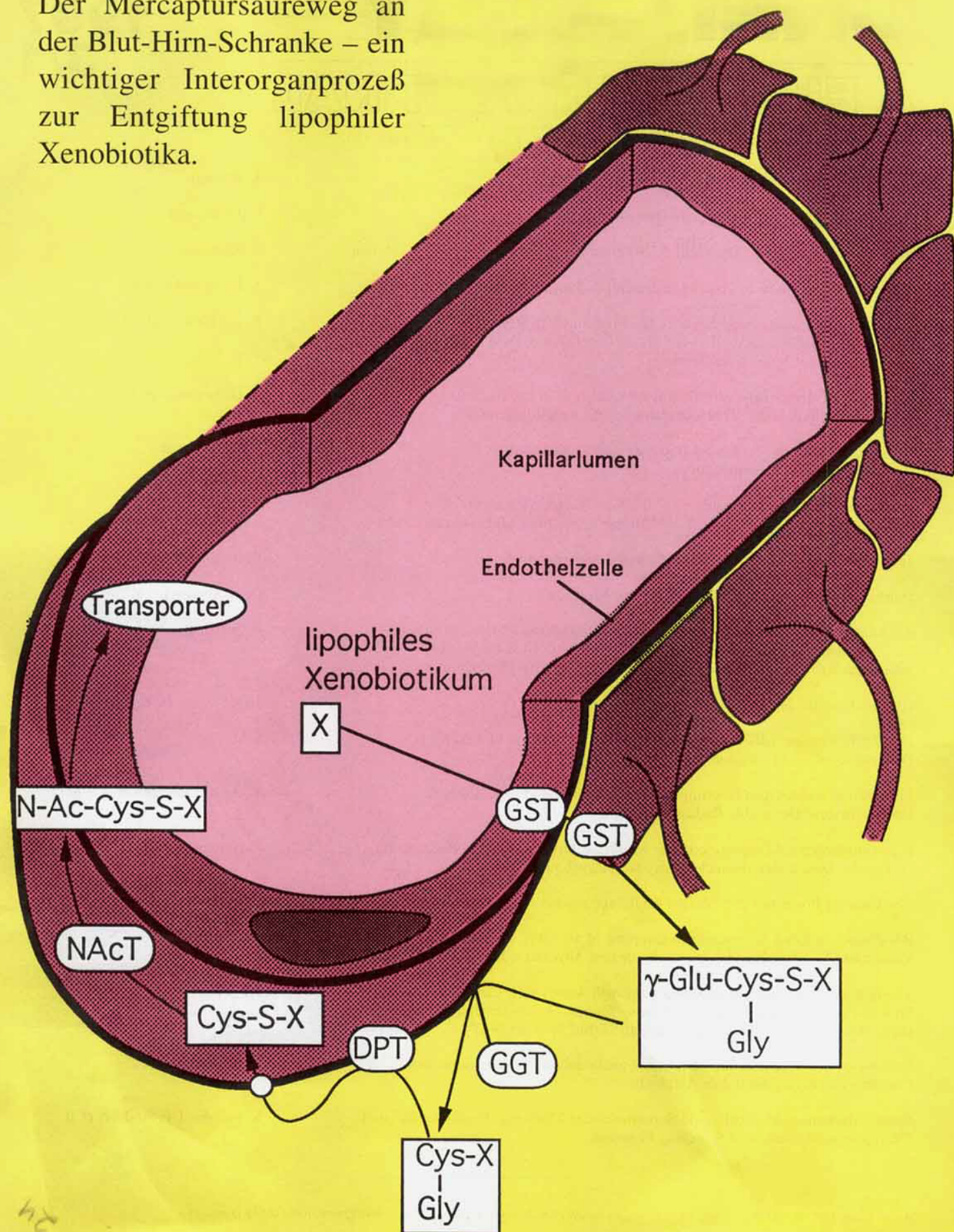


Der Mercaptursäureweg an der Blut-Hirn-Schranke – ein wichtiger Interorganprozeß zur Entgiftung lipophiler Xenobiotika.



Transport und Entgiftung: Grundlagen, Ansätze und Perspektiven für die Erforschung der Blut-Hirn-Schranke**

Achim Aigner, Sabine Wolf und Hans Günter Gassen*

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS), die in den Hirnkapillaren lokalisiert ist, hält als anatomische Barriere die Homöostase im Gehirn aufrecht. Neben den morphologischen Besonderheiten wurde eine Vielzahl spezifischer Proteine und Transportsysteme beschrieben, die die Barrierenfunktion vervollständigen, gleichzeitig aber auch die selektive Versorgung des Gehirns mit Substanzen aus dem Blut gewährleisten. Sie sind unter anderem aus pharmakologischer Sicht interessant. Erst in den letzten Jahren wurde erkannt, daß die Blut-Hirn-

Schranke auch der aktiven Entgiftung (also der Metabolisierung und damit letztendlich der Abwehr neurotoxischer Verbindungen) dient. Wichtig für das Verständnis dieser Prozesse ist die Kenntnis der Grundlagen von Entgiftungsreaktionen und -stoffwechselwegen in exkretorischen Organen, die hier kurz beschrieben werden. Durch die Aufklärung dieser Mechanismen im Gehirn wird das Verständnis der Blut-Hirn-Schranke und ihrer vielschichtigen Schutzfunktionen wesentlich erweitert. Außerdem wird deutlich, daß bei diesen

Entgiftungswegen Metabolite mit neurotoxischem oder (wie im Falle der Leukotriene) BHS-schädigendem Potential erst entstehen können. Am Beispiel des Mercaptursäureweges wird hier beschrieben, wie über den Nachweis repräsentativer Enzyme die Funktionen der Zelltypen und Markerproteine der Blut-Hirn-Schranke festgestellt werden können.

Stichworte: Enzymkatalyse · Leukotriene · Mercaptursäureweg · Metabolismus · Xenobiotika

1. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Bei allen Säugetieren bildet der Blutkreislauf das wichtigste Transportsystem des Körpers. So befördert das kardiovaskuläre System neben Nährstoffen, Atemgasen und Stoffwechselprodukten auch Wasser, Elektrolyte, Säuren, Basen, Hormone sowie Komponenten des zellulären und des humoralen Immunsystems und erfüllt damit vielfältige Aufgaben. Die kleinen, verzweigten Gefäße dieses Blutkreislaufs, die Arteriolen, Kapillaren und Venolen, werden unter dem Begriff Mikrozirkulationsgefäße zusammengefaßt. Ihr Aufbau richtet sich nach der Funktion und den lokalen Erfordernissen des Gefäßes. So sind die Kapillaren (Durchmesser: 3 bis 10 µm) der Ort des Stoffaustauschs mit dem umliegenden Gewebe und damit von großer Bedeutung; ihre Zahl wird beim Menschen auf 40 Milliarden mit einer Gesamtoberfläche von 600 m² geschätzt. Die Wand der Kapillaren wird von einer einzelnen Schicht von Endothelzellen gebildet, die von einer Basalmembran umgeben sind. Man

unterscheidet anhand ihrer Ultrastruktur drei Arten von Kapillaren: den diskontinuierlichen, kontinuierlichen und fenestrierten Typ. Nur im Falle des kontinuierlichen Typs bilden die Endothelzellen eine lückenlose Schicht, so daß kein ungehinderter Stoffaustausch mit der Umgebung möglich ist. Dieser Kapillartyp liegt unter anderem im Gehirn vor. Aufgrund ihrer funktionellen Erfordernisse sind die Endothelzellen der Hirnkapillaren besonders hoch spezialisiert: Sie bilden die Blut-Hirn-Schranke. Diese trennt die Blutgefäße, in denen das Blut durch ein dichtes dreidimensionales Netzwerk von Kapillaren in das Gehirn gelangt, von dem interstitiellen Raum, der die direkte Umgebung für die Neuronen und Gliazellen ist.

Für eine einwandfreie Funktion des Gehirns ist die Homöostase in der neuronalen Mikroumgebung unerlässlich. Nur so ist eine optimale Umgebung für synaptische und nicht-synaptische Kommunikation zwischen den Nervenzellen gewährleistet und zugleich sichergestellt, daß kurzzeitige Veränderungen in der Zusammensetzung der interstitiellen Flüssigkeit als Signale erhalten bleiben. Das Gehirn muß einerseits vor den metabolischen Schwankungen in der Zusammensetzung des Blutes geschützt werden, andererseits zur Versorgung mit Nährstoffen und Entsorgung von Abfallstoffen mit dem Blut in Kontakt stehen. Diese komplexe Aufgabe wird von der Blut-Hirn-Schranke wahrgenommen, die eine vierfache Funktion hat:

[*] Prof. Dr. H. G. Gassen, Dr. S. Wolf
Institut für Biochemie der Technischen Hochschule
Petersenstraße 22, D-64287 Darmstadt
Telefax: Int. + 6151/165399

Dr. A. Aigner
Lombardi Cancer Center, Georgetown University, Washington DC (USA)

[**] Die in diesem Aufsatz verwendeten Fachbegriffe werden im Anhang 1 erläutert.

1. Schutz des Gehirns vor dem Blut (und dessen wechselnder Zusammensetzung) durch eine lückenlose Endothelzellschicht, die einen unspezifischen Stoffdurchtritt verhindert und damit auch vor zirkulierenden, peripheren Neurotransmittern oder neuroaktiven Agentien schützt;
2. selektive Versorgung des Gehirns mit Substanzen aus dem Blut über spezifische Transportsysteme;
3. Metabolisierung und retrograder Transport von Substanzen ins Blut, die entweder wegen ihrer chemischen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke durchdringen oder als Metabolite im Gehirn anfallen und die Funktion des Gehirns beeinträchtigen könnten;
4. Zurückhalten von Ionen und Peptiden, die eine zusätzliche interneuronale Kommunikation gewährleisten.

In einigen Bereichen des Gehirns reagieren Neuronen auf den Gehalt von im Blut zirkulierenden Hormonen oder müssen selbst neuroendokrine Hormone in das Blut abgeben. Hier ist daher keine Trennung, sondern ein direkter Kontakt zwischen Neuronen und Blut von funktioneller Bedeutung. Zu diesen Regionen, die sich nahe der Ventrikel befinden und deshalb als Zirkumventrikularorgane bezeichnet werden, gehören unter anderem die Hypophyse, der Hypothalamus, die Area postrema, die Epiphyse und der Plexus choroideus.^[1] Eine ähnliche Barrierefunktion wird von spezialisierten Ependym- und Gliazellen ausgeübt, die das umgebende Nervengewebe trotz fehlender Blut-Hirn-Schranke schützen.^[2] Ort der Blut-Liquor-Schranke ist der Plexus choroideus. Von wenigen Ausnahmen abgesehen wurde im Gehirn aller Vertebraten eine Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen.

1.1. Entdeckung und morphologische Grundlagen der Blut-Hirn-Schranke

Vor über 100 Jahren wurden von Ehrlich in Vitalfärbungsexperimenten Hinweise auf das Vorliegen einer Barriere zwischen Blut und Gehirn gefunden.^[3] So wurden durch den intravenös in Ratten injizierten Farbstoff Trypanblau alle Gewebe mit Aus-

nahme des Zentralnervensystems (ZNS) angefärbt. Ehrlich interpretierte dieses 1909 von Goldmann wiederholte Experiment mit dem Fehlen wichtiger Merkmale zur Bindung des Farbstoffes. Im Gegenexperiment wurde von Goldmann^[4] festgestellt, daß auch ein in das Hirnparenchym injizierter Farbstoff nicht in die Blutgefäße übertritt.

Die Hypothese, nach der die Endfüßchen der Astrocyten (siehe unten) die morphologische Entsprechung der Blut-Hirn-Schranke seien, konnte erst in den späten sechziger Jahren dieses Jahrhunderts nach der Einführung hochauflösender Techniken berichtigt werden. Reese et al.^[5, 6] untersuchten Hirnschnitte von Tieren durch Elektronenmikroskopie (Abb. 1). Durch vorherige intravenöse Injektion des Enzyms Meerrettich-Peroxidase konnten sie die Blut-Hirn-Schranke im Endothel der cerebralen Kapillaren lokalisieren. Ein schematischer Quer- und Längsschnitt durch eine Hirnkapillare ist in Abbildung 1 dargestellt.

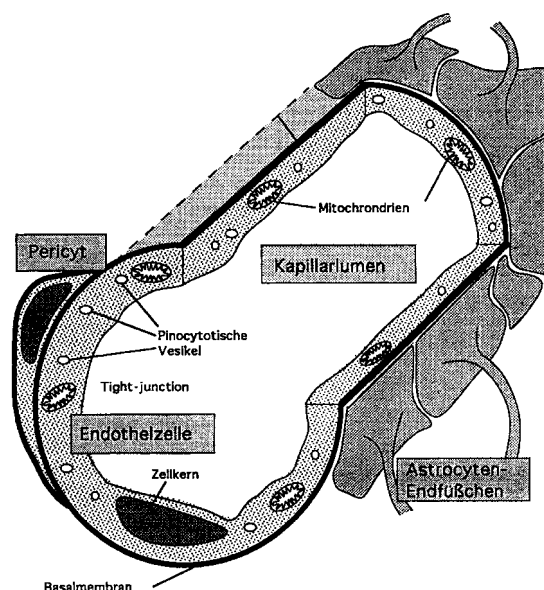


Abb. 1. Schematischer Quer- und Längsschnitt durch eine Hirnkapillare.

Achim Aigner, geboren 1965, studierte 1985–1991 Chemie an der Technischen Hochschule Darmstadt. Er promovierte 1992–1995 in Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. G. Gassen über Transport- und Entgiftungsprozesse an der Blut-Hirn-Schranke. Seit April 1996 arbeitet er als Postdoc am Lombardi Cancer Center der Georgetown University in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Wellstein.

Sabine Wolf, geboren 1958, studierte 1977–1982 Chemie an der Technischen Hochschule Darmstadt. Sie promovierte 1983–1986 in Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Heidemann. Seit 1993 ist sie Leiterin des Forschungsprojekts „Transport- und Entgiftungswege an der Blut-Hirn-Schranke“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. G. Gassen.

Hans Günter Gassen, geboren 1938, studierte Chemie an der Universität Marburg. Er promovierte in Biochemie (Enzymologie) und war anschließend zwei Jahre in den USA (Biology Division) und drei Jahre am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen. Er habilitierte sich an der Universität Münster und wurde 1973 an die Technische Hochschule Darmstadt berufen. 1985 gründete er mit den Firmen Grünenthal, Merck KGaA und Röhm den Forschungsverbund „Angewandte Gentechnik“. Er ist Autor von Sachbüchern und zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen.



S. Wolf



H. G. Gassen

Die Endothelzellen der Hirnkapillaren zeichnen sich im Unterschied zu anderen Endothelien des Körpers durch eine Reihe morphologischer und biochemischer Besonderheiten aus. Sie bilden mit benachbarten Endothelzellen und mit sich selbst durch Verschmelzung der Plasmamembranen feste Zell-Zell-Kontakte (Zonulae occludentes oder Tight-junctions), deren Komplexität einmalig ist und sich unter anderem in einem elektrischen Widerstand von bis zu $2000 \Omega \times \text{cm}^2$ widerspiegelt.^[7] Hierdurch wird parazelluläre Diffusion vollständig unterbunden. In Gefrierbruchaufnahmen sind die Tight-junctions als verzweigte Bänder mit perlschnurartigen Strukturen erkennbar. Neben Membranlipiden sind hierbei vermutlich auch Proteine beteiligt.

Darüber hinaus ist in den Endothelzellen durch eine nur sehr kleine Zahl pinocytotischer Vesikel der unspezifische transzelluläre Transport (Transcytose) stark eingeschränkt.^[8] Die große Zahl der für die zelluläre Energiegewinnung verantwortlichen Mitochondrien ist ein Hinweis auf viele energieverbrauchende Transportmechanismen.

1.2. Die Pericyten – ein weiterer Zelltyp der Blut-Hirn-Schranke?

Abluminal liegt ein weiterer Typ von Zellen vor, die Pericyten; diese könnten an der Blut-Hirn-Schranke und in den an der Barriere vermuteten Stoffwechselwegen eine wichtige Rolle spielen. Pericyten sind morphologisch, biochemisch und physiologisch heterogen und im Unterschied zu Endothelzellen weniger umfassend untersucht.^[9] Wegen des Fehlens hochspezifischer Zellmarker (siehe unten) werden Pericyten hauptsächlich über ihre abluminale Lokalisierung auf den Blutgefäßen definiert,^[10] wobei der Grad der Umschließung der Endothelzellen von der Lokalisation des jeweiligen Mikrozirkulationsgefäßes abhängt.^[9] Die in vivo und in vitro gewonnenen und teilweise vom untersuchten Organ oder der untersuchten Spezies abhängigen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Pericyten kommen auf den Kapillaren fast aller Organe, allerdings mit unterschiedlicher Häufigkeit, vor. Sie bedecken das Gefäß nie vollständig. Das Verhältnis von Endothelzellen zu Pericyten sowie die von Pericyten bedeckte Endothelzellfläche stehen im Zusammenhang mit der Dichtigkeit der interendothelialen Verbindungen sowie dem im Mikrozirkulationsgefäß herrschenden Blutdruck: Je höher die Zahl der Pericyten, desto dichter ist das Gefäß und desto höher ist der lokale Blutdruck.^[9] So wurden an sehr dichten Gefäßen (mit einer bedeckten Fläche pro Gesamtfläche von 0.41 für die Blut-Retina-Schranke und 0.22 bis 0.30 für die Blut-Hirn-Schranke) sehr hohe Pericytenbedeckungsgrade festgestellt.^[11]
2. Pericyten sind eingelagert in die Basalmembran, die die Endothelzellen abluminal umgibt. Sie sind an der Synthese und Freisetzung von Komponenten, die in der Basalmembran und der extrazellulären Matrix vorkommen, z. B. von Collagen^[12] und Glycosaminoglycanen,^[13] beteiligt. Die Basalmembranen verschmelzen innerhalb der Interzellularspalte

zwischen den Endothelzellen und den Pericyten häufig zu einer gemeinsamen Membran.

