

Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozirkulationssystems

Sabine Wolf*, Bernhard Seehaus, Klaus Minol,
Hans Günter Gassen*

Institut für Biochemie der Technischen
Hochschule, D-64287 Darmstadt, Germany

The blood-brain barrier, located in cerebral capillaries, guarantees a supply of glucose to neuroactive areas and protects against the penetration of harmful compounds. From the pharmaceutical point of view the limitation in transport is a problem: therapeutically effective substances are not able to reach the brain via the bloodstream. Blood-brain barrier research contributes to the understanding of the cerebral microcirculatory system.

* Die Forschungsprojekte der Autoren werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Das Gehirn der höheren Wirbeltiere, das wohl komplizierteste uns bekannte Organ, hat im Laufe der Evolution einzigartige Fähigkeiten und Spezialisierungen erworben, die eine hohe Abhängigkeit von einer konstanten und intensiven Nähr- und Sauerstoffversorgung zur Folge hatten. So setzt das Gehirn des Menschen, das mit rund 1300 g nur ca. 2% des Körpergewichtes ausmacht, rund 20% der Gesamtenergie des Stoffwechsels um. Dies entspricht einem Bedarf von ca. 75 mg Glucose und 50 ml O₂ pro Minute. Wird die Sauerstoffzufuhr vollständig unterbrochen, tritt schon nach 8–10 Sekunden Ohnmacht ein, nach wenigen Minuten resultieren ernste, meist irreparable Schädigungen des Zentralnervensystems. Gleiches gilt für eine partielle Unterbrechung der Sauerstoff- bzw. Blutzufuhr in einzelnen Hirnarealen, z. B. durch Verletzung. Die Dysfunktion eines bestimmten Hirnbereiches kann oft genau mit einer Schädigung des diese Region versorgenden Gefäßes korreliert werden.

Die komplexen elektrochemischen und humoralen Vorgänge an der Nervenzelle sind nur in einem konstanten extrazellulären Milieu möglich. So dürfen z. B. pH-Wert-Schwankungen im Blut, die unter Belastung auftreten, nicht an das Gehirn über den Blutstrom vermittelt werden. Änderungen im ionischen Milieu des interstitiellen Raumes, insbesondere der Kaliumionenkonzentration, hätten drastische Auswirkungen auf das Membranpotential der Nervenzellen. Außerdem stellt das Eindringen lipidlöslicher, körperfremder Substanzen (lipophile Xenobiotika) eine potentielle Gefahr dar. Solche Substanzen können die nicht zur Regeneration befähigten Neuronen sowie das umgebende Bindegewebe, die Neuroglia, irreversibel schädigen. Trotz der hohen Durchblutung muß deshalb der Stoffaustausch zwischen Blutplasma und Gehirn selektiv erfolgen.

Die Anatomie der Blutversorgung dieses Organs ist deshalb in vielerlei Hinsicht einzigartig und seine phy-

siologische Kontrolle hochkomplex. Zum Schutz des neuronalen Gewebes und zum Erhalt eines konstanten inneren Milieus (Homöostase) zeigt das cerebrale Gefäßsystem höherer Wirbeltiere zahlreiche strukturelle und funktionelle Besonderheiten. In ihrem Zusammenspiel beschränken diese weitgehend den unkontrollierten Übertritt der im Blut zirkulierenden Stoffe in das Hirngewebe und werden in ihrer Gesamtheit als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet.

Neben dem kapillären Bett trägt auch der Plexus choroideus zur Kontrolle und Aufrechterhaltung der Homöostase bei. Der Plexus choroideus produziert den Liquor cerebrospinalis, beim Menschen etwa 0,4 ml/min, der das Gehirn gewissermaßen „umspült“ und es mit Vitaminen, Nucleotiden und in begrenztem Maße auch mit Glucose versorgt. Die gesamte Hirnflüssigkeit (ca. 150 ml) wird im Laufe von 3–4 Stunden erneuert. Der Stofftransport ist dabei ebenfalls selektiv und wird vom Epithelgewebe des Plexus choroideus kontrolliert. Dieser bildet die Blut-Liquor-Schranke. Der verbrauchte Liquor wird über die Spinnenwebhaut (Arachnoidea), einer der drei Hirnhäute, ohne Beschränkung in das venöse Blut entsorgt.

Die im Liquor enthaltenen Mengen an Sauerstoff und Glucose reichen zur Versorgung des Gehirns bei weitem nicht aus. Diese Moleküle werden im wesentlichen über das cerebrale Kapillarnetzwerk transportiert, das eine etwa 5000fach höhere Austauschfläche hat als der Plexus choroideus. Die Dichte an Kapillaren schwankt zwischen verschiedenen Hirnregionen beträchtlich, am häufigsten findet man diese kleinsten Gefäße im Cortex. Typische Zahlen sind hier 300–800 Kapillarquerschnitte pro Quadratmillimeter Gewebe.

Der Energiebedarf einer Nervenzelle erhöht sich bei neuronaler Aktivität beträchtlich, da eine Reihe energieabhängiger Reaktionen, zum Beispiel bestimmte Ionen-Transportvorgänge, an der Zellmembran ausgelöst werden. Ganze Bereiche des Gehirns, die funktionelle Einheiten bilden, müssen daher ihre Blutversorgung selbständig dem Bedarf anpassen können. Beim Lesen z. B. kommt es in den Regionen im visuellen Cortex und im visuellen Assoziationsfeld (Fig. 1A) zu einer im Vergleich zum umgebenden Hirngewebe erhöhten Aufnahme von Glucose (Fig. 1C). Diese spontane und gezielte Versorgung besonders neuroaktiver Areale kann nur durch das kapilläre Netzwerk gewährleistet werden.

