

**Aus dem Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie  
Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**-Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Potschka-**

---

**Regulation der  
P-Glycoprotein-Expression  
im epileptischen Gehirn**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von**

**Bernadette Unkrüer**

**aus Salzkotten**

**München 2008**

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Gabius  
Univ.-Prof. Dr. Aigner  
Priv.-Doz. Dr. Kölle  
Priv.-Doz. Dr. Maierl

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

*Für meine Familie*



# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><u>LITERATURÜBERSICHT</u></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>EPILEPSIE</b>	<b>3</b>
2.1.1	DEFINITION UND BEDEUTUNG	3
<b>2.2</b>	<b>PHARMAKORESISTENZ</b>	<b>7</b>
2.2.1	DEFINITION UND BEDEUTUNG DER PHARMAKORESISTENZ	7
2.2.2	MECHANISMEN DER PHARMAKORESISTENZ	10
2.2.2.1	TARGETSTRUKTUR-VERÄNDERUNGEN (TARGETSTRUKTUR-HYPOTHESE)	11
2.2.2.2	ANFALLSINDUZIERTER ÜBEREXPRESSION VON MULTIDRUG-TRANSPORTERN (MULTIDRUG-TRANSPORTER-HYPOTHESE)	12
<b>2.3</b>	<b>REGULATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION</b>	<b>18</b>
2.3.1	NMDA-REZEPTOREN	23
2.3.2	COX-2	24
2.3.3	PGE2	26
2.3.4	TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	28
<b>3</b>	<b><u>ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG</u></b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>ANFALLSINDUZIERTER ÜBEREXPRESSION VON PGP IM HUNDEGEHIRN</b>	<b>35</b>
4.1.1	PATIENTENKOLLEKTIV	35
4.1.2	PROBENGWINNUNG UND AUFBEREITUNG	35
<b>4.2</b>	<b>EPILEPSIE-MODELL</b>	<b>37</b>
4.2.1	VERSUCHSTIERE	37
4.2.2	FRAKTIONIERTES LITHIUM-PILOCARPIN-MODELL	38
<b>4.3</b>	<b>HISTOLOGIE</b>	<b>39</b>
4.3.1	PROBENGWINNUNG UND AUFBEREITUNG: RATTENGEWEBE	39
4.3.2	PROBENGWINNUNG UND AUFBEREITUNG: HUMAN- UND PRIMATENGEWEBE	40
4.3.3	THIONIN-FÄRBUNG	41
4.3.4	IMMUNHISTOCHEMISCHE NACHWEISMETHODEN	41
<b>4.4</b>	<b>AUSWERTUNG UND STATISTIK</b>	<b>49</b>
4.4.1	AUSWERTUNGEN	49
4.4.2	QUANTIFIZIERUNG DER PGP-EXPRESSION MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE	49

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.4.3	BESTIMMUNG DER NEURONENZAHL	51
4.4.4	SCORE-SYSTEM DER YB-1 UND COX-2-EXPRESSION	52
4.4.5	DOPPELMARKIERUNGSSTUDIEN	52
4.4.6	STATISTIK	53
<b>4.5</b>	<b>VERSUCHSDESIGN</b>	<b>53</b>
4.5.1	ANFALLSINDUZIETE ÜBEREXPRESSION VON PGP IM HUNDEGEHIRN	53
4.5.2	REGULATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION	54
4.5.3	MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION MITTELS SC-51089	55
<b>5</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>ANFALLSINDUZIESTE ÜBEREXPRESSION VON PGP IM KANINEN GEHIRN</b>	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>REGULATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION</b>	<b>59</b>
5.2.1	NMDA-REZEPTOREN	61
5.2.2	COX-2	62
5.2.3	TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	64
<b>5.3</b>	<b>MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION DURCH SC-51089</b>	<b>70</b>
5.3.1	MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION	71
5.3.2	MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN NEURODEGENERATION	74
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>76</b>
<b>6.1</b>	<b>ANFALLSINDUZIESTE ÜBEREXPESSION VON PGP IM KANINEN GEHIRN</b>	<b>76</b>
<b>6.2</b>	<b>REGULATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION</b>	<b>78</b>
<b>6.3</b>	<b>MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION MITTELS SC-51089</b>	<b>86</b>
<b>6.4</b>	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b><u>LITERATURÜBERSICHT</u></b>	<b>96</b>
<b>10</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>112</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>10.1</b>	<b>IMMUNFLUORESCENZ UND MEHRFACHMARKIERUNGEN</b>	<b>112</b>
<b>10.2</b>	<b>PUFFER UND LÖSUNGEN</b>	<b>113</b>
<b>10.3</b>	<b>SUBSTANZEN</b>	<b>116</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>117</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>118</b>

---

## ABKÜRZUNGEN

A. inj.	Aqua ad injectabilia
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
AC	Adenylatcyclase
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AE	Antiepileptika (antiepileptic drugs)
AK	Antikörper
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalpropionat
Aqua. dest.	Aqua destillata
AR	Antigen-Retrieval
BCRP	Brustkrebs Resistenzprotein
biot.	biotinyliert
Bsp.	Beispiel
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA3	Cornu ammonis 3
CBZ	Carbamazepin
COX	Cyclooxygenasen
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Carbocyanin 3
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektro-Enzephalographie
EP1	Prostaglandin E <sub>2</sub> -Rezeptor-1
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
GBP	Gabapentin
GD	Gyrus Dentatus
ggr.	geringgradig
Glut-1	Glucose Transporter 1
h	Hour, Stunde
HA	Hippokampusatrophie
hgr.	hochgradig
HRP	horseradish peroxidase (Merrettichperoxidase)
HS	Hippokampussklerose
i.p.	intraperitoneal



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

IBE	Internationales Büro für Epilepsie (International Bureau for Epilepsy)
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie (International League against Epilepsy)
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
LEV	Levetiracetam
M	Molar
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MDR1	Multidrug resistance gene 1
MDT	Multidrug-Transporter
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRPs	Multidrug-assoziierte Resistenzproteine
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Tierzahl, Gruppengröße
NeuN	neural specific nuclear protein (neuronales Kernprotein)
NF-Y	nuclear factor-Y
NF-κB	nuclear factor-kappa B
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NR1	NMDA-Rezeptoruntereinheit1
NR1	Rezeptorsubunit-1
NR2	NMDA-Rezeptoruntereinheit2
NR3	NMDA-Rezeptoruntereinheit3
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika (non-steroidal antiinflammatory drugs)
OD	optische Dichte
PB	Phenobarbital
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandin F <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
Pgp	P-Glycoprotein
PHT	Phenytoin
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase-A <sub>2</sub>
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

s.o.	siehe oben
SE	Status epilepticus
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferter Natriumchloridlösung
TLE	Temporallappenepilepsie
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
$\mu$ m	Mikrometer
W	Watt
YB-1	Y-Box binding Protein 1
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid-binding protein
%	Prozent
°C	Grad Celsius

## **1 EINLEITUNG**

Epilepsien sind charakterisiert durch das wiederholte, spontane Auftreten von Krämpfen zentralen Ursprungs, wobei der Begriff zahlreiche unterschiedliche Krankheitsbilder und Syndrome umfasst. Sie stellen bei Mensch und Tier die häufigsten neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar. Weltweit sind ca. 50 Millionen Menschen und in Deutschland ca. 800.000 Menschen von Epilepsien betroffen.

Gegenwärtig ist die wichtigste Therapieform der Epilepsie nach wie vor die Pharmakotherapie. Ungeachtet einer Vielzahl neuer Antiepileptika kann jedoch bei über 30% der Menschen, aber auch der Hunde oder Katzen mit Epilepsien durch eine medikamentelle Therapie keine ausreichende Kontrolle der Anfälle herbeigeführt werden. Die Konsequenzen dieser mangelnden Therapie können sehr schwerwiegend sein. So liegt die Mortalitätsrate bei refraktären Patienten vier- bis siebenmal höher als bei sensitiven Patienten. Zusätzlich bedeutet eine unzureichende Kontrolle der epileptischen Anfallsaktivität in vielen Fällen eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität, eine Aufgabe der beruflichen Tätigkeit und der privaten Freizeitgestaltung, sowie ein Problem in der sozialen Eingliederung. In der Tiermedizin ist es sogar so, dass ein mangelnder Therapieerfolg in vielen Fällen zu einer Euthanasie des Patienten führt.

Als pharmakoresistent bezeichnet man Patienten, bei denen mindestens zwei verschiedene Antiepileptika der ersten Wahl nicht zu einer Kontrolle der Anfälle geführt haben. Im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Pharmakoresistenz werden verschiedene Thesen diskutiert. Eine, die in diesem Zusammenhang am häufigsten erwähnten Thesen, ist die Multidrug-Transporter-Hypothese. Hier wird davon ausgegangen, dass durch eine Überexpression von Effluxtransportern an der Blut-Hirn-Schranke, keine ausreichend hohen Konzentration eines Antiepileptikums im neuronalen Gewebe erreicht werden. Untersuchungen im Tiermodell und an humanem Gewebe unterstützen diese These. Sie zeigen, dass bei pharmakoresistenten Individuen eine deutlich vermehrte Expression des Multidrug-Transporters Pgp nachweisbar ist. Bisher existieren jedoch noch keine Studien darüber, ob auch bei an Epilepsie erkrankten Haustieren eine anfallsinduzierte

Überexpression von Pgp im Gehirn nachweisbar ist. Dies soll jedoch im Rahmen dieser Dissertation im kaninen Gehirn untersucht werden.

Eine wichtige Voraussetzung in der Entwicklung neuer Konzepte zur Behandlung der Erkrankung ist die weitergehende Erforschung der grundlegenden Mechanismen, die an der Überexpression der Multidrug-Transporter, sowie an der Epileptogenese (=Entstehungsprozess einer Epilepsie) beteiligt sind.

Aus diesem Grund soll in diesem Dissertationsvorhaben erfasst werden, ob und zu welchem Zeitpunkt nach einem Status epilepticus, die Transkriptionsfaktoren YB-1 und ZONAB, das Enzym COX-2, so wie NMDA-Rezeptoren in Endothelzellen des Gehirns exprimiert sind. Auf Grund von Ergebnissen verschiedener Studien aus unserer und aus anderen Arbeitsgruppen geht man davon aus, dass diese Faktoren an der anfallsinduzierten Überexpression des Multidrug-Transporters P-Glycoprotein (Pgp) beteiligt sein könnten. Einen weiteren Ansatz in der Entwicklung neuer Strategien gegen die Bildung pharmakoresistenter Epilepsien, stellt die Prüfung des EP-1-Rezeptorantagonisten SC-51089, dar. In vorausgegangenen *in vitro* Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von SC-51089 zu einer deutlichen Herunterregulierung von Pgp führt. In diesem Dissertationsvorhaben gewonnene Erkenntnisse könnten für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und für die Prophylaxe gegen eine anfallsinduzierte Überexpression von Pgp von großer Bedeutung sein.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### 2.1 EPILEPSIE

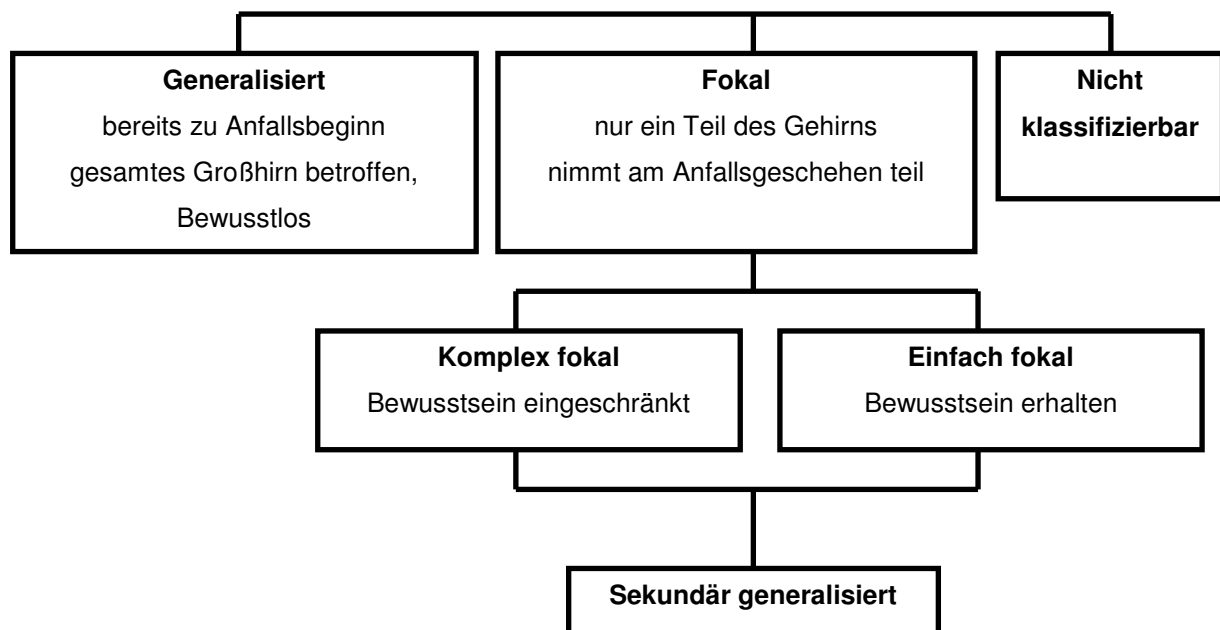
#### 2.1.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG

Epilepsien umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder und Syndrome (FRÖSCHER u. VASELLA 1994). Sie stellen bei Mensch und Tier die häufigsten chronischen neurologischen Krankheiten des zentralen Nervensystem (ZNS) dar (LOSCHER u. POTSCHKA 2002). Weltweit sind ca. 50 Millionen Menschen von Epilepsie betroffen, was ca. 1,4–5,7% der Weltbevölkerung entspricht (HAUSER et al. 1993; KWAN u. BRODIE 2006). Bei Tieren treten Epilepsien, mit ähnlicher Symptomatik wie in der Humanmedizin, vor allem beim Hund und seltener auch bei der Katze auf. Sie stellen dort, mit einer Prävalenz von 1–2%, ebenso wie in der Humanmedizin die häufigste chronische neurologische Erkrankung des ZNS dar (LÖSCHER 1994, 2003).