3. Laut Untersuchungen zur Ultrastruktur liegt in vivo ein hoher Wechselwirkungsgrad zwischen Pericyten und Endothelzellen vor. Die enge Assoziation dieser Zellen sowie die direkten Kontaktstellen zwischen den beiden Zelltypen durch Fenestrierungen in der Basalmembran wurden in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen deutlich.^[10] Nach Frank et al.^[11] hat diese Assoziation wichtige Auswirkungen auf die Kontrolle der Funktion des jeweiligen Mikrozirkulationsgefäßes. In mehreren Arbeiten wurde das Auftreten von Gap-junctions zwischen Pericyten und Endothelzellen (in vivo und in vitro) beschrieben.^[10]
4. In den meisten Fällen weisen Pericyten kontraktile Eigenschaften auf. Frühe Vermutungen bezüglich einer Regulation des kapillären Blutflusses durch die Kontraktion von Pericyten wurden in zahlreichen Untersuchungen durch den Nachweis kontraktiler Proteine bestätigt. Zu diesen gehören glatt- und nichtmuskuläre Actin-Isotypen, Glattmuskel- und Nichtmuskel-Myosin, Tropomyosin, sowie Vimentin und Desmin. Ein direkter Nachweis der Kontraktilität von Pericyten steht allerdings aus.^[14] Die Mengen an den Isoformen kontraktiler Proteine sind abhängig von der Größe des jeweiligen Mikrozirkulationsgefäßes (z. B. Kapillare oder postkapilläre Venole) und unterscheiden sich teilweise signifikant. Die Pericyten der Hirnkapillaren bilden in vielerlei Hinsicht eine Ausnahme. Sie weisen einen deutlich geringeren Gehalt an kontraktilen Proteinen auf als alle anderen Pericyten und enthalten spezifische Markerproteine wie γ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT)^[15, 16] und Amino-Peptidase N.^[17] Außerdem zeichnen sie sich durch eine geringere Heterogenität aus. Ebenso wie die Pericyten der Blut-Retina-Schranke dienen sie zur Erhaltung der jeweiligen Barriere und zur Stabilisierung der Kapillarwand, nicht jedoch zur Blutdruckregulierung. Die Pericyten der Blut-Hirn-Schranke mit ihren die Kapillare umschließenden Ausläufern stabilisieren also das Gefäß vor allem mechanisch und schützen vor Schädigungen durch den Gegendruck im Blut befindlicher Erythrocyten.
5. Pericyten regulieren die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen. So scheinen Zellen in der Umgebung der Blutgefäße eine wichtige Rolle in der Anfangsphase der Kapillaraussprossung zu spielen. Zudem beeinflussen sie das Wachstum von Endothelzellen in vivo und in vitro. In Untersuchungen von Crocker et al.^[18] wurde das Wachstum neugebildeter Kapillaren in einem In-vivo-Wundheilungsmodell durch das Einwandern von Pericyten in die Basalmembran gestoppt. Offenbar üben Pericyten eine suppressive Wirkung auf die Proliferation der Endothelzellen aus. Die Blutgefäßbildung ist daher wahrscheinlich ein hochkoordinierter und simultan ablaufender Wachstumsprozeß von Endothelzellen und Pericyten.^[14]
6. Pericyten spielen eine wichtige Rolle bei der Antigen-Präsentation im Gehirn und möglicherweise bei der Ablagerung von Amyloid in der Umgebung der Blutgefäße bei neurodegenerativen Veränderungen wie der Alzheimer-Krankheit.^[19]
7. Pericyten der Arteriolen, aber auch der Kapillaren und Venolen, spielen eine Rolle bei der Phagocytose.^[20] So wurde

durch Weibel eine phagokinetische Aktivität bei Pericyten der Haut und des Skelettmuskels festgestellt, allerdings konnten nur wenige Lysosomen nachgewiesen werden.^[21]

Den Pericyten wird neben der mechanischen Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke auch eine Schutzfunktion zugesprochen. So wird das Enzym Meerrettich-Peroxidase beim Auftreten im Interstitium des Gehirns selektiv in den cerebralen Pericyten angereichert.^[22] Auch andere Arbeiten belegen, daß die Pericyten zumindest unter pathologischen Bedingungen in der Lage sind, Proteine aus dem Interstitium des Gehirns aufzunehmen^[14] und extrazelluläre bioaktive Peptide zu metabolisieren.^[17] Den Pericyten wurde daher die Rolle einer zweiten Abwehrlinie (second line of defence) zugesprochen;^[17, 23] diese trägt dazu bei, die Homöostase im Gehirn aufrechtzuerhalten (insbesondere unter Bedingungen des Zusammenbruchs oder der teilweisen Disfunktionalität der endothelialen BHS). Von besonderem Interesse ist das Auftreten der γ -Glutamyl-Transpeptidase, die bei Glutathion-gekoppelten Entgiftungsreaktionen eine Rolle spielt, in cerebralen Pericyten (siehe auch Abschnitt 3).^[15, 16]

1.3. Die Bedeutung der Astrocyten

Abluminal werden die cerebralen Endothelzellen mit den in die Basalmembran eingelagerten Pericyten von den Endfüßchen der Astrocyten umgeben. Astrocyten gehören zu den Gliazellen und üben im Gehirn unter anderem eine Stützfunktion aus. Über die Regulation des Ionenhaushalts in der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns tragen sie außerdem zur Erhaltung der Homöostase bei.^[24] Obwohl die Endfüßchen der Astrocyten die Kapillaren fast vollständig umschließen, sind sie nicht durch feste Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden und daher nicht die anatomische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke. Durch Spalten zwischen den Astrocyten können Proteine und andere polare Verbindungen in der interstitiellen Flüssigkeit bis zur abluminalen Oberfläche der Endothelzellen und der Pericyten dringen.^[25] Über die Induktion von BHS-Eigenschaften leisten die Astrocyten einen ganz entscheidenden Beitrag zur Bildung und zur Erhaltung der Barriere. Durch In-vitro-Experimente mit Astrocyten-konditioniertem Medium oder mit kokultivierten Astrocyten konnte bewiesen werden, daß Endothelzellen endotheliale Marker für BHS-Eigenschaften exprimieren^[26] und komplexe Tight-junctions bilden;^[27, 28] die in vivo nachgewiesenen hohen elektrischen Widerstände werden allerdings nicht erreicht.^[29] Laut neueren Untersuchungen in Zellkulturen hat (abgesehen von den Astrocyten) der intraendotheliale Spiegel an *cyclo*-AMP einen entscheidenden Einfluß auf die Permeabilität und den elektrischen Widerstand.^[30] Dagegen unterstützen die Endothelzellen die Ausreifung oder die Differenzierung der Astrocyten und machen diese weniger anfällig für cytotoxische Effekte, z. B. für Blei.^[31] Da kein Zell-Zell-Kontakt zwischen Astrocyten und Endothelzellen erforderlich ist,^[32] wird die Induktion von BHS-Eigenschaften auf lösliche Faktoren zurückgeführt. Bei Untersuchungen der Blut-Hirn- und der Blut-Retina-Schranke wurde allerdings deutlich, daß sich die astrocytären Endfüßchen in vivo und in vitro^[33, 34] nahe den Endothelzellen befinden müssen, damit eine Induktion von Schranken-Eigenschaften möglich ist.

1.4. Marker für gefäßassoziierte Zellen mit BHS-Eigenschaften

Die Bestimmung von Markern dient der Charakterisierung von Zelltypen oder Zellverbänden sowie von deren Entwicklungs- und Differenzierungsstatus. Marker beziehen sich auf Eigenschaften eines Zelltyps oder Gewebes, die auf einer spezifischen Genexpression beruhen. Im Falle der Blut-Hirn-Schranke handelt es sich um die Besonderheiten des cerebralkapillären Endothels. Während durch Endothelmarker lediglich die Blutgefäße und die sie bildenden Zellen vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden können, ermöglichen Marker für BHS-Eigenschaften eine Unterscheidung von anderen Blutgefäßen. Als derartige Marker können deshalb nur solche Eigenschaften dienen, die ausschließlich in den Kapillaren mit (Blut-Hirn-)Schranken-Funktion (nicht jedoch in anderen Kapillaren) vorliegen und die daher den hohen Spezialisierungsgrad dieser Zellen widerspiegeln. Da hauptsächlich eine Unterscheidung von Kapillaren mit und ohne Schrankenfunktion erzielt werden soll, ist die Expression dieser Marker in anderen, nicht gefäßassoziierten Zellen weniger entscheidend.

Üblich ist eine Unterteilung in morphologische, biochemische und immunchemische Marker (Tabelle 1). Die morphologischen Besonderheiten der Kapillaren mit BHS-Eigenschaften wurden durch Untersuchungen der Ultrastruktur deutlich (siehe oben). Das cerebralkapilläre Endothel ist ein stoffwechselaktives Gewebe, in dem eine große Zahl spezifischer, von Enzymen katalysierter Transport- und Stoffwechselwege zur Funktion der Blut-Hirn-Schranke beitragen. Über immunchemische Methoden wurden mehrere Markerproteine für die Blut-Hirn-Schranke identifiziert, deren Funktion teilweise noch nicht bekannt ist. Detailliertere Untersuchungen haben mittlerweile in vielen Fällen ergeben, daß nicht alle Blut-Hirn-Schranke-Marker tatsächlich der strengen, obengenannten Definition genügen.

1.5. Transportprozesse an der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke verhindert wegen der besonderen Morphologie der Endothelzellen weitgehend den unspezifischen Durchtritt von Substanzen aus dem Blut (Abschnitt 1.1). Eine Ausnahme bilden Gase (wie O₂ oder CO₂), Wasser sowie Verbindungen, die wegen ihrer Lipophilie die Lipid-Doppelschicht der Endothelzellmembranen durchdringen und transzellulär das Interstitium des Gehirns erreichen können. Diese Lipophilie wird üblicherweise durch den Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten ausgedrückt. Mehrere In-vitro-, In-vivo- und In-situ-Meßtechniken zur Quantifizierung des Durchtritts einzelner Verbindungen sind beschrieben.^[64] Als Kenngröße für den Durchtritt ist der „brain uptake index“ (BUI) gebräuchlich. Dieser setzt das Verhältnis der Konzentrationen hirnsseitig aufgenommener und luminal injizierter Testsubstanz in Bezug zum Quotienten aus den Konzentrationen hirnsseitig aufgenommener zu luminal injizierter Referenzsubstanz (z. B. ³H₂O). Die Fähigkeit von Verbindungen zur Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke kann über die Messung der Oberflächenaktivität, die die Eigenschaften hydrophober und geladener Reste der Verbindung berücksichtigt, am präzisesten abgeschätzt werden. Es lassen sich

Tabelle 1. Morphologische, biochemische und immunchemische BHS-Marker.

| Marker | Bemerkungen | Lit. |
|--|--|-------------|
| <i>morphologische Marker</i> | | |
| feste Zell-Zell-Kontakte | | [5] |
| geringe Zahl pinocytotischer Vesikel | | [8] |
| hohe Zahl an Mitochondrien | | [35] |
| <i>biochemische Marker</i> | | |
| Alkalische Phosphatase | | [8, 36, 37] |
| Aminopeptidase A | geringe Aktivität auch in Hirnkapillaren ohne BHS | [38] |
| Aminopeptidase M | Aktivität auch in Hirnkapillaren ohne BHS | [38] |
| Butyrylcholinesterase | | [39] |
| | Aktivität auch in fenestrierten Hirnkapillaren | [1, 40] |
| | Aktivität Pericyten-assoziiert | [41] |
| Dipeptidylpeptidase IV | sehr spezifisch; Aktivität ausschließlich in Hirnkapillaren mit BHS | [38] |
| γ -Glutamyltranspeptidase | | [42] |
| | auch in den Epithelzellen des Plexus choroideus und in Hirnkapillaren ohne BHS | [1, 38] |
| | Aktivität überwiegend Pericyten-assoziiert | [15, 16] |
| | nicht in der BHS von Vögeln | [43] |
| | Vorkommen auch in anderen Organschränken | [44, 45] |
| <i>immunchemische Marker</i> | | |
| Endothelial-Barrier-Antigen | Antikörper erkennt Protein-Triplett; weitgehend spezifisch für Endothelzellen in Hirnkapillaren mit BHS | [46] |
| Glucosecarrier GLUT-1 | | [47–49] |
| | weniger N-glycosylierte Form auch in den Epithelzellen des Plexus choroideus | [50] |
| | Transport-Aktivität abhängig von subzellulärer Verteilung | [51, 52] |
| Glycoprotein GP 140 | nur in Pericyten | [53, 54] |
| Insulin-Rezeptor | Rezeptor-vermittelte Transcytose von Insulin | [55] |
| Low-Density-Lipoprotein(LDL)-Rezeptor | keine Expression in Endothelzellen peripherer Kapillaren | [56] |
| Neurothelin/HT 7/OX-45-Antigen/1W5-Antigen | integrales Membranprotein in der luminalen Membran der BHS | [57, 58] |
| | auch in anderen Geweben mit Schrankenfunktion; vermutlich Beteiligung an Transport, Oberflächenerkennung oder Zelladhäsion | [1, 59] |
| P-Glycoprotein | keine Expression in Endothelzellen ohne Schrankenfunktion, Bestandteil der Multidrug-Resistenz | [60] |
| Transferrin-Rezeptor | keine Expression in Endothelzellen peripherer Kapillaren | [61] |
| 46kDa-Protein/53kDa- und 45kDa-Proteine | Oberflächenantigene spezifisch auf den Endothelzellen der Hirnkapillaren; eventuell eine Komponente der Tight-junctions | [62] |
| | Antikörper erkennt ein 200kDa-Protein im Plexus choroideus | [63] |

drei Gruppen unterscheiden: a) sehr hydrophobe Verbindungen, die in den Membranen der Endothelzellen akkumuliert werden und deshalb nicht das Interstitium erreichen, b) relativ hydrophile Verbindungen, die die Blut-Hirn-Schranke unter physiologischen Bedingungen nicht durchdringen und c) Verbindungen mit zwischen diesen beiden Extremen liegenden Eigenschaften, die zum Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke befähigt sind.^[65] Eine vollständige Impermeabilität tritt vermutlich in keinem Fall auf.

Das metabolisch sehr aktive Gehirn muß in großem Umfang mit im Blut zirkulierenden Nährstoffen wie Glucose, Aminosäuren, Purinen, Ketonkörper und Cholin versorgt werden. Die Blut-Hirn-Schranke ist die entscheidende Barriere und der Transport durch diese eine wichtige regulatorische Stufe in vielen Substrat-limitierten Stoffwechselwegen im Gehirn. Der selektive Durchtritt von Verbindungen wird je nach ihrer Art durch spezialisierte Carrier oder durch Rezeptor-vermittelte oder adsorptiv vermittelte Transcytose gewährleistet (Tabelle 2). Bei den Carriern kann zwischen aktivem Transport, der gegen einen Konzentrationsgradienten und damit unter Energieaufwand verläuft, und erleichterter Diffusion, die entlang eines Konzentrationsgradienten ohne Energieaufwand stattfindet, unterschieden werden. Eine große Zahl von Carriern sind bekannt.

Die Rezeptor-vermittelte Transcytose bei Peptiden, Plasma-Proteinen und Viren gliedert sich in a) Rezeptor-vermittelte Endocytose auf der luminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke,

Tabelle 2. Carrier an der Blut-Hirn-Schranke (LNAA = Large neutral amino acids).

| Carrier | Substrate (Beispiele) | Lit. |
|------------------------------|------------------------------|----------|
| Hexose-Carrier | Glucose, Desoxyglucose | [66, 67] |
| Monocarbonsäuren-Carrier | Lactat, Pyruvat, Ketonkörper | [68] |
| L-System, LNAA-Carrier | Phenylalanin, Leucin | [69, 70] |
| A-System (nur abluminal) | Alanin | [71] |
| B ⁰ + -System | Phenylalanin | [72] |
| Saure-Aminosäuren-Carrier | Glutamat | [73] |
| Basische-Aminosäuren-Carrier | Lysin, Ornithin, Arginin | [69, 74] |
| Amin-Carrier | Cholin | [75] |
| Purinbasen-Carrier | Adenin, Guanin | [76] |
| Nucleosid-Carrier | Adenosin | [76] |
| Thiamin-Carrier | Thiamin | [73] |
| Glutathion-Carrier | Glutathion (GSH) | [77, 78] |
| Myo-Inositol-Carrier | Myoinositol | [79] |
| Thyroid-Hormon-Carrier | Triiodthyronin | [80, 81] |

b) Diffusion z. B. des Peptids oder des Peptid-Rezeptor-Komplexes durch das endotheliale Cytoplasma und c) Rezeptor-vermittelte Exocytose auf der abluminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke in das Interstitium. Beispiele für diesen Weg sind der Transport von Insulin^[82] und Transferrin.^[61] Die zugehörigen Rezeptoren sind häufig Marker für die Blut-Hirn-Schranke (vgl. Abschnitt 1.3). Ein ähnlicher Prozeß ist die adsorptiv vermittelte Transcytose, die auf der Adsorption von Lectinen^[83] oder polykationischen Proteinen (wie kationisiertem Albumin,^[84] rekombinantem CD4^[85] oder Histonen^[86]) an die luminalen Membran beruht.

