusten geschützt haben[54].

Auch im experimentellen SHT zeigte sich nun eine unterschiedliche Reaktion von Basalganglien und Kortex auf eine Schädigung, es gab jedoch zwischen den beiden experimentellen Versuchsmodellen MCAO/R und mildem SHT einige bemerkenswerte Unterschiede:

Der Verlust des Basalmembran-Antigens Kollagen Typ IV war genau entgegengesetzt zur Schädigung bei MCAO/R verteilt, die Reaktion im Fall des Flüssigkeits-Perkussionsmodells des milden SHT war im traumatischen Kortex ausgeprägter vorhanden als in den Basalganglien, die keinen signifikanten Mikrogefäßverlust in morphometrischen Vorarbeiten und auch keine Abnahme von Basalmembran-Antigen zeigten. Die Unterschiede zwischen MCAO/R und mildem SHT manifestierten sich aber auch im Ausmass des Kollagen Typ IV Verlustes, was

auch an der Intensität des initialen Schadens liegen kann. Der mikrovaskuläre Schaden nach mildem SHT ist weniger ausgedehnt und schwerwiegend als nach MCAO/R: im SHT fand sich eine Reduktion des Kollagen Typ IV Gehaltes um 30%, wohingegen sich die Kollagen Typ IV Reduktion bei MCAO/R um 50% bewegt[54].
Der Verlust einer intakten Basalmembran bedeutet konsekutiv den Verlust einer intakten Blut-Hirn-Schranke und somit den Verlust der Integrität der hirnversorgenden Gefäße. Einer dieser Folgen ist der Austritt von Flüssigkeiten in das die Gefäße umgebende Gewebe, das vasogene Ödem, welches das bereits durch Sauerstoffunterversorgung entstandene zytotoxische Ödem noch verstärken kann und in Abbildung 35 durch rote Sterne im fokalen zerebralen ischämischen Traumamodell markiert wurde.
Im experimentellen SHT konnten wir jedoch in der morphologischen Analyse kein wirkliches Ödem nachweisen, obwohl sich, wie in Kapitel 1.5.1. bereits beschrieben, ein deutliches Bleaching der Gefäßwände im Sinne einer schwächeren Kollagen Typ IV Färbeintensität, als auch feine Risse der Mikrogefäßwände bereits in der Lichtmikroskopie gezeigt hatten. Geschwollene Neuronenzellkörper, sowie apoptotische Zellen waren jedoch als Hinweise auf das durch die Traumaeinwirkung entstandene zytotoxische Ödem nicht zu entdecken.
Natürlich muss bedacht werden, dass diese unterschiedlichen Reaktionen in der Natur der Traumata liegen können. Das SHT einerseits, dessen primäre Druckwelle den Kortex unterhalb des Bohrloches betrifft (Ort der Läsion) und erst danach auf die Basalganglien übergreift, wobei die Übertragung proportional zu der Stärke des Traumas intensiver wird, verglichen zur Minderperfusion der von der Arteria cerebri media versorgten Gehirnteile könnten zu unterschiedlich in ihrer Pathophysiologie und ihrem Schweregrad sein, um direkte Vergleiche wirklich zuzulassen[82].
Einer der Gründe für die unterschiedliche Reaktion auf das angewandte Trauma lässt sich auch in der unterschiedlichen Anordnung von Gefäßnetzwerken im Gehirn sehen. Kortikale und basale Areale haben einen unterschiedlichen Kollateralfluß, der daher auch unterschiedlichen Blutflussregulierungen unterliegt[80,123] und verschieden auf zweierlei Traumata reagieren kann. Dennoch war es für uns überraschend, dass eine Schädigung der Basalganglien nicht stärker ausgefallen war, da das Flüssigkeits-Perkussions-Modell des SHT eher zur Erforschung eines diffusen und nicht relativ lokal begrenzten Hirnschaden genutzt wird (siehe Kapitel 1.2.1.). Ursächlich kann die Verwendung eines milden bis moderaten experimentellen SHT-

Modelles in dieser Dissertation gesehen werden, das eine Übertragung der Druckwelle über längere Distanzen möglicherweise nicht gewährleistete.

Was diese Arbeit jedoch deutlich und erstmalig zeigen konnte, ist der Verlust eines Bestandteiles der Basalmembran im milden experimentellen Schädelhirntraumamodell der Ratte. Das bedeutet, den tatsächlichen Nachweis eines morphologischen Korrelats im Hirnparenchym, das bisher als „nicht beschädigt“ betrachtet wurde (dieser Nachweis könnte die Schwierigkeiten in der Nachbetreuung dieser Patienten mit bisher nicht erklärlichen neuropsychologischen Teilleistungsstörungen verständlich machen).

Der Kollagen Typ IV Verlust ist deutlicher Ausdruck der Zerstörung der Basalmembran in den betroffenen Arealen, und weist damit auch auf den Verlust des gelartigen „Füllmaterials“ der Basalmembran, den Glucosaminoglykanen und Proteoglykanen hin.

Möglichkeiten zur Behandlung ergeben sich jedoch erst durch das tiefere Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen, die sich wie folgt darstellen:

4.1.3. Bedeutung des Kollagen Typ IV Verlustes für die chemische Signalübermittlung

Die Basalmembran mit allen ihren Bestandteilen dient nicht nur als Barriere und Teil der BBB, sondern mittels ihres vielfältigen Aufbaues auch der Signalübermittlung. Ihre Bestandteile Glucosaminoglycane und Proteoglycane sind mehr als Stabilisatoren die ein Vielfaches ihres eigenen Gewichtes an Wasser speichern können, sie sind auch Akteure in der chemischen Signalübermittlung zwischen Zellen.
So binden sie unterschiedliche Signalmoleküle wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren (FGFs) der Fibroblasten, die es Zellen ermöglichen zu proliferieren. Sie können aber auch Proteine durch ihre Bindung an die Stelle seiner Produktion „festnageln“, und so eine Art Reservoir bilden, die Proteine vor Degradation schützen und so zu einer verlängerten Wirkung des Proteins führen (wie zum Beispiel Chemokine in der Inflammation), eine Konzentration dieses Proteins an einer einzigen Stelle zu Steigerung seiner Wirkung kumulieren, aber auch seine Aktionsfähigkeit

einschränken, oder komplett unterbinden. Alle diese Eigenschaften gehen in einer "brüchigen" Basalmembran verloren.
Diesen Verlust dieser mehr funktionellen Aspekte der Basalmembran an einem Beispiel zu untersuchen ist der zweite Ansatz der vorliegenden Arbeit.
Einige der am besten charakterisierten Proteoglykane sind die Syndekane, die ein membrandurchspannendes Protein haben und auf der Oberfläche von vielen Zellen, einschließlich Fibroblasten und Epithelzellen zu finden sind. In Epithelzellen modulieren sie vor allem die Funktionen von Integrinen in fokalen Adhäsionen. Syndekane binden aber auch FGFs und präsentieren sie den FGF Receptoren auf derselben Zelle, so wie auch ein anderes Proteoglykan, das Betaglycan, TGF-β bindet und präsentiert. Leider lassen sie sich durch ihren stark hydrophilen Charakter mit den normalen Methoden der Immunhistochemie nicht anfärben. Die Integrine jedoch lassen sich immunhistochemisch darstellen und sind die Hauptadapter in diesem Prozess, die die Interaktionen zwischen den Zellen und der EZM beeinflussen.
Daher richtete sich unser zweites Augenmerk nun auf diese Signalübermittler innerhalb der Basalmembran und die die Basalmembran verankernden Strukturen, die Integrine.
Waren sie ebenfalls betroffen von dem Verlust an mikrovaskulärer Integrität, oder blieben sie verschont, kam es also zunächst nur zu einem Substanzverlust der Membran, oder wurden bereits essentielle funktionelle Strukturen angegriffen? Wären diese Veränderungen vergleichbar mit jenen im experimentellen ischämischen Modell der MCAO/R? Und zuletzt, sind sie vielleicht sogar Hauptakteure, also eventuell involviert in einem vierten Hauptmechanismus (neben den drei bekannten der Proteolyse) der Basalmembran-Zerstörung?

4.2. Integrine

Zellen brauchen Halt an der EZM, um zu proliferieren und vielfach auch um überhaupt zu überleben. Die Abhängigkeit von Zellwachstum, Proliferation und Überleben der Zellen von ihrer Anheftung an die EZM ist als „anchorage dependence“ bekannt und hauptsächlich von Integrinen und den von ihnen generierten intrazellulären Signalen vermittelt.

Dieser Effekt auf Zellwachstum und Verteilung ist ausschlaggebend bei der Regeneration von Gewebe nach einem Trauma.
Die Integrinfamilie besteht derzeit aus mindestens 24 Integrin-Heterodimeren (siehe auch Kapitel 1.4.) wobei 5 ihrer Mitglieder Kollagenrezeptoren sind[57,130]. Die Kollagenrezeptoren bestehen aus einer β1 Untereinheit gepaart mit α1, α2, α3, α10, oder α11. Vier dieser Integrine, genauer α1β1, α2β1, α10β1 und α11β1, bilden eine kleine Untergruppe in den Integrinen, denn sie haben eine extra „eingefügte" Domäne, die als Hauptregion zur Kollagenbindung dient, die αI Domäne[50]. Obwohl sie sich strukturell ähneln, haben sie doch ganz spezifische Kollagenbindungspartner, und Variationen in ihrer intrazellulären Domäne weisen auch auf unterschiedliche Signalwirkungen hin[72]. So kann Kollagen Typ IV selbst mit Hilfe von α1β1 und α2β1 Integrinen FAK und Src Kinasen aktivieren, die zur Zellmigration und Proliferation benötigt werden[3,51,71].