Der Begriff Epilepsie bezeichnet eine Störung des Gehirns, die charakterisiert ist durch eine Prädisposition wiederholt Anfälle zu entwickeln (FISHER et al. 2005). Die Internationale Liga gegen Epilepsie (International League against Epilepsy, ILAE) und das Internationale Büro für Epilepsie (International Bureau for Epilepsy, IBE) definieren Epilepsie als „eine Störung des Gehirns, die durch eine dauerhafte Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen dieses Zustands gekennzeichnet ist“ (FISHER et al. 2005). Als epileptischer Anfall wird dabei das vorübergehende Auftreten von krankhaften Befunden oder Symptomen verstanden, die sich in Folge von pathologisch exessiven oder synchronen Aktivitäten im Gehirn manifestieren (FISHER et al. 2005; ENGEL 2007). Zieht sich die Anfallsaktivität zusammen mit einer Bewusstseinsintrübung oder einem Bewusstseinsverlust über einen längeren Zeitraum hin, in dem es nicht zu einer Erholung kommt, spricht man von einem Status epilepticus (SE) (ENGEL et al. 2006).

## LITERATURÜBERSICHT

Für eine erfolgreiche Therapie ist eine exakte Klassifizierung der Epilepsie von großer Bedeutung (BROWNE u. HOLMES 2001). Diese erfolgt anhand der Merkmale Anfallsmuster, Ursache, Alter bei Krankheitsbeginn, auslösende Faktoren und elektroenzephalographische Befunde (EEG-Befunde). Anfälle können unter Beachtung der international gültigen Richtlinien in fokale (=partielle), generalisierte und unklassifizierbare Anfälle unterteilt werden (KWAN u. BRODIE 2006). Fokale Anfälle sind lokalisationsbezogen und nehmen ihren Ursprung in einer umschriebenen Gehirnregion, während generalisierte Anfälle schon zu Beginn eine epileptische Aktivität in beiden Großhirnhemisphären aufweisen (MCNAMARA 1994). Fokale Anfälle können in elementar-fokale (ohne Bewusstseinstörung), partial-fokale (Bewusstseinsbeeinträchtigung), hemilaterale und sekundär generalisierte fokale Anfälle gegliedert werden (BROWNE u. HOLMES 2001) (Abb.1). Klinisch äußern sich fokale Anfälle häufig nur in unwillkürlichen Bewegungen einzelner Muskelgruppen. Weiterhin wird differenziert nach dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein motorischer Funktionsstörungen, die entweder tonisch (Streckkrämpfe), klonisch (Ruderkrämpfe), tonisch-klonisch, atonisch (Erschlaffung der Muskulatur) oder myoklonisch (Muskelzuckungen ohne Bewegungseffekt) sein können.



**Abb.1** Einteilung epileptischer Anfälle anhand ihrer klinischen Symptome. (modifiziert nach [www.projekte.isb.bayern.de/chronischkrank/epilepsie1.html](http://www.projekte.isb.bayern.de/chronischkrank/epilepsie1.html))

Je nach Ätiologie der Erkrankung unterteilt man in symptomatische, idiopathische und kryptogene Epilepsien (KWAN u. BRODIE 2006). Bei symptomatischen Epilepsien entsteht die Erkrankung als Folge einer nachweisbaren Hirnschädigung, während idiopathische Epilepsien in den meisten Fällen genetisch bedingt sind. Von einer kryptogenen Epilepsie wird gesprochen, wenn keine Ursache für die Erkrankung erkennbar ist (KWAN u. BRODIE 2006). Die Mehrzahl der Epilepsien wird durch symptomatische Ursachen, wie z.B. ein Schädelhirntrauma, eine Enzephalitis oder einen Schlaganfall hervorgerufen. Dieser initiale Insult führt dann, im Rahmen der Entstehung der Epilepsie (=Epileptogenese), zu Veränderungen in neuronalen Schaltkreisen (MCNAMARA 1994). Die genaue pathophysiologische Kaskade, die zu einem Anfall führt, ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt. Man geht von Veränderungen an Liganden-bindenden Ionenkanälen, sowie Spannungsänderungen in Neuronen aus, die zu einer Imbalance zwischen excitatorischen und inhibitorischen neuronalen Erregungen führen (KWAN u. BRODIE 2006).

### *Temporallappenepilepsie*

Symptomatische fokale Epilepsien werden aufgrund der anatomischen Lokalisation des epileptischen Fokus in Temporallappenepilepsien, Frontal-, Parietal- und Okzipitallappenepilepsien unterteilt. Etwa 70-80% der komplex-fokalen Anfälle beginnen in den Temporallappen und dort überwiegend im Hippocampus, der Amygdala (Mandelkern) und dem parahippocampalen Cortex (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Die Entwicklung der so genannten mesialen Temporallappenepilepsie (TLE), wird häufig durch einen primären initialen Insult, wie eine Infektion, einen Tumor oder ein Schädelhirntrauma begünstigt (CHANG u. LOWENSTEIN 2003).

Bei der Krampfentstehung und -ausbreitung der TLE kommt es zu Läsionen im Hippocampus, in der Amygdala, im entorhinalen Cortex und in weiteren benachbarten Gehirnregionen (YILMAZER-HANKE et al. 2000). Die zu beobachtende Neurodegeneration tritt am massivsten im Hippocampus auf, ist aber auch im piriformen Cortex und der Amygdala beschrieben worden (YILMAZER-HANKE et al. 2000). Als Reaktion auf die entstehenden Läsionen kommt es zu

kompensatorischen Umbauprozessen, wie einer Hippocampussklerose mit einer sekundären Gliose und Moosfaser-Sprossung (DALBY u. MODY 2001). Diese plastischen Veränderungen sind die Grundlage für eine Beeinträchtigung inhibitorischer neuronaler Systeme und/oder einer überschießenden Aktivität exzitatorischer Systeme, welche das Auftreten weiterer Anfälle begünstigen. Der Prozess der kompensatorischen Umbauprozesse scheint insgesamt fortschreitend stattzufinden und rechtfertigt Überlegungen in Richtung einer neuroprotektiven Therapie.

### *Tiermodelle der TLE*

An ein Tiermodell einer Erkrankung werden verschiedene grundlegende Ansprüche gestellt. Sie sollen sowohl die Pathogenese und die Symptome einer Erkrankung widerspiegeln, als auch prädiktiv für die Wirksamkeit von neuen Arzneimitteln sein. Zur Untersuchung von Epilepsien stehen verschiedene chemisch oder elektrisch induzierte Anfallsmodelle zur Verfügung (LOSCHER 2002). Ein Modell, welches die neuropathologischen Veränderungen der TLE des Menschen nach einem SE widerspiegelt, ist das Lithium-Pilocarpin-Modell (TURSKI et al. 1983; CLIFFORD et al. 1987). Durch eine systemische Gabe des Parasympathomimetikums Pilocarpin wird, resultierend aus einer Aktivierung des cholinergen Systems, ein SE ausgelöst (CLIFFORD et al. 1987). Eine Lithiumgabe vor der Pilocarpininjektion potenziert diese Wirkung dabei um ein Vielfaches (HONCHAR et al. 1983). Durch den Anfall wird Glutamat freigesetzt, was zu neuropathologischen Veränderungen führt, die mit denen der humanen TLE vergleichbar sind. Dazu gehören z.B. die massiven Neuronenverluste, die bei der TLE des Menschen nachweisbar sind (CLIFFORD et al. 1987). Auch die daraus resultierenden elektrographischen, klinischen und pharmakologischen Befunde sind mit denen einer TLE vergleichbar (TURSKI et al. 1983; CLIFFORD et al. 1987; LOSCHER 2002). Auf Grund der relativ hohen Mortalitätsrate im Lithium-Pilocarpin-Modell wurde von Glien et al. (2001) ein fraktioniertes Lithium-Pilocarpin-Modell entwickelt (GLIEN et al. 2001). In diesem Modell wird den Tieren durch eine fraktionierte Verabreichung des Pilocarpins, in einem halbstündigen Rhythmus, lediglich die individuell zur Auslösung eines SE benötigte Menge, verabreicht. Die aus diesem Modell resultierenden Anfälle unterscheiden sich, sowohl in der Art der Ausprägung als auch in der Anfallsfrequenz,



nicht von denen des herkömmlichen Lithium-Pilocarpin-Modells. Das Modell zeichnet sich jedoch durch eine signifikant niedrigere Mortalitätsrate aus (GLIEN et al. 2001).

## 2.2 PHARMAKORESISTENZ

### 2.2.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG DER PHARMAKORESISTENZ

Zum jetzigen Zeitpunkt besteht die Epilepsiebehandlung darin, eine Unterdrückung bzw. eine Kontrolle der klinischen Symptome zu erzielen. Dies erfolgt im allgemeinen durch eine chronische Behandlung mit antikonvulsiv wirksamen Medikamenten (Antiepileptika, antiepileptic drugs, AE) (LOSCHER u. POTSCHKA 2002). Eine Epilepsitherapie im Sinne einer Heilung ist bisher noch nicht möglich (LOSCHER u. POTSCHKA 2002).

In der Humanmedizin stehen derzeit mehr als 20 verschiedene AE mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung. Je nach Klassifikation der zu Grunde liegenden Epilepsie werden unterschiedliche Wirkstoffe zur Behandlung ausgewählt. Carbamazepin (CBZ) gilt dabei z.B. als Mittel der Wahl bei fokalen oder sekundär generalisierenden Anfällen, während Valproinsäure eher bei der Dauerbehandlung primär generalisierter Anfälle bevorzugt wird (POHLMANN-EDEN u. STEINHOFF 2006). Als weitere klassische AE der ersten Generation sind neben CBZ z.B. Phenytoin (PHT) oder Phenobarbital (PB) zu nennen. Zu den bekannten AE der zweiten Generation zählen z.B. Levetiracetam (LEV), Vigabatrin oder Lamotrigin (LTG). Die meisten der bekannten AE wirken über eine Aktivierung von GABA-Rezeptoren oder durch eine Hemmung von Natrium- oder Calcium-Ionenkanälen (KWAN u. BRODIE 2006).

In der Tiermedizin ist trotz einer Vielzahl von neuen Medikamenten, die in der Humanmedizin schon verwendet werden, das Mittel der ersten Wahl nach wie vor PB. Unterschiede in der Pharmakokinetik von Menschen und kleinen Haustieren sind dafür verantwortlich, dass viele der neueren humanmedizinischen AE beim Hund eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen und dementsprechend nicht zur

## LITERATURÜBERSICHT

---

Langzeitbehandlung geeignet sind. Eine ausreichend lange Eliminationshalbwertszeit bei Hund und Katze und daraus resultierend eine ausreichend lange Aufrechterhaltung eines therapeutischen Plasmaspiegels, besitzen von den zur Zeit zugelassenen AE lediglich PB, Primidon, Bromidsalz, Felbamat und Zonisamid (LÖSCHER 2003). Bei dieser Aufzählung sollte jedoch beachtet werden, dass Primidon im Organismus vom Hund zu PB verstoffwechselt wird und aus diesem Grund in der Klinik obsolet ist, da es gegenüber PB keine Vorteile besitzt (SCHWARTZ-PORSCHKE et al. 1985). Alle weiteren Wirkstoffe werden relativ schnell abgebaut und erfordern vom Besitzer ein häufig nicht zu praktizierendes Behandlungsintervall. Dennoch in der Tiermedizin eingesetzte AE mit einem relativ kurzen Behandlungsintervall sind z.B. LEV und GBP.

Trotz einer optimalen Dosierung eines angemessenen AE sprechen jedoch ca. ein Drittel der zu behandelnden epileptischen Tiere und Menschen nur unvollständig oder gar nicht auf eine Therapie an (REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2002; LOSCHER u. POTSCHKA 2002; LÖSCHER 2003). Obwohl der Begriff „pharmakoresistent“ bisher noch nicht einheitlich definiert wurde, bezeichnen die meisten Kliniker einen Patienten als pharmakoresistent, wenn mindestens zwei verschiedene Antiepileptika der ersten Wahl in maximal toleranter Dosierung nicht zu einem Therapieerfolg geführt haben (LOSCHER u. POTSCHKA 2002). Unter einem Therapieerfolg versteht man dabei eine Anfallsfreiheit oder eine mindestens 50%ige Reduktion der Anfälle (REGESTA u. TANGANELLI 1999).

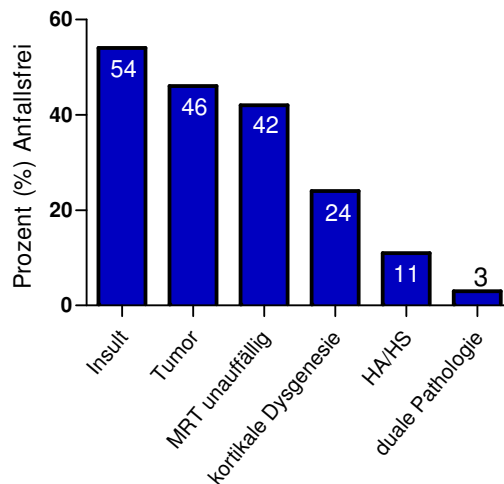
Es existieren einige Faktoren, welche als Basis für eine Prognose einer Resistenzentwicklung herangezogen werden können (REGESTA u. TANGANELLI 1999). Zu diesen Faktoren zählen unter anderem ein früher Beginn der Anfälle im ersten Lebensjahr, die Ätiologie (Abb.2), ein langer Zeitraum mit Anfällen, sowie eine hohe Anfallsfrequenz vor einer Behandlung, aber auch der Anfallstyp und die im EEG zu beobachtenden Abnormalitäten.

Die Konsequenzen einer Pharmakoresistenz können sehr schwerwiegend sein. So liegt die Mortalitätsrate bei refraktären Patienten vier bis sieben mal höher als bei sensitiven Patienten (SPERLING 2004). Zusätzlich bedeutet eine unzureichende

## LITERATURÜBERSICHT

Kontrolle der epileptischen Anfallsaktivität in vielen Fällen auch eine starke Einschränkung der Lebensqualität, sowie ein Problem in der sozialen Eingliederung.