1.6. Pharmakologische Anwendungen: Transport von Wirkstoffen durch die Blut-Hirn-Schranke

Einige der beschriebenen Transportmechanismen sind bekanntermaßen relevant für die Wirksamkeit von Arzneimitteln, andere werden diesbezüglich noch untersucht. Für die Anwendung von Pharmazeutika (wie rekombinanter Proteine, kationisierter Antikörper oder Antisense-Oligonucleotide) im Gehirn ist es notwendig, Strategien für deren Transport durch die Blut-Hirn-Schranke (in vivo) zu entwickeln. Tatsächlich können viele cerebrale Erkrankungen wie Infektionen, Mikroangiopathien und Tumore nur so therapeutisch behandelt werden. Bislang wird allerdings bei der Entwicklung und Entdeckung neuer diagnostischer oder therapeutischer Verbindungen vorrangig deren Wirkung und nicht deren spezifischer Transport untersucht.

Sind die Grundvoraussetzungen erfüllt, daß ein Pharmakon nichtionisiert im Blut löslich ist, im Blutplasma keinem enzymatischen Abbau unterliegt und nicht an Plasmaproteine gebunden vorliegt, so bleibt die Frage der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Neuopharmaka lassen sich auf dreierlei Weise in das zentrale Nervensystem einbringen. Man unterscheidet: a) invasive oder BHS-öffnende Techniken, b) pharmakologische Ansätze, die eine Verbesserung des Transports der Verbindungen zum Ziel haben und c) physiologische Ansätze über chimäre Peptide oder kationisierte Antikörper. Die erste Kategorie umfaßt die intraventrikuläre Infusion von Neuopharmaka zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke, die Zelltherapie sowie die kurzzeitige, unspezifische Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Die intraventrikuläre Infusion von Wirkstoffen, also deren direkte Injektion in die Hirnkammern, ist eine invasive Strategie mit allen sich daraus ergebenden Risiken. Sie ist nur für das Heranführen von Chemotherapeutika an die Hirnoberfläche geeignet, da diese von der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) umspült wird. Da sich die Cerebrospinalflüssigkeit rasch erneuert, wird der Wirkstoff – auch bei höheren Konzentrationen – schnell in die peripheren Blutgefäße abtransportiert; die Penetration des Wirkstoffes in das Parenchym beruht dagegen nur auf Diffusion und ist deshalb sehr langsam. Die Blut-Hirn-Schranke kann auf osmotischem, biochemischem oder pharmakologischem Weg geöffnet werden.^[87] Diese Verfahren beruhen auf der Infusion einer hyperosmotischen Mannitol- oder Arabinose-Lösung (hyperosmotischer Schock), auf der Applikation von Verbindungen, die auf das cerebrale Endothel permeabilitätserhöhend wirken (pharmakologischer Ansatz) bzw. auf der Infusion vasoaktiver Substanzen wie Bradykinin oder Leukotrienen (biochemische Strategien). Diese Permeabilitätserhöhung ist auf eine Schädigung der Tight-junctions durch Zellschrumpfung oder auf eine verstärkte vesikuläre Transportaktivität durch die Endothelzellen der Hirnkapillaren zurückzuführen. Der Schutz des ZNS vor neurotoxischen Substanzen und Abbauprodukten und die Erhaltung der Homöostase gehen durch diese zumindest kurzzeitige Öffnung der Blut-Hirn-Schranke verloren; daher treten Nebenwirkungen wie eine vorübergehende Verstärkung neurologischer Störungen, permanente neurologische Störungen und Hirnödeme auf.^[87, 88] Bei einer nur begrenzten Wiederholung der Behandlung (ca. 10 bis 30 Cycles) scheint das Risiko bleibender Schäden nach den vorliegenden Daten gering.^[89]

Pharmakologische Ansätze zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke umfassen unter anderem die Erhöhung der Lipophilie von Wirkstoffen durch chemische Modifikationen (Veresterung und Acetylierung von Carboxy-, Hydroxy- oder Aminogruppen) oder durch Eliminierung quartärer Ammoniumgruppen. Nach dem Durchtritt des modifizierten Pharmakons (Prodrug) durch die Blut-Hirn-Schranke wird im Gehirn gegebenenfalls die Lipophilie-induzierende Gruppe abgespalten und die aktive Wirksubstanz freigesetzt. Durch die Erhöhung der Lipophilie kann allerdings a) die ungewollte, nichtselektive Resorption durch andere Organe begünstigt, b) die Verweilzeit der Verbindung im Gehirn durch deren rascheren Austritt verkürzt und c) die aktive Wirksubstanz auch im Blut hydrolytisch freigesetzt werden sowie d) eine stärkere Bindung an Plasmaproteine stattfinden. Wegen dieser limitierenden Faktoren sind bislang nur wenige Prodrugs wie Ester des schwach neurotoxischen Chlorambucils praktisch einsetzbar. In einigen Fällen konnten Verbindungen so modifiziert werden, daß sie als Substrate für einen Carrier dienen. Beispiele hierfür sind das für die Therapie der Parkinson-Krankheit wichtige Dopamin (3,4-Dihydroxy- β -phenethylamin), dessen Vorstufe L-Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) eine hohe Affinität zum L-System aufweist,^[67] oder der Antitumor-Wirkstoff Melphalan, ein Phenylalaninderivat mit hoher Affinität zum gleichen Transportsystem.^[90]

Auch der Transport durch Liposomen wird zu den pharmakologischen Ansätzen gerechnet. Der Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke erfolgt vermutlich über Poren, die durch eine vorübergehende Verschmelzung der Liposomen- und Zellmembran entstehen und durch die der Inhalt der Liposomen in die Endothelzelle gelangt. Dies wurde aber nur bei kleinen Molekülen festgestellt. Zwar sind Liposomen wegen ihrer Größe meist ungeeignet für eine Erhöhung der Wirksamkeit von Therapeutika im Gehirn, doch wurden Gegenbeispiele auch beschrieben (z. B. im Falle des Citicolins).^[91]

Physiologische Ansätze beinhalten den Einsatz chimärer Peptide sowie kationisierter Antikörper. Die Anwendung chimärer Peptide beruht auf Rezeptor-vermittelter sowie adsorptiv vermittelter Transcytose von bestimmten Substanzen. Werden nichttransportable Diagnostika oder Therapeutika über Disulfidbrücken oder das Avidin-Biotin-System mit Transportvektoren verknüpft,^[92] kann das Konjugat durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert und z. B. durch hirnseitig vorhandene Disulfid-Reduktasen unter Freisetzung des Wirkstoffes gespalten werden. Beispiele für solche Transportvektoren sind das Insulin, der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor), der gegen den Transferrin-Rezeptor der Ratte gerichtete monoklonale Antikörper OX-26^[93] sowie kationisiertes Albumin,^[84, 94] kationisierte Histone und rekombinantes CD4.^[89] Die Hydrolyse des Konjugats sollte möglichst erst im Gehirn erfolgen. Wegen der im Blutplasma und vor allem in cerebralkapillären Zellen enthaltenen großen Zahl an Peptidasen sind Peptidase-resistentere Konjugate erforderlich. Ähnlich wie Albumin können auch kationisierte Antikörper über adsorptiv vermittelte Transcytose die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im Gehirn wertvolle diagnostische oder – beispielsweise als Immuntoxine – therapeutische Werkzeuge bilden. Ein Beispiel hierfür ist die immunchemische Früherkennung der für die Alzheimer-Krankheit typischen β A4-Amyloid-Ablagerungen oder das Verhindern ihrer Neubildung.^[95]

2. Grundlagen von Entgiftungsprozessen

Alle Lebewesen sind in der Natur ständig einer Vielzahl potentiell schädlicher Substanzen ausgesetzt. Durch Verteidigungsmechanismen soll die Aufnahme solcher Verbindungen vermieden oder diese nach ihrer Aufnahme modifiziert, abgebaut und ausgeschieden werden. Bei Säugetieren ist die Leber der Hauptort der Metabolisierung endogener und exogener Verbindungen. Die an diesen Biotransformationen beteiligten Enzyme und Enzymfamilien sind auch in anderen Organen wie in Niere, Darm, Lunge, Haut, Herz und Gehirn nachgewiesen worden. Bis Anfang der achtziger Jahre wurde von einigen Autoren vermutet, daß sich das ZNS von den peripheren Organen durch das Fehlen von Entgiftungsmechanismen unterscheidet und der Schutz des Gehirns nur auf die physikalische Wirkung der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist. Allerdings wurde deutlich, daß das ZNS sehr wohl – und auch über die Blut-Hirn-Schranke hinausgehend – über enzymatische Schutzmechanismen verfügt. Die ersten Hinweise von Cohn et al.^[96] bezogen sich auf eines der wichtigsten Entgiftungssysteme, das Cytochrom P450, und wurden später vielfach bestätigt. Mitte der achtziger Jahre waren über 30 Enzymsysteme bekannt, die im Gehirn exogene Verbindungen metabolisieren.^[97] Insbesondere wegen der geringen Enzymmengen im Gehirn gingen diesen Arbeiten meist Untersuchungen in anderen Organen, besonders der Leber, voraus.

Für die Eliminierung von Xenobiotika oder intrazellulären Metaboliten sind zwei grundsätzliche Wege beschrieben: 1. die direkte, aktive Ausschleusung der Verbindung über Transmembranpumpen mit hoher Substratbreite, also geringerer Spezifität (P-Glycoproteine, Abb. 2, X_A) und 2. die mehrstufige Biotransformation der Verbindung mit anschließender Ausschleusung des Produkts (Abb. 2, X_B).

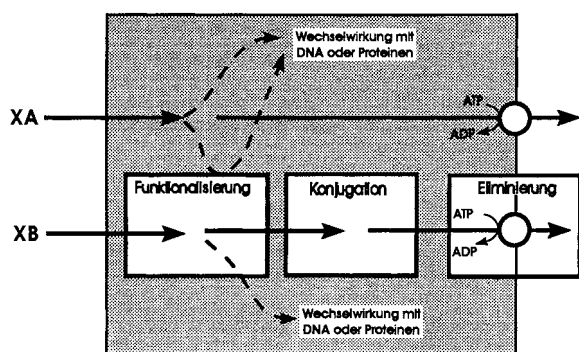


Abb. 2. Wege zur Eliminierung von Xenobiotika oder intrazellulären Metaboliten [98].

P-Glycoproteine wurden erstmals bei Untersuchungen zur Multidrug-Resistenz von Tumorzellen beschrieben.^[99] Die großen, 140 bis 170 kDa schweren Proteine der Plasmamembran bestehen aus zwei identischen Hälften mit vermutlich jeweils sechs Transmembrandomänen und einer intrazellulären ATP-Bindungsstelle^[100, 101] und gehören zu der großen Proteinfamilie der auch in Prokaryonten vorliegenden ATP-binding-cassette(ABC)-Translokasen.^[102] Durch die Ausschleusung einer Vielzahl strukturell nicht verwandter, amphiphiler Verbindungen aus der Zelle vermitteln sie den zellulären Phä-

notyp der Unempfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika (Multidrug-Resistenz). Diese Resistenz kann von Anfang an vorliegen, also intrinsischen Charakter aufweisen, oder erst im Verlauf beispielsweise einer Chemotherapie durch die Induktion der Überexpression des P-Glycoproteins auftreten (erworbene Resistenz).^[103] Da in beiden Fällen durch die Wirkung dieser Exportpumpe in Tumorzellen die intrazelluläre Konzentration und damit die cytotoxische Effektivität eines therapeutischen Wirkstoffes gesenkt wird, kann dies zum völligen Fehlschlagen einer Chemotherapie führen. Dies ist allerdings selten auf die alleinige Aktivität von P-Glycoproteinen, sondern meist auf das Zusammenwirken mehrerer Resistenzmechanismen zurückzuführen.^[103]

P-Glycoproteine werden von einer Genfamilie kodiert, die drei Gene (*mdr1a*, *mdr1b*, *mdr2*) bei der Maus und zwei Gene (*MDR1* und *MDR3*) beim Menschen umfaßt. Dabei vermitteln jedoch lediglich *mdr1a* und *mdr1b* bzw. *MDR1* die Multidrug-Resistenz.^[104] Außer in Tumorzellen sind funktionelle P-Glycoproteine auch in normalem Gewebe, insbesondere in drei Typen von Zellen, verbreitet: in Epithelzellen mit sekretorischen oder exkretorischen Funktionen, in den die Außenwand des Keimbläschens bildenden Trophoblasten und in den Endothelzellen kapillärer Blutgefäße mit Schrankenfunktion, z. B. der Blut-Hirn-Schranke.^[60] Dies legt die Vermutung nahe, daß die ATP-abhängige Transportpumpe ein operativer Bestandteil der enzymatischen Blut-Hirn-Schranke ist.^[105] Durch den damit möglichen retrograden Transport von Substanzen aus dem Gehirn zurück in das Blut ist das Gehirn vor dem passiven Durchtritt unpolare Xenobiotika (auch bei deren 15- bis 30fach höheren Plasmakonzentration) geschützt.^[60]

Tatsächlich reagieren P-Glycoprotein-knock-out-Mäuse (*mdr1a* (– / –)) empfindlicher auf ein verabreichtes Pestizid oder Carcinostatikum als Vergleichstiere. Außerdem zeichnen sie sich durch höhere Konzentrationen und eine verminderte Eliminierung dieser Verbindungen in vielen Organen, besonders dem Gehirn, aus.^[104] Dies wurde auch für eine Vielzahl von Toxinen und Carcinogenen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien festgestellt. Das P-Glycoprotein übt dabei eine zweifache Wirkung aus: Die Akkumulation wird durch Abtransport der Verbindungen aus Geweben wie dem Gehirn vermindert, und die Plasmakonzentrationen dieser Verbindungen werden durch höhere Ausschleusungsraten (wahrscheinlich durch Stimulation der Exkretion über Galle oder Urin) verringert.

Bei den an der Biotransformation von Xenobiotika beteiligten Stoffwechselprozessen können zwei oder (nach neueren Untersuchungen)^[106, 107] drei Phasen unterschieden werden (Tabelle 3).

Bei den meisten Xenobiotika laufen mehrere Stoffwechselwege gleichzeitig ab, die zu unterschiedlichen Produkten führen. Welche Stoffwechselprozesse tatsächlich stattfinden, hängt unter anderem ab von:^[97] a) den biochemischen Charakteristiken der beteiligten Enzyme (der Michaelis-Menten-Konstante K_M und der maximalen Geschwindigkeit v_{max}) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, b) der Zugänglichkeit der aktiven Zentren der Enzyme für Substrate, insbesondere im Falle von Kompartimentierungen und Permeabilitätsschranken, c) der Anwesenheit kompetitiver Substrate, d) der Verfügbarkeit von Coenzymen, Cosubstraten oder Cofaktoren sowie d) der hormongesteuerten Aktivierung oder Inhibierung der Enzyme.

Tabelle 3. Grundlegende Stoffwechselprozesse bei der Biotransformation von Xenobiotika.

| | | |
|-----------|--------------------------|--|
| Phase I | Funktionalisierung | Oxidation, Reduktion und Aromatisierung, Dealkylierung oder Hydrolyse lipophiler Substrate zur Einführung einer funktionellen Gruppe |
| Phase II | Konjugation | Verknüpfung der Verbindung mit einem polaren endogenen Substrat (Aminosäure, Sulfat, Glutathion oder Zucker) zur Erhöhung der Polarität, zur Verminderung des physiologischen, pharmakologischen oder toxischen Potentials sowie zur schnellen Exkretion |
| Phase III | Eliminierung/Speicherung | Exkretion über Niere/Darm oder (bei Pflanzen) Kompartimentation und Speicherung in Vakuolen oder in der Zellwand |

Die Stoffwechselwege, die Geschwindigkeit der Metabolisierung und die Produkte können daher in jedem Organ, Gewebe oder Zelltyp unterschiedlich sein. Aus der Vielzahl der Stoffwechselprozesse (27 Genfamilien mit über 200 Cytochrom-P450-Genen wurden identifiziert^[108, 109]) wurden Beispiele für einige der für die Entgiftung von Xenobiotika wichtigsten Reaktionen der Phasen I und II und der daran beteiligten Enzyme ausgewählt (Tabelle 4).