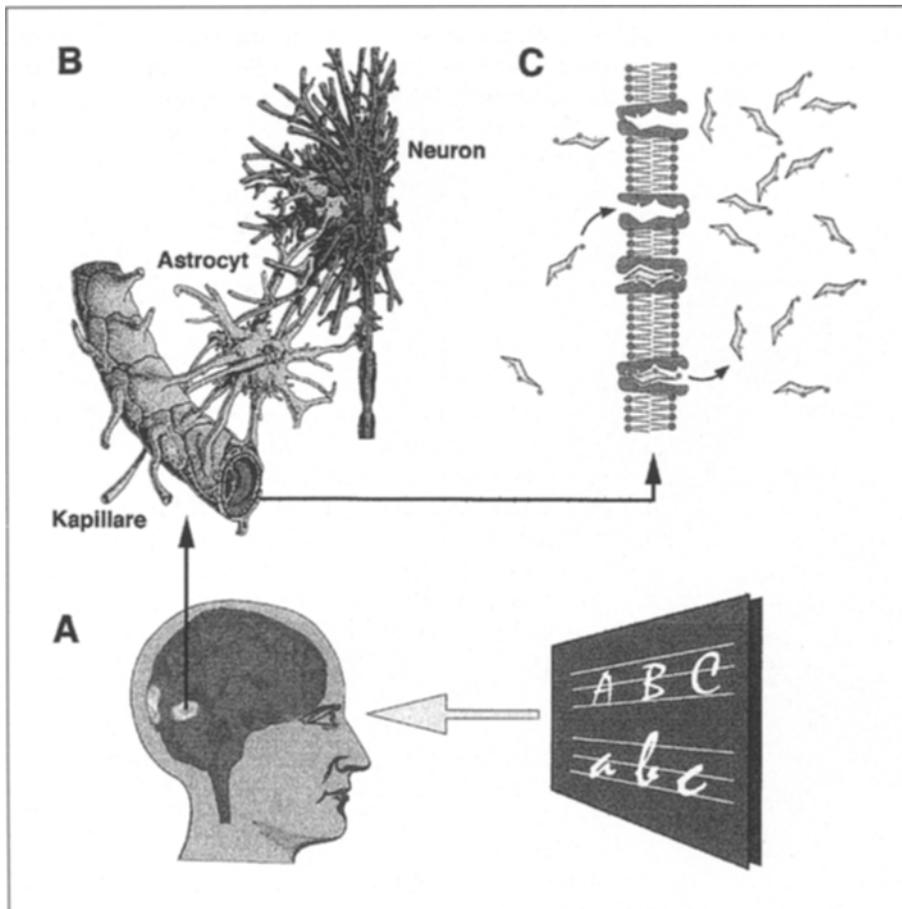


Fig. 1. A) Beim Lesen kommt es in den Bereichen des visuellen Cortex und im visuellen Assoziationsfeld zu einer im Vergleich zum umgebenden Hirngewebe vermehrten Aufnahme an Glucose. B) Die schnelle und gezielte Versorgung der betroffenen Neuronen (rechts oben) mit dem Metaboliten erfolgt über ein Netz von Hirnkapillaren (links unten), die abluminal fast vollständig mit den Endfüßchen der Astrozyten (Mitte) bedeckt sind. C) In der Membran der Endothelzelle ermöglicht ein „Carrier“, der Glucosetransporter GLUT 1, den Durchtritt des hydrophilen Moleküls durch erleichterte Diffusion

Anatomie der Blut-Hirn-Schranke

Die Entdeckung der Blut-Hirn-Schranke geht auf den Pharmakologen und Physiologen Paul Ehrlich zurück [1]. 1885 beobachtete Ehrlich, daß sich bei Versuchstieren, denen er intravenös Farbstoffe wie Trypanblau verabreichte, alle Gewebe mit Ausnahme des Gehirns und des Rückenmarks anfärbten. Ehrlichs Schüler Edwin E. Goldmann zeigte dann 1913 durch Gewebeschnitte, daß dabei nicht alle Bereiche des Zentralnervensystems ungefärbt blieben [2]. Im umgekehrten Experiment, bei Injektion der Farbstofflösung in den subarachnoidalen Raum, fand er Teile des Gehirns gefärbt, andere Gewebe hingegen nicht. Er schloß daraus, daß die cerebralen Kapillaren den Farbstoff zurückhalten, ohne jedoch weitere Erklärungen für dieses Phänomen geben zu können.

Erst die Entwicklung spezieller elektronenmikroskopischer Techniken ermöglichte Ende der 60er Jahre den Nachweis, daß intravenös injizierte Mikroperoxidase nur von der dünnen Endothelzellschicht am Austritt aus der Blutbahn gehindert wurde [3]. Das Endothel der cerebralen Mikrokapillaren wurde damit als zelluläre Grundlage der physiologischen Blut-Hirn-Schranke identifiziert. Es unterscheidet sich morphologisch auffällig von dem anderer Organe (Fig. 2). Die dünne Endothelzellschicht, die die Gefäßwände auskleidet, ist hier durch feste Zell-Zell-Kontakte („tight junctions“) verknüpft. Fenestrierungen fehlen völlig, und

die Zahl pinocytotischer Vesikel, morphologische Kennzeichen für parazellulären Transport, ist stark herabgesetzt. Dagegen läßt die hohe Dichte von Mitochondrien im dünnen Plasmaraum der Zellen eine hohe Stoffwechselaktivität erwarten.

Beide Membranen der Zelle, die luminale (dem Innenraum der Kapillare zugewandt) und die abluminale (dem Interstitium zugewandt), unterscheiden sich auffallend in ihrer enzymatischen Ausstattung.

Im schematischen Querschnitt (Fig. 2) durch eine Hirnkapillare ist ein weiterer, abluminal auf der Endothelzelle sitzender Zelltyp, ein Perizyt, dargestellt. Die Perizyten bedecken ca. 20% der Kapillaroberfläche und befinden sich vorzugsweise an den Kontaktstellen zweier Endothelzellen [4, 5]. Die genaue Funktion dieses Zelltyps an der Blut-Hirn-Schranke ist noch nicht geklärt.

Wegen des hohen Anteils an kontraktile Proteinen wurden den Perizyten Blutdruck regulierende Eigenschaften zugeschrieben, da sie mittels ihrer Fortsätze Einfluß auf den Kapillardurchmesser nehmen könnten [6]. Allerdings gibt es Hinweise, daß eine Dilatation der Kapillaren zur Kontrolle der Durchblutung nicht oder nur in begrenztem Maße stattfindet [7]. Andere Autoren wiederum sprechen den Perizyten eine mögliche Funktion in der mechanischen Stabilisierung der Hirnkapillaren zu [8]. Eine Hauptaufgabe dieses Zelltyps mag die Phagozytose von Molekülen sein, die die Endothelzellschicht bereits passiert haben. Perizyten