4.2.1. Integrine im fokalen zerebralen Ischämiemodel bei der Ratte und der Vergleich zum experimentellen SHT

Eigene Vorarbeiten zu dieser Dissertation machten sich zunächst die Verteilung der in der Dissertation untersuchten Integrine im gesunden Hirnparenchym bei der Ratte zur Aufgabe. Es konnte gezeigt werden, dass eine klare Immunoreaktivität vor allem für α1, α6 und β1 Integrin auf Endothelzellen, sowie α4 auf Astrozyten vorhanden ist, wobei die α6 Immunoreaktivität vermehrt auf größeren Gefäßen (Arteriolen und kleinen Arterien) zu finden war, und α1, β1 Integrin vermehrt auf Kapillaren. Elektronenmikroskopisch konnten diese Integrine sowohl auf der luminalen, als auch der abluminalen Seite der Endothelzellen gefunden werden, als auch auf Perizyten (siehe Kapitel 1.5.2.).

In fokalen zerebralen Ischämiemodell bei der Ratte nach Arteria cerebri media Okklusion und Reperfusion (MCAO/R) fand sich dann ein ganz spezifischer und Gefäßdurchmesser-abhängiger Verlust von den unterschiedlichen vaskulären Integrinen (siehe Kapitel 1.5.2.). Vor allem eine Reduktion der β1 Integrin-positiven Kapillaren war mit 43% nach 24 Stunden sehr eindrücklich, wobei auch die Färbeintensität der β1-positiven Kapillaren über den gesamten Zeitverlauf signifikant abnahm, was auf einen spezifischen Verlust ebendieser Integrinuntereinheit hinwies. Zusätzlich fand sich ein Abfall der α1-Färbeintensität in den Kapillaren der jedoch

nicht so ausgeprägt war. Eine Reduktion der α6- Färbeintensität war nur bei Gefäßen größer 15μm zu finden und spricht für eine größere Stabilität des Basalmembranbestandteiles Laminin, welches von α6β1 Integrin gebunden wird und diesem Integrin dadurch eine bessere Verankerung in der geschädigten Basalmembran liefert.

Fraglich war, ob das milde experimentelle SHT ebenfalls Veränderungen hervorrufen würde, da bildgebende Verfahren keinen Hinweis auf strukturelle Schäden im Hirnparenchym von Patienten mit mildem SHT ergeben hatten.

Tatsächlich fand sich jedoch auch im milden experimentellen SHT bei der Ratte eine deutliche Involvierung der untersuchten Integrine in das pathologische Geschehen. Selbst in diesem moderaten bis milden eperimentellen Modell des Schädelhirntraumas zeichneten sich bereits nach 12 Stunden Überlebenszeit ein Verlust der Untereinheiten α1, α6 und β1 Integrin ab, welcher in allen Fällen nach 24 Stunden bereits signifikant wurde.

4.2.2. Die Verteilung des Integrin Verlustes

Der Verlust der Integrin-Untereinheiten α1, α6 und β1 Integrin war vergleichbar dem Verlust des Basalmembran-Antigens Kollagen Typ IV verteilt. Das heisst, er war genau entgegengesetzt zur Schädigung bei MCAO/R verteilt, auch hier war die Reaktion im Fall des Flüssigkeits-Perkussionsmodells des SHT im traumatischen Kortex deutlicher ausgeprägt als in den Basalganglien. Vergleicht man jedoch die Intensität dieses Verlustes mit der Intensität des Integrin Verlustes nach MCAO/R (bis zu 43%), so ist dieser Verlust weitaus geringer (Maximum 14%), selbst im Vergleich mit der Intensität des Kollagen Typ IV Verlustes im SHT (um 39%). Des weiteren wurde kein spezifischer und Gefäßdurchmesser-abhängige Verlust von vaskulären Integrinen wie in der Ischämie festgestellt (Abb. 15), was an der gleichmässigen Mikrogefäßstruktur des kortikalen Gefäßnetzes liegen könnte.

Somit konnte mit dieser Arbeit zum ersten Mal der Verlust auch funktioneller Bestandteile der Basalmembran bereits 24h nach einem milden Schädelhirntrauma gezeigt werden.

Eine Beteiligung der Integrine bereits zu so einem frühen Zeitpunkt lässt eine aktive Einbindung der Integrine entweder in Reparaturmechanismen nach Trauma oder in die Zerstörung der Gefäßintegrität durch Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen oder ein Ablösen von Zell-Zell Vernetzungen an die Basalmembran vermuten, da

sich daraus weitere Angriffspunkte für Makrophagen oder andere Entzündungsprozesse ergeben würden.

4.2.3. Integrine und Matrix Metalloproteinasen

Tatsächlich gibt es einen intrazellulären Signalweg auf dem Integrine einen direkten Einfluss auf die Bildung und auch die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) nehmen können. Wie bereits zuvor in der Diskussion beschrieben, haben die MMPs einen direkten Einfluss auf die Integrität der Mikrogefäße durch ihre zerstörerische Funktion an der Basalmembran. Bindung von Integrinen an ihre Bindungspartner induziert die Phosphorylierung der fokalen Adhäsions Kinase (FAK) die sich dadurch als Bindungspartnerin für andere Kinasen wie Csk, Fyn, und Src Kinasen präsentieren kann[39,105,111]. Neben der Induktion von unterschiedlichen intrazellulären Vorgängen, wie unter anderem die MAPK/ERK/JNK Kaskaden, findet vor allem eine gesteigerte MMP Produktion statt [16,63].

Integrin-vermittelte Signale betreffen vor allem die Expression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9[86]. MMP-2 wurde aktiviert sobald Zellen in einem dreidimensionalen Kollagengitter kultiviert wurden, eine Induktion von pro-MMP-2 und TIMP-2 fand in dem Moment statt, sobald ein löslicher anti-β1-Integrin Antikörper der Zellkultur hinzugefügt wurde. Nach dieser anti-β1-Integrin Antikörper Inkubation wurde eine Aggregation der Integrine auf der Zelloberfläche beobachtet, die die Metalloprotease aktivierte, was bedeutet, dass eine MMP-2 Aktivierung durch β1 Integrin beobachtet werden konnte[78]. Somit hätte ein Verlust von β1 Integrin möglicherweise eine gestörte Regeneration des Hirnparenchymes zur Folge, da dieses zur Einwanderung von regenerativen Endothelzellen in geschädigtes Gewebe benötigt werden könnte.

Die gleiche Wirkung wurde für α6 Integrin bei Adenomazellen des Kolons berichtet, die ebenfalls Signale zur gesteigerten Produktion von MMP-2 zur erleichterten Tumorinvasion vermittelt haben[92]. Auch hier stellt sich daher bei Verlust dieses Integrines die Möglichkeit einer erschwerten Neoangiogenese.

Zusätzlich zur Regulation von MMP-2 wurde β-Integrin aber auch ein Einfluss auf die Produktion von MMP-9 zugeschrieben. Im Gegensatz zu anderen Integrinen beeinflussten anti-α3 und anti-β1 in menschlichen Keratinozyten die Produktion von MMP[131]. Aber auch Wachstumsfaktoren die durch Bestandteile der EZM aktiviert werden können, wie Plättchen-assoziierter-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth

factor) sowie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor, FGF), können eine Hochregulierung der MMP-9 Aktivität hervorrufen oder die Wirkung von intrazellulären Integrinsignalkaskaden verstärken[6]. Transforming-growth-factor β (TGF-β) wiederum verliert seine regenerationsfördernde Wirkung, sobald er an Bestandteile der EZM wie Kollagen oder Decorin gebunden wird, er wird einfach stillgelegt. Bindet er jedoch über Decorin an das Integrin αV, so kann sogar die Produktion von MMP-1 induziert werden [18].

Integrine und MMPs verkörpern somit einen hochkomplexen Wirkmechanismus, mit dessen Hilfe sich Zellen kontrolliert durch die ansonsten unüberwindliche Basalmembran der Mikrogefäße des zentralen Nervensystems schleusen können. Gerät dieses bewährte System jedoch durch die Auswirkungen eines Traumas aus den Fugen, so kann sich eine Zerstörungskaskade in Gang setzen, dessen Auswirkung auch auf das das Traumaarreal umgebende und ansonsten ungeschädigte Gewebe gravierende Folgen haben kann. Insbesondere sei hier auf die gestörte Neoangiogenese, unwirksame Wachstumsfaktoren und auf die dadurch eventuell verminderte Plastizität der Nervenzellen hingewiesen.