Die Lokalisation der Enzyme im Gehirn ist in manchen Fällen schwierig, da sie teilweise nur in geringen Mengen vorliegen. Dennoch konnte in mehreren Arbeiten die Bedeutung einiger der beschriebenen Stoffwechselwege für die Blut-Hirn-Schranke aufgezeigt werden. So wurden für eine Reihe von Enzymen mit entgiftender Funktion wie der NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, der 1-Naphthol-Glucuronyl-Transferase oder der Epoxid-Hydrolase in isolierten Hirnkapillaren höhere Aktivitäten gemessen als im Hirnparenchym.^[110, 111] Da sie Substanzen im Blut mit potentieller oder tatsächlicher Neuroaktivität oder dem Potential zur Störung der cerebralen Homöostase zurückhalten, haben sie eine Schutzfunktion in der enzymatischen Blut-Hirn-

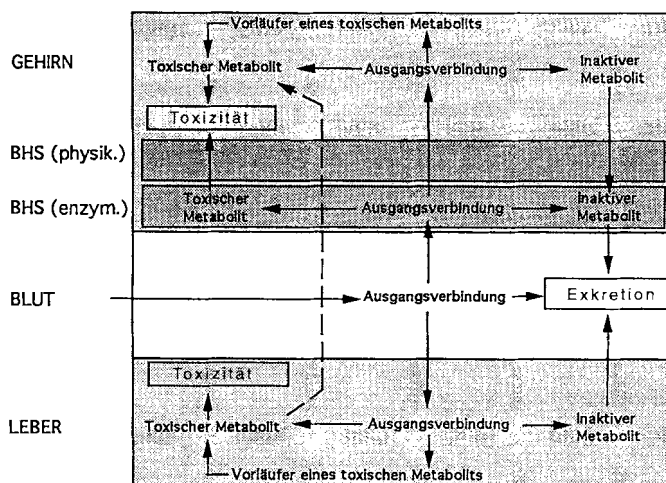


Abb. 3. Beziehungen zwischen Gehirn und Leber bei der Biotransformation lipophiler Xenobiotika (nach Lit. [97] verändert).

Schranke.^[97] In der Leber, im cerebralen Endothel oder im Hirnparenchym kann ein toxischer Metabolit auch erst entstehen (Abb. 3). So wird im Falle der Umsetzung von Codein zu Morphin^[112] eine Vorstufe erst aktiviert. Darüber hinaus unterliegen die Enzymsysteme an der Blut-Hirn-Schranke einer raschen Sättigung, so daß bei höheren Plasmakonzentrationen der Substrate der Durchtritt lipophiler Verbindungen nicht mehr vollständig unterbunden werden kann.^[97]

Die Metabolisierung ist somit häufig mit einer Steigerung der Hydrophilie und mit einer Verringerung der Membranlöslichkeit und -durchgängigkeit verbunden. Was sich auf der luminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke als Vorteil erweist, führt bei Verbindungen innerhalb des Hirnparenchyms zu Problemen. So muß hier die Verminderung der Durchgängigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke durch Transportsysteme ausgeglichen werden. Aus Abbildung 3 wird deutlich, daß Entgiftungsreaktionen in vielen Fällen Interorganprozesse sind. Dies gilt auch für Glutathion-gekoppelte Stoffwechselwege.

Tabelle 4. Reaktionen der Phasen I und II.

| Enzym | Reaktion(en) | Beispielsubstrat(e) | Produkt(e) |
|---------------------------------|--|--|--|
| Phase I | | | |
| Monoamin-Oxidasen | oxidative Desaminierung | prim., sek., tert. Amine, z. B. Serotonin, Dopamin | Aldehyde, H ₂ O ₂ , NH ₃ |
| Cytochrom P450 | Hydroxylierung, N-Demethylierung, Epoxidierung | Lipide, Steroide, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, Arachidonsäure | hydroxylierte Verbindungen, Steroide, Prostanoid, freie Radikale |
| NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase | Reduktion | Cytochrom P450 | |
| Epoxid-Hydrolasen | Hydrolyse von Epoxiden | Epoxide | vicinale Dirole |
| Phase II | | | |
| UDP-Glucuronosyl-transferasen | Glucuronidierung | 1-Naphthol, p-Nitrophenol | Glucuronsäure-Konjugate |
| Phenol-Sulfotransferase | Sulfokonjugation | Phenolderivate | Sulfate |
| Glutathion-S-Transferase | Verknüpfung mit Glutathion | Hydrophobe Elektrophile (Halogenide, Epoxide etc.) | Glutathion-Konjugate |
| N-Acetyltransferasen | N-Acetylierung | aromatische Amine | Acetyl-Verbindungen |

3. Glutathion-gekoppelte Entgiftung: der Mercaptursäureweg

Für viele Xenobiotika, aber auch für eine Reihe endogener Verbindungen, ist der Mercaptursäureweg ein wichtiger, lange bekannter Mechanismus der Entgiftung (Abb. 4). Die am Mercaptursäureweg beteiligten Enzyme treten hauptsächlich in Leber, Niere, Gallenweg und Dünndarm auf; diese Organe tragen

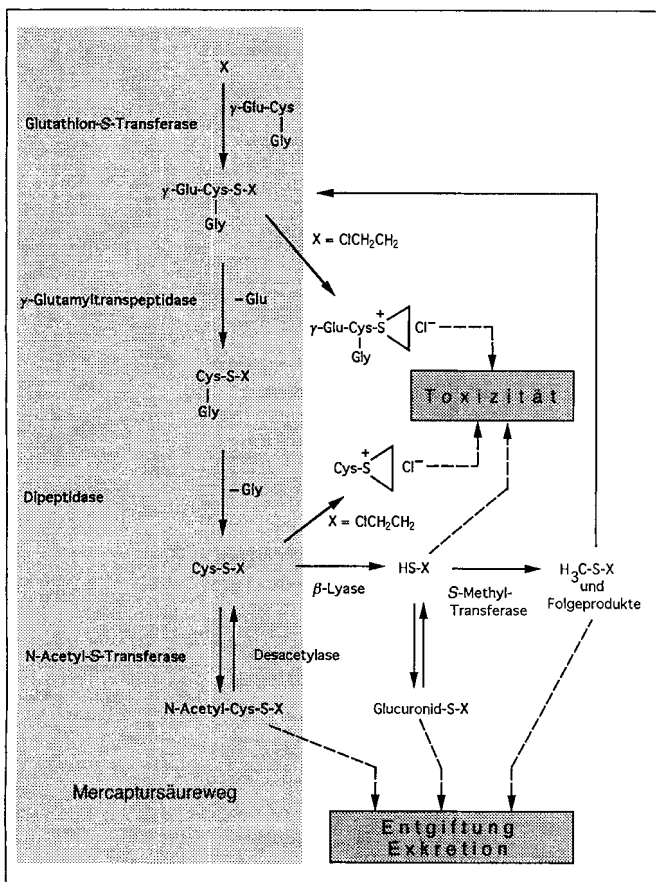


Abb. 4. Der Mercaptursäureweg der Entgiftung sowie bekannte Nebenreaktionen (nach Lit. [117,118] verändert).

speziesabhängig in unterschiedlichem Umfang zu den Reaktionen des Mercaptursäureweges bei. Der einleitende Schritt ist eine intrazelluläre Konjugation der Substanz mit Glutathion (GSH) im Sinne einer Phase-II-Reaktion. Die große biochemische Bedeutung des Tripeptids Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) spiegelt sich in seiner relativ hohen Konzentration von bis zu 10 mM in Säugetierzellen und in seinen vielfältigen Funktionen wider. Es ist das wichtigste intrazelluläre Nichtprotein-Thiol, liegt hauptsächlich in der reduzierten Form vor und kann reversibel zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert werden. Glutathion dient als Nucleophil bei Verknüpfungsreaktionen und ist ein wichtiges Reduktionsmittel für die Zelle (unter anderem zum Schutz vor oxidativem Streß).^[113] Darüber hinaus ist die Beteiligung des Tripeptids an Aminosäuretransportprozessen beschrieben.^[114] Die Verknüpfung von Xenobiotika oder endogenen Verbindungen mit Glutathion erfolgt über Glutathion-S-Transferasen; diese multifunktionellen, weitverbreiteten En-

zyme kommen meist im Cytosol, aber auch in Mitochondrien und Mikrosomen vor (siehe Abschnitt 3.1). Zur weiteren Metabolisierung werden die Glutathion-S-Konjugate über einen ATP-abhängigen Glutathion-S-Konjugat-spezifischen Carrier^[106] aus der Zelle transportiert. Durch das Ektoenzym γ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT) wird der γ -Glutamylrest und durch die Cysteinylglycin-Dipeptidase Glycin abgespalten, so daß das Cystein-S-Konjugat der Verbindung erhalten wird. Dieses kann abschließend intrazellulär durch die Cystein-S-Konjugat-spezifische N-Acetyl-Transferase zu den N-Acetyl-Cystein-S-Konjugaten (Mercaptursäuren) umgesetzt werden.^[115] Zwar erfolgt erst mit diesem letzten Reaktionsschritt die Entgiftung, doch ist das beteiligte Enzym das innerhalb des Mercaptursäureweges am wenigsten untersuchte und verstandene. Die Produkte sind mindertoxisch und werden über einen Probenecid(4-Dipropylsulfamoylbenzoesäure)-spezifischen Carrier für organische Anionen^[116] hauptsächlich über den Urin ausgeschieden.

Der Mercaptursäureweg ist ein komplexer Interorganprozeß, wie durch Enzymaktivitätstests und durch Untersuchungen des Weges radioaktiv markierter Xenobiotika in vivo festgestellt werden konnte. Die Verknüpfung der mit dem Blut herantransportierten Xenobiotika oder endogenen Verbindungen mit Glutathion findet hauptsächlich in der Leber statt, die Abspaltung von Glutamat und Glycin wegen der dortigen hohen Enzymaktivitäten von γ -Glutamyl-Transpeptidase und Dipeptidase dagegen vorwiegend in der Niere, aber auch im Gallengang und Dünndarm. In neueren Untersuchungen wird auf große, speziesabhängige Unterschiede der Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen Organen hingewiesen und zumindest bei einigen Säugetieren von einer Metabolisierung der Glutathion-S-Konjugate auch am Ort ihres Entstehens, der Leber, ausgegangen. Inhalierter Substanzen werden vermutlich gleich in der Lunge konjugiert.^[119] Die Leber scheint der Hauptort der N-Acetylierung zu sein.^[120] Dies ist insofern überraschend, als 1. viele Cystein-S-Konjugate hierzu wieder vom Ort ihrer Entstehung, vorwiegend der Niere, in die Leber zurücktransportiert werden müssen, 2. die anschließende Exkretion der Mercaptursäuren hauptsächlich über den Urin erfolgt, was einen erneuten Transport zur Niere bedeutet und 3. in der Niere eine hohe, die Leber übertreffende N-Acetyl-S-Transferase-Aktivität vorliegt.^[121]

Tatsächlich findet die N-Acetylierung auch in der Niere statt. Möglicherweise werden Cystein-S-Konjugate, die eine hohe Affinität zur N-Acetyl-Transferase aufweisen, in der Niere acetyliert, während Substrate geringerer Affinität hauptsächlich in der Leber akkumuliert und dort acetyliert werden.^[120] Bislang ist das komplexe Zusammenspiel der Organe bei der Metabolisierung, dem Transport und der Exkretion der Mercaptursäuren und ihrer Vorstufen nur teilweise verstanden. Obwohl die Funktion des Mercaptursäureweges in der Entgiftung von Xenobiotika und endogenen Substanzen besteht und deren Verknüpfung mit Glutathion in den meisten Fällen zu einer Abnahme der Toxizität führt, findet für viele Verbindungen ausgehend von Zwischenstufen des Mercaptursäureweges auch eine Bioaktivierung zu mutagenen und/oder nephrotoxischen Metaboliten statt.^[117,122] Hierfür sind mehrere, von den jeweiligen Verbindungen abhängige Prozesse verantwortlich; die vermuteten oder nachgewiesenen Stoffwechselwege sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5. Bioaktivierung von Zwischenstufen des Mercaptursäureweges zu toxischen Produkten (GSH = Glutathion).

| Xenobiotika | Edukte | toxische Produkte | Enzym | Lit. |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------|-------|
| 1,2-Dihalogenethane (Cl, Br) | GSH-S-Konjugate | GSH-Episulfoniumionen | – | [123] |
| Halogenalkene | Cys-S-Konjugate | reaktive Thiole | β -Lyase | [118] |
| Halogenalkene | Cys-S-Konjugate | α -Ketosäuren | β -Lyase | [124] |
| 1,2-Dihalogenethane (Cl, Br) | Cys-S-Konjugate | Cys-Episulfoniumionen | – | [123] |
| Trichlorethylen | S-(1,2-Dichlorvinyl)cystein | S-(1,2-Dichlorvinyl)cysteinsulfoxid | Monooxygenase | [125] |

Die wichtigste Reaktion ist die β -Lyase-katalysierte Metabolisierung von Cystein-S-Konjugaten zu reaktiven Thiolen, Amoniak und Pyruvat.^[126] Sie ist eine Konkurrenzreaktion zur N-Acetylierung und wird als β -Lyase-Shunt bezeichnet.^[127] Die physiologische Bedeutung dieses Stoffwechselweges, der bei Säugetieren sowohl in Leber und Niere als auch in der Darmflora nachgewiesen wurde,^[118] ist nicht bekannt. Die toxische Wirkung der reaktiven Thiole sowie ihrer nur teilweise bekannten Folgeprodukte entfaltet sich allerdings hauptsächlich in der Niere und beruht auf der spontanen Reaktion mit z. B. Makromolekülen wie Proteinen oder DNA. Die reaktiven Thiole können durch die Thiol-S-Methyl-Transferase zu Methylthioderivaten oder deren S-oxidierten Folgeprodukten methyliert werden, die in vivo bei vielen Xenobiotika entstehen.^[128] Diese Methylierung widerspricht dem im Mercaptursäureweg verfolgten Prinzip der Erhöhung der Hydrophilie lipophiler Xenobiotika (zu deren besserer Exkretion), so daß weitere Entgiftungsreaktionen wie etwa ein erneutes Durchlaufen des Mercaptursäureweges erforderlich sind.

Mercaptursäuren selbst werden nicht zu reaktiven Thiolen umgesetzt, doch können sie durch die Desacetylase-katalysierte Abspaltung der N-Acetylgruppe wieder in die Cystein-S-Konjugate überführt und so dem β -Lyase-Shunt zugänglich gemacht werden. Da diese Desacetylierung in erster Linie in der Niere und weniger in der Leber oder in anderen Organen stattfindet, sind viele Xenobiotika überwiegend nephrotoxisch.

Der relative Anteil an ausgeschiedenen Mercaptursäuren hängt daher nicht nur von der N-Acetyl-Transferase-Aktivität, sondern auch von der Aktivität der konkurrierenden Enzyme wie N-Desacetylase oder β -Lyase ab. Das Gleichgewicht zwischen (Re-)Acetylierung und Desacetylierung, die Reaktivität der Produkte, der Transport zwischen den Organen und die Aufnahme der Zwischenprodukte in die Zelle sowie die scheinbaren oder tatsächlichen Unterschiede der N-Acetyl-Transferase-Aktivität in verschiedenen Spezies sind damit wichtige Kriterien für die Nephrotoxizität oder Mutagenität einer Mercaptursäure und für die entgiftende Wirkung des Mercaptursäureweges.

3.1. Die Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen (GST, EC 2.5.1.18) gehören zu den in den letzten Jahren am häufigsten untersuchten Enzymen, zumal sie am Schutz vor elektrophilen Xenobiotika, chemischen Carcinogenen und oxidativem Streß beteiligt sind und möglicherweise eine Rolle spielen in der erworbenen Resistenz von Krebszellen während der Chemotherapie. Sie bilden eine Multienzymfamilie mit breiter Substratspezifität und katalysieren die nucleophile Addition der Thiolgruppe von reduziertem Gluta-

thion an eine Vielzahl hydrophober Elektrophile wie Alkyl- und Arylhalogenide, Epoxide, organische Peroxide, Sulfatester, Chione, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und aktivierte Alkene.^[129, 130] Außerdem entfalten Glutathion-S-Transferasen ligandenbindende Funktionen und erleichtern so den intrazellulären Transport hydrophober und amphipatischer Verbindungen wie Bilirubin, Häm, Steroiden und Gallensalzen.^[131, 132] Die Mehrzahl der cytosolischen Glutathion-S-Transferasen läßt sich in mindestens vier speziesunabhängige Klassen (α , μ , π und θ) einteilen, die sich erheblich voneinander unterscheiden.^[133, 134] Viele homo- und heterodimere Isoformen sind bekannt, allerdings keine Mischklassen-Heterodimere und keine aktiven Monomere. Abgesehen von den vier Klassen der cytosolischen Enzyme wurden in Rattenleber auch mikrosomale und Plasmamembran-gebundene Glutathion-S-Transferasen identifiziert.^[135, 136] Diese spielen vermutlich eine besondere Rolle beim Schutz des endoplasmatischen Retikulums vor der Bildung von Lipidperoxiden sowie bei der Glutathion-Konjugation von Xenobiotika, welche nach ihrer Aktivierung durch Cytochrom P-450 wegen ihrer Hydrophobie in der Membran verbleiben.^[137, 138] Laut Ergebnissen einer neueren Arbeit ist in einer humanen Zelllinie eine homotrimere, mikrosomale Glutathion-S-Transferase die wichtigste Bindungsstelle für das bioaktive Leukotrien C₄ (LTC₄, Abschnitt 4). Ob so eine Speicherung von neugebildetem LTC₄ oder eine Änderung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität erzielt wird, ist nicht bekannt.^[139] Alle Glutathion-S-Transferasen scheinen eine Zweidomänen-Struktur aufzuweisen.^[140] Untersuchungen von Isozymen der μ -Klasse ergaben, daß die Substratspezifität durch die (größere) Domäne II festgelegt wird. Auf der Ebene der Primärstruktur sind hierfür Bereiche höherer Variabilität verantwortlich, die in Anlehnung an die Immunglobuline „variable Regionen“ genannt werden und hauptsächlich auf Domäne II lokalisiert sind. Einige Reste der Domäne I tragen ebenfalls zur dreidimensionalen Struktur der Substratbindungsstelle bei, doch ist die Hauptaufgabe dieser kleineren Domäne die Bindung von Glutathion.^[141] Die deutlichen Unterschiede der Isozymklassen im Hinblick auf ihre Substratspezifität, ihre Sequenzübereinstimmungen, ihre immunologischen Eigenschaften, ihre zelluläre Verteilung und ihr Expressionsmuster während der Entwicklung spiegeln wahrscheinlich ihre unterschiedlichen biologischen Funktionen wider,^[142] die nur teilweise aufgeklärt sind.