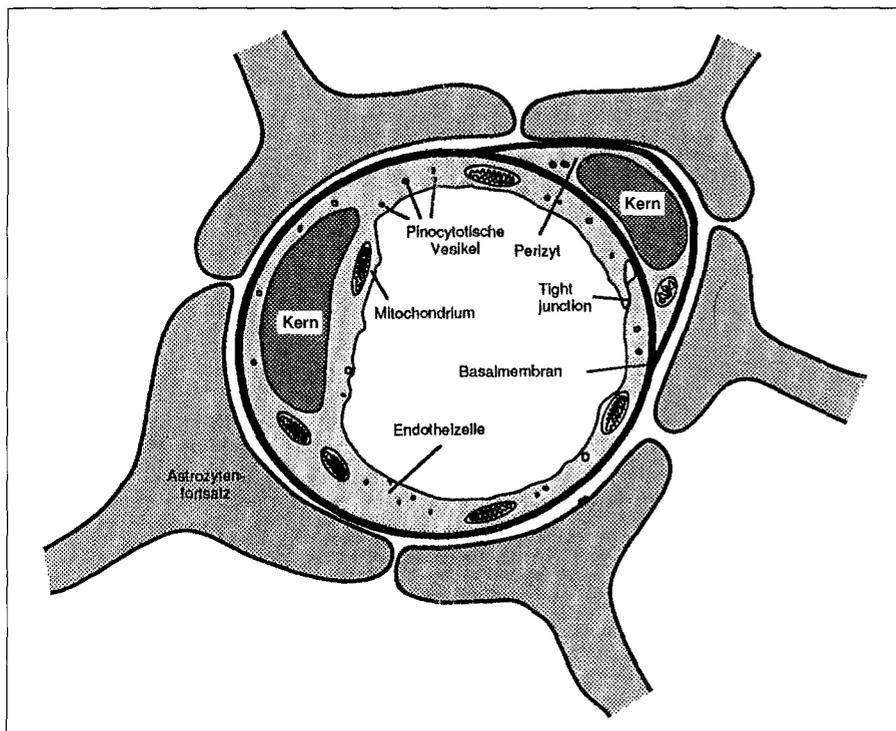


Fig. 2. Schematischer Querschnitt durch eine Hirnkapillare. Das gesamte Lumen der Kapillare wird von einer einzigen Endothelzelle begrenzt. Morphologische Charakteristika sind die festen Zell-Zell-Kontakte („tight junctions“) sowie die geringe Anzahl pinocytotischer Vesikel. Mitochondrien dagegen, die „Kraftwerke“ der Zellen, sind zahlreich vorhanden. Sie liefern die Energie für viele Transportprozesse (aus Goldstein, G. W., Betz, A. L.: „Die Blut-Hirn-Schranke“, Spektrum der Wissenschaft II, 1986)

werden daher im Zusammenhang mit einer „second line of defense“ – einer zweiten Abwehrfront – genannt [9].

Beide Zelltypen, Endothelzellen und Perizyten, sind eingebettet in eine Basalmembran. Das so gebildete Kapillarrohr ist abluminal fast vollständig bedeckt von den Endfüßchen der Astrozyten. Diese Zellen bilden ein dreidimensionales Netzwerk (Fig. 1 B), versorgen Neuronen mit Nährstoffen und regulieren die extrazelluläre Ionenkonzentration [5]. Astrozyten erfüllen bei höheren Vertebraten selbst keine Schrankenfunktion, allerdings induzieren sie diese Eigenschaften in den benachbarten Endothelzellen [10]. Transplantationsversuche mit Hirnkapillaren zeigen, daß diese in peripheren Organen einen Phänotyp wie „gewöhnliche“ Kapillaren annehmen, im umgekehrten Experiment zeigten Kapillaren aus der Peripherie im Zentralnervensystem nach kurzer Zeit Blut-Hirn-Schranke-Charakteristika [11].

Funktionell bedeutet die Dichtigkeit des cerebralen Kapillarendothels eine fast vollständige Impermeabilität für Elektrolyte, was sich in einem hohen spezifischen Widerstand von etwa $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ausdrückt [12]. Die Zell-Zell-Verbindungen sind außerdem undurchlässig für Proteine wie Albumin und Peroxidase. Hydrophobe Substanzen, z. B. Rauschgifte wie Heroin, aber auch lipophile Vitamine können dagegen weitgehend ungehindert durch die Endothelzellschicht diffundieren.

Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke

Das Penetrationsvermögen lipophiler bzw. hydrophober, kleiner Moleküle durch die Blut-Hirn-Schranke geht einher mit einer Lipophilie, gemessen durch den Öl/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Eine hydrophobe Substanz passiert dabei zunächst die luminalen Lipid-Plasmamembran, durchquert die Endothelzelle und tritt durch die abluminale Membran in die Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns ein. Wie bei der freien Diffusion von Sauerstoff und Kohlendioxid bestimmt allein der Konzentrationsgradient zwischen Blut und Gehirn den Austausch. Dagegen ist das Eindringen einiger kleiner, hydrophiler Moleküle höher, als der entsprechende Öl/Wasser-Verteilungskoeffizient erwarten ließe [13]. Für Moleküle wie D-Glucose und L-DOPA existieren in den Membranen der Endothelzelle spezifische Transportproteine (Carrier). Große Moleküle, Peptide und Proteine, werden durch rezeptorvermittelte Transzytose transportiert.

Spezifische Transportsysteme sind für eine Reihe von Nährstoffen und Hormonen beschrieben. D-Glucose und einige strukturanaloge Kohlenhydrate gelangen

durch das Glucose-Transportprotein GLUT-1 mittels erleichterter Diffusion in das Gehirn [14, 15]. Treibende Kraft bei diesem energieunabhängigen Prozeß ist allein das Konzentrationsgefälle. Der Glucose-Transporter, ein Protein von 45 kDa, ist daher in hoher Konzentration in beiden Membranen der Endothelzelle enthalten.

Für Aminosäuren sind fünf Transportsysteme an der Blut-Hirn-Schranke bekannt. Auf beiden Membranen ist das Transportsystem für große neutrale Aminosäuren (L-System) vorhanden, das die für die Neurotransmitter-Synthese essentiellen aromatischen Aminosäuren transportiert [16]. Die biochemische Polarität der Endothelzelle, d. h. die unterschiedliche Ausstattung der luminalen und der abluminalen Membran mit Proteinen zeigt sich bei der Betrachtung eines weiteren Aminosäuretransportsystems für kleine neutrale Aminosäuren. Das Na^+ -abhängige A-System befindet sich ausschließlich in der abluminalen Membran und befördert dort Glycin, das im Gehirn als Neurotransmitter dient, vom Interstitium in die Endothelzelle.

Daneben existieren Transportsysteme für saure und basische sowie für kationische Aminosäuren, Monocarbonsäuren, Amine und Nukleoside [17]. Die in der abluminalen Membran nachgewiesene Na^+/K^+ -ATPase und andere, noch nicht näher beschriebene Ionenkanäle dienen der Aufrechterhaltung der Ionenkonzentration im Cytoplasma der Endothelzelle und der interstitiellen Flüssigkeit.

Große Moleküle wie das Eisen-Transportprotein Transferrin gelangen über rezeptorvermittelte Transzytose in die Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns [18]. Rezeptoren an der luminalen Membran der Zelle bewirken dabei zunächst die spezifische Bindung des Liganden. Der nun beladene Rezeptor wird internalisiert und in „pits“ auf die gegenüberliegende Membran übergeführt. Für den LDL-Rezeptor (Low-Density Lipoprotein) gilt dieser Mechanismus als gesichert [19]. Ein analoger Mechanismus wurde für Insulin gezeigt [20]. Möglicherweise handelt es sich bei der rezeptorgekoppelten Transzytose um einen generellen Mechanismus zum Transport von Polypeptidhormonen und Cytokinen über die Blut-Hirn-Schranke.