4.2.4. Integrine – aktiv beteiligt?

Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten von Integrinen mit MMPs zu interagieren ist auch die Fähigkeit von Integrinen vorhanden, sich aktiv an posttraumatischen Abbauprozessen zu beteiligen. Um ihnen diese Eigenschaft jedoch sicher zusprechen zu können muss weitere intensive Nachforschung auf diesem Gebiet erfolgen. Eine weitere Möglichkeit der aktiven Beteiligung von Integrinen ist ihre Wirkung im Zusammenhang mit Kollagenspaltprodukten. Besonderes Augenmerk muß man hier auf die Untereinheiten von Kollagen Typ IV selbst richten. Untereinheiten von Kollagen Typ IV, wie Arresten (26 kDa), das ein NC1 Domänen Fragment ist, aber auch Canstatin (24 kDa) ein NCl Fragment der α2 Typ IV Kollagenkette, sowie Tumstatin (28 kDa) ein NCl Fragment der α3 Typ IV Kollagenkette, haben mit Hilfe der Integrine wiederum eine stark antiangiogene Wirkung[71].

So wird beispielsweise die antiangiogene Wirkung von Arriestin mit Hilfe von Heparansulfat Proteoglykanen und $\alpha_1\beta_1$ Integrin auf proliferierende Endothelzellen übertragen[23]. Senger zeigte, dass α_1Integrin neutralisierende Antikörper die VEGF vermittelte Angiogenese stoppen kann, ohne jedoch einen Effekt auf die bereits

bestehenden Gefäße auszuüben. Ebenso kann VEGF die Expression von $\alpha_1\beta_1$- and $\alpha_2\beta_1$- Integrinen induzieren. Unabhängig davon konnten Pozzi und seine Mitarbeiter beweisen, dass Tumore in einer α_1 Integrin Knockout Maus wesentlich langsamer wuchsen als in einer Wildtyp Maus[102].

Ähnlich verhält es sich mit Canstatin. Es induziert spezifisch Apoptose nur in Endothelzellen nicht in anderen Zellen, und zwar über eine Wechselwirkung mittels $\alpha_3\beta_1$ Integrin. Canstatin inhibierte humane Endothelzell-Migration und murine Endothelzell-Tubenformation, möglicherweise durch irreversible Bindung von Integrinen der Endothelzellen. Zusätzlich zur Apoptoseinduktion unterdrückte Canstatin die Endothelzell-Proliferation, ohne dieselbe Wirkung auch auf Nicht-Endothelzellen auszuüben[64].

Und zuletzt Tumstatin, das an Endothelzellen via $\alpha_v\beta_3$Integrin und $\alpha_6\beta_1$ Integrin bindet und damit vor allem eine Apoptose von proliferierenden Epithelzellen auslöst[17].

Diese Untereinheiten von Kollagen Typ IV können somit als kryptische, das heißt zunächst verborgene, antiangiogene Proteine durch die Zerstörung der Basalmembran freigesetzt werden und durch ihre Bindung an die spezifischen Integrinbindungspartner die Regeneration des geschädigten Gewebes unterdrücken[57]. Das könnte zusätzlich mögliche Langzeitauswirkungen auf die Plastizität des Gehirns haben, da zerstörte Mikrogefäße durch die lokale Wirkung dieser Kollagenbruchstücke nicht oder nur langsam wiederhergestellt werden könnten.

Eine weitere mögliche Erklärung für den im MCAO/R als auch im SHT beobachteten Verlust von α1, α6 und β1 Integrin wäre jedoch auch durchaus das Verschwinden der Integrine durch Abbauprozesse, direkte Schädigungen der Integrine oder durch zu geringe Reproduktion in den durch das Trauma unmittelbar betroffenen Zellen, was wiederum auch zu einem Verlust von Endothelzellen führen könnte, da diese die integrinvermittelte Bindung an die EZM zum Überleben benötigen[38].

Integrine können durch Disintegrine, die bei Integrinen zu verstärkten Konformationsänderungen bis hin zu deren Auflösung führen, abgebaut werden[90]. Eine Eigenschaft aller Disintegrine ist das Vorhandensein einer sogenannten Integrin-bindenden Region, das sie befähigt einerseits gezielt Integrinheterodimere anzugreifen, andererseits aber auch spezifische proteolytische Prozesse durchzuführen, die als „Ectodomain shedding“ bezeichnet werden. Das erlaubt Zellen

Membranrezeptoren zu inaktivieren und aktive lösliche Proteine, wie Zytokine, aus ihrer Membranbindung freizulassen[77]. Disintegrine könnten durch das Trauma freigesetzten werden und würden daher nicht nur zu einem Integrinabbau führen sondern auch zu einer Zytokinfreisetzung.
Denkbar wäre auch, dass die Integrine zusammen mit den Kollagenbestandteilen aus der Basalmembran gelöst werden, da der Zeitverlauf des Integrin und Kollagenverlustes, soweit mit dieser Studie beurteilbar, relativ parallel verlief. So könnten sie durch Bindung an Basalmembranbestandteile aus dem aktiven Geschehen „herausgefiltert“ werden, ohne die oben beschriebenen Bindungsmöglichkeiten und ihre aktiven Komponenten ausführen zu können.
Somit muss letztendlich eine Klärung der Frage, ob Integrine eventuell aktiv am posttraumatischen Geschehen beteiligt sein könnten, noch unbeantwortet bleiben.

4.3. Ausblick in zukünftige Behandlungsstrategien

Diese hier vorgestellte Studie hat trotz des milden Charakters des gewählten experimentellen Schädel-Hirn-Traumamodelles bei der Ratte bereits zum frühen Zeitpunkt von 24 Stunden Überlebenszeit stabil signifikante Verluste von Basalmembranbestandteilen nachweisen können. Therapeutische Strategien sollten sich daher auch im milden Schädelhirntrauma auf eine Wiederherstellung der endothelialen Basalmembran konzentrieren, insbesondere um die oben beschriebenen Folgeschäden durch im Blut gelöste Bestandteile der Basalmembran, ihre Interaktion mit Integrinen und den nachfolgenden intrazellulären Signalkaskaden zu unterbinden.

4.3.1.Mechanismen zur Hemmung der Proteolyse:

Zukünftige Untersuchungen könnten sich auf die drei bisher bekannten proteolytischen Hauptwege konzentrieren (das Plasminogen-Plasmin System, Matrix Metalloproteinasen und von Granulozyten freigesetzte Enzyme), sowie die Basalmembranbestandteile selbst und ihre Auswirkungen auf die Regeneration der

Mikrogefäße untersuchen, um ein besseres Verständnis für die in den Verlust von Basalmembran involvierten Prozesse im Schädelhirntrauma zu entwickeln.
Eine lokale oder systemische Unterbindung des Plasmin- und Matrixmetalloproteinasen-Systems mittels Inhibitoren wäre das vielversprechendste akut-therapeutische System[75,99]. Ein Eingriff in die Plasminkaskade war bereits mit Hilfe des Doxycyclins im Herzinfarkt möglich. Die Auflösung der Vernetzung von Myokardzellen und der EZM war hier sogar unabhängig von einer MMP-Aktivierung allein über Plasmin beobachtet worden und die Inhibierung von Plasmin durch Doxycyclin konnte einen Reduktion des Infarktareals in vivo hervorrufen[49]. Unter den Antibiotika nehmen Tetracycline eine besonders prominente Stellung in der derzeitigen Forschung ein, da sie als neuroprotektiver Ansatzpunkt die Blockade der Glutamatrezeptoren via Calpaininhibition und somit einen bereits in die Physiologie der posttraumatischen Schadenskaskade eingebetteten Mechanismus nutzen, was ihnen eine besondere Effektivität verleiht.

Antioxidantien wie Flavonoide oder Pyrrolopyrimidine mit endothelial zellprotektiven Effekten wurden bereits experimentell in der fokalen zerebralen Ischämie angewandt[36]. Sie stabilisierten neben den Endothelzellen auch die Basalmembranen der untersuchten Gefäßsysteme. Eine weitere Möglichkeit wäre die Anwendung von Hypothermie, um die Bildung von Radikalen zu minimieren und mittels Enzyminaktivierung einer Proteolyse vorzubeugen. Aber auch das therapeutische Potential der Disintegrine oder ihrer Inhibition sollte weiter untersucht werden.
Um einen besseren Einblick in die komplexen Veränderungen der Gefäßwand insbesondere der kleinen hirnversorgenden Gefäße zu erhalten, wäre es zudem nötig die Gefäßveränderungen mit neuronalen Veränderungen zu vergleichen, da Hinweise auf einen sekundären neuronalen Zellschaden nach Mikrogefäßturbulenzen bestehen[23].

Abschließend und einschränkend soll nochmals betont werden: Aufgrund der in dieser Studie geringen Anzahl an untersuchten Tieren (n=16) sollten die Ergebnisse zwar zu weiteren und detaillierteren Untersuchungen führen, für deren Planung sie auch genug Anhaltspunkte liefern. Die bisher vorliegenden Ergebnisse sollten aber dennoch weiterhin mit Zurückhaltung betrachtet werden. Die Daten der 24 Stunden Überlebensgruppe zeigten zwar bereits bei der geringen Anzahl untersuchter Tiere eine deutliche Konstanz und Signifikanz, so dass auf eine Erhöhung der Tieranzahl

verzichtet wurde, dennoch wäre die vertiefende Wiederholung des Versuchs, insbesondere in Bezug auf die Weiterentwicklung der Western Blots in Hinsicht auf verwendete Antikörper und Technik notwendig. Bezüglich der Basalganglien muss nochmals bedacht werden, dass das in dieser Arbeit untersuchte experimentelle SHT-Modell einem milden bis moderaten Traumamodell zuzuordnen ist (1.5 atm), und daher ein etwas Trauma-entfernterer Gefäßschaden eventuell nicht ausgelöst wurde. Daher müssen die hier veröffentlichten Ergebnisse wiederum nicht für ein stärkeres Flüssigkeits-Perkussions-Trauma, oder ein experimentelles SHT im Allgemeinen, sowie in seiner Übertragung auf den Menschen zutreffen.