Anfallskontrolle in Abhängigkeit von der Ätiologie



**Abb.2 Medikamentelle Anfallskontrolle in Abhängigkeit von der Ätiologie der Epilepsie. Die Prognose hängt dabei entscheidend von der Ätiologie der Erkrankung ab, was die Bedeutung einer möglichst exakten diagnostischen Abklärung unterstreicht. (modifiziert nach [www.medizin-medien.info/mm/mm005/abb1\\_2\\_epanfall.jpg](http://www.medizin-medien.info/mm/mm005/abb1_2_epanfall.jpg))**

In der Veterinärmedizin konnten in zwei prospektiven Studien, in denen die Wirkung von PB und Primidon in der Dauertherapie der Epilepsie beim Hund geprüft wurde (SCHWARTZ-PORSCHÉ et al. 1985), festgestellt werden, dass ähnlich wie in der Humanmedizin zwischen 20–40 % der Tiere pharmakoresistent sind (LÖSCHER 2003). Bei einigen der Tiere konnte durch eine zusätzliche Therapie mit Kaliumbromid eine Anfallsfreiheit erzielt werden (TREPANIÉ et al. 1998). Lässt sich jedoch auch durch eine Kombinationstherapie keine Reduktion der Anfallsfrequenz erreichen, werden viele dieser Tiere euthanasiert (LÖSCHER 2003).

Die Epilepsieform, die beim erwachsenen Humanpatienten, mit 70-80% der Patienten die nicht auf eine medikamentelle Therapie ansprechen, am häufigsten als pharmakoresistent eingestuft wird, ist die TLE mit komplex fokalen Anfällen (LEPPIK 1992). Häufig kann bei diesen Patienten auch durch einen chirurgischen Eingriff, bei

## LITERATURÜBERSICHT

---

dem der epileptische Fokus entfernt wird, eine Anfallsfreiheit lediglich im Zusammenspiel mit einer weiteren Pharmakotherapie erreicht werden (LOSCHER u. SCHMIDT 2002). Eine solche Entfernung des epileptischen Fokus ist jedoch nur in den Fällen möglich, in denen sich ein eindeutiger Bereich im Gehirngewebe als Ursprung der Anfälle abgrenzen lässt (FOLDVARY et al. 2001). Das nach einer Entfernung des epileptischen Fokus trotzdem in den meisten Fällen eine Pharmakotherapie notwendig ist, lässt auf die Hypothese schließen, dass nicht das komplette epileptische Netzwerk entfernt werden konnte, sondern nur der Teil, der für die Pharmakoresistenz verantwortlich war (COULTER et al. 2002).

Je nach Ätiologie oder Form der Epilepsie sind in der Humanmedizin noch weitere mögliche alternative pharmakologische Therapieansätze als Ergänzung zu den eigentlichen Mono- oder Kombinationstherapien mit AEs bekannt. So hat sich z.B. gezeigt, dass bei epilepsiekranken Kindern mit Heuschnupfen eine Injektion mit Immunglobulinen zu einer Verbesserung des Anfallsleidens führt oder dass bei Patienten, die am West-Syndrom erkrankt sind, eine Behandlung mit ACTH (adrenocorticotropes Hormon) eine Reduktion des Anfallsleidens hervorruft. Eine besonders gut bei 1-10 Jahre alten Kindern mit myoklonischen und atonischen Anfällen geeignete Form der erweiternden Therapie ist die ketogene Diät, bei der sehr hohe Fett- und sehr geringe Kohlenhydrat- oder Eiweißanteile zu sich genommen werden (KWAN u. BRODIE 2006). Weitere in der Humanmedizin etablierte Therapien sind z.B die Vagusnervstimulation oder die transkranielle Magnetstimulation (KWAN u. BRODIE 2006), die aber in der Veterinärmedizin bisher noch keine Verwendung finden.

### 2.2.2 MECHANISMEN DER PHARMAKORESISTENZ

Die Mechanismen der Pharmakoresistenz stellen eine große Hürde in der Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen, wie Gehirntumoren, Epilepsie, Schizophrenie, Depressionen und Infektionen des Gehirns, dar (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b). Die Ursachen der Pharmakoresistenz sind jedoch trotz eines verbesserten Verständnisses der Ätiologie und Pathogenese von Anfällen und Epileptogenese noch weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass es sich um einen multifaktoriellen

Prozess handelt (REGESTA u. TANGANELLI 1999; LOSCHER u. POTSCHKA 2002). Zum jetzigen Zeitpunkt geht man von drei unterschiedlichen Mechanismen aus, die an der Behandlungsresistenz beteiligt sein können. Zum einen, die direkten Genomvariationen der einzelnen Patienten, welche bei gleicher Epilepsieform eine unterschiedliche Antwort auf ein Medikament erklären würden (LOSCHER u. POTSCHKA 2002). Diese These würde eine Erklärung für einige schwerbehandelbare epileptische Syndrome mit genetischem Hintergrund, die schon von Beginn einer Therapie an nicht, oder nur unzureichend auf ein AE reagieren, liefern. Als weiterer Mechanismus werden erkrankungsbezogene Veränderungen und daraus entstehende strukturelle Modifikationen im Gehirn angesehen, die aus der unterschiedlichen Ätiologie und dem individuellen Verlauf der jeweiligen Erkrankung resultieren. Bei diesen strukturellen Veränderungen handelt es sich nicht nur um neurodegenerative Veränderungen im epileptischen Fokus, sowie abnormale neuronale Verknüpfungen (COULTER 2001), sondern auch um Veränderungen an pharmakologischen Angriffspunkten („Targets“), die zu einer veränderten Sensitivität gegenüber einem AE führen (REGESTA u. TANGANELLI 1999; LOSCHER u. POTSCHKA 2002; REMY et al. 2003).

Unter die dritte Kategorie fallen dann die vom verwendeten Arzneimittel selbst hervorgerufenen Abweichungen (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b). Diese können dazu führen, dass sich im Laufe des Therapiezeitraumes eine Toleranz gegenüber dem verabreichten AE entwickelt.

### 2.2.2.1 TARGETSTRUKTUR-VERÄNDERUNGEN (TARGETSTRUKTUR-HYPOTHESE)

Die meisten in der Epilepsitherapie verwendeten AE nehmen Einfluss auf spannungsabhängige Ionenkanäle oder wirken über eine Beeinflussung von Rezeptoren der Neurotransmitter (STEFAN et al. 2006). Diese pharmakologischen Targets bestehen aus verschiedenen Proteinuntereinheiten, welche ihnen ihre spezifischen physiologischen Eigenschaften geben. Es sind verschiedene Hinweise dazu bekannt, dass wiederholte Anfälle zu Veränderungen und funktionellen Umstrukturierungen an den Proteinuntereinheiten dieser Targets führen können. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Fähigkeit von CBZ, spannungsabhängige

Natriumkanäle zu blockieren, in hippocampalen Neuronen von CBZ resistenten Epilepsiepatienten vollständig verloren geht (RECKZIEGEL et al. 1999; REMY et al. 2003). Außerdem konnten verschiedene Veränderungen in der Zusammensetzung und der Verteilung von GABA<sub>A</sub>- und Glutamat-Rezeptoren im epileptischen Gewebe festgestellt werden (KWAN u. BRODIE 2002). Pirker et al. (2003) wiesen z.B. Veränderungen an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten im Hippocampus von Patienten mit TLE nach (PIRKER et al. 2003). Ferner konnten Furtinger et al. (2003) zeigen, dass es zu einer erhöhten Expression von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren im Hippocampus von Patienten mit TLE kommt (FURTINGER et al. 2003).

Bei pharmakoresistenten Patienten wird dementsprechend davon ausgegangen, dass das Pharmakon durch eine Veränderung der Zielstruktur nicht mehr die volle, oder gar keine Wirkung entfalten kann. Gegen eine Targetstrukturveränderung als Mechanismus der Pharmkoresistenz spricht jedoch, dass die meisten pharmakoresistenten Patienten eine Pharamakoresistenz gegenüber mehreren, wenn nicht sogar allen AE zeigen (REGESTA u. TANGANELLI 1999). Es ist sogar so, dass Patienten, die auf eine Monotherapie mit einem AE nicht ansprechen, eine nur 13%ige Chance haben, ihre Anfälle mit einem weiteren AE unter Kontrolle zu bringen. Dieses trifft ebenfalls zu, wenn ein AE mit einem völlig anderen Wirkungsmechanismus verwendet wird (BRODIE u. KWAN 2002). Diese Tatsache spricht gegen epilepsieinduzierte Veränderungen in speziellen Zielstrukturen der AE als Hauptursache für pharmakoresistente Epilepsien. Vielmehr scheinen unspezifische und adaptive Mechanismen, wie eine verminderte Aufnahme von AE durch eine anfallsinduzierte Überexpression von Multidrug-Transportern in der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle zu spielen (LOSCHER u. POTSCHKA 2002).

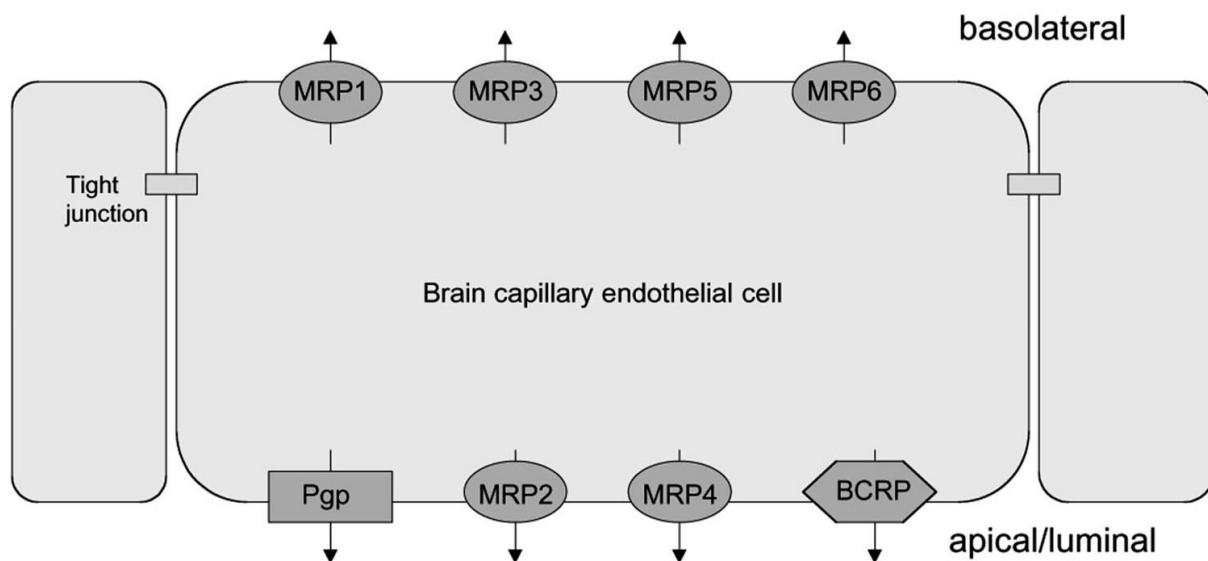
### 2.2.2.2 ANFALLSINDUZIERTER ÜBEREXPRESSION VON MULTIDRUG-TRANSPORTERN (MULTIDRUG-TRANSPORTER-HYPOTHESE)

Multidrug-Transporter werden von allen Zellen des Körpers exprimiert, um sie vor endogenen oder exogenen toxischen Substanzen zu schützen (SCHINKEL u. JONKER 2003). Anhand Sequenzanalysen des menschlichen Genoms wird im Moment davon ausgegangen, dass zwischen 500 und 1200 Gene Arzneimittel-

## LITERATURÜBERSICHT

Transporter kodieren (SAKAEDA et al. 2004). Die meisten Multidrug-Transporter gehören zur Familie der „ATP-binding cassette (ABC) Superfamilie“. Sie bestehen aus zwei hydrophoben Transmembrandomänen und zwei ATP-bindenden Domänen, die im Cytoplasma lokalisiert sind (LITMAN et al. 2001).

Als erster Multidrug-Transporter wurde im Rahmen der Krebsforschung Ende der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts P-Glycoprotein (Pgp) entdeckt (JULIANO u. LING 1976). Neben Pgp sind auch die Familie der Multidrug-assoziierten Resistenzproteine (MRPs) und das Brustkrebs Resistenzprotein (BCRP) an der Regulation der Aufnahme und Ausschleusung von Arzneimitteln und anderen Substanzen involviert (Abb.3) (LOSCHER u. POTSCHKA 2005a). Die verschiedenen MRPs wirken hauptsächlich als Transporter von organischen konjugierten Anionen und neutralen organischen Substanzen, wohingegen Pgp hauptsächlich unkonjugierte, kationische Substanzen transportiert (HAIMEUR et al. 2004).



**Abb.3 Lokalisation einiger ausgewählter Arzneimitteltransporter in den Epithelzellen der Blut-Gehirn-Schranke. Nur Transporter die an der apikalen/luminalen Seite der Kapillarendothelzellen exprimiert sind, können die Aufnahme von Xenobiotika in das Gehirn beschränken (LOSCHER u. POTSCHKA 2005a).**

## LITERATURÜBERSICHT

---

Pgp wird beim Menschen und beim Hund vom Multidrug resistance gene 1 (MDR1) kodiert, während es bei Nagern von den Isoformen mdr 1a oder mdr 1b kodiert wird. Es fungiert als Transporter für eine große Anzahl von unterschiedlichen Substanzen, zu denen unter anderem auch viele AE gehören. Als Resultat seiner anatomischen Lokalisation als transmembranelle Effluxpumpe, arbeitet Pgp auf unterschiedliche Art und Weise. Durch seine Expression an der luminalen Darmseite, limitiert es die Arzneimittelaufnahmen nach oraler Applikation. Außerdem befördert es bereits in den Blutkreislauf eingedrungene Arzneimittel, durch Expression an den Kanälen der Leber und der Niere, in die Galle oder den Urin. Pgp schützt empfindliche Gewebe, wie z.B. das Gehirn, in dem es die Aufnahme von Xenobiotika aus dem Blutkreislauf in das jeweilige Gewebe verhindert bzw. verringert (SCHINKEL 1997; FROMM 2004), was für den Mechanismus der Pharmakoresistenz im Bereich von Epilepsien und anderen Gehirnerkrankungen von entscheidender Bedeutung ist.