In Endothelzellen kapillärer Blutgefäße mit Schrankenfunktion wie der BHS wurde außerdem das sogenannte P-Glykoprotein, ein kanalbildendes Transmembranprotein mit intrazellulärer ATP-Bindestelle nachgewiesen [21]. Diese Proteine wurden erstmals im Zusammenhang mit der sogenannten „multi drug resistance“ – einer Unempfindlichkeit gegenüber chemotherapeutischen Reagenzien – von Tumorzellen beschrieben. Sie sind für die Ausschleusung zahlreicher strukturell nicht verwandter Verbindungen aus der Zelle verantwortlich. Das Vorkommen dieses Transportproteins an der BHS läßt auf einen retrograden Trans-

port von Substanzen schließen, die die Endothelzellmembran aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit bereits passiert haben. Tatsächlich zeigen P-Glykoprotein-defiziente Mäuse gegenüber Vergleichstieren nach Verabreichung von Pestiziden und Karzinostatika eine erhöhte Konzentration und eine verminderte Elimination dieser Stoffe besonders im Gehirn [22].

Die oben beschriebene Polarität der Endothelzelle ist nicht allein auf Transportproteine beschränkt, asymmetrische Verteilungen an den Membranen zeigen auch andere Proteine wie die Alkalische Phosphatase und die Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT) [23]. Das letztgenannte Enzym gehört wie der Glucosetransporter und der Transferrinrezeptor zu den Blut-Hirn-Schranke-Markern. Es handelt sich dabei um Proteine, die für die cerebralen Kapillaren spezifisch sind, d.h. sie treten unabhängig von dem sonstigen Vorkommen im Organismus nur in den Hirnkapillaren auf und unterscheiden diese damit von anderen Kapillaren.

Die metabolische Blut-Hirn-Schranke

Neben ihrer spezifischen Morphologie und dem Vorhandensein selektiver Transportmechanismen verfügen die Zellen in den Hirnkapillaren über enzymatische Systeme zur Erhaltung der Homöostase. Diese Enzyme verhindern z. B. das unspezifische Eindringen von Substanzen, die als Neurotransmitter dienen und daher nicht unkontrolliert in das Gehirn gelangen dürfen. Enzyme, die diese enzymatische Barriere ausbilden, sind z. B. die Monoaminoxidase, Catechol-O-methyltransferase, Cholinacetyltransferase und die Cholinesterase.

L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa), ein Zwischenprodukt des Tyrosinstoffwechsels, bindet wie Phenylalanin und Tryptophan an ein Transportsystem für große neutrale Aminosäuren und gelangt so in die Endothelzelle. Um den Weitertransport über die abluminale Membran der Zelle in das Gehirn zu verhindern, wird diese Substanz durch Decarboxylierung zu Dopamin und durch die Katalyse der Monoaminoxidase zur Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) umgesetzt [24]. Das Katecholamin Dopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter und im Zentralnervensystem die Muttersubstanz von Noradrenalin und Adrenalin. Zwar kann Dopamin das Gehirn über ein eigenes Transportsystem verlassen, doch weder Dopamin noch DOPAC können die abluminale Membran in Richtung Gehirn passieren.

Die natürliche Konzentration von L-Dopa im Blutstrom ist ca. 30 nM. Das enzymatische Schutzsystem der Blut-Hirn-Schranke ist wirksam bis zu L-Do-

pa-Konzentrationen von ca. 1 μ M, darüber ist das System gesättigt, und L-Dopa kann aus dem Blutstrom in das Hirngewebe gelangen. Diese Sättigungserscheinung ist von medizinischem Interesse und wird z. B. bei der Behandlung der Parkinsonschen Krankheit mit hohen Dosen an L-Dopa ausgenutzt. Bei dieser Krankheit, die durch einen Dopaminmangel im Gehirn verursacht wird, kann die hohe Dosierung jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sein. Strukturverwandte Stoffe wie Carbidopa oder Benserazid inhibieren die Decarboxylase und schränken damit die Metabolisierung des Medikamentes L-Dopa in den Hirnkapillaren stark ein. Damit vermindert sich die Dosis, und die Nebenwirkungen werden drastisch reduziert.

Pharmakologische Aspekte: Strategien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke, die das Zentralnervensystem einerseits vor Schwankungen der Konzentration von im Blutplasma gelösten Metaboliten und dem Eindringen körperfremder Substanzen schützt, verhindert andererseits oftmals die Aufnahme von Arzneistoffen in pharmakologisch relevanten Konzentrationen. Viele cerebrale Erkrankungen einschließlich Mikroangiopathien, Infektionen und Tumoren werden dadurch der Therapie entzogen. Um auf die Zellen des Zentralnervensystems einwirken zu können, muß ein Pharmakon die Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns erreichen. In welchem Ausmaß dies gelingt, hängt von einer Reihe miteinander verknüpfter Faktoren ab. So darf das Medikament keinem enzymatischen Abbau im Blutplasma unterliegen, muß in nicht-ionisierter Form in Lösung bleiben und darf nicht an Plasmaproteine binden. Beschränkt man sich aber ausschließlich auf Pharmaka, die bereits gelöst im Blutplasma vorliegen, und auf die Faktoren, die direkt mit der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in Verbindung stehen, so sind für die Arzneimittelversorgung des Gehirns drei Methoden gebräuchlich [25] (Tabelle 1).

Tabelle 1. Strategien für die Arzneimittelversorgung des Gehirns

Invasive Methoden	– Intraventriculäre Infusion – Intracarotoidale Infusion von hypertonen Medien
Pharmakologische Methoden	– Lipidlösliche „Vorläufersubstanzen“ – „Chemisches Liefersystem“ CDS
Physiologische Methoden	– Chimäre Nährstoffe – Chimäre Peptide

Bei der intraventriculären Infusion wird das Pharmakon direkt in die Ventrikel des Gehirns injiziert. Diese Methode ist vergleichbar mit der häufiger angewandten Lumbalpunktion zur Schmerzlinderung oder Anästhesie, hat aber den Nachteil, daß das Medikament über die Cerebrospinalflüssigkeit an seinen Wirkort gelangen muß und durch deren Austausch über die Arachnoidea bald wieder dem Gehirn entzogen wird. Die Verabreichung des Medikaments mittels Injektion in die Carotis interna (Halsschlagader), die das Gehirn mit Blut versorgt, ermöglicht ein Eindringen direkt über die Blut-Hirn-Schranke. Dabei kommen meist hypertotonische Medien als Lösungsmittel für das Medikament zum Einsatz, die die Blut-Hirn-Schranke reversibel öffnen. Diese reversible Öffnung ist besonders bei der Behandlung von inoperablen Tumoren im Gehirn von Bedeutung. Durch die Endothelzellbarriere können zur Behandlung eingesetzte Cytostatika sonst nicht in ausreichender Konzentration an ihren Wirkort gelangen.