5. Zusammenfassung

- Das leichte Schädelhirntrauma stellt in der Altersgruppe zwischen dem 15. und dem 25. Lebensjahr mit einer Inzidenz von 600 Personen/100000 Gesamtbevölkerung in Deutschland eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen dar.

- 10-20% der Betroffenen leiden an chronischen posttraumatischen Leistungseinbussen, ohne zerebral einen makroskopisch erkennbaren Schaden aufzuweisen.

- In dieser Dissertation konnte im experimentellen Tiermodell des leichten Schädelhirntraumas erstmals der Verlust von Basalmembranbestandteilen als ein mikroskopisches Korrelat im Sinne einer deutlichen Störung der für die normale Funktion des Gehirns notwendigen Blut-Hirn-Schranke gezeigt werden.

- Dieses mikroskopische Korrelat äusserte sich in der Zerstörung der Integrität der Basalmembran und ihrer Verankerung mittels Integrinen in der extrazellulären Matrix.

- 24 Stunden nach einem milden Flüssigkeits-Perkussions-Trauma zeigte der Kortex der Ratten einen Verlust von 31 ± 6% ($p < 0,03$) des Basalmembran-bestandteiles Kollagen Typ IV im Western Blot gegenüber der nicht-traumatischen Seite und bestätigte somit den bereits in Vorarbeiten in der Immunhistochemie festgestellten Verlust von 19 ± 4% ($p < 0,009$) der gefärbten Kollagenfläche, als auch mit 29 ± 6% ($p < 0,02$) der Reduktion der Gesamtanzahl der durch Kollagen identifizierten Mikrogefäße. Dieser Verlust war nach 12 Stunden Überlebenszeit erst als Trend zu sehen und erst nach 24 Stunden Überlebenszeit signifikant.

- Der beobachtete Verlust war auf den Kortex der Traumaseite beschränkt, das heißt die Basalganglien blieben unbeschädigt.

- Verglichen mit ischämischen Veränderungen nach MCAO/R (Verschluss der Arteria cerebri media und Reperfusion) war der Kollagen Typ IV Verlust im milden SHT weniger ausgeprägt, als auch von einem unterschiedlichen Verteilungsmuster, da im MCAO/R der mikrovaskuläre Basalmembranschaden hauptsächlich in den Basalganglien zu finden ist, im experimentellen SHT jedoch in kortikalen Arealen.

- Auch im Bereich der Verankerung der Basalmembran fand sich ein ausgeprägter Verlust der Zell-Adhäsions-Molekül Untergruppe genannt Integrine. Die untersuchten Integrinuntereinheiten α1, α6 und β1 finden sich entlang des Endothels der kleinen hirnversorgenden Gefäße. Als direkte Folge auf ein moderates Schädelhirntrauma in der Ratte treten hier deutliche Verluste auf. Die mit α1-Integrin Antikörper durchgeführte Immunhistochemie zeigte von allen drei untersuchten Integrinsubgruppen die stärkste Reduktion: Die angefärbte maximale Fläche nahm sowohl in der 12-Stunden-Überlebensgruppe, als auch in der 24-Stunden-Überlebensgruppe signifikant gegenüber der nicht-traumatischen Seite ab. Die 12-Stunden-Gruppe erfuhr eine Reduktion der maximalen α1 Integrinfläche um 8 ± 2% ($p < 0,01$; Abbildung 30), die 24-Stunden-Gruppe sogar eine Reduktion der maximalen α1-Integrinfläche um 13 ± 2% ($p < 0,001$). Die ebenfalls untersuchte α1 Integrinintensität nahm in einem vergleichbarem Maß signifikant ab, in der 12-Stunden-Überlebensgruppe um 8 ± 1% ($p < 0,01$), in der 24-Stunden-Überlebensgruppe um 14 ± 2% ($p < 0,01$). Etwas weniger stark ausgeprägt und erst nach 24 Stunden Überlebenszeit signifikant, folgten die beiden Integrinuntereinheiten β1 und α6 mit 12 ± 2% ($p < 0,005$) respektive 8 ± 2% ($p < 0,05$) Verlust der gefärbten Integrinfläche, sowie 10 ± 3% ($p < 0,05$) respektive 7 ± 1% ($p < 0,005$) Verlust der Integrin Färbeintensität.

- Dieser Effekt konnte nur in kortikalen Arealen des Gehirns entdeckt werden, wie bereits zuvor die Schäden der Basalmembran, und war auch im Zeitverlauf parallel zum Verlust von Kollagen Typ IV.

- Auch war, verglichen mit ischämischen Veränderungen nach MCAO/R, der Integrinverlust im milden SHT weniger ausgeprägt und von einem unterschiedlichen Verteilungsmuster. Die vorbeobachteten Verluste dieser Integrinuntereinheiten (entsprechend Kollagen Typ IV) werden nach MCAO/R

hauptsächlich in den Basalganglien gefunden, im experimentellen SHT jedoch in kortikalen Arealen.

- Als ursächlich für die beobachteten und deutlichen Schäden der mikrovaskulären Basalmembran des Gehirns auch nach dem milden experimentellen Schädelhirntrauma wäre am ehesten die Aktivierung der Matrix-Metallo-Proteasen als einer der drei Hauptwege der Proteolyse (Plasminogen-Plasmin-System, Matrix-Metallo-Proteasen und Inflammation) zu vermuten.

- Zudem könnten auch die Basalmembranbestandteile selbst, die als Reaktion auf ein Trauma freigesetzt werden, insbesondere Untereinheiten von Kollagen Typ IV, verborgene Bindungsstellen zur Signalvermittlung präsentieren, welche eine Kaskade von intrazellulären Zerstörungsmechanismen anstossen könnten.

- Zukünftige Untersuchungen sollten sich daher auf die drei bisher bekannten proteolytischen Hauptwege, sowie die Basalmembranbestandteile selbst und ihre Auswirkungen auf die Regeneration der Mikrogefäße stützen, um ein besseres Verständnis für die in den Verlust von Basalmembran involvierten Prozesse während eines Schädelhirntrauma zu entwickeln.

- Zukünftige Therapien des leichten bis moderaten experimentellen Schädelhirntraumas sollten daher möglicherweise bereits während der akutmedizinischen Versorgung in Betracht gezogen werden. Man sollte anhand der Ergebnisse dieser Dissertation in Betracht ziehen, dass die hier vorgestellte Studie auch im milden experimentellen Schädelhirntraumamodell bereits zum frühen Zeitpunkt von 24 Stunden Überlebenszeit stabil signifikante Verluste von Basalmembranbestandteilen nachweisen konnte. Therapeutische Strategien sollten sich daher auch nach mildem Schädelhirntrauma auf eine Wiederherstellung der endothelialen Basalmembran konzentrieren, insbesondere um die oben beschriebenen Folgeschäden durch im Blut gelöste Bestandteile der Basalmembran, ihre Interaktion mit Integrinen und den nachfolgenden intrazellulären Signalkaskaden zu unterbinden. Optimalerweise sollten diese Strategien bereits für den akutmedizinischen Zeitpunkt geplant werden.

6. Literaturverzeichnis

1. AKIYAMA, H. (1994). Inflammatory response in Alzheimer's disease. Tohoku J Exp Med. **174**, 294-303.
2. ALBELDA, S.M. and BUCK, C.A. (1994). Intergrins and other cell adhesion molecules. FASEB J. **50**, 2868-80.
3. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., and WALTER, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th ed, New York: Garland Publishing
4. ALEXANDER, M.P., (1995). Mild traumatic brain injury: Pathophysiology, natural history, and clinical management. Neurology **45**, 1253–1260.
5. ALTAY, T., MCLAUGHLIN, B., WU, J.Y., PARK, T.S.; GIDDAY, J.M. (2007). Slit modulates cerebrovascular inflammation and mediates neuroprotection against global cerebral ischemia. Exp Neurol. **26,** epub ahead of print.
6. ANTEBY, E.Y., GREENFIELD, C., NATANSON-YARON, S., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. Mol Hum Reprod. **10,** 229-35.
7. APLIN, A.E., HOWE, A.K., ALAHARI, S.K., JULIANO, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. Pharmacol Rev. **50**, 197-263.
8. APLIN, A.E., HOWE, A.K., and JULIANO, R.L. (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. Curr Opin Cell Biol. 11, 737-44.
9. ARCHELOS, J.J., PREVITALI, S.C. and HARTUNG, H.P. (1999). The role of intergrins immune-mediated diseases of the nervous system. Trends Neurosci. **22**, 30-8.
10. ARMAO, D., KORNFELD, M., ESTRADA, E.Y., GROSSETETE, M., and ROSENBERG, G.A. (1997). Neutral proteases and disruption of the blood-brain barrier in rat. Brain Res. **767,** 259-64.
11. BARONAS-LOWELL, D., LAUER-FIELDS, J.L., BORGIA, J.A., et al. (2004). Differential modulation of human melanoma cell metalloproteinase expression by alpha 2beta 1 integrin and CD44 triple-helical ligands derived from type IV collagen. J Biol Chem. 2004 Aug 2 epub ahead
12. BINDER, L.M., ROHLING, M.L. and LARRABEE, G.J., 1997. A review of mild head trauma: Part I. Meta-analytic review of neuropsychological studies. J Clin Exp Neuropsychol. **19**, 421–431.
13. BO, L., PETERSON, J.W., MORK, S., et al. (1996). Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerois lesions. J Neuropathol Exp Neurol. **55,** 1060-72.
14. BOZZO, C., LOMBARDI, G., SANTORO, C. and CANONICO, P.L. (2004). Involvement of beta(1) integrin in betaAP induced apoptosis in human neuroblastoma cells. Mol Cell Neurosci. **25**, 1-8.