Um im Gehirn eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration zu erlangen, müssen AE die Blut-Hirn- und die Blut-Liquor-Schranke passieren. Die Blut-Hirn-Schranke stellt dabei eine strikte physiologische Barriere zwischen dem Gehirn und dem systemischen Blutkreislauf dar (PARDRIDGE 1999). Sie besteht aus kapillären Endothelzellen, welche über tight-junctions miteinander verbunden sind (LOSCHER u. POTSCHKA 2005a; ABBOTT et al. 2006). Die Kapillarendothelzellen des Gehirns sind zusätzlich von einer Basalmembran, von Perizyten und von astrozytären perivaskulären Endfüßchen umgeben (LOSCHER u. POTSCHKA 2005a; PARDRIDGE 2005). Durch diese Verbindung und eine relativ geringe Ausprägung von Pinozytischen Transportvesikeln ist die Aufnahme von Substanzen in das Gehirn stark eingeschränkt (LOSCHER u. POTSCHKA 2005a). Im Allgemeinen ähnelt der Aufbau der Blut-Hirn-Schranke dem einer Phospholipidmembran, durch die nur lipophile Moleküle relativ leicht per Diffusion oder carriervermittelten Transport in das Gehirngewebe gelangen können (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b).

Pgp wurde an der Blut-Hirn-Schranke sowohl an der luminalen Membran der Kapillaren beschrieben (LOSCHER u. POTSCHKA 2005b), wie auch in den Endfüßen der Astrozyten (PARDRIDGE et al. 1997). Die vorherrschende Meinung ist jedoch, dass Pgp an der luminalen / apikalen Membran der Endothelzellen lokalisiert ist (SCHINKEL 1999; LOSCHER u. POTSCHKA 2005a). Durch eine Hydrolyse von ATP kann es seine Substrate auch entgegen eines hohen Konzentrationsgradienten



## LITERATURÜBERSICHT

transportieren (LITMAN et al. 2001) und verhindert dadurch aktiv eine Akkumulation lipophiler Substanzen, zu denen auch verschiedene AEs gehören, im Gehirnparenchym. Durch diesen auswärtsgerichteten Arzneimitteltransport kann es dann, trotz ausreichender Wirkstoffkonzentration des AEs im Blut, nicht zu einer genügenden Ansammlung im Gehirnparenchym kommen.

Die physiologische Schutzfunktion von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke wird bei einigen Hunderassen (Collie, American Shepard), die einen genetischen Defekt des MDR-1 Gens aufweisen, deutlich. Bei ihnen kommt es durch eine mangelnde Ausprägung des Multidrug-Transporters zu einer Ivermectin-Überempfindlichkeit mit Symptomen einer Neurotoxizität (MEALEY et al. 2001). Auch in einer Studie mit Pgp Knockout-Mäusen konnte belegt werden, dass diese Mäuse eine deutlich erhöhte Aufnahme von lipophilen Stoffen ins Gehirn zeigen (SCHINKEL et al. 1995).

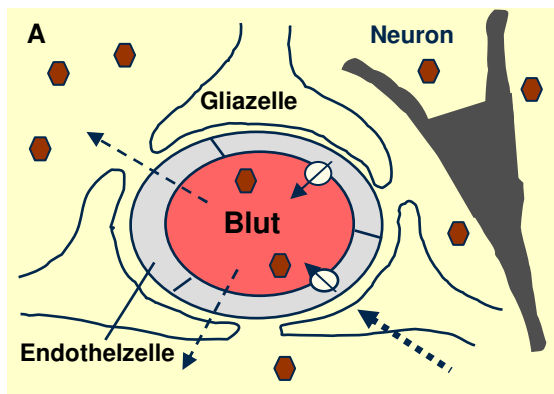
AE	<i>in vitro</i> (Zellkultur)		<i>in vivo</i>			Quelle
	Humanes Pgp	Nager Pgp	Mikrodialyse (Nager)	KO-Mäuse	Humanpatient	
Phenytoin	+	+	+	(+)	?	((POTSCHKA u. LOSCHER 2001; RIZZI et al. 2002; CUCULLO et al. 2007)
Carbamazepin	?	-	+	(+)	?	(POTSCHKA et al. 2001; POTSCHKA u. LOSCHER 2001; SILLS et al. 2002)
Oxcarbazepin	?		+	?	+	(CLINCKERS et al. 2005; MARCHI et al. 2005)
Levetiracetam	?	?	-	?	?	(POTSCHKA et al. 2004)
Phenobarbital	?	?	+	?	?	(POTSCHKA et al. 2002)
Felbamat	?	?	+	?	?	(POTSCHKA et al. 2002)
Lamotrigin	?	?	+	?	?	(POTSCHKA et al. 2002)
Topiramamat	?	?	?	?	?	(SILLS et al. 2002)

**Tab.1 Antiepileptika die als Substrate von Pgp nachgewiesen werden konnten. Es sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Daten dargestellt. + = Nachweis erfolgt; (+) = Datenlage nicht eindeutig; ? = Ergebnisse nicht eindeutig; - = kein Nachweis**

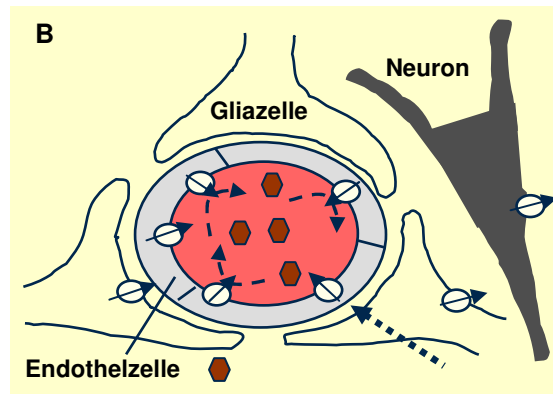
## LITERATURÜBERSICHT

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass viele der zu Epilepsiebehandlung verwendeten AE sowohl Substrate von Pgp als auch von MRPs sind (Tab.1). Man geht jedoch davon aus, dass AE relativ schwache Pgp Substrate sind, da bevorzugt transportierte Substanzen, wie beispielsweise Ivermectin, nahezu gar nicht in das Gehirn gelangen (SCHINKEL 1999). Aus diesem Grund kommt es auch erst bei einer Überexpression von Multidrug-Transportern zu einer funktionellen Auswirkung auf die Wirkstoffkonzentration im Gehirn. (Abb.4)

A: Expression von MDT (normal)



B: Überexpression von MDT



● = Antiepileptikum

⊖ = Multidrug-Transporter (MDT)

Abb.4 Schematische Darstellung der Expression von Multidrug-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke (LOSCHER u. POTSCHKA 2002, 2005c). Abb.A zeigt die Expression von Multidrug-Transportern unter physiologischen Bedingungen, unter denen eine ausreichende Menge eines lipophilen AE durch die Blut-Hirn-Schranke diffundieren kann. In Abb.B dagegen ist eine Überexpression von MDT im epileptischen Fokus dargestellt. Durch die vermehrte Expression von MDT werden die AE bei Übertritt durch die Endothelzellen abgefangen und aktiv gefäßlumenwärts transportiert, so dass keine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Parenchym des Gehirns erreicht werden kann.

Tishler et al. (1995) beschrieben erstmalig eine vermehrte Expression des MDR1-Gens und anderer Multidrug-Transporter-Gene bei pharmakoresistenten, zumeist an Temporallappenepilepsie erkrankten Patienten (TISHLER et al. 1995). Sisodiya et al.

(2002) berichteten zudem von einer Überexpression von Pgp in Gliazellen von Gehirngewebe bei Patienten mit Missbildungen des corticalen Aufbaus, die häufig assoziiert waren mit resistenten Epilepsien (TISHLER et al. 1995; SISODIYA et al. 2002). In weitergehenden Studien wurde auch eine Überexpression von MRP1 in dysplastischen Neuronen, Gliazellen und in Gefäßzellen von intraoperativ entnommenem humanem Gehirngewebe von Patienten mit fokaler corticaler Dysplasie und daraus resultierender refraktärer Epilepsie, nachgewiesen (SISODIYA et al. 2002). Auch Lazarowski et al. (2004) beschrieben eine Überexpression von Pgp im chirurgisch entnommenen Gehirngewebe eines an pharmakoresistenter Epilepsie erkrankten Jungen (LAZAROWSKI et al. 2004).

In Studien der Temporallappenepilepsie an Tiermodellen konnte ebenfalls eine vermehrte Expression von Pgp und MRP in den Endothelzellen und Astrozyten der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (LOSCHER u. POTSCHKA 2002, 2005b). Die Pgp-Expression war dabei nicht nur auf die Endothelzellen und perivaskulären Astrozyten beschränkt, sondern konnte auch in Neuronen nachgewiesen werden. Bisher existieren jedoch noch keine Studien darüber, ob es auch bei an Epilepsie erkrankten Haustieren zu einer anfallsinduzierten Überexpression von Pgp im Gehirn kommt.

In Modellen pharmakoresistenter Epilepsien konnte gezeigt werden, dass durch eine Hemmung von Pgp und MRP die Aufnahme von AE in das Gehirn deutlich gesteigert werden kann (LOSCHER u. POTSCHKA 2002, 2005b). Durch den selektiven Pgp-Hemmer Tariquidar konnte z.B. in Kombination mit dem antikonvulsiv wirksamen PB eine deutliche Reduktion bis hin zu einer Anfallsfreiheit bei pharmakoresistenten Tieren erreicht werden (BRANDT et al. 2006; VAN VLIET et al. 2006).

Zum jetzigen Zeitpunkt wird angenommen, dass die vermehrte Expression von Multidrug-Transportern durch den Ablauf eines oder mehrerer epileptischer Anfälle hervorgerufen wird, wobei die genauen an der Überexpression beteiligten Mechanismen noch unklar sind.

### 2.3 REGULATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP- ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION

Um neue Zielstrukturen für eine Prävention der anfallsinduzierten Überexpression von Multidrug-Transporter zu identifizieren und eine verbesserte Pharmakotherapie von Epilepsiepatienten zu ermöglichen, ist es essentiell möglichst genaue Kenntnisse, von den an der Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression und Neurodegeneration beteiligten Mechanismen zu haben.

#### *Regulation der anfallsinduzierten Neurodegeneration*

Es ist schon sehr lange bekannt, dass der endogene exzitatorische Neurotransmitter Glutamat eine Schlüsselrolle bei der Induktion von verschiedenen neuropathologischen Veränderungen des ZNS spielt. Unter anderem scheint die anfallsinduzierte Ausschüttung von Glutamat auch an neurodegenerativen Prozessen im ZNS, die im Zusammenhang mit einem SE oder einem epileptischen Anfällen auftreten, beteiligt zu sein (COLE-EDWARDS u. BAZAN 2005).

Glutamat kann sowohl über ionotrope als auch über metabotrope Rezeptoren in der postsynaptischen Membran von Neuronen wirken (MELDRUM 2000). Zum jetzigen Zeitpunkt konnten drei verschiedene Familien von ionotropen Glutamat-Rezeptoren, die nach ihrem selektiven Agonisten benannt wurden, identifiziert werden, N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren,  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalpropionat (AMPA)-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren (MELDRUM 2000). AMPA- und Kainat-Rezeptoren haben eine hohe Konduktivität für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  und dienen der schnellen synaptischen Transmission, während NMDA-Rezeptoren eher eine vermehrte Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  aufweisen, durch die vor allem langsame aber langanhaltende exzitatorische Prozesse vermittelt werden (MELDRUM 2000).

Im Anfallsgeschehen kommt es durch die starke Depolarisation von Neuronen zu einer massiven Freisetzung und Akkumulation von Glutamat in der interstitiellen Flüssigkeit (HOLMES 2002; STRAUSS u. MARINI 2002) und daraus resultierend zu einer vermehrten Stimulation der NMDA-Rezeptoren (COLE-EDWARDS u. BAZAN 2005). Die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren bewirkt einen schnellen Einstrom von

## LITERATURÜBERSICHT

---

$\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle, was zur Calcium Überladung der Mitochondrien und zur Freisetzung von intrazellulären Sauerstoffradikalen führt (MAWATARI et al. 1996; HOLMES 2002; COLE-EDWARDS u. BAZAN 2005; PAOLETTI u. NEYTON 2007; ARONIADOU-ANDERJASKA et al. 2008). Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass diese vermehrte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  und Sauerstoffradikalen zu einer Aktivierung von cytosolischer Phospholipase- $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) führt, welche aus Membranphospholipiden Arachidonsäure (AA) abspalten kann (COLE-EDWARDS u. BAZAN 2005; PEPICELLI et al. 2005). Diese freigesetzte AA wird dann durch Cyclooxygenasen (COX) zu Prostaglandinen verarbeitet. In einem ersten Schritt kommt es dabei COX-abhängig zur Synthese von Prostaglandin  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ) und darauf folgend dann zur Synthese von Prostaglandin  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) (WARNER u. MITCHELL 2004; COLE-EDWARDS u. BAZAN 2005).  $\text{PGH}_2$  wird im Anschluss daran durch verschiedene Prostaglandin-Synthasen in unterschiedliche Prostaglandine, wie  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  und Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TxA}_2$ ), aufgespalten (WARNER u. MITCHELL 2004).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Kaskade maßgeblich an der anfallsinduzierten Neurodegeneration beteiligt zu sein scheint.

Sowohl chemisch, als auch elektrisch induzierte Anfälle führen NMDA-Rezeptor vermittelt zu einer deutlichen Aktivierung von COX-2 Genen und folglich zu einer Expressionszunahme von COX-2, die 18 – 24 h nach dem Anfallsgeschehen in Neuronen nachweisbar ist (MANEV et al. 2000; TU u. BAZAN 2003; VOUTSINOS-PORCHE et al. 2004; KAWAGUCHI et al. 2005). Eine neuronale Zunahme der COX-2-Expression konnte nicht nur anfallsinduziert, sondern auch bei verschiedenen anderen neuropathologischen, mit einer vermehrten Neurodegeneration einhergehenden Erkrankungen (STRAUSS u. MARINI 2002), nachgewiesen werden. Erkrankungen, für die ein solcher Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, sind unter anderem ausgeprägten Depressionen (CAGGIANO et al. 1996), Alzheimer (PASINETTI u. AISEN 1998) oder zerebrale Ischämie (COLLACO-MORAES et al. 1996),

In verschiedenen Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der oben beschriebenen Kaskade zu einer deutlichen Reduktion der Glutamat-induzierten Neurodegeneration führt. So konnten Brandt et

al. (2003) zeigen, dass eine Gabe des NMDA-Rezeptor Blocker Dizoclipine (MK-801) im Anschluss an einen SE zu einer signifikanten Reduktion der anfallsinduzierten Neurodegeneration in limbischen Gehirnregionen, unter anderem im Hippocampus und im Piriformen Cortex, führte (BRANDT et al. 2003).