Die Entwicklung lipidlöslicher „Vorläufermedikamente“ (engl. pro-drugs) aus wasserlöslichen Arzneimitteln ist eine Alternative [26]. Um polare Gruppen wie Hydroxyl-, Carboxyl- und Aminogruppen zu modifizieren, werden oftmals Ester oder Amide dieser Verbindungen hergestellt. Durch diese Modifikationen wird die Lipidlöslichkeit und damit die Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität des Pharmakons erhöht. Im Gehirn erfolgt die Hydrolyse der Lipophilie-vermittelnden Gruppe und damit die Freisetzung der aktiven Wirksubstanz. Für einfache Vorläufermedikamente gelten aber eine Reihe von Einschränkungen. Durch die gestiegene Lipophilie ist auch die Aufnahme in andere Gewebe erhöht. Diese wenig selektive Resorption des Medikamentes kann besonders bei cytotoxischen Agenzien große Schäden im betroffenen Gewebe anrichten [27]. Durch die erhöhte Lipophilie ist das Wiederausströmen der Substanz ebenfalls erhöht, was sich in einer kurzen Verweildauer und damit in einer verkürzten biologischen Aktion äußert. Zudem werden Methyl- oder Ethylester noch vor Erreichen der Blut-Hirn-Schranke im Blut hydrolysiert, Hexyl- oder Octyl-derivate dagegen an Plasmaproteine gebunden und dadurch dem möglichen Transport durch das Endothel entzogen. Nur wenige Vorläufermedikamente, darunter verschiedene Ester des Chlorambucils, das sich wegen seiner geringen Neurotoxizität zur Behandlung von Hirntumoren eignet, haben sich bisher als brauchbar erwiesen.

Durch „chemische Liefersysteme“ (engl.: „Chemical Delivery Systems“, CDS) wurden die oben beschriebenen Nachteile umgangen. CDS ist definiert als ein biologisch inertes Molekül, bei dem mehrere Schritte erforderlich sind, um es in die therapeutisch wirksame Substanz zu konvertieren, und das ver-

stärkt in ein bestimmtes Zielgewebe aufgenommen wird [28].

Die Aufnahme von wasserlöslichen, essentiellen Nährstoffen wie D-Glucose und L-Aminosäuren durch die mikrovaskulären, cerebralen Endothelzellen wird durch stereospezifische Transportsysteme gewährleistet. Therapeutische Relevanz erlangte bisher das L-System, das große, neutrale Aminosäuren transportiert und auch das Parkinson-Medikament L-Dopa und verschiedene Abkömmlinge wie α -Methyl-L-Dopa („chimäre Nährstoffe“) akzeptiert.

Der Rezeptor-gekoppelte Transport einiger Peptide und Proteine durch die Blut-Hirn-Schranke ist ein normaler physiologischer Prozeß und führte zur Entwicklung von chimären Peptiden [29]. Hier gewinnt die Kopplung an monoklonale Antikörper gegen Transcytose-Rezeptoren (Transferrin, Insulin) an Bedeutung [30, 31].

Bei akuten und chronischen pathologischen Prozessen wurde außerdem die Einwanderung von aktivierten T-Lymphozyten in das Gehirnparenchym gezeigt [32]. Möglicherweise eröffnet dies neue Möglichkeiten für die Behandlung solcher Erkrankungen.

Bei allen hier vorgestellten Strategien haben bislang nur wenige Systeme die klinische Anwendung am Patienten erreicht. Dennoch sind einige Konzepte vielversprechend, und mit wachsendem Verständnis der molekularen Zellphysiologie der Hirnkapillar-Endothelzelle werden neue Einsichten in die Wirkung von Pharmaka auf die Blut-Hirn-Schranke und den Transport durch diese Barriere möglich werden.

Molekulare Blut-Hirn-Schranken-Forschung

Viele Fragen in bezug auf den Stoffübertritt durch das Gefäß-Endothel und den dabei wirksamen Regulationsmechanismen konnten noch nicht beantwortet werden, da In-vivo-Experimenten enge Grenzen gesetzt sind. Daher stehen In-vitro-Modelle der Blut-Hirn-Schranke, z. B. Kulturen intakter cerebraler Endothelien, zur Zeit im Mittelpunkt des Interesses. Diese Endothelzellkulturen sind jedoch trotz der großen Fortschritte in der Zellbiologie mit großer Zurückhaltung zu beurteilen. So verlieren Primärkulturen dieser Zellen bereits nach wenigen Tagen Kultivierungsdauer viele Blut-Hirn-Schranke-Charakteristika [33]. Konfluente Monolayer primärer Endothelzellkulturen zeigen nach fünf bis sechs Tagen Kultivierungsdauer nur noch ein Zehntel des Anfangswertes der Enzymaktivität des Blut-Hirn-Schranken-Markers GGT [34, 35]. Die Ausbildung von komplexen „tight junctions“ unterbleibt und der in vivo gemessene hohe spezifische

elektrische Widerstand von $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ wird in Zellkulturen auf etwa $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ reduziert [36]. Diese Dedifferenzierung wird auf das Fehlen des induzierenden Signals der Astrocyten, die in vivo in engem Kontakt mit dem Gefäß-Endothel stehen, zurückgeführt. Eine realistische Beschreibung der Blut-Hirn-Schranke-Charakteristika in vivo kann nur durch die Cokultur von Neuronen, Astrocyten und Endothelien erreicht werden. Selbst dann kann die Dedifferenzierung nur einer Zellspezies zum Verlust der Blut-Hirn-Schranke-Eigenschaften führen. Immunologische Ansätze und molekularbiologische Verfahren eröffnen neue Wege zur Erforschung der komplexen Zusammenhänge an der Blut-Hirn-Schranke. Beide Strategien werden zur Zeit in der Arbeitsgruppe der Autoren verfolgt und sollen hier vorgestellt werden.

Strategien bei der Suche nach Hirnkapillar-spezifischen Proteinen

Die spezifischen Eigenschaften eines bestimmten Zell- oder Gewebetyps werden vor allem von seiner individuellen Proteinausstattung bestimmt. Diese wiederum hängt davon ab, welche Gene in Boten-RNA umgeschrieben und nachfolgend in Protein übersetzt werden. Die molekulare Struktur der meisten BHS-assoziierten Proteine wie die vieler Transportproteine oder auch der tight junctions ist noch immer ungeklärt. Wegen der Limitierung des zur Verfügung stehenden Materials ist eine Reinigung BHS-spezifischer Proteine experimentell extrem schwierig. Sucht man aber nach ebensolchen Proteinen, die in Zusammenhang mit BHS-Eigenschaften stehen, kann die unterschiedliche Ausstattung verwandter Zell- oder Gewebetypen an Boten-RNA bzw. Protein zur Entwicklung einer Suchstrategie genutzt werden.