Im humanen Gehirn wurden drei Glutathion-S-Transferasen nachgewiesen und gereinigt, die sich in Molekülmasse, isoelektrischem Punkt und katalytischen Eigenschaften unterscheiden. Sie gewährleisten vermutlich den Schutz des ZNS vor oxidativem Streß ebenso wie vor toxischen Xenobiotika und kommen in anderen Geweben nicht vor.^[143] Auf Transkriptionsebene wurden mit einer Expressionsbank mehrere Gene für Glutathion-S-Transferasen im Rattenhirn nachgewiesen, deren ge-

naue Funktionen wegen der Heterogenität der Hirnzellen noch nicht bekannt sind und von denen zumindest eines in anderen Geweben nicht oder nur in geringem Ausmaß exprimiert wird.^[144] In der Maus kommt eine GST ausschließlich im Gehirn und in anderen lipidreichen Geweben mit hoher Sauerstoffversorgung vor; ihr wird eine Schlüsselrolle in der Konjugation und/oder Reduktion cytotoxischer Verbindungen der Lipidperoxidbildung zugesprochen.^[145] Hinweise auf zelluläre Lokalisation und biologische Funktionen von Glutathion-S-Transferasen im humanen Gehirn geben immunhistochemische Arbeiten von Carder et al.,^[142] in denen Isozyme der π -Klasse an den Trennschichten der Flüssigkeitsräume festgestellt wurden. So konnten die Enzyme in der Pia Arachnoidea, dem Plexus choroideus, dem Ependym, den Astrocyten und dem vaskulären Endothel (nicht aber in Neuronen) nachgewiesen und daher unter anderem der Blut-CSF- und der Blut-Hirn-Schranke sowie der Grenzschicht zwischen Interstitium und CSF zugeordnet werden. Glutathion-S-Transferasen scheinen damit ideal plziert, um die neuronale Exposition gegenüber potentiell toxischen Substanzen aus dem Blut oder der Cerebrospinalflüssigkeit zu regulieren und einzudämmen.

3.2. Die γ -Glutamyl-Transpeptidase

Die γ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT, EC 2.3.2.2), ein integrales Membranprotein, besteht aus zwei nichtkovalent miteinander verknüpften Untereinheiten. In Prokaryonten wie auch in Säugetieren und anderen Eukaryonten ist das Enzym weit verbreitet und weist je nach Spezies Molekülmassen zwischen 68 und etwa 95 kDa auf, die auf unterschiedliche Glycosylierungsgrade zurückzuführen sind.^[146] Auch innerhalb eines Gewebes können mehrere Isoformen des Enzyms vorliegen, die sich unter anderem in ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Glycosylierungsmuster unterscheiden. In neueren Arbeiten wurde ferner eine gewebeabhängige Expression von GGT-Genen festgestellt.^[147] Die GGT ist auf der externen Seite von Zellen lokalisiert und über eine Transmembrandomäne am aminoterminalen Ende der schweren Untereinheit mit der Membran verankert.^[148] Sie katalysiert die Übertragung eines γ -Glutamylrests von einem γ -Glutamyl-Peptid oder -peptidderivat auf eine Vielzahl von Acceptoren wie Aminosäuren, Peptiden oder Wasser. Neben Glutathion, dem vermutlich wichtigsten Donor, dienen eine Vielzahl natürlicher und künstlicher γ -Glutamylverbindungen (wie S-substituierte Glutathionderivate) als Substrate.^[149–151]

Das Verhältnis der konkurrierenden Übertragungsreaktionen (Transpeptidierung, Autotranspeptidierung, Hydrolyse) zueinander hängt vom pH-Wert sowie von Art und Konzentration der Acceptorsubstrate im Medium ab. Über dieses Verhältnis unter physiologischen Bedingungen (beispielsweise im Blutplasma) liegen widersprüchliche Daten vor.^[149, 152] Wegen der zahlreichen GGT-Isoformen und deren geringer Substratspezifität sowie der Konkurrenz von Reaktionsmechanismen ist eine

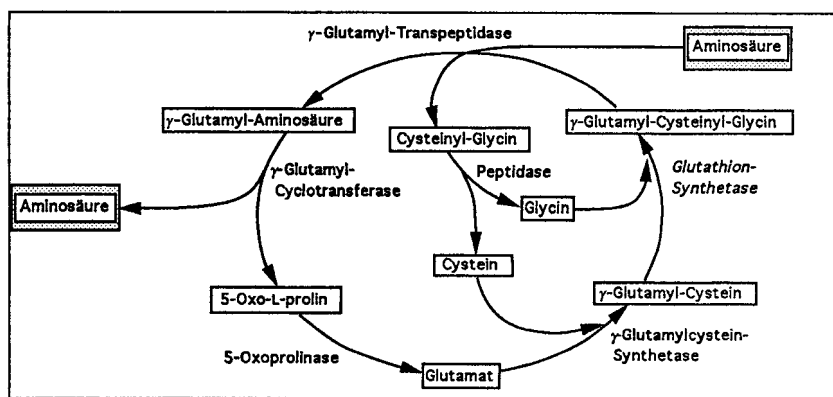


Abb. 5. Der γ -Glutamylcyclus (nach Lit. [114] verändert).

exakte Beschreibung der Funktionen der GGT in einem Gewebe schwierig. Schon früh wurde am Beispiel der Niere die Beteiligung der GGT an einem cyclischen Stoffwechselweg zur Metabolisierung von Glutathion, dem γ -Glutamylcyclus, vorgeschlagen (Abb. 5). Kontrovers diskutiert wird dieser Weg hauptsächlich bezüglich des Transports von Aminosäuren aus dem Plasma in das Cytosol.^[114] Grundlage des γ -Glutamylcyclus ist die GGT-katalysierte extrazelluläre γ -Verknüpfung von Glutamat, das aus Glutathion abgespalten wird, mit der zu transportierenden Aminosäure im Sinne einer Transpeptidierung. Intrazellulär wird dann das Addukt unter Freisetzung der Aminosäure gespalten sowie Glutathion zurückgebildet, so daß der Kreis geschlossen wird, sobald Glutathion aus dem Cytosol zum aktiven Zentrum der GGT transportiert wird.

Anhand experimenteller Befunde wurde dieses Modell bezüglich Stöchiometrie des Cyclus sowie Funktion der γ -Glutamyl-Transpeptidase variiert. So ist die GGT selbst mit Sicherheit kein Transportprotein. Auch führten Untersuchungen zur Beteiligung der γ -Glutamyl-Transpeptidase an anderen, bekannten Aminosäure-Transportsystemen zu widersprüchlichen Ergebnissen.^[153] Nach neueren Vorstellungen^[154] soll der γ -Glutamylcyclus – möglicherweise über das Zwischenprodukt Oxoprolin als sekundärer Botenstoff – den Aminosäuretransport bei hohen extrazellulären Aminosäurekonzentrationen lediglich induzieren; der Transport erfolgt dann über ein anderes System gleicher Substratspezifität.

GGT spielt außer im γ -Glutamylcyclus auch eine Rolle im Mercaptursäureweg und im Leukotrienstoffwechsel, der ein Spezialfall des Mercaptursäureweges ist (Abschnitt 4). In Säugetieren liegt die GGT in vielen Geweben wie Niere, Leber, Lunge und Gehirn, aber auch in vielen Körperflüssigkeiten vor. Besonders hohe Enzymaktivitäten wurden in Epithelzellen mit sekretorischen oder absorptiven Funktionen wie dem Bürstensaum der renalen Tubuli, der inneren Oberfläche der Gallengänge, dem intestinalen Epithel oder den Bronchiolen^[150] sowie an Organschränken nachgewiesen.^[153] Im Gehirn wurden in histochemischen und biochemischen Untersuchungen zur Verteilung der GGT in vielen Spezies regionale Heterogenitäten des Enzyms festgestellt. So wurde die GGT außer im Plexus choroideus^[155] auch im cerebralkapillären Endothel nachgewiesen und daraus eine Beteiligung an der Blut-Hirn-Schranke und am Transport von Aminosäuren durch die Barriere abgeleitet.^[156–158] Eine ähnliche Rolle könnte der GGT in Gliazellen

zukommen, wo sie möglicherweise am Entfernen von Transmittern aus dem synaptischen Spalt durch deren Transport in Gliazellen beteiligt ist.^[158] Die Expression der GGT in den Hirnkapillaren korreliert in der Maus mit der Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke und spiegelt den Differenzierungsstatus der Endothelzellen wider.^[43] Nach Wolff et al.^[159] ist die GGT-Aktivität in den Kapillaren verschiedener Bereiche des Gehirns von Rind und Ratte unterschiedlich. In Übereinstimmung mit der postulierten Beteiligung der GGT an der Blut-Hirn-Schranke wurden auch hier besonders niedrige Aktivitäten in Bereichen ohne Schrankenfunktion festgestellt.

Auf welche Art die Regulation der GGT-Aktivität in Hirnkapillaren erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt. Zellkultur-Experimente mit Hirnkapillar-Endothelzellen ergaben, daß kokultivierte Astrocyten die GGT-Expression induzieren^[160] und so einer Dedifferenzierung der sich teilenden Endothelzellen^[161] entgegenwirken. Da Astrocyten einen heterogenen Zelltyp bilden, könnte die regionale Uneinheitlichkeit der GGT-Expression auf Unterschiede in der astroglären Differenzierung und damit auf die unterschiedliche Induktion der Endothelzellen durch Astrocyten zurückzuführen sein.^[159] Die Expression möglicherweise auch anderer Eigenschaften cerebralkapillärer Endothelzellen wäre damit über die Induktion durch Astrocyten mit den Stoffwechselerfordernissen in dem jeweiligen Hirnbe- reich verknüpft.

Laut immunchemischen, histochemischen und biochemischen Untersuchungen von Frey et al.^[15] sowie von Risau et al.^[16] liegt der größere Teil der GGT-Aktivität in Hirnkapillaren allerdings nicht in Endothelzellen, sondern in den abluminal lokalisierten Pericyten vor. So war in immunfluoreszenzmarkierten Kryogewebeschnitten aus Schweinehirn eine asymmetrische Färbung längs- oder quergeschnittener Kapillaren festzustellen. Bei diesen stärker gefärbten Bereichen handelte es sich um Pericyten, wie in Zellkulturexperimenten sowie durch Elektronenmikroskopie von Hirnschnitten deutlich wurde. Die Tatsache, daß GGT ausschließlich abluminal lokalisiert ist,^[15] steht nicht im Einklang mit früheren Untersuchungen des Kleinhirns (Cerebellums).^[162] Ähnlich wie im Gewebeschnitt regionale Heterogenität vorlag, wiesen Pericyten in Kultur unterschiedliche GGT-Aktivitäten und -Färbungsintensitäten auf.^[16] Dies könnte unserer Ansicht nach sowohl auf ihre Abstammung von unterschiedlichen Subpopulationen als auch auf ein zellkulturbedingtes, teilweises Fehlen einer natürlichen Umgebung aus Endothelzellen und/oder Astrocyten zurückzuführen sein. So wurde eine höhere GGT-Expression in Pericyten mit Kontakt zu benachbarten Endothelzellen oder Pericyten festgestellt. Außerdem werden bei der Präparation cerebralvaskulärer Zellen zugleich größere Gefäße präpariert, die geringe oder keine BHS-Eigenschaften aufweisen.

Der hohe GGT-Gehalt in Pericyten, der mit dem Modell des Aminosäuretransports nur schwer vereinbar ist, könnte auf eine Schutzfunktion dieser Zellen an der Blut-Hirn-Schranke im Sinne des Mercaptursäureweges hinweisen.^[15] Das Auftreten offensichtlich hirnkapillarspezifischer Pericyten, die sich zumindest in ihrem GGT-Gehalt von den Pericyten aller anderen Gewebe unterscheiden, macht deutlich, daß über die Aufklärung der Wirkungsweisen der GGT an der Blut-Hirn-Schranke auch den dortigen Pericyten eine gesicherte Funktion zugeordnet werden könnte.

3.3. Die Cystein-S-konjugat-spezifische N-Acetyl-S-Transferase

Die für Cystein-S-Konjugate spezifische N-Acetyl-S-Transferase (NACT, EC 2.3.1.80) ist ein membranständiges Enzym, das die N-Acetylierung von Thioethern und damit den letzten Reaktionsschritt des Mercaptursäureweges katalysiert. Zwar ist dieses Enzym an der Entgiftung einer Vielzahl reaktiver Elektrophile beteiligt, doch wurde es vergleichsweise wenig untersucht. In der Ratte ist die N-Acetyl-S-Transferase hauptsächlich in Leber und Niere lokalisiert,^[121, 163] allerdings wurden geringe Enzymmengen auch im Dünndarm nachgewiesen.^[164] In der Niere, wo die höchste spezifische Aktivität gemessen wurde,^[121] wurden markante Übereinstimmungen im Verteilungsprofil der N-Acetyl-S-Transferase mit den am Mercaptursäureweg beteiligten Ektoenzymen γ -Glutamyl-Transpeptidase und Dipeptidase festgestellt.^[165] Ein wesentlicher Unterschied zu diesen Enzymen ist allerdings die für Leber und Niere nachgewiesene subzelluläre Lokalisation der N-Acetyl-S-Transferase auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums. Dies stellt vermutlich sicher, daß eine hinreichend hohe Konzentration des für die N-Acetylierung erforderlichen und ausschließlich intrazellulär vorkommenden Cofaktors Acetyl-CoA gewährleistet ist.

Durch seine Membranständigkeit und seine Substratspezifität kann das Enzym klar von anderen Acetyl-Transferasen unterschieden werden, die im Cytosol und im Kern eukaryotischer Zellen lokalisiert sind und hauptsächlich in der Leber nachgewiesen wurden. Hierzu gehören unter anderem die cytosolischen Arylamin-N-Acetyl-Transferasen (EC 2.3.1.5), die auch eine N-Hydroxyarylamin-O-Acetyl-Transferase- sowie eine Arylhydroxamsäure-N,O-Acyl-Transferase-Aktivität aufweisen, die kernständige Histon-N-Acetyl-Transferase, die lysosomalen α -Glucosaminid-N-Acetyl-Transferasen (EC 2.3.1.78) und die Serotonin-Acetyl-Transferase (EC 2.3.1.87). Die Cystein-S-Konjugat-spezifische N-Acetyl-S-Transferase akzeptiert ausschließlich S-substituierte L-Cysteine und O-substituierte Analoga (Serinderivate). Freie Aminosäuren werden nicht oder wie im Falle von Tryptophan oder unsubstituiertem L-Cystein nur in sehr geringem Umfang N-acetyliert. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Lipophilie der S-Substituenten zu. Daß das Enzym auch Leukotrien E₄ N-acetyliert, liegt zumindest für einige Spezies nahe, konnte aber in keinem Fall eindeutig nachgewiesen werden.^[166] Anhand eines Aktivitätstests^[167] konnten wir die N-Acetyl-S-Transferase im Schwein außer in Niere und Leber auch im Gehirn nachweisen. Die präparierten Hirnkapillaren sowie Plexus choroideus und die endothelzellreichen Kulturen von Hirnkapillarzellen wiesen hohe spezifische Aktivitäten auf, was eine Rolle des Enzyms in Bereichen mit Barrierenfunktionen (Blut-Hirn-Schranke, Blut-Liquor-Schranke) nahelegt.