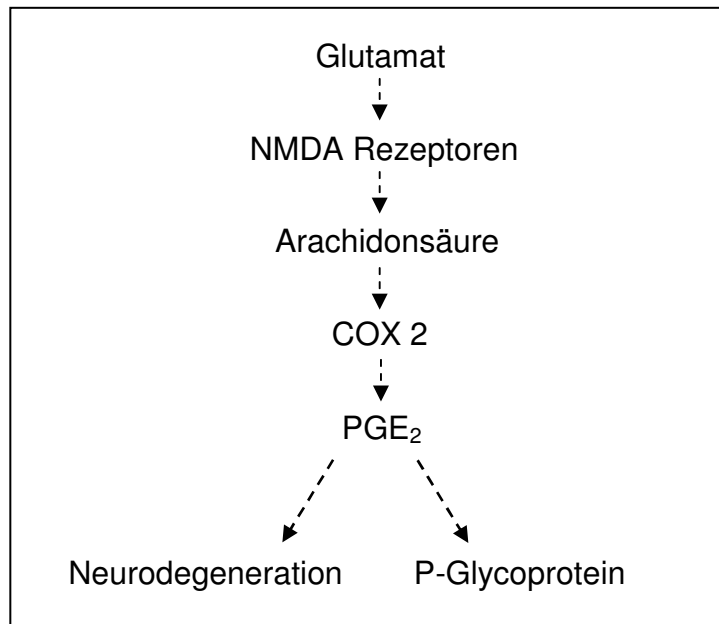
Auch durch eine Hemmung auf Ebene der COX-2 konnte sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Studien ein neuroprotektiver Effekt erzielt werden (STRAUSS u. MARINI 2002; HEWETT et al. 2006; JUNG et al. 2006). Gobbo u. O`Mara (2004) konnten sogar zeigen, dass Ratten, die im Anschluss an eine Stimulation durch Kainat mit dem selektiven COX-2-Hemmer Celecoxib behandelt wurden, deutlich bessere Ergebnisse in verschiedenen Verhaltens- und Lerntests erzielten als unbehandelte Tiere (GOBBO u. O'MARA 2004). Des weiteren scheint eine Inhibition von COX-2 auch den Kindling-Verlauf in einem Hippocampus-Kindling-Modell zu verändern, was ein deutlicher Hinweis für eine Beteiligung von COX-2 an der Epileptogenese zu sein scheint (TU u. BAZAN 2003).

Die beschriebenen neurodegenerativen COX-2-Effekte scheinen vor allem PGE<sub>2</sub> vermittelt, über den EP1-Rezeptor, abzulaufen. In *in vivo* Ischämie-Studien konnte durch die Gabe eines EP1-Rezeptorantagonisten eine deutliche Reduktion des Infarktvolument bzw. der Neurodegeneration erreicht werden (GENDRON et al. 2005; KAWANO et al. 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EP1-Rezeptor Knockout-Mäuse (EP1<sup>-/-</sup>) in Folge einer NMDA-Injektion ein deutlich geringeres Läsionsvolumen als Wildtypmäuse ausbilden (AHMAD et al. 2006). Auch Studien an EP1<sup>-/-</sup> Mäusen in einem Ischämie-Modell haben gezeigt, dass diesen Tieren im Vergleich zu Wildtypmäusen ein deutlich geringeres Infarktvolument aufzeigen (KAWANO et al. 2006). Bisher liegen jedoch noch keine Angaben dazu vor, ob eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Wirkung am EP1-Rezeptor auch zu einer Reduktion der anfallsinduzierten Neurodegeneration in einem Pilocarpin-SE-Modell führen. Aus diesem Grund soll nun, der in einem Ischämie-Modell schon erfolgreich verwendete, EP1-Rezeptorantagonist SC-51089 in einem Pilocarpin-SE-Modell getestet werden.

### *Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression*

Unserer Arbeitsgruppe (Heidrun Potschka, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, LMU München) gelang es in den letzten Jahren in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Björn Bauer (UMD, MN, USA) und David Miller (NIEHS/NIH,

NC, USA) einen Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Weg in Endothelzellen des Gehirns zu identifizieren, der an der anfallsinduzierten Überexpression von Pgp beteiligt zu sein scheint (BAUER et al. 2008). Der dabei in den Endothelzellen ablaufende Prozess, scheint mit der in den Neuronen ablaufenden Kaskade identisch zu sein (Abb.5).



**Abb.5 Vereinfachte, schematische Darstellung der sowohl in Neuronen, als auch in Endothelzellen ablaufenden anfallsinduzierten Kaskade.**

Sowohl Zu u. Liu (2004), als auch Bauer et al. (2008) konnten zeigen, dass eine Inkubation von kultivierten Gehirndothelzellen mit Glutamat zu einer Zunahme der Pgp-Expression und der Pgp-Transportaktivität führt. Außerdem konnten sie einen direkten Zusammenhang zwischen der extrazellulären Glutamatkonzentration und der Pgp-Expression nachweisen (ZHU u. LIU 2004; BAUER et al. 2008). Auch *in vivo* konnte dieser Zusammenhang durch eine unilaterale Injektion von Glutamat in den rechten Hippocampus bestätigt werden. Im Vergleich mit dem jeweiligen contralateralen Hippocampus konnte dabei immunhistologisch eine deutlich höhere Pgp-Expression auf der Injektionsseite nachgewiesen werden (BAUER et al. 2008). Die beschriebene Glutamat-Wirkung scheint auch an Endothelzellen über dort exprimierte NMDA-Rezeptoren abzulaufen. In einer Studie von Bauer et al. (2008)

## LITERATURÜBERSICHT

---

konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 die Glutamat-induzierte Überexpression von Pgp in kultivierten Endothelzellen komplett verhindert werden kann (BAUER et al. 2008).

Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors führt auch in Endothelzellen zu einem vermehrten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen (SHARP et al. 2003). Der daraus resultierende oxidative Stress scheint direkt an der Induktion von Pgp beteiligt zu sein (FELIX u. BARRAND 2002). In kultivierten Gehirnzellen konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung dieser Zellen mit dem Radikalfänger N-Acetylcystein nicht nur die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies im Anschluss an eine Glutamat-Behandlung verhindert, sondern auch die Glutamat induzierte Pgp-Überexpression vermindert (ZHU u. LIU 2004).

Durch den vermehrten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in Zusammenhang mit den frei werdenden Sauerstoffradikalen kommt es zu einer Stimulation von  $\text{PLA}_2$ , die wiederum aus Membranphospholipiden AA abspaltet, welche dann durch COX und Prostaglandin-Synthasen zu Prostaglandinen umgebaut werden. Das im Anfallsgeschehen vermehrt freigesetzte Glutamat führt also demzufolge zu einer vermehrten Liberalisierung von AA, wodurch der COX vermehrt Substrat zur Verfügung steht.

Nachdem Patel et al. (2002) einen Zusammenhang zwischen der COX-Expression und der Pgp-Expression in Nierenzellen zeigen konnten, gelang es Bauer et al. (2008) diesen Zusammenhang auch in Kapillarendothelzellen des Gehirns nachzuweisen (PATEL et al. 2002; BAUER et al. 2008). Eine Exposition der Gehirndothelzellen sowohl mit dem spezifischen COX-2-Antagonisten Celecoxib, als auch mit dem COX-1/COX-2-Antagonisten Indomethacin, konnte die Glutamat induzierte Pgp-Überexpression und die vermehrte Transportaktivität von Pgp hemmen (BAUER et al. 2008). Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung der Tiere mit Celecoxib die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression verhindert wird (unveröffentlichte Daten).

Eine Induktion der Pgp-Expression in kultivierten Kapillarendothelzellen des Gehirns lässt sich nicht nur durch eine Behandlung der Zellen mit Glutamat erzielen, sondern ist auch nach einer Exposition dieser Zellen mit  $\text{PGH}_2$  oder  $\text{PGE}_2$  sichtbar (unveröffentlichte Daten). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der  $\text{PGE}_2$ -Wirkung auf die Kapillarendothelzellen durch den EP1-Rezeptorantagonisten



SC-51089, sowohl die Glutamat, als auch die PGE<sub>2</sub> induzierte Überexpression von Pgp an den kultivierten Endothelzellen verhindert (unveröffentlichte Daten).

Aus diesem Grund soll nun die Wirkung von SC-51089 auf die Pgp-Expression *in vivo* in einem Pilocarpin-SE-Modell getestet werden.

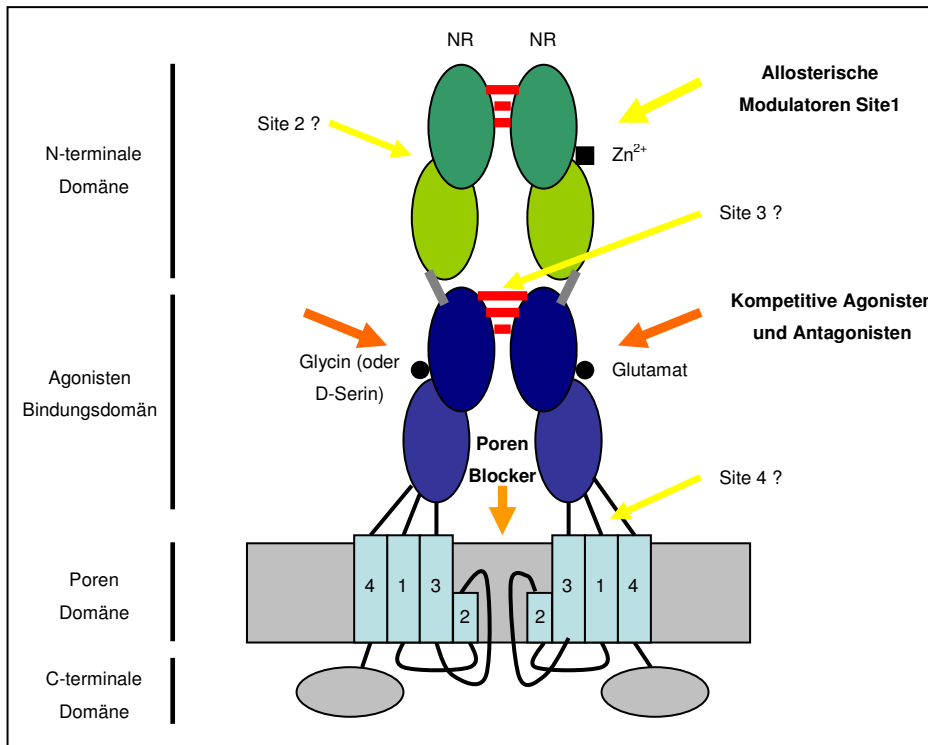
### 2.3.1 NMDA-REZEPTOREN

NMDA-Rezeptoren sind Glutamat-abhängige Ionenkanäle, die im gesamten Gehirn exprimiert sind. Sie bestehen aus verschiedenen Untereinheiten die sich aus einem Repertoire von drei Subtypen dieser Untereinheiten, NR1, NR2 und NR3, zusammensetzen (PAOLETTI u. NEYTON 2007). Durch unterschiedliche Splicing-Varianten der jeweiligen Gene existieren 8 verschiedene NR1-Typen, vier verschiedene NR2-Typen (A, B, C und D) und zwei NR3-Typen (A und B) (PAOLETTI u. NEYTON 2007). NR1 wird durch ein Gen kodiert während NR2 und NR3 durch sechs verschiedene Gene kodiert werden (DINGLELINE et al. 1999). Im Säugetier besteht ein funktioneller NMDA-Rezeptor wenigstens aus einer NR1 und einer NR2-Untereinheit (PAOLETTI u. NEYTON 2007).

NMDA-Rezeptoruntereinheiten zeigen alle den gleichen charakteristischen Aufbau. Sie besitzen einen langen extrazellulären N-terminalen Anteil, eine Membranregion, bestehend aus drei Transmembransegmenten und einem C-terminalen Anteil (PAOLETTI u. NEYTON 2007) (Abb.6).

In verschiedenen Studien an isolierten Gehirndothelzellen konnte z.B. durch RT-PCR gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptoren nicht nur, wie zuvor angenommen, an Neuronen, sondern auch an Endothelzellen des Gehirns exprimiert sind (KOENIG et al. 1992; KRIZBAL et al. 1998; PARFENOVA et al. 2003; SHARP et al. 2003; ANDRAS et al. 2007; BAUER et al. 2008). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte deshalb, mit einem schon an kultivierten Endothelzellen erfolgreich getesteten AK, untersucht werden, ob die Anwesenheit von NMDA-Rezeptoren an Endothelzellen des Gehirns auch immunhistochemisch in nativem Gewebe nachzuweisen ist.

## LITERATURÜBERSICHT



**Abb.6 Schematische Darstellung des Aufbaus eines NMDA-Rezeptors und seiner potentiellen Bindungsstellen für verschiedene Liganden. Die meisten NMDA-Rezeptoren sind Tetramere, die aus zwei NR1- und zwei NR2-Untereinheiten aufgebaut sind. Zur vereinfachten Darstellung ist in diesem Schema nur jeweils eine NR1- und eine NR2- Untereinheit abgebildet (modifiziert nach PAOLETTI u. NEYTON 2007).**

### 2.3.2 COX-2

Die Cyclooxygenase (COX), auch bekannt als Prostaglandin-G/H-Synthase, ist ein Enzym, das die Produktion von Prostaglandinen aus Arachidonsäure katalysiert (SMITH et al. 1996). Sie ist der Angriffspunkt für alle gebräuchlichen Nichtsteroidalen Antiphlogistika (non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) (KAWAGUCHI et al. 2005). Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei COX-Formen bekannt, COX-1, COX-2 und COX-3, die jedoch eine Splicevariante von COX-1 darstellt (WARNER u. MITCHELL 2004). Obwohl die Gene für COX-1 und COX-2 auf zwei unterschiedliche Chromosomen kodiert sind, zeigen die beiden Proteine in ihrer Struktur eine 60%ige Übereinstimmung (SMITH et al. 2000). Die Konformation der Substratbindungsstelle ist bei beiden Enzymen sehr ähnlich, aber nicht identisch. Während COX-1 die Aminosäure Valin an Position 434 und 523 beinhaltet, exprimiert COX-2 an diesen

## LITERATURÜBERSICHT

---

Stellen Isoleucin. Dieser Unterschied in der Aminosäuresequenz resultiert in einer größeren und flexibleren Substratbindungsstelle von COX-2 (KURUMBAIL et al. 1996; PHILLIS et al. 2006).