Immunologische Ansätze

Zur Identifizierung BHS-assoziiierter Proteine wurde häufig ein immunologischer Ansatz gewählt. Die experimentelle Strategie dabei ist, mono- oder polyklonale Antiseren zu gewinnen, die Antigene auf der Oberfläche von Hirnkapillar-Endothelzellen erkennen. Durch Vergleich mit Endothelzellen anderer Organe wurde die Spezifität solcher Antiseren überprüft. Als Antigene zur Gewinnung der entsprechenden Antiseren wurden eine große Auswahl biologischen Materials eingesetzt, von Homogenat aus Hirn bzw. Retina über isolierte Hirnkapillaren und isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen bis hin zu angereicherten Membranfraktionen aus Hirnkapillaren und Hirnkapillar-Endothelzellen. In einer Reihe von Arbeitsgruppen wurde ein solches Verfahren bereits mit Erfolg durchgeführt. Eines

der am besten untersuchten Antigene ist HT7 [37]. Es wird in Kapillaren der grauen und weißen Substanz ebenso gefunden wie in Kapillaren des Kleinhirns und des Rückenmarks. Trotz intensiver Untersuchungen ist die Funktion des Proteins noch immer ungeklärt. Eine ganze Reihe weiterer Antigene wurde bisher auf diesem Wege ermittelt. Eine genaue funktionelle Charakterisierung steht jedoch in allen Fällen noch aus.

Molekulargenetische Ansätze

In der Arbeitsgruppe der Autoren wurde mit Hilfe der Gentechnik versucht, Hirnkapillar-spezifisch transkribierte Gene zu finden. Ausgehend von der Annahme, daß sich die Proteinausstattung unterschiedlich spezialisierter Zellen in einer unterschiedlichen Ausstattung an Boten-RNA zeigt, wurde eine subtraktive Klonierung spezifischer Transkripte durchgeführt (Fig. 3). Dazu wurde Boten-RNA aus Hirnkapillar-Endothelzellen isoliert und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einzelsträngige, basenkomplementäre cDNA umgeschrieben. Aus einem Vergleichsgewebe isolierte RNA wurde dann im Überschuß mit der cDNA hybridisiert. Dabei kommt es zur Ausbildung von Doppelsträngen durch Basenpaarung zwischen der einzelsträngigen Boten-RNA und der einzelsträngigen basenkomplementären cDNA. cDNA-Moleküle aus den Hirnkapillar-Endothelzellen, deren entsprechende Transkripte im Vergleichsgewebe nicht vorkommen, können wegen des Fehlens eines basenkomplementären Partners keinen Doppelstrang bilden und verbleiben einzelsträngig in der Lösung. Einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren wurden durch Chromatographie an Hydroxylapatit getrennt. Bei den verbliebenen einzelsträngigen cDNA-Molekülen wurden vor allem die angereichert, die spezifisch für Hirnkapillar-Endothelzellen sind. Diese wurden kloniert (Fig. 3) und stehen dann als subtraktive cDNA-Bank für weitere Untersuchungen, z.B. Sequenzanalysen, zur Verfügung. Auf diese Weise gelang es, sowohl die mRNA für den Glucosetransporter vom Typ I (Glut-1) als auch eine mRNA für das Apolipoprotein A1 (ApoA1) in Hirnkapillar-Endothelzellen nachzuweisen [15, 38]. Zwar war das Vorkommen eines Glucosetransporters in Hirnkapillaren schon bekannt, daß es sich aber um den Typ I handelt, konnte durch unsere Arbeiten gezeigt werden. Die Expression von ApoA1 in Hirnkapillar-Endothelzellen könnte auf eine gewisse Eigenständigkeit des Gehirns in Bezug auf seinen Lipidstoffwechsel hinweisen. Zur Zeit werden in unserer Gruppe weitere Gene untersucht, die zum Teil hochspezifisch in Hirnkapillaren transkribiert werden. Die Aufklärung ihrer Struktur und Funktion könnte dann noch weitere Einblicke in die Funktion der Blut-Hirn-Schranke gewähren.