15. CARMELIET, G., HIMPENS, B. and CASSIMAN, J.J. (1994). Selective increase in the binding of the alos 1 beta 1 integrin for collagen type IV during neurite outgrowth of human neuroblastoma TR 14 cells. J Cell Sci. **107**, 3379-92.
16. CASERMAN, S., and LAH, T.T. (2004). Comparison of expression of cathepsins B and L and MMP2 in endothelial cells and in capillary sprouting in collagen gel. Int J Biol Markers. **19,** 120-9.
17. CAUDROY, S., CUCHEROUSSET, J., LORENZATO, M., et al. (2004). Implication of tumstatin in tumor progression of human bronchopulmonary carcinomas.Hum Pathol. **35,** 1218-22.
18. CHAKRABORTY, C., GLEESON, L. M., MCKINNON, T., and LALA, P. K. (2002). Regulation of human trophoblast migration and invasiveness.Can J Physiol Pharmacol. **80,** 116-24.
19. CHEN, Z.L., and STRICKLAND, S. (1997). Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. Cell. **91,** 917-25.
20. CHEN, C.W., TSAI, Y.H., DENG, W.P., et al. (2005). Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. J Orthop Res. **23**, 446-53.
21. CHRISTMAN, C., GRADY, S., WALKER, S., HOLLOWAY, K., and POVLISHOCK, J. (1994). Ultrastructural studies of diffuse axonal injury in humans. J. Neurotrauma **11**, 173–186.
22. CIMINO, M., GELOSA, P., GIANELLA, A., NOBILI, E., TREMOLI, E. and SIRONI, L. (2007). Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. Neuroscientist **13,** 208-13.
23. COLORADO, P.C., TORRE, A., KAMPHAUS, G., et al. (2000). Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen.Cancer Res. **60,** 2520-6.
24. COOPER, G. M. (2000) The Cell - A Molecular Approach. 2nd ed. Sunderland (MA) Sinauer Associates, Inc.
25. DEFILIPPI, P., VAN HINSBERG, V., BERTOLOTTO, A., et al. (1991). Differential distribution and modulaton of expression of alpha1/beta1 integrin on humanendothelial cells. J Cell Biol **114**, 855-863.
26. DEJANA,E., RAITERI, M., RESNATI, M. and LAMPUGNANI, M.G.(1993). Endothelial integrinsnad their role in maintaining the integrity of the vessel wall. Kidney Int. **43**, 61-3.
27. DEL ZOPPO, G.J., and HALLENBECK, J.M. (2000). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. Thromb. Res. **98,** 73-81.
28. DIKMEN, S.S., MACHAMER, J.E., WINN, R. and TEMKIN, N. (1995). Neuropsychological outcome at 1-year post head injury. Neuropsychol. **9**, 80–90.
29. DIRNAGL, U., IADECOLA, C., and MOSKOWITZ, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci. **22,** 391-7.
30. DONG, L., CHEN, Y., LEWIS, M., et al. (2002). Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking entactin-1/nidogen-1. Lab Invest. 82, 1617-30.
31. EBLE, J.A. (2001). The molecular basis of integrin-extracellular matrix-interactions. Osteoarthritis Cartilage. **9**, 131-40.
32. EIKELENBOOM, P., ZHAN, S.S., KAMPHORST, W., VAN DER VALK, P., and ROZEMULLER, J.M. (1994). Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease. Virchows Arch. 424, 421-7.

33. ELICEIRI, B.P. and CHERESH, D.A. (2001). Adhesion events in angiogenesis. Curr Opin Cell Biol. **13**, 563–568.
34. ERB., D.E., and POVLISHOCK, J.T. (1991). Neuroplasticity following traumatic brain injury: a study of GABAergic terminal loss and recovery in the cat lateral vestibular nucleus. Exp Brain Res **83**, 253–267.
35. ETZIONI, A. (1994). Adhesion molecule deficiencies and their clinical significance. Cell Adhes Commun. **2**,257-60.
36. FRANKO, J., POMFY, M., NOVAKOVA, B., and BENES, L. (1999). Stobadine protects against ischemia-reperfusion induced morphological alterations of cerebral microcirculation in dogs. Life Sci. **65,** 1963-7.
37. FRENETTE, P.S., and WAGNER, D.D. (1996). Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. N Engl J Med. 335,43-5.
38. FRIEDRICH, E.B., LIU, E., SINHA, S., et al. (2004). Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. Mol Cell Biol. **24,** 8134-44.
39. FU, Y.M., ZHANG, H., DING, M., et al. (2004). Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling.Clin Exp Metastasis. **21,** 587-98.
40. GALL, C., M. and LYNCH, G. (2004). Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis. Adv Exp Med Biol. **548,** 12-33.
41. GANEA, E., TRIFAN, M., LASLO, A. C., PUTINA, G. and CRISTESCU, C. (2007). Matrix metalloproteinases: useful and deleterious. Biochem Soc Trans **35,** 689-91.
42. GASQUOINE, P.G. (1997). Postconcussion symptoms. Neuropsychol Rev. **7**, 77–85.
43. GEHLSEN, K.R., KLIER, F.G., DICKERSON, K., ARGRAVES, W.S., ENGVALL, E., and RUOSLAHTI, E. (1989). Localization of the binding site for a cell adhesion receptor in laminin. J Biol Chem **264**,19034-19038.
44. GENNARELLI, T.A. (1993). Mechanisms of brain injury. J Emerg Med **11**, 5–11.
45. GENNARELLI, T.A., and GRAHAM, D.I. (1998). Neuropathology of the Head Injuries. Semin. Clin. Neuropsychiatry. **3,** 160-175.
46. GIESE, A. and WESTPAHL, M. (1996). Glioma invasion in the central nervous system. Neurosurgery **39**, 235-52.
47. GLADSON, C.L. (1999). The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function J Neuropathol Exo Neurol. **58**, 1029-40.
48. GOLDBRUNNER, R.H., BERNSTEIN, J.J., TONN, J.C. (1998). ECM- mediated glioma cell invasion. Microsc Res Tech. **43**, 250-7.
49. GRIFFIN, M.O., JINNO, M., MILES, L.A., and VILLARREAL, F.J. (2005). Reduction of myocardial infarct size by doxycycline: a role for plasmin inhibition. Mol Cell Biochem. **270,** 1-11.
50. GULLBERG, D.E. and LUNDGREN-AKERLUND, E. (2002). Collagen-binding I domain integrins--what do they do? Prog Histochem Cytochem. **37,** 3-54.
51. HALL, A. (1998). Rho GTPases and actin cytoskeleton. Science. **279**, 509-514.
52. HAMANN G.F., DEL ZOPPO G.J., and VON KUMMER R. (1999). Hemorrhagic transformation of cerebral infarction - possible mechanisms. Thromb. Haemost. 82 Suppl. **1,** 92-94.

53. HAMANN, G.F., OKADA, Y., FITRIDGE, R., and DEL ZOPPO, G.J. (1995). Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. Stroke **26,** 2120-2126.
54. HAMANN, G.F., OKADA, Y., and DEL ZOPPO, G.J. (1996). Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab. **16,** 1373-1378.
55. HAMANN, G.F., LIEBETRAU, M., MARTENS, H., et.al. (2002). Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. **22,** 526-33.
56. HAUCK, C.R. (2002). Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. Med Microbiol and Immunol. 2002
57. HEINO, J. (2000).The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. Matrix Biol. **19**, 319-323.
58. HOMMEL, M. (1993). Amplfication of cytoadherence in cerebral malaria: towards a more rational explanation of disease pathophysiology. Ann Trop Med Parasitol. **87**, 627-35.
59. HUDSON, B.G., TRYGGVASON, K., SUNDARAMOORTHY, M., and NEILSON, E.G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. N. Engl. J. Med. **348**, 2543-56.
60. HUMPHRIES M.J. (2000). Integrin structure. Biochem. Soc. Trans. **28,** 311–39.
61. HUMPHRIES, M.J., MOULD, A.P. and TUCKWELL, D.S. (1996). Dynamic aspects of adhesion receptor function-integrins both twist and shout. Bioessays. **15**, 391-7.
62. JAFFE, E.A. (1987). Cell biology of endothelial cells. Hum. Pathol. **18,** 234-9.
63. KAGAMI, S., URUSHIHARA, M., KITMURA, A. et al (2004). PDGF-BB enhances alpha1beta1 integrin-mediated activation of the ERK/AP-1 pathway involved in collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. J Cell Physiol. **198,** 470-8.
64. KAMPHAUS, G.D., COLORADO, P.C., PANKA, D.J., et al.(2000). Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. J Biol Chem. **275** 1209-1215.
65. KANNAN, M., AHMED, R.P., JAIN, P., KUMAR, R., CHOUDHRY, V.P., and SAXENA, R. (2003). Type I Glanzmann thrombasthenia: most common subtypes in North Indians. Am J Hematol. 74,139-41.
66. KARZMARK, P., HALL, K. and ENGLANDER, J., 1995. Late-onset post-concussion symptoms after mild brain injury: The role of premorbid, injury-related, environmental, and personality factors. Brain Injury **9**, 21–26.
67. KEIDEL, M., and POREMBA, M. In: BRANDT, T., DICHGANS, J., DIENER, H.C. (1998). Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. 3. Aufl.Stuttgart: Kohlhammer; 535 – 552.
68. KEIDEL, M., and RAMADAN, N. (2000). Acute posttraumatic headache. In: OLESEN, J., WELCH, K.M.A The Headaches. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 765-770.
69. KIM, J.S., KIM, J.G., JEON, C.Y., et al. (2005). Downstream components of RhoA required for signal pathway of superoxide formation during phagocytosis of serum opsonized zymosans in macrophages. Exp Mol Med. **37**, 575-87.