In den meisten Geweben ist COX-1 die vorherrschende Isoform, während COX-2 eher im Laufe von inflammatorischen Prozessen exprimiert wird. Im Gehirn, vor allen in Neuronen des Cortex und des Hippocampus (YAMAGATA et al. 1993), ist jedoch ein relativ hoher Basalwert von COX-2 vorhanden, dessen funktionelle Bedeutung bisher lediglich unvollständig geklärt ist. Die Transkription von COX-2 mRNA im Gehirn wird durch synaptische Aktivität induziert (KAWAGUCHI et al. 2005). Daher wird davon ausgegangen, dass COX-2 an der synaptischen Plastizität im Rahmen von Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt ist (CHOI et al. 2006).

Eine Induktion von COX-2 nach einem SE kann die Epileptogenese durch einen progressiven Verlust von hippocampalen Neuronen beeinflussen. Es ließen sich jedoch ebenfalls Effekte auf die Astroglieose und Neurogenese nachweisen (JUNG et al. 2006). Wie in Kap. 2.3 schon beschrieben, führen sowohl chemisch-, als auch elektrisch-induzierte Anfälle, NMDA-Rezeptor vermittelt, zu einer deutlichen Aktivierung von COX-2-Genen und folglich zu einer Expressionszunahme von COX-2 in Neuronen (MANEV et al. 2000; TU u. BAZAN 2003; VOUTSINOS-PORCHE et al. 2004; KAWAGUCHI et al. 2005).

Eine Überexpression von COX-2 scheint außerdem zu einer Hochregulation von verschiedenen Genen, zu denen auch MDR1 zählt, zu führen. Patel et al. (2002) konnten zeigen, dass eine Überexpression von COX-2 in Nierenzellen zu einer erhöhten Pgp-Expression führt (PATEL et al. 2002). Dabei scheinen verschiedene Produkte der COX-2-Aktivität, z.B. PGE<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> oder TxA<sub>2</sub>, an der Induktion von Pgp beteiligt zu sein.

In *in vitro* Versuchen unserer kooperierenden Arbeitsgruppe konnte jedoch, anders als in Neuronen, durch Glutamat keine Induktion der COX-2-Expression in Endothelzellen nachgewiesen werden. Glutamat führte lediglich zu einer vermehrten Liberalisierung von AA, dem Substrat von COX-2, und daraus resultierend zu einer vermehrten Bildung von PGE<sub>2</sub> (unveröffentlichte Daten). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, soll nun *in vivo* immunhistochemisch die Expression von COX-2 in Endothelzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE untersucht werden.

### 2.3.3 PGE<sub>2</sub>

Prostaglandine werden cyclooxygenaseabhängig aus Arachidonsäure über PGG und PGH<sub>2</sub> gebildet. Sie sind potente Regler einer Vielzahl von körpereigenen physiologischen Antworten, wie Entzündungsreaktionen, Schmerzempfinden, Fieber oder der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur (PATEL et al. 2002). Die Bedeutung dieser körpereigenen Wirkstoffe, zeigt die sehr weite Anwendung der cyclooxygenaseinhibierenden NSAIDs, bei einer großen Anzahl unterschiedlicher Krankheiten, wie Entzündungen, Krebserkrankungen, aber auch bei Hypertonie. NSAIDs hemmen jedoch unselektiv die Synthese aller Prostaglandinkomponenten, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (BREYER 2001).

#### *Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptoren*

Prostaglandine wirken am Ort ihrer Synthese, an spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die nach ihren jeweiligen Bindungspartnern benannt werden. Prostaglandinrezeptoren bestehen charakteristischer Weise aus sieben hydrophoben Transmembransegmenten und einer, je nach Prostaglandinrezeptor, unterschiedlichen C-terminalen Sequenz, durch die die jeweilige Rezeptorfunktion modifiziert wird (BREYER et al. 2001). Für Prostaglandin E sind bisher vier verschiedene Rezeptoren beschrieben worden, EP1, EP2, EP3 und EP4. Allgemein scheinen EP2 und EP4 Adenylatcyclase (AC) zu stimulieren, während EP3 AC hemmt und EP1 die Calciumkonzentration (Ca<sup>2+</sup>) intrazellulär, über eine Beeinflussung der intrazellulären Mobilisierung und einen verstärkten Influx von Ca<sup>2+</sup>, ansteigen lässt (GENDRON et al. 2005) (Abb.7). Takadera et al. (2004) zeigten, dass PGE<sub>2</sub> in Cortex- und Hippocampuszellen von Ratten eine Apoptose herbeiführt, während Cazevielle et al. (1994) berichteten, dass die Gabe von PGE<sub>2</sub>, Neuronen, vor einem durch N-methyl-D-aspartat- und Glutamat-induzierten Zelltod bewahrt, was sich über die Aktivierung unterschiedlicher PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren erklären lässt (CAZEVIELLE et al. 1994; TAKADERA et al. 2004).

In *in vitro*-Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Gabe von PGE<sub>2</sub> über eine Aktivierung des EP1-Rezeptors zu einer deutlichen Erhöhung der Pgp-Transporter-Funktion führt (unveröffentlichte Daten). Diese Erkenntnisse machen PGE<sub>2</sub> zu einer wichtigen Zielstruktur in der Entwicklung neuer Strategien in der Behandlung von transporterbasierender Pharmakoresistenz.

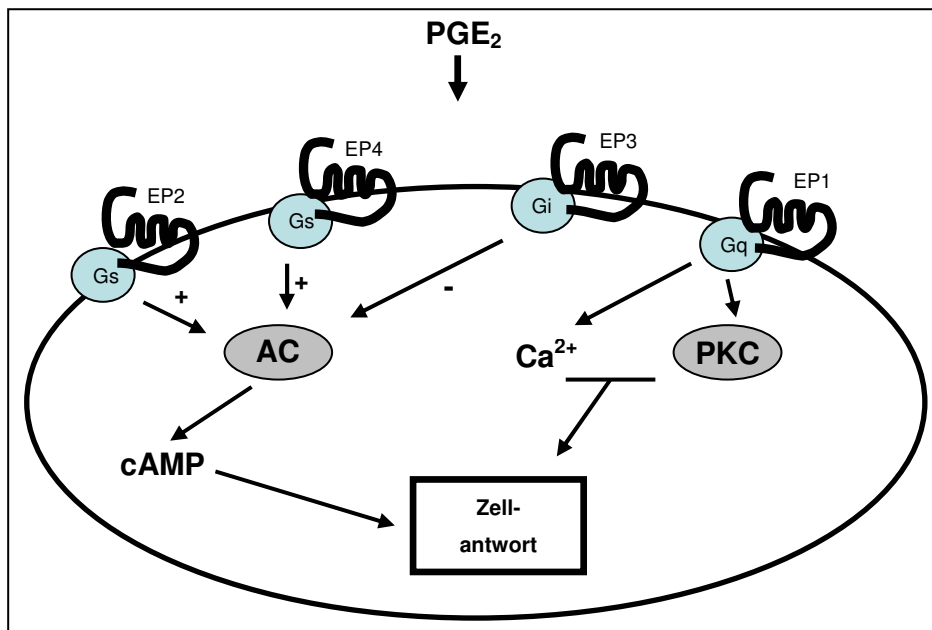


Abb.7 Schematische, vereinfachte Darstellung des primären Signalweges nach Aktivierung von EP-Rezeptoren (modifiziert nach BREYER 2001).

#### EP1-Rezeptorantagonist

Malmberg und Yaksh (1992) konnten zeigen, dass die intrathecale Injektion eines Cyclooxygenaseinhibitors, welcher in die Synthese von spinalen Prostaglandinen eingreift, die Schmerzantwort auf eine Formalininjektion in die rechte Hinterpfote von Ratten unterdrückt (MALMBERG u. YAKSH 1992). Da vorausgehende Studien gezeigt haben, dass eine systemische Applikation von EP1-Rezeptorantagonisten einen antinoczeptiven Effekt haben, testeten Malmberg et al. (1994) die intrathecale Applikation der EP1-Rezeptorantagonisten SC-51089 und SC-51234A (MALMBERG et al. 1994). Sie erreichten dabei eine dosisabhängige Reduktion der zweiten Phase der Schmerzantwort.

Es ist bekannt, dass EP1-Rezeptoren über eine Steigerung der Ca<sup>2+</sup>-Dysregulation an der Neurotoxizität beteiligt sind und einen neuronalen Zelltod induzieren können. Kawano et al. (2006) verabreichten daher den EP1-Rezeptorantagonisten SC-51089 in einem Schlaganfallmodell, was zu einer deutlichen Reduzierung neuronaler Läsionen führte (KAWANO et al. 2006). In bisher unveröffentlichten *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden (siehe Kap. 2.3), dass SC-51089 eine Glutmat-induzierte Überexpression von Pgp in Rattengehirnendothelzellen verhindern kann. Es ist jedoch bisher unbekannt, ob dieser vielversprechende Ansatz *in vivo* mit

ähnlichen Effekten einhergeht. Der therapeutische Einsatz von SC-51089 könnte demnach eine neue Strategie zur Prophylaxe der Pgp verursachten Pharmakoresistenz von Epilepsien sein.

### 2.3.4 TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Transkriptionsfaktoren können an DNA-Sequenzen unterschiedlicher Gene binden und dort die jeweilige Promotorregion der Gene aktivieren oder reprimieren. Für jede Transkription sind allgemeine Transkriptionsfaktoren notwendig, die entweder direkt an die DNA, zum Beispiel an allgemeine Motive wie Promotorelemente, an die RNA-Polymerase oder an andere Proteine des Initiationskomplexes binden. Zusätzlich existieren in jeder Zelle spezifische Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung bestimmter spezieller Gene. Sie sind nur in den Zellen vorhanden, in denen das Gen, das sie regulieren, aktiviert oder reprimiert werden soll, um so direkt auf spezifische Umweltreize reagieren zu können (SCOTTO 2003). DNA-Bereiche, an die Transkriptionsfaktoren binden, haben eine spezifische Sequenz, die von dem jeweiligen Transkriptionsfaktor erkannt und gebunden wird (LABIALLE et al. 2002).

Um eine kausale Therapie von pharmakoresistenten Epilepsien zu ermöglichen, besteht ein großes Interesse an der Bestimmung der, an der Pgp-Überexpression beteiligten Faktoren. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten eine Beteiligung verschiedener Faktoren, unter anderem NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), NF-Y (nuclear factor-Y), p53 und TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) an der Regulation der Transkription von MDR1-Genen nachgewiesen werden (BAUER et al. 2007; SHAREEF et al. 2008). Auf Grund ihrer spezifischen Bindungssequenzen wird die Beteiligung von weiteren Transkriptionsfaktoren wie YB-1 und ZONAB an der Aktivierung von Pgp codierenden Genen diskutiert.

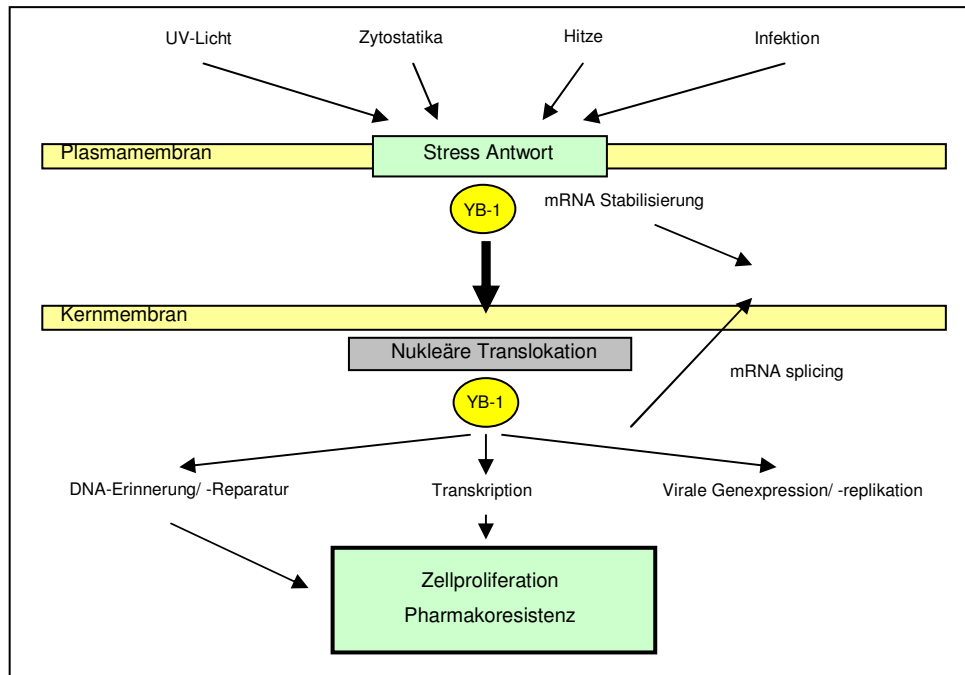
#### *YB-1*

Das Y-Box binding Protein 1 (YB-1) gehört zur Familie der DNA/RNA-bindenden Proteine, welche alle ein gemeinsames Strukturmotiv, die Kälteschock-Domäne, besitzen (VAIMAN et al. 2006). Sie interagieren mit reversen CCAAT-Sequenzen

(Y-boxes) in Promotor-Regionen von unterschiedlichen eukaryotischen Genen (FUJITA et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass YB-1 die Expression bestimmter Gene sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Translation aktiviert oder hemmt (HUANG et al. 2005). Außerdem scheint YB-1 an verschiedenen weiteren DNA- und mRNA-abhängigen Prozessen, wie Zellproliferation und DNA-Reparaturmechanismen beteiligt zu sein (Abb.8) (KUWANO et al. 2003).

YB-1 konnte sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma von unterschiedlicher Zellen beobachtet werden (HOMER et al. 2005; VAIMAN et al. 2006), wobei das Expressionslevel jedoch altersabhängig zu variieren scheint (MIWA et al. 2006). Miwa et al. (2006) konnten zeigen, dass es altersabhängig zu einer deutlichen Reduktion der YB-1-Expression im Gehirn und im Herz von Mäusen kommt, während in der Milz im gleichen Zeitraum eine deutlichen Zunahme der YB-1-Expression nachweisbar war (MIWA et al. 2006). Es ist bekannt, dass verschiedene externe Stimuli, wie Zellirritationen durch UV-Licht oder Chemotherapeutika, eine Aktivierung und Translokation von YB-1 bewirken können (FUJITA et al. 2005). In verschiedenen Studien an Tumorgewebe konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression, sowie eine nukleäre Lokalisation von YB-1 sehr eng mit der Expression von MDR1-Genen assoziiert ist (ODA et al. 1998; JANZ et al. 2002; KUWANO et al. 2003; FUJITA et al. 2005). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob YB-1 im Gehirn von Ratten nachweisbar ist, und ob es im Anschluss an eine Zellirritation durch einen SE zu einer Expressionsveränderung von YB-1 kommt.