4. Der Leukotrienstoffwechsel

Die Leukotriene sind eine erst vor rund zehn Jahren exakt beschriebene Klasse biologisch aktiver Verbindungen mit vielfachen, vom jeweiligen Organ oder Zelltyp abhängigen Wirkungen und Funktionen.^[168–170] Ihr Name ist auf ihr Vorkommen

in Leukocyten (wo sie zuerst entdeckt wurden) sowie ihre drei konjugierten Doppelbindungen (Trien) zurückzuführen. Sie leiten sich von der Arachidonsäure ab, einer mehrfach ungesättigten C_{20} -Fettsäure, deren Grundgerüst in allen Leukotrienen vorkommt. Aus der Arachidonsäure entstehen in einer Folge von enzymkatalysierten Reaktionen, die in weiten Teilen analog zu denen des Mercaptursäurewegs sind, die Leukotriene. Diese werden nach ihrer Reihenfolge von A bis F benannt; der jeweilige Index gibt die Gesamtzahl der C-C-Doppelbindungen im C_{20} -Grundgerüst an.^[169] Die Leukotriensynthese wird von dem Enzym Arachidonsäure-5-Lipoxygenase initiiert und daher häufig auch als Lipoxygenase-Stoffwechselweg bezeichnet (Abb. 6).^[170–172] Das calciumabhängige Enzym überführt die Arachidonsäure zunächst in 5-Hydroperoxyeicosatetraenoat (5-HPETE) und dieses rasch durch Reduktion in das instabile Leukotrien A_4 (LTA_4).^[173] LTA_4 kann enzymatisch durch eine Hydrolase zu Leukotrien B_4 (LTB_4) oder nichtenzymatisch zu unterschiedlichen Verbindungen hydrolysiert werden.^[174] Geht die Verbindung hingegen die Reaktionen des Mercaptursäurewegs ein, wird sie mit Glutathion konjugiert, und es entsteht das Cysteinyl-Leukotrien Leukotrien C_4 (LTC_4).^[168, 170] Anders als im Mercaptursäureweg und im Unterschied zu früheren

Auffassungen wird diese Reaktion nicht von einer Glutathion-*S*-Transferase, sondern von der mikrosomalen Leukotrien- C_4 -Synthetase, einem integralen 36kDa-Membranprotein, katalysiert.^[175, 176] Schon vor einigen Jahren wurde die LTC_4 -Synthetase von den cytosolischen und mikrosomalen Glutathion-*S*-Transferasen unterschieden;^[177] laut neueren Arbeiten bestehen deutliche Unterschiede sowohl in Nucleotid- und Aminosäuresequenz als auch in der Substratspezifität.^[178, 179] So scheint die homodimere LTC_4 -Synthetase nicht an der zellulären Entgiftung, sondern ausschließlich an der LTC_4 -Biosynthese beteiligt zu sein. LTC_4 wird aus den Zellen über einen ATP-abhängigen Leukotrien-Export-Carrier (LTEC) ausgeschleust.^[180, 181] Wahrscheinlich katalysieren die Ektoenzyme γ -Glutamyl-Transpeptidase und Dipeptidase des Mercaptursäurewegs die nun folgende sukzessive Abspaltung von γ -Glutamylrest und Glycin aus LTC_4 , wobei Leukotrien D_4 (LTD_4) bzw. Leukotrien E_4 (LTE_4) entstehen.^[168, 169] Die drei Verbindungen bilden die durch ihre Wirkung (siehe unten) seit langem bekannte „slow reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A). In Analogie zum Mercaptursäureweg kann Leukotrien E_4 dann zum biologisch weitgehend inaktiven *N*-Acetyl- LTE_4 umgesetzt werden.^[182]

Von LTE_4 , *N*-Acetyl- LTE_4 sowie von LTB_4 in Hepatocyten sind die ω -Hydroxy- und ω -Carboxyprodukte beschrieben, die durch peroxisomale β -Oxidation von ihrem ω -Ende aus abgebaut werden.^[174] Reaktionen zu anderen Produkten wie die GGT-katalysierte Bildung von LTf_4 (γ -Glutamyl- LTE_4)^[169] konnten in vitro, allerdings nicht in vivo im intakten Organismus nachgewiesen werden. Die biologisch hochaktiven Cysteinyl-Leukotriene LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 werden durch Aufnahme in die Niere und vor allem in die Leber rasch aus dem Blut entfernt, möglicherweise nach vorheriger Metabolisierung. Zur Exkretion über die Galle werden die Leukotriene und deren Folgeprodukte, die im Blut an Albumin gebunden in nanomolaren Konzentrationen vorliegen, über die basolaterale (sinusoidale) Membran in Hepatocyten aufgenommen und nach eventueller Metabolisierung über den ATP-abhängigen Leukotrien-Export-Carrier (LTEC) aus den Zellen ausgeschieden.^[98] Das beste Substrat für den LTEC in der biliären Membran ist LTC_4 , doch macht die ebenfalls hohe Affinität von LTD_4 oder auch *N*-Acetyl- LTE_4 deutlich, daß der Glutathion-Rest kein die Substratspezifität dominierendes Strukturmerkmal ist.^[98] Untersuchungen von erblichen Transportdefekten bei der Ratte ergaben, daß es trotz ähnlicher Substratspezifitäten in verschiedenen Geweben unterschiedliche LTEC geben muß.^[183, 184] Laut Konkurrenzexperimenten liegt zumindest in einem Gewebe oder Zelltyp jeweils ein gemeinsamer Carrier für alle Leukotriene vor.^[185] Diese LTEC sind dabei klar von anderen, nicht mit Leukotrienen im Zusammenhang stehenden Carriern wie dem P-Glycoprotein (siehe Abschnitt 2) oder dem kürzlich entdeckten, ebenfalls ATP-abhängigen Gallensalz-Carrier^[186] zu unterscheiden. Anhand transfizierter Zellen konnte nachgewiesen werden, daß der Leukotrientransport durch ein 190kDa-Glycoprotein erfolgt, das das Genprodukt des Multidrug-resistance-associated-protein(MRP)-Gens ist.^[187, 188]

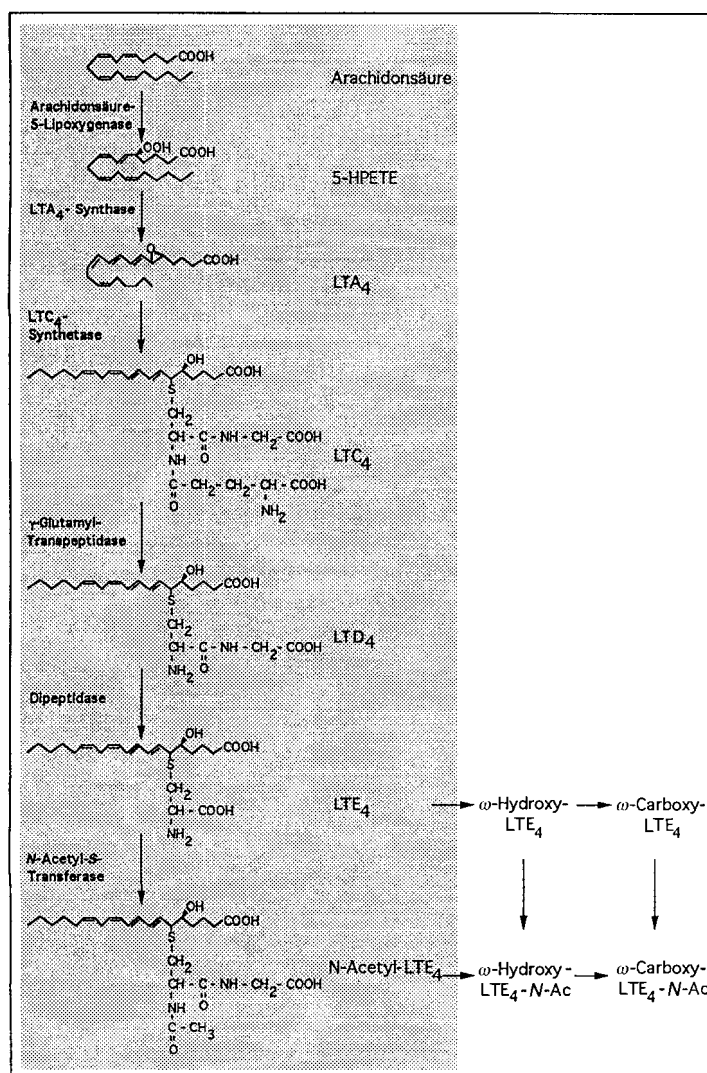


Abb. 6. Der LT-Stoffwechsel; 5-HPETE: 5-Hydroperoxyeicosatetraenoat.

Untersuchungen mit (bio-)synthetisch hergestellten Leukotrienen haben detaillierte Informationen über deren biologische Wirkungen in unterschiedlichen Geweben und Organen ergeben. So spielen Leukotriene bei der Signalübertragung zwischen Zellen, bei Entzündungen, bei Schockzuständen, bei allergischen Reaktionen, bei Gewebsschädigungen sowie beim Bronchialasthma und bei koronaren Erkrankungen als endogene Mediatoren eine wichtige Rolle. In der Lunge wirken die als SRS-A bekannten Cysteinyl-Leukotriene auf die zentralen und peripheren Atemwege als starke Konstriktoren,^[189] bewirken den Verschluss von Luftgefäßen und induzieren Schleimsekretion.^[190] Da sie insbesondere nach Eintrag von Allergenen gebildet werden, stehen sie im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen.^[191, 192] Durch ihre starke Glattmuskel-kontrahierende Aktivität^[170, 193] sind die Cysteinyl-Leukotriene wirkungsvolle Vasokonstriktoren in den Gefäßen von Herz, Lunge, Niere und anderen Geweben. Konzentrationen im unteren nanomolaren Bereich reichen für eine dosisabhängige Kontraktion von Gefäßen und insbesondere von terminalen Arteriolen und postkapillären Venolen aus; über Rezeptoren wirken die Cysteinyl-Leukotriene direkt und spezifisch auf die endotheliale Auskleidung der Gefäße. Indirekte Auswirkungen dieser Kontraktion sind beispielsweise negative inotrope Effekte im Herzen mit Verminderung des koronaren Blutflusses sowie eine verminderte glomeruläre Filtration in der Niere.^[169, 194] Vor allem folgt in zahlreichen Organen eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität unter Austritt von Plasma und Makromolekülen.^[170, 195] Das Gehirn synthetisiert ebenfalls in weiten Bereichen Leukotriene, wobei allerdings deutliche regionale Unterschiede in der Leukotrienmenge festgestellt wurden. So wird LTC₄ hauptsächlich im Hypothalamus und nur zu einem kleinen Teil in der Hirnrinde und im Kleinhirn gebildet;^[196, 197] LTC₄ wurde auch in der Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen.^[198] Der Syntheseort der Leukotriene ist nicht bekannt, vermutlich sind es die Neuronen.

Die Leukotriene im ZNS sind bei der Kontrolle neuronaler Erregung von Bedeutung, wie am Beispiel von Purkinje-Zellen des Cerebellums demonstriert werden konnte.^[199] Außerdem werden ihnen neuroendokrine Funktionen^[200] zugesprochen; so sind sie an der Freisetzung des Luteinisierungshormons aus dem Hypophysenvorderlappen der Ratte beteiligt.^[196, 201] Da nach einer cerebralen Ischämie ein erhöhter Leukotrienspiegel im Gehirn auftreten kann,^[202] wurde eine Beteiligung der Leukotriene an der Pathogenese von Hirnschäden als Konsequenz einer Ischämie vermutet.^[202, 203] Untersuchungen, ob die vaso-konstriktorische und -permeabilisierende Wirkung der Leukotriene auch in den cerebralen Kapillaren auftritt und zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke oder zu einem Hirn-ödem führt, lieferten zunächst widersprüchliche Daten. So wurde nach intraparenchymaler Injektion von LTC₄ bei Ratten tatsächlich die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht^[203, 204] und den Leukotrienen daher die Fähigkeit zur partiellen Zerstörung der Barriere zugesprochen. Für diese Wirkung waren allerdings unphysiologisch hohe Leukotrienmengen erforderlich, die die nach einer vorübergehenden Ischämie in der Hirnrinde gemessenen um Größenordnungen übertrafen. Bei niedrigeren Leukotrienkonzentrationen wurde von Mayhan et al.^[205] nur eine geringe cerebrale Vasokonstriktion und eine minimale Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke festgestellt;

in nichtcerebralen Gefäßen waren die Wirkungen der Leukotriene stärker ausgeprägt. Die Autoren schlossen ebenso wie Hsu et al.,^[206] die im Gehirn neugeborener Schweine keine Zunahme des Leukotrienspiegels bei einer vorübergehenden Ischämie feststellen konnten, die Beteiligung der Leukotriene am Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke aus. In neueren Arbeiten wird dieser scheinbare Widerspruch mit Hinweis auf die enzymatische Blut-Hirn-Schranke gelöst.^[207, 208] Die besondere Resistenz von Hirnkapillaren gegenüber der vasokonstriktorischen und -permeabilisierenden Wirkung der Leukotriene wird mit der GGT-katalysierten Metabolisierung von LTC₄ erklärt, die in Hirnkapillaren, nicht jedoch in den Blutgefäßen anderer Organe stattfindet und zum Schutz der cerebralen Kapillaren vor LTC₄ dient. Tatsächlich wurde schon in einer früheren Untersuchung die Umwandlung von LTC₄ in LTD₄ und LTE₄ in Hirnkapillaren und im Plexus choroideus nachgewiesen.^[209] Die Anfälligkeit der Hirnkapillaren gegenüber LTC₄ läßt sich folglich mit einer von Baba et al.^[207] nachgewiesenen Abnahme der GGT-Aktivität erklären, die eine Folge der cerebralen Ischämie ist. Auch im Falle von Hirntumoren wird an der GGT-defizienten Blut-Tumor-Schranke eine deutliche Wirkung von LTC₄ festgestellt.^[210]

5. Ausblick

Ein Merkmal der Blut-Hirn-Schranke ist, das sie lipophile Substanzen aus dem Blut nicht zurückhalten kann, so daß diese wegen ihrer Fettlöslichkeit die Membranen der cerebralkapillären Endothelzellen durchdringen und in das Gehirn gelangen können. Daher ist ein effektiver Rücktransport dieser Verbindungen, eventuell nach deren chemischer Modifikation, zur Vollständigung der Barrierenfunktion erforderlich. Der Nachweis von Glutathion-S-Transferasen und der γ -Glutamyl-Transpeptidase in den Astrocyten sowie der GSTs, der GGT und der *N*-Acetyl-S-Transferase im cerebralkapillären Endothel legt die Vermutung nahe, daß neben Transportsystemen wie dem P-Glycoprotein (siehe Abschnitt 2) auch der Mercaptursäureweg an der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle spielt und das Markerenzym GGT hierüber eine definierte Funktion ausübt (Abb. 7). Nach diesem Modell ist der Mercaptursäureweg Teil der enzymatischen Blut-Hirn-Schranke und schützt das ZNS und die BHS durch Metabolisierung und Transport toxischer oder in anderer Weise schädlicher Verbindungen. So werden lipophile Xenobiotika beim oder unmittelbar nach dem Durchtritt durch die BHS in den Endothelzellen oder in den Astrocyten-Endfüßchen konjugiert und abluminal durch die γ -Glutamyl-Transpeptidase und die Dipeptidase in die Cystein-S-Konjugate überführt. Der entscheidende Schritt ist die intrazelluläre *N*-Acetylierung der Konjugate zu den Mercaptursäuren, die in anderen Organen Endprodukt des Entgiftungsweges sind und für die ebenfalls ein Transportsystem beschrieben ist.

Da die Cystein-S-Konjugat-spezifische *N*-Acetyl-S-Transferase für den gesamten Stoffwechselweg repräsentativ ist, kann über dieses Enzym untersucht werden, ob der Mercaptursäureweg an der Blut-Hirn-Schranke vorliegt. Hierzu wurde in einer neueren Arbeit das Enzym erstmals vollständig gereinigt und durch Immunisierung ein polyklonales Antiserum gewonnen.^[211] Wir konnten die Cystein-S-Konjugat-spezifische *N*-

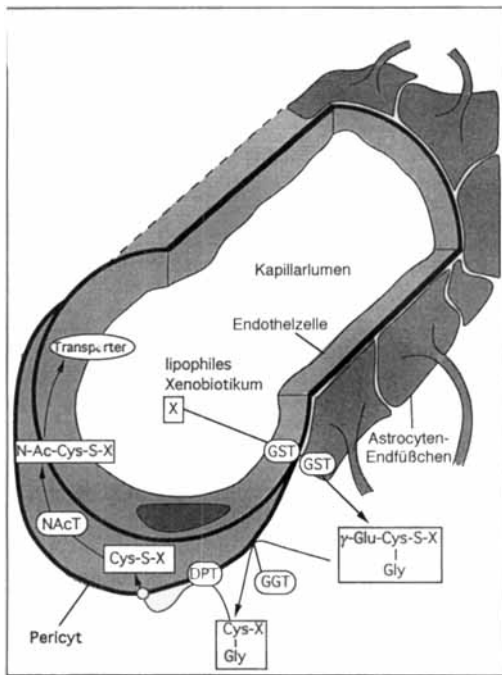


Abb. 7. Modell des Mercaptursäureweges an der Blut-Hirn-Schranke; GST: Glutathion-S-Transferase, GGT: γ -Glutamyl-Transpeptidase, DPT: Dipeptidase, NACT: *N*-Acetyl-S-Transferase.

Acetyl-S-Transferase über Immunfluoreszenz sowie anhand ihrer Aktivität spezifisch in den Kapillaren des Gehirns nachweisen. Außerdem wurden Hinweise auf einen besonders hohen Gehalt des Enzyms in Pericyten erhalten. Damit könnte dieser Zelltyp an Entgiftungswegen an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sein.