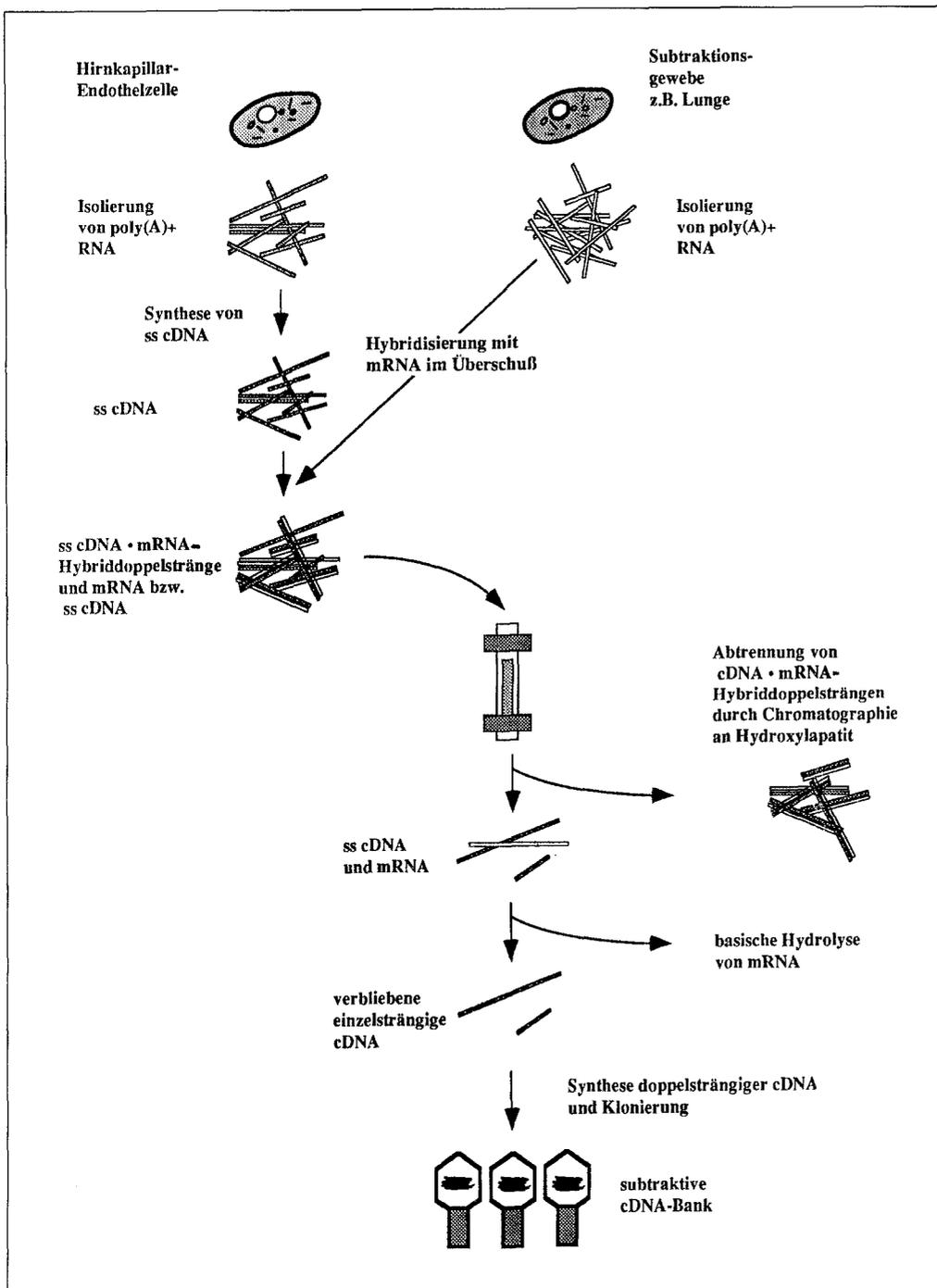


Fig. 3. Anlage einer subtraktiven cDNA-Bank. Ausgehend von zwei nahe verwandten Gewebe- oder Zelltypen wird die jeweilige Boten-RNA (mRNA) isoliert. Die Boten-RNA aus dem experimentellen Gewebe wird in einzelsträngige (single stranded, ss) cDNA umgeschrieben. Nach Hybridisierung zwischen dieser cDNA und der basenkomplementären mRNA aus dem Vergleichsgewebe bilden sich zwischen Nucleinsäuren, die in beiden Geweben vorkommen, durch Basenpaarung Hybrid-doppelstränge aus (subtraktive Hybridisierung). Die doppelsträngigen mRNA · cDNA-Hybride werden durch Chromatographie an Hydroxylapatit aus der Lösung entfernt. Die einzelsträngig verbliebene cDNA enthält nun einen erhöhten Anteil an spezifischen, nur im experimentellen Gewebe vorkommenden Molekülen. Diese werden kloniert und stehen in Form einer subtraktiven cDNA-Genbank für weitere Untersuchungen zur Verfügung

Die funktionelle Analyse: Gamma-Glutamyl-transpeptidase-gekoppelte Stoffwechselwege

Eine weitere Strategie zur Klärung einzelner Stoffwechselwege an der BHS wird im Zusammenhang mit der Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT) verfolgt. Dieses Enzym wurde oben bereits als Blut-Hirnschranken-Marker vorgestellt. Arbeiten zur subzellulären Lokalisation des Enzyms in Hirnkapillar-Endothelzellen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Während Ghandour et al. [39] das Enzym als luminal lokalisiert beschrieben, fanden wir [40] die GGT auf der abluminalen Seite. Zusätzlich wurde die GGT auf der Membran der Perizyten nachgewiesen, was von Risau et al. [41] bestätigt wurde. Die eigentliche Funktion des Enzyms in der Membran dieser Zellen ist noch unklar.

In Leber und Niere ist die GGT über den Gamma-Glutamyl-Zyklus am Aminosäuretransport bzw. Gluta-

thionstoffwechsel beteiligt und über den Mercaptursäureweg sowie den Leukotrienstoffwechsel in Entgiftungsprozesse involviert.

Zur funktionellen Analyse des Enzyms an der BHS wurde von uns ein weiteres Enzym, im Falle der Entgiftungswege die N-Acetyl-S-Transferase, ausgewählt. Das mikrosomale Enzym katalysiert den letzten Schritt im Mercaptursäureweg, die N-Acetylierung eines Cystein-S-Konjugates. Nach unserer Vorstellung könnte auf diese Weise ein lipophiles Xenobiotikum (X), das durch die Endothelzellmembran diffundiert, durch die in Astrozyten vorkommende Glutathion-S-Transferase zum Glutathion-S-Konjugat umgesetzt werden (Fig. 4). Die abluminal lokalisierte GGT sorgt

dann für die Abspaltung des Gamma-Glutamylrestes, eine Dipeptidase hydrolysiert die Verbindung zum Cystein-S-Konjugat. Den letzten Schritt, die N-Acetylierung und damit die Umsetzung zur mindergiftigen Mercaptursäure, katalysiert schließlich die von uns untersuchte N-Acetyl-S-Transferase.

Auf der Basis dieses Modells wurde zunächst die Aktivität der N-Acetyl-S-Transferase in Hirnkapillaren und cerebralen Endothelzellen nachgewiesen. Nach Isolierung des Enzyms aus Niere erhielten wir ein spezifisches Antiserum. Immunhistologische Untersuchungen an Gewebeschnitten deuten bisher auf ein Vorkommen des Enzyms in Hirnkapillaren hin. Die subzelluläre Lokalisation steht noch aus. Sie soll zeigen, ob den Perizyten auch hier eine Sonderrolle in bezug auf die Entgiftung an der BHS im Zusammenhang mit einer zweiten Abwehrfront zukommt.