## LITERATURÜBERSICHT



**Abb.8 Schematische Darstellung der zellulären Funktion von YB-1. YB-1 ist vorwiegend im Cytoplasma der Zelle lokalisiert und interagiert dort mit verschiedenen Proteinen und RNAs. Verschiedene Stimuli von außerhalb der Zelle können eine Translokation von YB-1 in den Nucleus initiieren und dadurch zu einer Aktivierung von weiteren Genen führen (modifiziert nach KOHNO et al. 2003).**

### ZONAB

ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid-binding protein) gehört, wie YB-1, zur Familie der Y-box-Transkriptionsfaktoren. Es bindet an die SH3-Domäne von Zonula occludens-1 (ZO-1), einem Tight-junction-Submembranprotein (BALDA et al. 2003).

Tight-junctions sind spezielle Plasmamembrandomänen, die den apikalen Pol von epithelialen und endothelialen Zellen umgeben können, und dadurch die apikale von der basolateralen Seite trennen (ZAHRAOUI 2004). Durch ihre Lokalisation formen sie eine interzelluläre Diffusionsbarriere, die die Passage von Ionen und verschiedenen Makromolekülen durch den parazellulären Raum hemmt (ZAHRAOUI 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Tight-junction-Proteine außerdem an verschiedenen Zelltransduktionswegen beteiligt sind. So ist z.B. die Interaktion des Tight-junction-Protein ZO-1 mit dem Transkriptionsfaktor ZONAB maßgeblich an der Regulation der Expression des Proto-oncogens Erb-2 und der epithelialen Proliferation und Differenzierung beteiligt (ZAHRAOUI 2004).



## LITERATURÜBERSICHT

---

ZONAB konnte sowohl im Zellkern, wie auch an Tight-junctions verschiedener Zellen nachgewiesen werden. Nukleär lokalisiertes ZONAB kann an Sequenzen spezifischer Promotorregionen, die eine reverse CCAAT-Sequenz beinhalten, binden, und dadurch Gene aktivieren (BALDA u. MATTER 2000). Eine Reduktion der Expression von ZONAB in MDCK (Madin-Darby canine kidney) Zellen durch RNA-Interferenz führte z.B. zu einer deutlicher Reduktion der Zellproliferation dieser Zellen, während eine Überexpression von ZONAB eine deutlichen Zunahme der Zelldichte herbeiführte (BALDA et al. 2003).

Da auch ZONAB zur Familie der Y-box-Transkriptionsfaktoren zählt, sollte auch für dieses Protein nachgewiesen werden, ob ein Zusammenhang zwischen der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression und der Expression von ZONAB im Gehirn besteht.

### **3 ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG**

Zum jetzigen Zeitpunkt stellt die kausale, medikamentelle Therapie mit einem oder mehreren AE nach wie vor die wichtigste Therapieform bei der Behandlung von Epilepsien bei Menschen und Tieren dar. Durch diese Therapieform kann jedoch in vielen Fällen keine zufrieden stellende Kontrolle der Anfälle erreicht werden, was für die betroffenen Personen häufig schwerwiegende Konsequenzen mit sich bringt. So liegt z.B. die Mortalitätsrate bei refraktären Patienten vier- bis siebenmal höher als bei sensitiven Patienten. Außerdem bedeutet eine unzureichende Kontrolle der epileptischen Anfallsaktivität vielfach eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität, eine Aufgabe der beruflichen Tätigkeit und Einschränkung der privaten Freizeitgestaltung, sowie ein Problem in der sozialen Eingliederung. In der Tiermedizin führt ein mangelnder Therapieerfolg in den meisten Fällen sogar zu einer Euthanasie des Patienten.

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass die anfallsinduzierte Überexpression des Multidrug-Transporters Pgp eine bedeutende Rolle für die Pharmakoresistenz von Epilepsien spielt. Für die Entwicklung von neuen Strategien zur Prophylaxe und Überwindung dieser Transporter basierten Pharmakoresistenz, ist es deshalb essentiell möglichst genaue Kenntnisse über den Hintergrund der anfallsinduzierten Überexpression von Pgp zu erhalten. Aus diesem Grund werden in dem geplanten Dissertationsprojekt eine Reihe unterschiedlicher Untersuchungen zur anfallsinduzierten Überexpression von Pgp durchgeführt.

1. Verschiedene Studien in Tiermodellen, bei denen epileptische Anfälle chemisch oder elektrisch induziert wurden, konnten in den letzten Jahren zeigen, dass es anfallsinduziert zu einer Überexpression des Multidrug-Transporters Pgp kommt. Bei diesen Studien kann jedoch ein Einfluss der chemischen oder elektrischen Stimulation auf die Pgp-Expression nicht ausgeschlossen werden. Da zum jetzigen Zeitpunkt außer in Tiermodellen lediglich Untersuchungen zur Pgp-Expression an intraoperativ entnommenem Gehirngewebe von Humanpatienten existieren, und bisher noch keine Studien darüber existieren, ob es auch bei an Epilepsie-erkrankten

Haustieren zu einer anfallsinduzierten Überexpression von Pgp im Gehirn kommt, soll im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden:

- Lässt sich auch im Kaninen Gehirn im Anschluss an spontane Anfälle eine anfallsinduzierte Überexpression von Pgp nachweisen?

2. Die Strategie, einer Multidrug-Transporter-Überexpression bereits zu einem frühen Zeitpunkt präventiv entgegen zu steuern, ist ein viel versprechender Ansatz der letzten Jahre. Da aus verschiedenen Studien bekannt ist, dass sowohl NMDA-Rezeptoren an Endothelzellen, als auch die dort gebildete COX-2 einen Einfluss auf die anfallsinduzierte Pgp-Expression haben, und man auch für YB-1 und ZONAB eine mögliche Beteiligung an der anfallsinduzierten Überexpression von Multidrug-Transportern an nimmt, sind diese Faktoren interessante Angriffspunkte für eine medikamentelle Prävention der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression. Die genaue Kenntnis über die Expression bzw. eine anfallsinduzierte Expressionsveränderung dieser, möglicherweise an der Pgp-Überexpression beteiligten Mechanismen, würde neue Ansatzpunkte für eine gezielte Hemmung dieser Faktoren liefern. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Lässt sich immunhistochemisch eine Expression von NMDA-Rezeptoren und COX-2 an bzw. in Endothelzellen des Gehirns nachweisen?
- Lassen sich die Transkriptionsfaktoren YB-1 und ZONAB immunhistochemisch in Gehirngewebe nachweisen und wo sind sie lokalisiert?
- In wie weit und zu welchem Zeitpunkt nach einem SE kommt es anfallsinduziert zu einer Expressionsveränderung von NMDA-Rezeptoren, COX-2, YB-1 und ZONAB?
- Lässt sich YB-1 immunhistochemisch in Human- und Primatengehirngewebe nachweisen?

3. Unserer Arbeitsgruppe (Heidrun Potschka, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, LMU München) gelang es in den letzten Jahren in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Björn Bauer (UMD, MN, USA) und David Miller

(NIEHS/NIH, NC, USA) einen Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2 Weg in Endothelzellen des Gehirns zu identifizieren, der an der anfallsinduzierten Überexpression von Pgp beteiligt zu sein scheint (BAUER et al. 2008). Die Induktion von Pgp durch COX-2 scheint dabei PGE<sub>2</sub> abhängig über EP-1-Rezeptoren anzulaufen. In vorausgegangenen *in vitro* Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation des EP-1-Rezeptorantagonisten SC-51089 zu einer deutlichen Herunterregulierung von Pgp führt (unveröffentlichte Daten). Da SC-51089 außerdem in einem Schlaganfallmodell eine neuroprotektive Wirkung gezeigt hat (KAWANO et al. 2006), soll in diesem Dissertationsvorhaben *in vivo* untersucht werden:

- Wie wirkt sich eine Behandlung mit dem EP-1-Rezeptorantagonisten SC-51089 auf die anfallsinduzierte Überexpression von Pgp in einem Lithium-Pilocarpin SE-Modell aus?
- Lässt sich durch eine Behandlung mit SC-51089 eine anfallsinduzierte Neurodegeneration in einem Lithium-Pilocarpin-SE-Modell verhindern?

Die, in diesem Dissertationsvorhaben gewonnenen Erkenntnisse, könnten für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und für die Prophylaxe gegen eine anfallsinduzierte Überexpression von Pgp von großer Bedeutung sein.

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 ANFALLSINDUZIERTER ÜBEREXPRESSION VON PGP IM HUNDEGEHIRN**

#### **4.1.1 PATIENTENKOLLEKTIV**

Für die Auswertung der anfallsinduzierten Überexpression von Pgp im Hundegehirn wurden Gewebeschnitte von 29 Hunden unterschiedlicher Rassen und unterschiedlichen Geschlechts verwendet. Die Schnitte wurden freundlicherweise von dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt (AG Prof. Dr. W. Baumgärtner). Es handelte sich bei allen verwendeten Tieren um Patienten der Kleintierklinik der Tierärztlichen Hochschule in Hannover. Das Alter der einzelnen Tiere lag zwischen zwei Monaten und vierzehn Jahren. Da alle in der Studie verwendeten Hunde unterschiedlichen Besitzern gehörten, waren sie im Laufe ihres Lebens unterschiedlichen Umwelteinflüssen und Haltungsbedingungen ausgesetzt. Tiernummer, Alter, Rasse, Geschlecht und Erkrankungs- bzw. Todesursache sind, so weit die Daten bekannt waren, in Tab.2 aufgelistet.

#### **4.1.2 PROBENGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG**

Die Gehirne von allen Hunden wurden im Rahmen einer Sektion entnommen und in 10%igem Formalin fixiert. Nach 10-tägiger Fixation wurde das gesamte Gehirn lamelliert und sowohl aus dem Großhirn als auch aus dem Kleinhirn Proben entnommen. Die Gehirnprouben wurden maschinell entwässert und in einem Gewebereinbettungsapparat in Paraffin eingebettet (Pathcentre, Thermo Electron, Dreieich). Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur. Von den erstellten Paraffinblöcken wurden 2-3 µm dicke Serienschritte angefertigt und auf SuperFrost/Plus<sup>®</sup> Objektträger (Menzel Gläser GmbH & Co. Kg, Braunschweig) aufgezogen. Die für die Pgp-Expressionsmessung verwendeten hippocampalen Gehirnschnitte lagen im Bereich der Schnittebenen 4/5 bis 7/8 im Bezug auf den im

## MATERIAL UND METHODEN

Internet veröffentlichten Hundegehirnatlas. (<http://vanat.cvm.umn.edu/brainset/controller.html>)

Tier-Nr.	Alter	Geschlecht	Rasse	klinische Diagnose	Zeitraum zwischen SE/Anfällen und Euthanasie	Erster Anfall im Leben des Tieres	Neuropathologie	Todesursache
1	2m, 2w	m / -	Deutscher Schäferhund	Kontrolle	-	-	-	ACVF
2	2m, 3w	m / -	Beagle	Kontrolle	-	-	-	ACVF
3	3m, 1w	m / -	Beagle	Kontrolle	-	-	-	ACVF
4	1y, 10m	m / -	Alaskan Malamut	Kontrolle	-	-	-	Euthanasie
5	3y	m / -	Golden Retriever	Kontrolle	-	-	-	?
6	3y	m / -	Chihuahua	Kontrolle	-	-	-	?
7	2m, 5d	f / -	Labrador Retriever	Kontrolle	-	-	-	ACVF
8	2m, 3w	f / -	Beagle	Kontrolle	-	-	-	Euthanasie
9	4m	f / -	?	Kontrolle	-	-	-	ACVF
10	5m	f / -	Dogge	Kontrolle	-	-	-	Euthanasie
11	3y	f / -	Gordon Setter	Kontrolle	-	-	-	Euthanasie
12	8y, 8m	f / c	?	Kontrolle	-	-	-	Verstorben
13	8y, 3m	f / ?	Mischling	Kontrolle	-	-	-	Euthanasie
14	14y	f / -	Dachshund	Kontrolle	-	-	-	?
15	23m	f / c	?	Kontrolle	-	-	-	?
16	8y	m / ?	?	Kontrolle	-	-	-	?
17	2,5m	m / -	Deutscher Schäferhund	Cluster-Anfälle	> 1d	einen Tag vor Präsentation	Hydrocephalus	Euthanasie
18	3m	m / -	Riesenschnauzer	Cluster-Anfälle	> 1d	vor 5 Tagen	Hydrocephalus	Euthanasie
19	3m	m / -	Mischling	Cluster-Anfälle	> 1d	seit dem Tag der Präsentation	"Staupe"	Euthanasie
20	5m	m / -	Mops	Cluster-Anfälle	> 1d	seit dem Alter von 10 Wochen	"Staupe"	während Anästhesie verstorben
21	10y	m / -	Boxer	Cluster-Anfälle	> 3d	einen Tag vor Präsentation	Oligoastrocytom	Euthanasie
22	7m	f / -	Husky	Cluster-Anfälle	> 1w	seit Wochen	"Staupe", multifocale, cerebellare Leukencephalomalazie	Euthanasie
23	2m 14d	m / -	Cocker Spaniel	SE	> 5d	seit einer Woche	Keine	Euthanasie
24	2y	m / -	Lhasa Apso	SE	> 1d	einen Anfall vor 5 Monaten, wiederholte Anfälle seit 4 Wochen	cerebrale Neurodegeneration	Euthanasie
25	3y	m / -	Miniatur Schnauzer	SE	> 1d	seit dem Tag der Präsentation	Keine	Euthanasie
26	6y, 5m	m / c	Shih-Tzu	SE	> 1h	seit 9 Monaten	fibroblastisches Meningiom, purulent Encephalitis und Malazie	Euthanasie
27	8y	m / c	Mischling	SE	> 1h	seit der Nacht	spongiforme Encephalopathie	Euthanasie
28	9y	f / -	Mischling	SE	> 3d	seit der Nacht	Meningiom im Bulbus olfactorius	Euthanasie
29	13y, 6m	f / c	Mischling	SE	> 3d	seit dem Tag der Präsentation	Meningiom im Bulbus olfactorius, purulent nekrotische Entzündung, Satellitose in der Großhirnrinde	Euthanasie

**Tab.2 Übersicht über alle in der Studie verwendeten Hunde. Angegeben sind, soweit die Daten bekannt waren, das Alter der Tiere, das Geschlecht, die Rasse und die jeweilige Todesursache. Zusätzlich ist bei den Tieren mit Anfällen oder einem SE die jeweilige klinische Diagnose und die Neuropathologie, der Zeitpunkt des ersten epileptischen Anfalls im Leben des Tieres, sowie der Zeitraum zwischen dem letzten Anfall bzw. SE und der Euthanasie angegeben.**

## 4.2 EPILEPSIE-MODELL

### 4.2.1 VERSUCHSTIERE

Für beide Fragestellungen im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell wurden weibliche Wistar Unilever Ratten des Versuchstierzüchters Harlan Winkelmann, Borcheln verwendet. Die Tiere hatten zum Zeitpunkt ihrer Anlieferung ein Gewicht von 180 bis 210 g. Nach ihrer Ankunft wurden sie bis zum jeweiligen Versuchsende in Gruppen von 5-6 Tieren in Makrolonkäfigen Typ IV untergebracht.