70. KLOSS, C.U.A., THOMASSEN, N., FESL, G., MARTENS, H., YOUSRI, T.A., and HAMANN, G. F. (2002). Tissue-saving infarct volumetry using immunhistochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. Neurol. Res. **24,** 713-8.
71. KUFE, D.W., POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R.R et al., (2003). In Cancer Medicine**.** 6th ed. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.
72. LANGHOLZ, O., ROCKEL, D., MAUCH, C., et al. (1995). Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by α1ß1 and α2ß1 integrins. J Cell Biol. **131**, 1903-1915.
73. LEMONS, M., L. and CONDIC, M., L. (2007) Integrin signaling is integral to regeneration. Exp. Neurol.14 (epub ahead print).
74. LIJNEN, H.R., and COLLEN, D., (1997). Endothelium in hemostasis and thrombosis. Prog. Cardiovasc. Dis. **39,** 343-50.
75. LIJNEN, H.R., SILENCE, J., LEMMENS, G., FREDERIX, L., and COLLEN D. (1998). Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. Thromb. Haemost. **79,** 1171-1176.
76. LINDGREN, S., and RINDER, L. (1966). Experimental studies in head injury. II. Pressure propagation in "percussion concussion". Biophysik. **3,** 174-80.
77. LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., et al. (2000). In: Molecular Cell Biology. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co
78. LU, K.V., JONG, K.A., RAJASEKARAN, A.K., CLOUGHESY, T.F., MISCHEL, P.S.(2004).Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line.Lab Invest. **84,** 8-20.
79. MANVELYAN, H. (2006) Contemporary experimental models of traumatic brain injury. Review. Georgian Med News **140**, 13-6.
80. MARCHAL, G., YOUNG, A.R., and BARON, J.C. (1999). Early postischemic hyperperfusion: pathophysiologic insights from positron emission tomography. J. Cereb. Blood Flow Metab. **19,** 467-82.
81. MARMAROU, A., FODA, M.A., VAN DEN BRINK, W., CAMPBELL, J., KITA, H., and DEMETRIADOU, K. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. J. Neurosurg. **80,** 291-300.
82. MARMAROU, A. (2007) A review in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema. Neurosurg Focus. Review 15;22 **5**:E1
83. MAXWELL, W.L., WHITFIELD, P.C., SUZEN, B., et al. (1992). The cerebrovascular response to experimental lateral head acceleration. Acta Neuropathol. **84,** 289-96.
84. MAZZONE, A. and RICEVUTI, G. (1995). Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. Haematologica. **80**, 161- 75.
85. MITRA, A., CHAKRABARTI, J., and CHATTERJEE, A. (2003). Binding of α5 monoclonal antibody to cell surface α5β1 integrin modulates MMP2 and MMP7 activity in B16F10 melanoma cells. J. Environ. Pathol., Toxicol. Oncol. **22**,167–178.

86. MORGAN, M.R., THOMAS, G.J., RUSSELL, A., HART, I.R., MARSHALL, J.F. (2004). The integrin cytoplasmic-tail motif EKQKVDLSTDC is sufficient to promote tumor cell invasion mediated by matrix metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9. J Biol Chem. **279,** 26533-9.
87. MUELLNER, A., BENZ, M., KLOSS, C.U., MAUTES, A., BURGGRAF, D., and HAMANN, G.F. (2003). Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat. J Neurotrauma **20**, 745-54.
88. NEWTON, R.A., THIEL, M. and HOGG, N. (1997). Signaling mechanisms and the activation of leukocyte integrins. J Leukoc biol. **61**, 422-6.
89. NEWTON, H.B. (2004). Molecular neuro-oncology and the development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 3: brain tumor invasiveness. Expert Rev Anticancer Ther. **4**, 803-21.
90. NIEWIAROWSKI, S., MCLANE, M. A., KLOCZEWIAK, M., and STEWART, G.J. (1994). Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. Semin. Hematol., **31**,289-300.
91. NIMNI, M. E. in ZERN, M. and REID, L. eds. (1993), *Extracellular Matrix,* Marcel Dekker, 121 – 148.
92. O'CONNOR, K., NGYUEN, B., and MERCURIO, A. (2000). RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the a6ß4 integrin and cAMP metabolism. J. Cell Biol. **148,** 253-258.
93. OHTAKE, M., MORINO, S., KAIDOH, T., and INOUE, T. (2004).Three-dimensional structural changes in cerebral microvessels after transient focal cerebral ischemia in rats: scanning electron microscopic study of corrosion casts. Neuropathology. **24,** 219-27.
94. OMMAYA, A., and GENNARELLI, T. (1974). Cerebral concussion and traumatic unconsciousness: correlation of experimental and clinical observations on blunt head injuries. Brain **97**, 633–654.
95. PAULSSON, M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **27,** 93-127
96. PAXINOS, G., and WATSON, C. (1998).The Rat Brain in Stereotxic Coordinates. Academic Press, San Diego, CA.
97. PETTIGREW, L.C., HOLTZ, M.L., CRADDOCK, S.D., MINGER, S.L., HALL, N., and GEDDES, L.W. (1996). Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. J.Cereb. Blood Flow Metab. **16,** 1189-202.
98. PETTUS, E., CHRISTMAN, C., GIEBEL, M., and POVLISHOCK, J. (1994). Traumatically induced altered membrane permeability: its relationship to traumatically induced reactive axonal change. J. Neurotrauma **5**, 507–522.
99. PFEFFERKORN, T., STAUFER, B., LIEBETRAU, M., et al. (2000). Plasminogen activation in focal cerebral ischemia and reperfusion. J. Cereb. Blood Flow Metab. **20,** 337-342.
100. PONSFORD, J., WILLMOTT, C., ROTHWELL, A., CAMERON, P., KELLY, A., et al., (2000). Factors influencing outcome following mild traumatic brain injury in adults. JINS. **6**, 568–579
101. POSTMANUR, R.M., NEWCOMB, J.K., KAMPFL, A. and HAYES, R.L. (2000). Light and confocal microscopic studies of evolutionary change in neurofilament proteins following cortical impact injury in the rat. Exp Neurol **161**, 15–26.

102. POZZI, A., MOBERG, P.E,, MILES, L.A., WAGNER, S., SOLOWAY, P., GARDNER, H.A.. (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization.Proc Natl Acad Sci **97,** 2202-7.
103. POZZI, A., LEVINE, W.F., GARDNER, H.A. (2002). Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. Oncogene. **21,** 272-81.
104. PROCKOP, D. J., and KIVIRIKKO, K.,I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu. Rev. Biochem., **64** 403-434.
105. REN, X., KIOSSES, W., and SCHWARTZ, M. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytosceleton. EMBO J. **18,** 578-585.
106. ROSE, D., M., ALON, R., GINSBERG, M., H. (2007). Integrin modulation and signalign in leukocyte adhesion and migration. Immunol Rev. **218,** 126-34.
107. RUOSLATHI, E. (2003). The RGD story: a personal account. Matrix Biol. **22**, 459-65.
108. RUIZ, C., LIU, C.Y., SUN, Q.H., et al. (2001). A point mutation in the cysteine-rich domain of glycoprotein (GP) IIIa results in the expression of a GPIIb-IIIa (alphaIIbbeta3) integrin receptor locked in a high-affinity state and a Glanzmann thrombastenia-like phenotype. Blood **98**, 2432-41.
109. SATZ, P., ALFANO, M.S., LIGHT, R., MORGENSTERN, H., ZAUCHA, K., et al. (1999). Persistent post-concussive syndrome: A proposed methodology and literature review to determine the effects, if any, of mild head and other bodily injury. J Clin Exp Neuropsych. **21**, 620–628.
110. SCHRETLEN, D.J., and SHAPIRO, A.M. (2003) A quantitative review of the effects of traumatic brain injury on cognitive functioning. Int Rev Psychiatry. **15**, 341-9.
111. SCHWARTZ, M., and SHATTIL, S. (2000). Signaling networks linking integrins and Rho family GTPases. Trnds Biochem. Sci. **25,** 388-391.
112. SEHBA, F.A., MOSTAFA, G., KNOPMAN, J., FRIEDRICH, V. Jr., and BEDERSON, J.B. (2004). Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg. **101,** 633-40.
113. SEKIMOTO, H., EIPPER-MAINS, J., POND-TOR, S., BONEY, C.M. (2005).{alpha}V{beta}3 integrins and Pyk2 mediate IGF-I activation of Src and MAPK in 3T3-L1 cells.Mol Endocrinol**. 3,** 10
114. SHARMA, H.S., WESTMAN, J., CERVOS-NAVARRO, J., and NYBERG, F., (1997). Role of neurochemicals in brain edema and cell changes following hyperthermic brain injury in the rat. Acta Neurochir. Suppl. **70,** 269-74.
115. SHATTIL, S.J. and NEWMAN, P.J. (2004). Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. Blood **104**, 1606-15.
116. SMITH, S.L., ANDRUS, P.K., ZHANG, J., and HALL, E.D. (1994). Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. J. Neurotrauma **11,** 393-404.
117. SOBEL, R.A., HINOJOZA, J.R., MAEDA, A. and CHEN, M. (1998). Endothelial cell integrin laminin receptor expression in multiple sclerosis lesions. Am J Pathol. **153**, 405- 15.
118. SONNENBERG, A. (1993). Integrins and their ligands. Curr Top Microbiol Immunol. **184**, 7-35.