Leukotriene sind unter bestimmten Bedingungen zur partiellen Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke in der Lage. Daher müssen diese unter anderem im Gehirn synthetisierten Verbindungen unmittelbar beim Erreichen der BHS metabolisiert, biologisch inaktiviert und abtransportiert werden. Die Bedeutung der GGT-Aktivität zum Schutz der BHS vor der Wirkung der Leukotriene wurde in neueren Arbeiten belegt (siehe Abschnitt 4). Da LTD₄ jedoch in vielen Fällen eine noch höhere biologische Aktivität als LTC₄ aufweist,^[190, 212, 213] ist eine weitere Metabolisierung erforderlich. Erst mit der *N*-Acetylierung und/oder Oxidation von LTE₄ wird eine biologische Inaktivierung erreicht. Der *N*-Acetyl-S-Transferase könnte eine Schlüsselstellung beim Schutz der Blut-Hirn-Schranke vor endogenen Leukotrienen zukommen. Hierzu muß allerdings noch nachgewiesen werden, daß dieses Enzym LTE₄ *in vivo* acetyliert.

In frühen Arbeiten wurden zunächst die morphologischen Besonderheiten der cerebralen Mikrokapillaren und damit der Blut-Hirn-Schranke aufgeklärt, ehe spezifische Transport-

Anhang 1. Glossar der wichtigsten Abkürzungen und medizinischen Ausdrücke.

| | |
|--|---|
| abluminal | auf der Blut-abgewandten Seite der Mikrozirkulationsgefäße |
| Amyloide | Eiweißkörper, der durch krankhafte Prozesse im Organismus entsteht und sich im Bindegewebe der Blutgefäße abgelagert |
| Astrocyten | Gliazellen mit zahlreichen sternförmigen Fortsätzen |
| Basalmembran | Grenzschicht zwischen Epithel bzw. Endothel und Bindegewebe |
| Blut-Hirn-Schranke (BHS) | kontrolliert Übertritt von Substanzen aus dem Blut ins Gehirn |
| Blut-Liquor-Schranke | angenommenes Trennungssystem zwischen Blut und Cerebrospinalflüssigkeit |
| CD4 | Oberflächenantigen von T-Lymphozyten |
| Cerebellum | Kleinhirn |
| Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) | unter anderem im Rückenmark befindliche lymphähnliche Flüssigkeit, vom Plexus choroideus im Gehirn abgesonderte |
| Endothel | Zellschicht, die die Innenfläche der Blutgefäße auskleidet |
| Ependym | feinhäutige Zellschicht, mit der die Hirnhöhlen und der Zentralkanal des Rückenmarks ausgekleidet sind |
| Epiphyse | Zirbeldrüse |
| Gap-junctions | der metabolischen Kooperation von Zellen dienende Zellkontakte (junctions); die Plasmamembranen der beteiligten Zellen sind durch einen Abstand (gap) von ca. 2 bis 4 nm voneinander getrennt |
| Gliazellen | Bindegewebszellen des Zentralnervensystems (ZNS) |
| Homöostase | Gleichgewicht der physiologischen Körperfunktionen |
| Interstitium | nerven- und gefäßführendes Binde- oder Stützgewebe, das die Zwischenräume im Parenchym eines Organs ausfüllt oder das Parenchym umgibt |
| Ischämie | örtliche Blutleere |
| luminal | auf der Blut-zugewandten Seite der Mikrozirkulationsgefäße |
| Mikrozirkulationsgefäße | Arteriolen, Kapillaren und Venolen des kardiovaskulären Systems |
| multidrug resistance | die Mehrfachresistenz (Multidrug-Resistenz) von Tumoren gegenüber Cytostatika ist auf ein Membranprotein (P-Glycoprotein) zurückzuführen, das die eingedrungenen Zellgifte ATP-abhängig wieder nach außen transportiert |
| Parenchym | der spezifischen Funktion des Organs dienendes Organgewebe im Unterschied zum Binde- und Stützgewebe |
| Pericyten | spindelförmige Bindegewebszellen, die den Blutkapillaren außen aufliegen und sie mit langen Fortsätzen umschlingen |
| Plexus choroideus | Ependymzellgewebe, das die Hirnkammern auskleidet; Entstehungsort der CSF und Ort der Blut-Liquor-Schranke |
| Purkinje-Zelle | große Nervenzelle in der Kleinhirnrinde |
| slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) | Gemisch aus den Cystein-haltigen Leukotrienen LTC ₄ , LTD ₄ und LTE ₄ |
| Tight-junctions | Zellkontakte zwischen benachbarten Epithel- oder Endothelzellen; die Plasmamembranen verschmelzen und versiegeln den Interzellularraum |
| Transcytose | transzellulärer Transport (Aufnahme an einer Membran, Transport durch das Cytosol und Freisetzung an der gegenüber liegenden Membran), der spezifisch (über Rezeptoren) oder unspezifisch erfolgen kann |
| Vasokonstriktion | Gefäßverengung durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur |
| Vasokonstriktor | gefäßverengender Nerv |

systeme für biochemische Verbindungen nachgewiesen wurden. Die Untersuchung enzymatischer Entgiftungswege unter dem Gesichtspunkt einer unvollständigen physikalischen Barrierenfunktion fand erst später statt und vervollständigt unser Bild der enzymatischen BHS. Durch den Nachweis weiterer entgiftender Stoffwechselwege wie des Mercaptursäureweges an der Barriere wird die Komplexität der Blut-Hirn-Schranke deutlich.

Diese Arbeit wurde von der Max-Buchner-Forschungsförderung, von der Hanns-Seidel-Stiftung (Stipendien für A. A.) und vom Fonds der chemischen Industrie sowie von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Wo569/1-1 und Ga131/1-1).

Eingegangen am 21. März 1996 [A 160]

- [1] U. Albrecht, H. Seubert, H. Schwarz, W. Risau, *Brain Res.* **1990**, 535, 49–61.
- [2] W. Risau, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, 633, 405–419.
- [3] P. Ehrlich, *Eine farbenanalytische Studie*, A. Hirschwald, Berlin, **1885**, S. 69–72.
- [4] E. E. Goldmann, *Abh. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Math. Kl.* **1913**, 1, 1–60.
- [5] T. S. Reese, M. J. Karnowski, *J. Cell. Biol.* **1967**, 34, 207–217.
- [6] M. W. Brightman, T. S. Reese, *J. Cell. Biol.* **1969**, 40, 648–677.
- [7] C. Crone, S.-P. Olesen, *Brain Res.* **1982**, 241, 49–55.
- [8] P. A. Stewart, M. J. Wiley, *Dev. Biol.* **1981**, 84, 183–192.
- [9] D. Shepro, M. L. Morel, *FASEB J.* **1993**, 7, 1031–1038.
- [10] P. A. D'Amore in *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research* (Hrsg.: H. M. Piper), Springer, Berlin, **1990**, S. 299–314.
- [11] R. N. Frank, S. Dutta, M. A. Mancini, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1987**, 28, 1086–1091.
- [12] M. P. Cohen, R. N. Frank, A. A. Khalifa, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **1980**, 19, 90–94.
- [13] L. E. Stramm, W. Li, G. D. Aguirre, J. H. Rokey, *Exp. Eye Res.* **1987**, 44, 98–107.
- [14] V. Nehls, D. Drenckhahn, *Histochemistry* **1993**, 99, 1–12.
- [15] A. Frey, B. Meckelein, H. Weiler-Güttler, B. Möckel, R. Flach, H. G. Gassen, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 202, 421–429.
- [16] W. Risau, A. Dingler, U. Albrecht, M.-P. Dehouck, R. Cecchelli, *J. Neurochem.* **1992**, 58, 667–672.
- [17] D. Krause, J. Kunz, R. Dermietzel in *Frontiers in Cerebral Vascular Biology: Transport and its Regulation* (Hrsg.: L. R. Drewes, A. L. Betz), Plenum, New York, **1992**, S. 149–152.
- [18] D. J. Crocker, T. M. Murad, J. C. Geer, *Exp. Mol. Pharmacol.* **1970**, 13, 51–65.
- [19] W. M. Pardridge, *J. Neurochem. Suppl.* **1995**, 64, 76.
- [20] B. Van Deurs, *J. Ultrastruct. Res.* **1976**, 56, 65–77.
- [21] E. R. Weibel, *Microvasc. Res.* **1974**, 8, 218–235.
- [22] R. D. Broadwell, M. Salzman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 7820–7824.
- [23] C. R. Farrell, P. A. Stewart, C. L. Farrell, R. F. DelMaestro, *Anat. Rec.* **1987**, 218, 466–469.
- [24] H. K. Kimelberg, M. D. Norenberg, *Spektr. Wiss.* **1989**, 6, 52–60.
- [25] G. W. Goldstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, 529, 31–39.
- [26] M.-P. Dehouck, S. Mèresse, P. Delorme, J.-C. Fruchart, R. Cecchelli, *J. Neurochem.* **1990**, 54, 1798–1801.
- [27] F. E. Arthur, R. R. Shivers, P. D. Bowman, *Dev. Brain Res.* **1987**, 36, 155–159.
- [28] J.-H. Tao-Cheng, Z. Nagy, M. W. Brightman, *J. Neurosci.* **1987**, 7, 3293–3299.
- [29] J. Greenwood, *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **1991**, 633, 426–431.
- [30] H. Wolburg, J. Neuhaus, U. Kriesel, B. Krauss, E. M. Schmid, M. Ocalan, C. Farrell, W. Risau, *J. Cell. Sci.* **1994**, 107, 1347–1357.
- [31] A. M. Gebhart, G. W. Goldstein, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1988**, 94, 191–206.
- [32] J. Neuhaus, W. Risau, H. Wolburg, *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **1991**, 633, 578–580.
- [33] J. Meyer, J. Rauh, H.-J. Galla, *J. Neurochem.* **1991**, 57, 1971–1977.
- [34] F. Roux, O. Derieu-Trautmann, N. Chaverot, M. Claire, P. Mailly, J. M. Bourre, A. D. Strosberg, P. O. Couraud, *J. Cell Physiol.* **1994**, 159, 101–113.
- [35] W. H. Oldendorf, W. J. Brown, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1975**, 149, 736–738.
- [36] T. Samorajski, J. McLeod, *Lab. Invest.* **1961**, 10, 492–501.
- [37] S. Mori, M. Nagano, *Histochemistry* **1985**, 82, 225–231.
- [38] R. Schnabel, H.-G. Bernstein, H. Lippa, Z. Loida, A. Barth, *Neuroscience* **1992**, 47, 431–438.
- [39] B. A. Flummerfelt, P. R. Lewis, D. G. Gwyn, *Histochem. J.* **1973**, 5, 67–77.
- [40] S. Karcso, G. Jancso, L. Tóth, *Brain Res.* **1977**, 120, 146–150.
- [41] D. Z. Gerhart, L. R. Drewes, *Cell Tissue Res.* **1987**, 247, 533–536.
- [42] A. Meister, S. S. Tate, *Annu. Rev. Biochem.* **1976**, 45, 559–604.
- [43] W. Risau, R. Hallmann, U. Albrecht, *Dev. Biol.* **1986**, 117, 537–545.
- [44] M. Niemi, B. P. Setchell, *Biol. Reprod.* **1986**, 35, 385–391.
- [45] L. S. Morse, K. Steinsapir, J. Terrell, Y. Sidikaro, *Curr. Eye Res.* **1989**, 8, 1131–1140.
- [46] N. H. Sternberger, L. A. Sternberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 8169–8173.
- [47] H. Weiler-Güttler, H. Zinke, B. Möckel, A. Frey, H. G. Gassen, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1989**, 370, 467–473.
- [48] W. M. Pardridge, D. Triguero, C. L. Farrell, *Diabetes* **1990**, 39, 1040–1044.
- [49] R. Dermietzel, D. Krause, M. Kremer, C. Wang, B. Stevenson, *Dev. Dyn.* **1992**, 193, 152–163.
- [50] A. K. Kumagai, K. J. Dwyer, W. M. Pardridge, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1193, 24–30.
- [51] C. L. Farrell, W. M. Pardridge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 5779–5783.
- [52] E. M. Cornford, S. Hyman, B. E. Swartz, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1994**, 14, 106–112.
- [53] D. Krause, B. Vatter, R. Dermietzel, *Cell Tissue Res.* **1988**, 252, 543–555.
- [54] J. Kunz, D. Krause, M. Kremer, R. Dermietzel, *J. Neurochem.* **1994**, 62, 2375–2386.
- [55] K. R. Duffy, W. M. Pardridge, *Brain Res.* **1987**, 420, 32–38.
- [56] B. Dehouck, M.-P. Dehouck, J.-C. Fruchart, R. Cecchelli, *J. Cell Biol.* **1994**, 126, 465–473.
- [57] B. Schlosshauer, K.-H. Herzog, *J. Cell Biol.* **1990**, 110, 1261–1274.
- [58] B. Schlosshauer, *Development* **1991**, 113, 129–140.
- [59] H. Seubert, C. M. Unger, W. Risau, *Neurosci. Lett.* **1992**, 140, 93–97.
- [60] C. Cordon-Cardo, J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J. L. Biedler, M. R. Melamed, J. R. Bertino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 695–698.
- [61] W. A. Jefferies, M. R. Brandon, S. V. Hunt, A. F. Williams, K. C. Gatter, D. Y. Mason, *Nature* **1984**, 312, 162–163.
- [62] W. M. Pardridge, J. Yang, J. Eisenberg, L. J. Mietus, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1986**, 6, 203–211.
- [63] W. M. Pardridge, J. Yang, J. L. Buciak, R. J. Boado, *Mol. Cell. Neurosci.* **1990**, 1, 20–28.
- [64] J. B. M. M. Van Bree, A. G. De Boer, M. Danhof, D. D. Breimer, *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.* **1992**, 14, 338–348.
- [65] A. Seelig, R. Gottschlich, R. M. Devant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 68–72.
- [66] C. Crone, *J. Physiol. (London)* **1965**, 181, 103–113.
- [67] W. H. Oldendorf, *Am. J. Physiol.* **1971**, 221, 1629–1639.
- [68] W. M. Oldendorf, *Am. J. Physiol.* **1973**, 224, 1450–1453.
- [69] W. M. Pardridge, *Fed. Proc.* **1984**, 43, 201–204.
- [70] S. S. Tate, N. Yan, S. Udenfriend, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 1–5.
- [71] A. L. Betz, G. W. Goldstein, *Science* **1978**, 202, 225–227.
- [72] M. M. Sánchez del Pino, D. R. Peterson, R. A. Hawkins, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14913–14918.
- [73] J. B. M. M. Van Bree, A. G. De Boer, M. Danhof, D. D. Breimer, *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.* **1992**, 14, 305–310.
- [74] J. Stoll, K. C. Wadhvani, Q. R. Smith, *J. Neurochem.* **1993**, 60, 1956–1959.
- [75] E. M. Cornford, L. D. Braun, W. H. Oldendorf, *J. Neurochem.* **1978**, 30, 299–308.
- [76] E. M. Cornford, W. H. Oldendorf, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 394, 211–219.
- [77] R. Kannan, J. F. Kuhlkamp, E. Jeandier, H. Trinh, M. Oskhtens, N. Kaplowitz, *J. Clin. Invest.* **1990**, 85, 2009–2013.
- [78] B. V. Zlokovic, J. B. Mackic, J. G. McComb, M. H. Weiss, N. Kaplowitz, R. Kannan, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1994**, 201, 402–408.
- [79] R. Spector, *Neurochem. Res.* **1988**, 13, 785–787.
- [80] W. M. Pardridge, *Endocrinology* **1979**, 105, 605–612.
- [81] A. Dembri, C. R. Séances Soc. Biol. Ses Fil. **1981**, 181, 249–257.
- [82] W. M. Pardridge, *Endocr. Rev.* **1986**, 7, 314–330.
- [83] R. D. Broadwell, B. J. Balin, M. Salzman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 632–636.
- [84] A. K. Kumagai, J. Eisenberg, W. M. Pardridge, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 15214–15219.
- [85] W. M. Pardridge, J. L. Buciak, T. Yoshikawa, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 261, 1175–1180.
- [86] W. M. Pardridge, D. Triguero, J. Buciak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, 251, 821–826.
- [87] J. B. M. M. Van Bree, A. G. De Boer, M. Danhof, D. D. Breimer, *Pharm. World Sci.* **1993**, 15, 2–9.
- [88] M. Hiesmayr, H. Dirnberger, A. Aloy, K. Heimberger, A. Horacek, B. Branstatter, *Schweiz Med. Wochenschr.* **1987**, 117, 450–454.
- [89] E. A. Newell, M. Glasberg, E. Frenkel, P. Barnett, *Ann. Neurol.* **1983**, 14, 316–324.
- [90] N. H. Greig, S. Momma, D. J. Sweeney, Q. R. Smith, S. I. Rappoport, *Cancer Res.* **1987**, 47, 1571–1576.
- [91] M. Fresta, G. Puglisi, C. Di-Giacomo, A. Russo, *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, 46, 974–981.