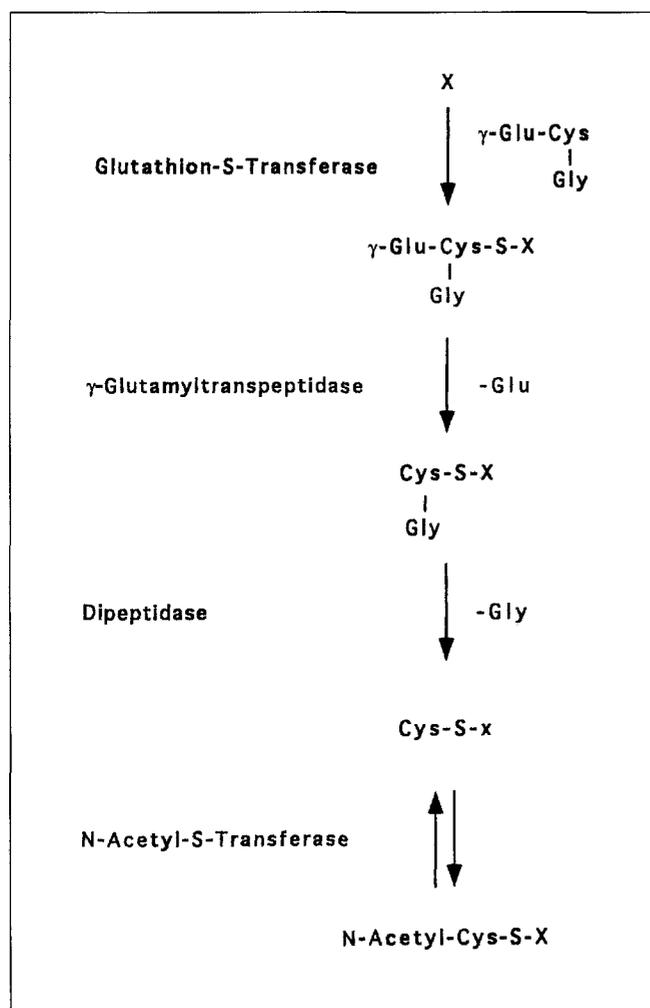


Fig. 4. Der Mercaptursäureweg der Entgiftung. Ein lipophiles Xenobiotikum (X) wird zunächst durch die Glutathion-S-Transferase (GST) mit Glutathion konjugiert. Die Gammaglutamyl-Transpeptidase und eine Dipeptidase setzen das Produkt zum Cystein-S-Konjugat um. Der letzte Schritt des Stoffwechselweges, die N-Acetylierung unter Bildung einer mindergiftigen Mercaptursäure, wird durch die Cystein-S-Konjugat spezifische N-Acetyl-S-Transferase katalysiert

Schlußbemerkungen

Molekularbiologische Arbeiten im System Säugerhirn üben eine eigenartige Faszination aus. Informationsspeicherung, Informationsverarbeitung sowie schließlich das Entstehen von Bewußtsein sind Themen, zu deren Lösung es noch keinen theoretischen Ansatz gibt. Jeder, der am System Gehirn arbeitet, wird diese Aspekte aber im Blickwinkel haben. Wir haben uns eine andere Aufgabe gestellt: beizutragen zum molekularen Verständnis der einzigartigen Mikrozirkulation im Gehirn. Zum einen aus schierer Neugierde, zum anderen auch, um zur Lösung wichtiger medizinischer und sozialer Fragen einen Beitrag zu leisten.

1. Ehrlich, P., in: Eine farbanalytische Studie: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus, S. 69. Berlin: Hirschwaldt 1885
2. Goldmann, E.E.: Abh. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Math. Kl. I, 1 (1913)
3. Reese, T.S., Karnovsky, M.J.: J. Cell. Biol. 34, 07 (1967)
4. D'Amore, P.A., in: Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research: Culture and Study of Pericytes, p. 299 (H.M. Piper, ed.). Berlin: Springer 1990
5. Abbott, N.J.: Nature 325, 195 (1987)
6. Hermann, I.M., D'Amore, P.A.: J. Cell. Biol. 101, 43 (1985)
7. Villringer, A., Them, A., Lindauer, U., Einhaupl, K., Dirnagel, U.: Circ. Res. 75, 55 (1994)
8. Ehler, E., Karlhuber, G., Bauer, H.C., Draeger, A.: Cell. Tissue Res. 279, 393 (1995)
9. Krause, D., Kunz, J., Dermietzel, R.: Adv. Exp. Med. Biol. 331, 149 (1993)
10. Neuhaus, J., Risau, W., Wolburg, H.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 633, 578 (1991)
11. Stewart, P.A., Wiley, M.J.: Dev. Biol. 84, 183 (1981)
12. Crone, C., Olesen, S.P.: Brain Res. 241, 415 (1982)
13. Betz, A., Goldstein, G.W.: Annu. Rev. Physiol. 48, 241 (1986)
14. Crone, C.: J. Physiol. London 181, 103 (1965)
15. Weiler-Güttler, H., Zinke, H., Möckel, B., Frey, A., Gassen, H.G.: Biol. Chem. Hoppe-Seyler 370, 467 (1989)

16. Del Pino, M.M.S., Hawkins, R.A., Peterson, D.R.: *J. Biol. Chem.* 267, 25951 (1992)
17. Bradbury, M.W.B.: *Exp. Physiol.* 78, 453 (1993)
18. Roberts, R.L., Fine, R.E., Sandra, A.: *J. Cell. Sci.* 104, 521 (1993)
19. Dehouck, B., Dehouck, M.-P., Fruchart, J.-C., Cecchelli, R.: *J. Cell. Biol.* 126(2), 465 (1994)
20. Duffy, K.R., Pardridge, W.M., Rosenfeld, R.G.: *Brain Res.* 42, 32 (1987)
21. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M., Bertino, J.R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86, 695 (1989)
22. Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P.J., Berns, A.J.M., Borst, P.: *Cell* 77, 491 (1994)
23. Vorbrod, A.W.: *Progr. Histochem. Cytochem.* 18(3), 1 (1988)
24. Ghersi-Egea, J.F., Leininger, M.B., Minn, A., Siest, G.: *Prog. Brain Res.* 91, 373 (1992)
25. Pardridge, W.M.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28, 25 (1988)
26. Wermuth, C., in: *Drug Design: Fact or Fantasy*, p. 47 (G. Jolles, K. Wooldridge, eds.). New York: Academic Press 1984
27. Stella, V., Himmelstein, K.: *J. Med. Chem.* 23, 1275 (1980)
28. Bodor, N., Farag, H., Brewster, M.: *Science* 214, 1370 (1981)
29. Pardridge, W.M.: *Endocr. Rev.* 7, 314 (1986)
30. Pardridge, W.M.: *Tibtech.* 12, 239 (1994)
31. Friden, P.M.: *Neurosurgery* 35(2), 294 (1994)
32. Hickey, W.F.: *J. Neurosci. Res.* 28(2), 254 (1991)
33. Fukushima, H., Fujimoto, M., Ide, M.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 612 (1990)
34. Mischeck, U., Meyer, J., Galla, H.J.: *Cell. Tiss. Res.* 256, 221 (1989)
35. Meyer, J., Mischeck, U., Vehyl, M., Henzel, K., Galla, H.J.: *Brain Res.* 514, 305 (1990)
36. Greenwood, J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 633, 426 (1991)
37. Seulberger, H., Unger, C., Albrecht, U., Risau, W.: *ibid.* 633, 611 (1991)
38. Möckel, B., Zinke, H., Flach, R., Weiss, B., Weiler-Güttler, H., Gassen, H.G.: *J. Neurochem.* 62, 788 (1994)
39. Ghandour, M.S., Langley, O.K., Varga, V.: *Neurosci. Lett.* 20, 125 (1980)
40. Frey, A., Meckelein, B., Weiler-Güttler, H., Möckel, B., Flach, R., Gassen, H.G.: *Eur. J. Biochem.* 202, 421 (1991)
41. Risau, W., Dingler, A., Albrecht, U., Dehouck, M.P., Cecchelli, R.: *J. Neurochem.* 58, 667 (1992)