119. SULLIVAN, H.G., MARTINEZ, J., BECKER, D.P., MILLER, J.D., GRIFFITH, R., and WIST, A.O. (1976). Fluid-percussion model of mechanical brain injury in the cat. J.Neurosurg. **45,** 521-34.
120. TAMKUN, J.W., DESIMONE, D.W., FONDA, D., PATEL, R.S., BUCK, C., HORWITZ, A.F. and HYNES, R.O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. Cell. 46, 271-82.
121. THEIEN, B.E., VANDERLUGT, C.L., EAGAR, T.N., NICKERSON-NUTTER, C., NAZARENO, R. et al. (2001). Discordant effects of anti-VLA-4 treatment before and after onset of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest. **107**, 995-1006.
122. THEILEN, H., SCHROCK, H., and KUSCHINSKY, W. (1993). Capillary perfusion during incomplete forebrain ischemia and reperfusion in rat brain. Am J Physiol Heart Circ Physiol **265**, H642-H648.
123. TOUZANI, O., YOUNG, A.R., DERLON, J.M., et al. (1995). Sequential studies of severely hypometabolic tissue volumes after permanent middle cerebral artery occlusion. A positron emission tomographic investigation in anesthetized baboons. Stroke. **26,** 2112-9.
124. TUCKWELL, D.S., WESTON, S.A., and HUMPHRIES, M.J. (1994). Integrins; a review of their structure and mechanisms of ligand binding. Symp Soc Exp Biol. 47, 107-136.
125. VANDENBERG, P., KERN, A., RIES, A., LUCKENBILL-EDDS, L., MANN, K., and KUHN, K. (1995). Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the α1ß1 and the α2ß1 integrins. J Cell Biol. **26**, 2120-2126.
126. VILLRINGER, A., and DIRNAGL, U. (1999). Pathophysiologie der zerebralen Ischämie; ZäFQ 93: 164-168.
127. WAGNER, S., and HAMANN, G.F. (2003). Experimental microvascular and clotting changes-significance for acute stroke therapy. Nervenarzt. **74**, 123-32.
128. WAGNER, S., TAGAYA, M., KOZIOL, J.A., QUARANTA, V., and DEL ZOPPO, G.J. (1997). Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by integrin α6ß4 during focal cerebral ischemia/reperfusion. Stroke. **28**, 858-865.
129. WENK, G.L., MCGANN, K., HAUSS-WEGRZYNIAK, B., and ROSI, S. (2003). The toxicity of tumor necrosis factor-alpha upon cholinergic neurons within the nucleus basalis and the role of norepinephrine in the regulation of inflammation: implications for Alzheimer's disease. Neuroscience. **121**, 719-29.
130. WHITE, D.J., PURANEN, S., JOHNSON, M.S., and HEINO, J. (2004). The collagen receptor subfamily of the integrins. Int. J. Biochem. Cell Biol. **36**, 1405-1410.
131. XU, P., WANG, Y., PIAO, Y., et al. (2001). Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. Biol Reprod. **65,** 240-6.
132. YURCHENCO, P.D., and SCHITTNY, J.C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. FASEB J. **4,** 1577-90.

7. Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Originalarbeiten

A. Muellner, M. Benz, A. Mautes, D. Burggraf, G.F. Hamann; Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat. J. Neurotrauma 2003 Aug; 20: 745-54.

Poster

A. Muellner, C.U.A. Kloss, G. Raivich, G.F. Hamann; Localization of integrins in the normal rat brain and after middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion; ENS 2003

Vorträge

Rolle der Basalmembran der Zellen, Signale aus dem Kitt. 02/2007
Schweizerisches Epilepsie Zentrum, Dr. med. Krämer, Zürich, Schweiz

CRPS and mild traumatic brain injury. As invisible as gosts? 09/2005 Interne Schmerzfortbildung, Universitätsspital Zürich, Prof. Dr. med. K. Hess, Zürich, Schweiz

Integrins and their role in regeneration. Possible intracellular signaling contributing to NoGo inactivation? 04/2005
Brain research insitute, Prof. Dr. M. Schwab, Zürich, Schweiz

8. Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG unterstützt (Graduiertenkolleg: Neurotrauma and Rehabilitation GRK / 688).

Sie wäre aber auch ohne die Unterstützung meines Doktorvaters Herrn Professor Gerhard F. Hamann, als auch seines Laborteams Dorothe Burggraf, Gabriele Jäger, Nathalie Wunderlich, Markus Benz, Christian Kloss, Martin Liebetrau, Helge Martens, Thomas Pfefferkorn, Andreas Trinkl und Milan Vosco, nicht möglich gewesen. Besonderer Dank gebührt Frau PD Dr. rer. nat. Angelika Mautes, Leiterin des Neurochirurgischen Forschungslabors der Universitätskliniken des Saarlandes für die Zurverfügungsstellung des Rattenmaterials. Ich möchte auch dem Graduiertenkolleg der DFG, GRK 688/Neurotrauma und Rehabilitation, allen voran Herrn Professor A. Baethmann und Frau Dr. von Bülow für ihre anregenden und hilfreichen Diskussionen danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meiner verstorbenen Großmutter Herta Habermann, meinen Eltern Herta und Eckart Müllner, meiner Tante Angela Zellner und meinem verstorbenen Freund Willibald Schiele, die durch ihre Zusprache die wüstesten Stunden der Arbeit erträglich machten.

9. Anhang

9.1. Verwendetes Material

9.1.1. Geräte

Bildanalysesoftware:	„OPTIMAS 6.1“ Stemmer Imaging GmbH, Puchheim	
Bildanalysekomponenten:	Computer:	Sony, Triniton, Multiscan 400 PS
	Kamera:	Sony, Power HAD, 3CCD Color Video Camera
	Mikroskop:	Zeiss, Axioskop 2, HAL 100 Fluoreszenzlampe HBO 50/AC, Göttingen
	Mikroskoptischkontrolle:	Multicontrol 2000
	Objektive:	Zeiss, Plan Neofluar 5x, 10x, 20x, 40x, 100x, Göttingen
	Installation:	Weiss IMAGING Solutions, Olching
Brutschrank:	Heraeus Instruments Function line Type B12, Hanau	
Kryostat:	CM3000, Leika	
pH-Meter:	WTW, Mulitcal pH 526	
Rührer:	Colora Magnetomix, Colora Messtechnik GmbH, Lorch/ Württemberg	
Rüttler:	Heidolph REAX 2000, Ludwigshafen	
Scanner:	EPSON Perfection 1240C	
WesternBlotanalyse:	Tina, Version 2.08, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Munich	
Waage:	Sartorius und Sartorius micro M 500P, Göttingen	
Zentrifugen:	Mikroliter-Zentrifuge Typ 2027, Hettlich, Tuttlingen	

9.1.2. Verbrauchsmaterial

9.1.2.1. Tiere

Ratten, Sprague-Dawley	Tierhaus Universität Homburg/Saar

9.1.2.2. Chemikalien

Aprotinin	Amersham Biosciences, Cardiff, UK
Azeton	Merck, Darmstadt, D
Diaminobenzidin DAB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
CAPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
(cyclohexylamino)1-propanesulfonic acid	
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
CoCl2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Gelatine	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphos.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Milchpulver	Fluka, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphos.	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphos.	Merck, Darmstadt, D
NiSO4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Sodium Pentobarbital	Merck, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Xylene	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

9.1.2.3. Antikörper

Primäre Antikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Kollagen Typ IV	Ziege	1/1000	Southern Biotechnology Ass, Birmingham, USA
MAP 2	Maus	1/800	Boehringer, Mannheim, D
Integrin alpha 1	Kaninchen	1/4000 (IHC) 1/500 (WB)	Chemicon, Hofheim, D
Integrin alpha 6	Maus	1/4000 (IHC) 1/500 (WB)	Serotec
Integrin beta 1	Kaninchen	1/4000 (IHC) 1/500 (WB)	Chemicon, Hofheim, D

Sekundäre Antikörper

Kollagen Typ IV:

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Herkunft
anti-Ziege Peroxidase konjugiert	Pferd	1/200	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA

MAP2:

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Herkunft
anti-Maus biotinyliert	Pferd	1/200	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA

Integrin:

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Herkunft
anti-Kaninchen biotinyliert peroxidase konjugiert	Pferd Pferd	1/100 (IHC) 1/100 (WB)	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
anti-Maus biotinyliert peroxidase konjugiert	Pferd Pferd	1/100 (IHC) 1/100 (WB)	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA

9.1.2.4. Tierseren

Pferdeserum	Vector, Wiesbaden, D
Rinderserum	Vector, Wiesbaden, D

9.1.2.5. Weitere Reagentien

AEC-Kit	AEC Kit SK-4200, Biomedia Corporation, Foster City, USA (5mlAqua dest.+2Tropfen Puffer-Lösung+3Tropfen AEC+2Tropfen Wasserstoffperoxid)
Bradford Protein Assay	TEBU GmbH, Frankfurt, D
Bicinchoninsäure-Mikroprotein-Assay	Pierce Chemical Company, USA
ECL Development Kit	Amersham, Beckinghamshire, UK
PVDF Membran	Sequi-Blot; Biorad, München, D
Polyoxyethylensorbitan-monolaurat (Tween)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Vectorstain® Elite Kit	ABC Kit Vectastain PK-6100; Vector, Wiesbaden, D (Lösung A 1:125/20µl+Lösung B 1:125/20µl+1ml PBS+1µl Tween20)

9.1.2.6. Lösungen, Puffer

Blotto: 100ml Tris saline stock (s.u.), 5g Milchpulver (Fluka), 1ml Pferdeserum, 20mg Natriumacid

Lyse Puffer für SDS-PAGE: 20mM Tris mit einem pH von 7,3, 1mM EDTA, 2% SDS

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS): 10mM Na2HPO4, 8,4 g/l NaCl, mit H3PO4 auf pH 7,4 eingestellt

Reagent diluent: 50ml Tris saline stock (s.u.), 20mg RinderSerumAlbumin (Bovineserum albumin, BSA), 25mg Thimerosal

SDS-PAGE Loading Puffer: 0,5 M Tris (pH 6,8), 5% SDS, 15% Glycerol, 2% ß Mercaptoethanol, 0,02% Bromophenol Blau

Tris saline stock: 0,05M TRIS-HCL, 8,7g/l NaCl, mit 1N HCL auf pH 7,4 einstellen

9.2. Lebenslauf

Schulausbildung

1978-1982	Peslmüller Grundschule, München, Deutschland
1982-1991	Abitur (großes Latinum, naturwissenschaftlicher Zweig) Karls-Gymnasium, München, Deutschland
1991-1992	Studium der Kunstgeschichte, Université de Paris/Sorbonne, Paris, France

Medizinische Ausbildung

1992-1995	Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland
1995	17.08.1995 Physikum
1995-2000	Ludwig-Maximilians-Universität (Wahlfach PJ: Neurologie, Neurochirurgie), München, Deutschland
1996-1998	wissenschaftlich-studentische Hilfskraft, Friedrich-Baur-Institut, Dr. M. Toepfer, Neurologische Klinik, Prof. Dr. med. D. Pongratz, München, Deutschland
1998	"one month lab" for visiting students, UCSF Vascular Laboratory, MD Chris Zellner, Cardiology research, MD Tony M. Chou, San Francisco, USA
1998-2000	wissenschaftlich-studentische Hilfskraft, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, PD. Dr. med. C. Trenkwalder, Neurologische Abteilung, Prof. Dr. med. F. Holsboer, München, Deutschland
2000	08.11.2000 III. Staatsexamen (28.08.1997 I. Staatsexamen, 25.03.1999 II. Staatsexamen)
2002	11.07.2002 Vollapprobation als Ärztin

Ärztliche Tätigkeit

Jan'01-Jun'02	Ärztin im Praktikum, Schlaganfallintensivstation und -ambulanz, Aufbau des Schwerpunktgruppe klinische Studien (siehe Anhang), Prof. Dr. med. G.F. Hamann, Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, Prof. Dr. med. Dr. h.c.Th. Brandt FRCP, München, Deutschland
April '01	Kurs „Methoden der Ischämieforschung-Tiermodelle", Dr. med. U. Dirnagl, Charite Berlin, SFB - Neurol. Forschung
Juli 11, 2002	Approbation als Ärztin (Vollapprobation)
Jul'02- Dez'03	Weiterbildungsassistenz Schlaganfallintensivstation, von März '03 bis Dez '03 Stationsärztin der Schlaganfallintensivstation, Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt FRCP, München, Deutschland
Jan'05-Jun'05	Weiterbildungsassistenz Psychiatrie/Neurophysiologie Dr. med. E. Muellner, Straubing, Deutschland
Jul'05-Mär'06	Assistenzärztin, Neurologische Klinik, Universitätsspital Zürich, Prof. Dr. med. K. Hess, Zürich, Schweiz
Seit April'06	Assistenzärztin, Privatassistenz, Schweizerisches Epilepsie Zentrum, Dr. med. G. Krämer, Zürich, Schweiz

Forschungstätigkeit

2001- 2003	DFG-Forschungsstipendium "Neurotrauma and Rehabilitation" GRK 688, Prof. Dr. A. Baethmann, Chirurgische Forschung, LMU-München,

	mit dem Tiermodell der Ratte *"Neurotrauma and microvessels- integrins and the basal lamina in the fluid-percussion model of the rat",* experimentelle Schlaganfallforschung, Prof. Dr. med. G.F. Hamann, Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt FRCP, München, Deutschland
Jan'01-Dez'03	Experimentelle Schlaganfallforschung, Prof. Dr. med. G.F. Hamann, Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt FRCP, München, Deutschland
seit Jan'01	Aktives Mitglied der deutschen Schlaganfall-Studien Vereinigung
Jan'04-Dez'05	ENS Forschungsstipendium am Institut für Hirnforschung, Universität Zürich, Prof. Dr. M. E. Schwab, Zürich, Schweiz
seit Jan'05	freie wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Hirnforschung, Universität Zürich, Prof. Dr. M. E. Schwab, Zürich, Schweiz
seit Apr'06	freie wissenschaftliche Mitarbeiterin Msc I. Mothersill, Schweizerisches Epilepsie Zentrum, Zürich, Schweiz

Lehrtätigkeit

2001	Vorlesung „Dissections of cranial arteries **"**, Stroke-Unit Harlaching, München 2001 Kurs „Neurologische Examination" für Medizinstudenten der LMU München SoSem 2001
2002	Kurs „NerV VII" / Harvard Medical Alliance, einschließlich Dopplersonographie, und Triple Jump Examen für Medizinstudenten der LMU München WiSem 2002/2003
2003	Kurs „NerV VII" / Harvard Medical Alliance, einschließich Dopplersonographie, und Triple Jump Examen für Medizinstudenten der LMU München SoSem 2003

Stipendien

2001	Gewährung einer Sachbeihilfe der Friedrich-Baur-Stiftung für das Projekt: „Distribution of calpain positive cells in the rat brain after MCAO/R detected by double-immunofluorescence labeling."
2001- 2002	DFG-Forschungsstipendium (Deutsche Forschungsgemeinschaft)**,** GRK 688 (Graduiertenkolleg) "Neurotrauma und Rehabilitation"
2004	ENS-Forschungsstipendium (Europäische Neurologische Gesellschaft) am Institut für Hirnforschung, Universität Zürich, Prof. Dr. M. E. Schwab, Zürich, Schweiz

Publikationen

A. Muellner, N. Goebels, M. Liebetrau, G.F. Hamann; Stroke associated with pancreatic carcinoma. J Neurol 2000; 247 (Suppl.3) III / 132 / 528

A. Muellner, M. Benz, A. Mautes, D. Burggraf, G.F. Hamann; Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat. J. Neurotrauma 2003 Aug; 20: 745-54.

T. Pfefferkorn, M. Liebetrau, **A. Mullner**, A. Bender, G.F. Hamann; Increasing use of intravenous rt-PA does not affect safety in acute stroke. J Neurol. 2005 Dec; 252(12):1500-3.

A. Muellner, R. R. Gonzenbach, O. Weinmann, L. Schnell, Th. Liebscher, M.E. Schwab; Lamina specific restoration of serotonergic projections after Nogo-A antibody treatment of spinal cord injury, EJN 01/2008.

In Vorbereitung: A. Muellner, G. Cascino, F. Sharbrough, A. M. Siegel; The role of 'forced normalization' in EEG in psychosis following epilepsy surgery.

A. Muellner, C.U.A. Kloss, G. Raivich, G.F. Hamann; Localization of integrins in the normal rat brain and after middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion; Poster ENS 2003

9.3. Verzeichnis der Abkürzungen

AK	Antikörper
BBB	Blood brain barrier = Bluthirnschranke
BSA	Bovine serum albumin = Rinderserumalbumin
DTT	Dithiotheitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsions Kinase
FPI	Fluid percussion injury = Flüssigkeits-Perkussions-Modell des SHT
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
MAP2	Mikrotubulär assoziiertes Antigen 2
MCAO/R	Okklusion der Arteria cerebri media mit nachfolgender Reperfusion
MMP	Matrix Metalloproteasen
ROI	Region of interest = zu untersuchende (interessierende) Region
SDS	Sodium dodecyl Sulfat
SHT	Schädelhirntrauma