- [92] W. M. Pardridge, *Peptide Drug Delivery to the Brain*, Raven, New York, **1991**, S. 189–218.
- [93] W. M. Pardridge, J. L. Buciak, P. M. Friden, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 66–70.
- [94] W. M. Pardridge, D. Triguero, J. B. Buciak, J. Yang, *J. Pharmacol. Med. Ther.* **1990**, *255*, 893–899.
- [95] U. Bickel, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, W. M. Pardridge, *Bioconjug. Chem. USA* **1994**, *5*, 119–125.
- [96] J. A. Cohn, A. P. Alvares, A. Kappas, *J. Exp. Med.* **1977**, *145*, 1607–1612.
- [97] A. Minn, J.-F. Ghersi-Egea, R. Perrin, B. Leininger, G. Siest, *Brain Res. Rev.* **1991**, *16*, 65–82.
- [98] T. Ishikawa, M. Müller, C. Klünemann, T. Schaub, D. Keppler, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 19279–19286.
- [99] R. L. Juliano, V. Ling, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152–162.
- [100] C. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, I. B. Robinson, *Cell* **1986**, *47*, 381–389.
- [101] P. Gros, J. Croop, D. Housman, *Cell* **1986**, *47*, 371–380.
- [102] K. Lewis, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 119–123.
- [103] C. K. Pearson, C. Cunningham, *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 511–516.
- [104] A. H. Schinkel, J. J. M. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. A. M. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H. P. J. te Riele, A. J. M. Berns, P. Borst, *Cell* **1994**, *77*, 491–502.
- [105] T. Tatsuda, M. Naito, K. Mikami, T. Tsuruo, *Cell Growth Differ.* **1994**, *5*, 1145–1152.
- [106] T. Ishikawa, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 463–468.
- [107] H. Sandermann, Jr., *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 82–84.
- [108] D. W. Nebert, D. R. Nelson, M. J. Coon, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, Y. Fujii-Kuriyama, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson, J. C. Loper, R. Sato, M. R. Waterman, D. J. Waxman, *DNA Cell Biol.* **1991**, *10*, 1–14.
- [109] D. R. Nelson, T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda, D. W. Nebert, *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*, 1–51.
- [110] J. F. Ghersi-Egea, A. Minn, G. Siest, *Life Sci.* **1988**, *42*, 2515–2523.
- [111] J. F. Ghersi-Egea, Y. Tayaranni, J. M. Lefauconnier, A. Minn in *Cellular and Molecular Aspects of Glucuronidation*, Vol. 173 (Hrsg.: G. Siest, J. Magdalou, B. Burchell), Colloque INSERM/John Libbey Eurotext, London, **1988**, S. 169–175.
- [112] Z. R. Chen, R. J. Irvine, F. Bochner, A. A. Somogyi, *Life Sci.* **1990**, *46*, 1067–1074.
- [113] L. H. Lash, M. W. Anders, *Rev. Biochem. Toxicol.* **1988**, *9*, 29–67.
- [114] M. Orlowski, A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *67*, 1248–1255.
- [115] J. S. Elce, *Biochem. J.* **1970**, *116*, 913–917.
- [116] M. Inoue, K. Okajima, Y. Morino, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *641*, 122–128.
- [117] A. A. Elfarra, M. W. Anders, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 3729–3732.
- [118] J. E. Bakke, J. A. Gustafsson, *Trends Pharmacol. Sci.* **1984**, 517–521.
- [119] C. A. Hinchman, H. Matsumoto, T. Simmons, N. Ballatori, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22179–22185.
- [120] M. Inoue, K. Okajima, Y. Morino, *J. Biochem. (Tokyo)* **1984**, *95*, 247–254.
- [121] R. M. Green, J. S. Elce, *Biochem. J.* **1975**, *147*, 283–289.
- [122] W. Dekant, S. Vamvakas, M. W. Anders, *Drug Metab. Rev.* **1989**, *20*, 43–83.
- [123] M. W. Anders, L. Lash, W. Dekant, A. A. Elfarra, D. R. Dohn, *Crit. Rev. Toxicol.* **1988**, *18*, 311–341.
- [124] J. Stevens, P. Hayden, G. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3325–3332.
- [125] S. B. Park, J. D. Osterloh, S. Vamvakas, M. Hashmi, M. W. Anders, J. R. Cashman, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 193–201.
- [126] J. Tateishi, S. Suzuki, H. Shimizu, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8854–8859.
- [127] J. Stevens, W. B. Jakoby, *Mol. Pharmacol.* **1983**, *23*, 761–765.
- [128] K. A. Richardson, V. T. Edwards, B. C. Jones, D. H. Hutson, *Xenobiotica* **1991**, *21*, 371–382.
- [129] W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.* **1978**, *266*, 24763–24772.
- [130] L. F. Chasseaud, *Adv. Cancer Res.* **1978**, *29*, 175–274.
- [131] B. Ketterer, T. Carne, E. Tipping in *Transport by Proteins* (Hrsg.: G. Blauer, H. Sund), Walter de Gruyter, Berlin, **1978**, S. 79–94.
- [132] I. Listowski, M. Abramovitz, H. Homma, Y. Niitsu, *Drug Metab. Rev.* **1988**, *19*, 305–318.
- [133] B. Mannervik, P. Alin, C. Guthenberg, H. Jensson, M. K. Tahir, M. Warholm, H. Jörnvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7202–7206.
- [134] D. J. Meyer, B. Coles, S. E. Pemble, K. S. Gilmore, G. M. Fraser, B. Ketterer, *Biochem. J.* **1991**, *274*, 409–414.
- [135] R. Morgenstern, C. Guthenberg, J. W. DePierre, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *128*, 243–248.
- [136] M. E. Horbach, H. Sies, T. P. M. Akerboom, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 91–96.
- [137] R. Morgenstern, J. W. DePierre in *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance* (Hrsg.: H. Sies, B. Ketterer), Academic Press, London, **1988**, S. 157–174.
- [138] E. Mosialou, G. Ekström, A. E. P. Adang, R. Morgenstern, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 1645–1651.
- [139] K. M. Metters, N. Sawyer, D. W. Nicholson, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12816–12823.
- [140] P. Reinemer, H. W. Dirr, R. Ladenstein, J. Schäffer, O. Gally, R. Huber, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1997–2005.
- [141] X. Ji, W. W. Johnson, M. A. Sesay, L. Dickert, S. M. Prasad, H. L. Ammon, R. N. Armstrong, G. L. Gilliland, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1043–1052.
- [142] P. J. Carder, R. Hume, A. A. Fryer, R. C. Strange, J. Lauder, J. E. Bells, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1990**, *16*, 293–303.
- [143] C. Theodore, S. V. Singh, T. D. Hong, Y. C. Awasthi, *Biochem. J.* **1985**, *225*, 375–382.
- [144] M. Abramovitz, I. Listowsky, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 7770–7773.
- [145] P. Zimniak, S. S. Singhal, S. K. Srivastava, S. Awasthi, R. Sharma, J. B. Hayden, Y. Awasthi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 992–1000.
- [146] S. S. Tate, V. Khadse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *141*, 1189–1194.
- [147] C. Courtay, N. Heisterkamp, G. Siest, J. Groffen, *Biochem. J.* **1994**, *297*, 503–508.
- [148] Y. Matsuda, A. Tsuji, N. Katunuma, *J. Biochem. (Tokyo)* **1983**, *93*, 1427–1433.
- [149] T. M. McIntyre, N. P. Curthoys, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6499–6504.
- [150] S. S. Tate, A. Meister, *Mol. Cell. Biochem.* **1981**, *39*, 357–368.
- [151] R. D. Allison, *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 419–437.
- [152] R. D. Allison, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2988–2992.
- [153] A. Frey in *The Blood-Brain Barrier: Cellular and Molecular Biology* (Hrsg.: W. M. Pardridge), Raven, New York, **1993**, S. 339–368.
- [154] J. R. Vina, M. Palacin, I. R. Puertes, R. Hernandez, J. Vina, *Am. J. Physiol.* **1989**, *257*, E916–E922.
- [155] S. S. Tate, L. R. Ross, A. Meister, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 1447–1449.
- [156] Z. Albert, M. Orlowski, Z. Rucidlo, J. Orlowska, *Acta Histochem.* **1966**, *25*, 312–320.
- [157] M. Orlowski, G. Sessa, J. P. Green, *Science* **1974**, *184*, 66–69.
- [158] K. L. Reichelt, E. Poulsen, *J. Neurochem.* **1992**, *59*, 500–504.
- [159] J. E. A. Wolff, L. Belloni-Olivi, J. P. Bressler, G. W. Goldstein, *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 909–915.
- [160] K. Maxwell, J. A. Berliner, P. A. Cancilla, *Brain Res.* **1987**, *410*, 309–314.
- [161] U. Mischek, J. Meyer, H.-J. Galla, *Cell Tissue Res.* **1989**, *256*, 221–226.
- [162] M. S. Ghandour, O. K. Langley, V. Varga, *Neurosci. Lett.* **1980**, *20*, 125–129.
- [163] K. Okajima, M. Inoue, Y. Morino, K. Itoh, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 281–286.
- [164] M. Inoue, K. Okajima, S. Nagase, Y. Morino, *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2145–2150.
- [165] R. P. Hughey, B. B. Rankin, J. S. Elce, N. P. Curthoys, *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *186*, 211–217.
- [166] D. Keppler, W. Hagmann, S. Rapp, C. Denzlinger, H. K. Koch, *Hepatology* **1985**, *5*, 883–891.
- [167] A. Aigner, M. Jäger, P. Weber, S. Wolf, *Anal. Biochem.* **1994**, *223*, 227–231.
- [168] S. Hammarström, *Ann. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 355–377.
- [169] B. Samuelsson, *Science* **1983**, *220*, 568–575.
- [170] B. Samuelsson, S.-E. Dahlén, J. A. Lindgren, C. A. Rouzer, C. N. Serhan, *Science* **1987**, *237*, 1171–1175.
- [171] R. A. F. Dixon, R. E. Jones, R. E. Diehl, C. D. Bennett, S. Kargmann, C. A. Rouzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 416–420.
- [172] B. Samuelsson, C. D. Funk, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19469–19472.
- [173] C. A. Rouzer, T. Matsumoto, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 857–861.
- [174] M. Huber, D. Keppler, *Glutathione Conjugation*, Academic Press, London, **1988**, S. 449–470.
- [175] D. W. Nicholson, M. W. Klemba, D. M. Rasper, K. M. Metters, R. J. Zamboni, A. W. Ford-Hutchinson, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 725–734.
- [176] J. F. Penrose, L. Gagnon, M. Goppelt-Strube, P. Myers, B. K. Lam, R. M. Jack, K. F. Austen, R. J. Soberman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11603–11606.
- [177] T. Yoshimoto, R. J. Soberman, R. A. Lewis, K. F. Austen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 8399–8403.
- [178] B. K. Lam, J. F. Penrose, G. J. Freeman, K. F. Austen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7663–7667.
- [179] D. J. Welsch, D. P. Creely, S. D. Hauser, K. M. Mathis, G. G. Krivi, P. C. Isakson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9745–9749.
- [180] T. Schaub, T. Ishikawa, D. Keppler, *FEBS Lett.* **1991**, *279*, 83–86.
- [181] D. Keppler, M. Müller, C. Klünemann, A. Guhlmann, K. Krauss, J. Müller, U. Berger, I. Leier, E. Mayatepek, *Adv. Enzyme Regul.* **1992**, *32*, 107–116.
- [182] S. Hammarström, L. Örnning, K. Bernström, B. Gustafsson, E. Norin, L. Kaijser, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **1985**, *15*, 185.
- [183] M. Huber, A. Guhlmann, P. L. M. Jansen, D. Keppler, *Hepatology* **1987**, *7*, 224–228.
- [184] P. Board, T. Nishida, Z. Gatmaitan, M. Che, I. M. Arias, *Hepatology* **1992**, *15*, 722–725.
- [185] D. Keppler in *The Liver: Biology and Pathobiology*, 3. Aufl. (Hrsg.: I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jakoby, D. A. Schachter, D. A. Shafritz), Raven, New York, **1994**, S. 1015–1029.

- [186] M. Müller, T. Ishikawa, U. Berger, C. Klünemann, L. Lucka, A. Schreyer, C. Kannicht, W. Reutter, G. Kurz, D. Keppler, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 18920–18926.
- [187] G. Jedlitschky, I. Leier, U. Buchholz, M. Center, D. Keppler, *Cancer Res.* **1994**, 54, 4833–4836.
- [188] I. Leier, G. Jedlitschky, U. Buchholz, S. P. C. Cole, R. G. Deeley, D. Keppler, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27807–27810.
- [189] J. W. Weiss, J. M. Drazen, N. Coles, *Science* **1982**, 216, 196–198.
- [190] P. J. Piper, *Physiol. Rev.* **1984**, 64, 744–776.
- [191] R. A. Lewis, K. F. Austen, R. J. Soberman, *New Engl. J. Med.* **1990**, 323, 645–655.
- [192] W. Hagmann, I. Kaiser, B. A. Jakschik, *Hepatology* **1991**, 13, 482–488.
- [193] J. M. Drazen, K. F. Austen, R. A. Lewis, D. A. Clark, G. Goto, A. Marfat, E. J. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 4354–4358.
- [194] J. A. Burke, R. Levi, Z.-G. Guo, E. J. Corey, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1982**, 221, 235–241.
- [195] M. J. Peck, P. J. Piper, T. J. Williams, *Prostaglandins* **1981**, 21, 315–321.
- [196] J. A. Lindgren, T. Hökfelt, S.-E. Dahlén, C. Patrono, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 6212–6216.
- [197] T. Miyamoto, J. A. Lindgren, B. Samuelsson, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 922, 372–378.
- [198] N. Hynes, I. Bishai, J. Lees, F. Cocceani, *Brain Res.* **1991**, 553, 4–13.
- [199] M. R. Palmer, W. R. Mathews, B. J. Hoffer, R. C. Murphy, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, 219, 91–96.
- [200] F. Dray, A. Wisner, M. C. Bommelaer-Bayet, C. Tiberghien, K. Gerozissis, M. Saadi, M. P. Junier, C. Rougeot, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, 559, 100–111.
- [201] A.-L. Hulting, J. A. Lindgren, T. Hökfelt, P. Eneroth, S. Werner, C. Patrono, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3834–3838.
- [202] M. A. Moskowitz, K. J. Kiwak, K. Hekimian, L. Levine, *Science* **1984**, 224, 886–888.
- [203] K. L. Black, *Prostaglandins Leukotrienes Med.* **1984**, 14, 339–340.
- [204] K. L. Black, J. T. Hoff, *Ann. Neurol.* **1985**, 18, 349–351.
- [205] W. G. Mayhan, G. Sahagun, R. Spector, D. D. Heistad, *Am. J. Physiol.* **1986**, 251, H471–H474.
- [206] P. Hsu, S. Zukerman, R. Mirro, W. M. Armstead, C. W. Leffer, *Prostaglandins* **1991**, 42, 557–565.
- [207] T. Baba, K. L. Black, K. Ikezaki, K. Chen, D. P. Becker, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1991**, 11, 638–643.
- [208] K. L. Black, T. Baba, W. M. Pardridge, *J. Neurosurg.* **1994**, 81, 745–751.
- [209] J. A. Lindgren, I. Karnushina, H.-E. Claesson, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, 112–120.
- [210] K. L. Black, W. A. King, K. Ikezaki, *J. Neurosurg.* **1990**, 72, 912–916.
- [211] A. Aigner, M. Jäger, R. Pasternack, P. Weber, D. Wienke, S. Wolf, *Biochem. J.* **1996**, 317, 213–218.
- [212] R. A. Lewis, K. F. Austen, J. M. Drazen, D. A. Clark, A. Marfat, E. J. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, 77, 3710–3714.
- [213] P. J. Piper, M. N. Samhoun, J. R. Tippins, T. J. Williams, M. A. Palmer, M. J. Peck in *SRS-A and Leukotrienes* (Hrsg.: P. J. Piper), Wiley, New York, **1981**, S. 81–89.

Die Stellung von Literaturverweisen

Mancher Autor hat schon sich oder uns gefragt, warum wir in der deutschen Ausgabe der *Angewandten Chemie* Hinweise auf Literaturzitate **vor** und in der englischen Ausgabe **hinter** Satzzeichen platzieren. Eine deshalb eingeleitete „Nachforschung“ hat nun ergeben, daß auch in deutschsprachigen Empfehlungen zur Gestaltung wissenschaftlicher Texte der Platzierung hinter dem Satzzeichen der Vorzug gegeben wird.^[1] Aus diesem Grund und um uns und den Autoren das Leben zu erleichtern, werden wir daher ab diesem Jahr auch in der deutschen Ausgabe die Literaturverweise **hinter** die Satzzeichen stellen. Unsere Autoren bitten wir, ab sofort bei eingereichten Manuskripten diese neue Gestaltung bereits zu berücksichtigen.

Vielen Dank

Die Redaktion

[1] *Rechtschreibung der deutschen Sprache und der Fremdwörter* (Duden Band 1), 19. Aufl., Bibliographisches Institut, Mannheim, **1986**, S. 73; H. F. Ebel, C. Bliefert, *Schreiben und Publizieren in den Naturwissenschaften*, 3. Aufl., VCH, Weinheim, **1994**, S. 227, 369.