Die Umgebungstemperatur im Tierraum betrug 20-24°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 50-60%. Durch ein automatisches Lichtprogramm wurden die Tiere bei einem Hell-Dunkel Zyklus mit 12 h Rhythmus gehalten, bei dem die Lichtphase von 7.00-19.00 Uhr MEZ andauerte. Die Ratten erhielten ein Standardnagerfutter (Hövlerrattenfutter Nr. 10630, Hövler, Dormhagen) und Wasser ad libitum. Das Futter wurde einmal pro Woche und das Wasser zweimal pro Woche erneuert. Als Einstreu diente ein Weichholzgranulat der Firma Vetripharm (Equi Power Allround Späne; Fa. Vetripharm, Kaufering). Nach ihrer Ankunft erhielten die Tiere bis zum jeweiligen Versuchsbeginn eine Zeit von 3-5 Tagen, um sich an die neuen Haltungsbedingungen zu akklimatisieren. Alle Tiere wurden vor dem geplanten Versuchsbeginn durch Handling (Fixierung, Wiegen) an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch circadiane Einflüsse zu vermeiden, lag der Versuchsbeginn immer zwischen 7.30 und 9.00 Uhr.

### 4.2.2 FRAKTIONIETRES LITHIUM-PILOCARPIN-MODELL

Das fraktionierte Lithium-Pilocarpin-Modell ist ein Modell der Temporallappenepilepsie, bei dem durch wiederholte Gabe des parasymphomimetischen Alkaloids Pilocarpin ein SE ausgelöst werden kann. Die Tiere erhalten 14 h vor der ersten Pilocarpininjektion einmalig eine Lithiumchlorid-Lösung (127 mg/kg Lithiumchlorid, gelöst in 3 ml/kg 0,9% Natriumchloridlösung, pH-Wert 6-7 i.p.). 13,5 h nach dieser Injektion werden sie zur Reduktion der peripheren cholinergen Nebenwirkungen des Pilocarpins mit Methyloscopolamin (1 mg/kg Methyloscopolamin-bromid, gelöst in 3 ml/kg 0,9% Natriumchloridlösung, pH-Wert 6, i.p.) vorbehandelt. Exakt 30 min nach der Methyloscopolamin-Behandlung wird den Ratten die erste Pilocarpindosis (10 mg/kg Pilocarpin, gelöst in 3 ml/kg 0,9% Natriumchloridlösung) i.p. injiziert. Da es sich bei diesem Modell um das fraktionierte Pilocarpinmodell handelt, wird den Tiere bis zur Auslösung eines generalisierten SE, alle 30 min, Pilocarpin in gleicher Dosierung i.p. nachappliziert. Die Applikation erfolgt jedoch maximal zwölfmal. Die Tiere der Kontrollgruppe erhalten ebenfalls Lithium, werden jedoch an Stelle von Methyloscopolamin und Pilocarpin jeweils nur einmalig mit Natriumchloridlösung (3 ml/kg 0,9% Natriumchloridlösung) behandelt. Im Anschluss an die Injektionen wird das Verhalten der Tiere beobachtet. Die dabei sichtbaren Anfallsstadien wurden nach einer von Baran modifizierten Skala von Racine et al. bewertet (RACINE et al. 1972; BARAN et al. 1995) (Tab.3). Als SE wurde eine kontinuierliche generalisierte Anfallsaktivität definiert, wobei die Tiere in den dazwischen liegenden Pausen weiterhin eine Bewusstseinsbeeinträchtigung zeigten (konvulsiver SE). Es wurde der Beginn des SE ermittelt und davon ausgehend dieser nach 90 min mit Diazepam (10 mg/kg in 2 ml/kg Fertigarzneimittel, Fa. Ratiopharm, Ulm) unterbrochen. Sollte die motorische Anfallsaktivität nicht komplett abgeklungen sein, wurde alle 3-5 min Diazepam in gleicher Dosierung nachappliziert bis zur vollständigen Unterbindung der Anfallsaktivität.



Krampfschwere	Anfallscharakteristika	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Schließen eines Auges, stereotypes Schnüffeln)	Fokale Anfallsaktivität
Stadium II	schwerer Fazialklonus (klonische Kaubewegungen, Kopfnicken)	
Stadium III	unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium IV	bilateraler Vorderextremitätenklonus und Aufrichten des Rumpfes	Generalisierte Anfallsaktivität
Stadium V	bilateraler Vorderextremitätenklonus mit Verlust der Stellreflexe (nach hinten fallen)	
Stadium VI	SE (Serie von Anfällen der Klasse III-V ohne anfallsfreie Intervalle bzw. Erlangen des Bewusstseins)	

**Tab. 3 Skala der Krampfstadien**

## 4.3 HISTOLOGIE

### 4.3.1 PROBENGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG: RATTENGEWEBE

#### *Dekapitation*

Je nach Fragestellung wurden die Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem SE mittels einer Guillotine dekapitiert. Mit Hilfe einer Schere wurde die Kopfhaut und die Nackenmuskulatur entfernt und im Anschluss daran die knöcherne Schädeldecke mit einer gebogenen Schere und einer Knochenzange eröffnet. Nach Durchtrennung der Gehirnnerven wurde das unfixierte Gehirn unter Zuhilfenahme einer feinen Pinzette vorsichtig aus der Schädelkalotte in ein mit Tissue Freezing Medium<sup>®</sup> (Fa. Jung, Nussloch) gefüllten Zylinder aus Alufolie überführt. Um das Gewebe möglichst schonend und gleichmäßig zu gefrieren, wurde der Aluzylinder in ein mit 2-Methyl-butan (Fa. AppliChem, Darmstadt) gefüllten, in flüssigem Stickstoff

auf ca. -80 °C vorgekühlten Behälter gestellt. Im Anschluss an den Einfrierprozess wurden die Gewebeproben in einer -80 °C Gefriertruhe aufbewahrt.

### *Herstellung der Gehirnschnitte*

Zur Herstellung der Gehirnschnitte wurden die in Tissue Freezing Medium® eingebetteten Proben 1-2 Tage vor Beginn des Schnittprozesses in eine -20 °C Truhe überführt. Das Schneiden der 14 oder 40 µm dicken coronalen Gehirnschnitte erfolgte an einem Kryostaten der Fa. Leica (2800 Frigocut N, Fa. Leica, Nussloch), bei einer Temperatur von -18 °C bis -20 °C. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Fa. Histobond, Marienfeld) aufgenommen und bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80 °C aufbewahrt.

### 4.3.2 PROBENGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG: HUMAN- UND PRIMATENGEWEBE

Um eine vergleichende Aussage über die Expression von YB-1 im Gehirn treffen zu können, stand uns zusätzlich zu dem Rattengehirn auch Primatengehirngewebe zur Verfügung.

#### *Primatengehirn*

Das verwendete, perfundierte Primatengehirn wurde uns freundlicherweise von Frau PD Dr. A. Horn-Bochtler, aus der Abteilung Neuroanatomie, der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Es handelte sich bei dem Tier um einen ca. 6 kg schweren, aus China stammenden adulten, weiblichen Affen der Rasse *Macaca fascicularis*.

Die 40 µm dicken Gehirnschnittserien wurden an einem Kryostaten (HM560M Fa. Mikrom, Walldorf) angefertigt. Hierzu wurde das perfusionsfixierte Gehirn eingefroren und bei einer Objektemperatur von ca. -20 °C und einer Messertemperatur von ca. -20 °C geschnitten. Die hergestellten Gehirnschnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen und anschließend in Gefriermedium überführt. Nach einer 24-stündigen Lagerung bei -20 °C wurden die Schnittserien bei -80 °C aufbewahrt.

### *Humanes Gehirngewebe*

Die humanen Gehirnschnitte wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, aus dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule in Hannover zur Verfügung gestellt. Bei den Gehirnschnitten handelte es sich sowohl um Gehirnschnitte von einer Person ohne neuropathologische Veränderungen, als auch um Personen mit Alzheimer. Es handelte sich bei der Person ohne neuropathologische Veränderungen um eine 44 jährige, männliche Person. Bei den Alzheimerpatienten lagen sowohl Gehirnschnitte von männlichen als auch von weiblichen Personen mit einem Alter von 72-81 Jahren vor. Aus Datenschutzgründen können keine weiteren Angaben zu den Personen gemacht werden. Die Gehirnschnitte wurden aus Paraffinblöcken in Höhe des Hippocampus hergestellt.

### 4.3.3 THIONIN-FÄRBUNG

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen der 14 µm Schnitte wurde bei den 40 µm dicken Gehirnschnitten eine Nissl-Färbung (Protokoll s. Anhang) durchgeführt, für die der Farbstoff Thionin verwendet wurde. Diese Färbung eignet sich besonders zur Darstellung der Somata von Neuronen, da diese im Vergleich zu Gliazellen eine große Menge an Nisslschollen (Stapel Endoplasmatischen Reticulums) besitzen. Die Nisslschollen werden durch den Farbstoff selektiv angefärbt und können so nach dem Eindecken quantitativ ausgewertet werden.

### 4.3.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE NACHWEISMETHODEN

Die Durchführung immunhistochemischer Färbemethoden diente dazu verschiedene anfallsinduzierte Veränderungen auf zellulärer Ebene darzustellen. Für die verschiedenen Nachweise wurden sowohl mono-, als auch polyklonale Antikörper verwendet. Polyklonale Antikörper stammen aus verschiedenen B-Lymphozyten, die alle gegen dasselbe Protein, jedoch gegen unterschiedliche Epitope dieses Proteins gerichtet sind. Im Gegensatz dazu stammen monoklonale Antikörper aus einer B-Zelllinie, und richten sich demnach auch nur gegen ein spezifisches Epitop eines

Proteins. Der Vorteil von polyklonalen Antikörper besteht darin, dass sie bei Maskierung oder Zerstörung eines Epitopes immer noch an andere Epitope des gesuchten Proteins binden können, während monoklonale Antikörper in diesem Fall nicht mehr binden können. Im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern haben monoklonale jedoch eine viel höhere Spezifität, und ermöglichen so eine differenziertere Betrachtung der einzelnen Proteine (BOENISCH 2003).

### *Standardprotokoll*

Der Expressionsnachweis der einzelnen nachzuweisenden Proteine erfolgte auf Basis eines für das jeweilige Protein modifizierten immunhistologischen Standardprotokolls. Alle 14 µm dicken Rattengehirn Kryostatschnitte, so wie die humanen Gehirnschnitte wurden im Cover-Plate-Verfahren gefärbt. Lediglich die 40µm dicken Makakengehirnschnitte und die Rattengehirnschnitte für eine YB-1/NeuN Doppelmarkierung wurden im Free floating Verfahren gefärbt. Zu Beginn wurden die Schnitte gründlich in 0,05 M Tris-gepufferter Natriumchloridlösung (TBS, pH 7,6) gewaschen. Im Anschluss an diesen Schritt erfolgte je nach Protein ein Fixations- oder Demaskierungsschritt, um die natürliche Zellmorphologie zu bewahren oder ein Antigen-Retrieval (AR) zu bewirken (BOENISCH 2003). Nach einem erneuten Waschgang wurden die Schnitte zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase, einer 0,5%igen Wasserstoffperoxidlösung ausgesetzt. Um eine unspezifische Reaktion des primären Antikörpers zu verhindern, wurden die Schnitte für 60 min mit einer Blockinglösung (2% bovines Serumalbumin, 0,3% Triton X-100, und 5% Serum der Tierart aus der der sekundäre Antikörper stammt) behandelt, um danach direkt für 12-16 h bei 4°C mit dem primären Antiserum inkubiert zu werden. Nach einer erneuten TBS-Spülung wurden die Schnitte für 90 min mit einem Biotin-markiertem sekundären Antikörper inkubiert. Nach 90 min Inkubationszeit wurde noch ungebundener sekundärer Antikörper durch mehrmaliges Spülen mit TBS entfernt. Abschließend wurden die Schnitte für 90 min mit einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (Streptavidin-HRP, 1:375 in TBS) behandelt, wobei ebenfalls das nach 90 min noch ungebundene überschüssige Streptavidin-HRP durch spülen mit TBS entfernt wurde.

Für die Sichtbarmachung der Antikörperkonjugate mit einer Nickel-verstärkten 3,3'-Diaminobenzidin-Reaktion wurden die Schnitte für 15 min in eine

Diaminobenzidin-Reaktionslösung (0,05% 3,3`Diaminobenzidin, 0,6% Ammonium-Nickel-Sulfat, 0,01% $H_2O_2$  gelöst in 0,5M TBS) gebracht. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Spülen mit TBS und einmaliges Spülen mit Aqua dest. beendet. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet und am darauf folgenden Tag dehydriert und mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckt.

*Immunhistologischer Nachweis von Pgp*

*Hundegewebe:* Für den Nachweis von Pgp in dem formalinfixierten, paraffinierten Hundegewebe musste das Gewebe zunächst durch eine zweimalige 10 min Behandlung mit Xylol, eine einmalige 5 min Behandlung mit 100%igen Ethanol und eine einmalige 3 min Behandlung mit 96%igen Ethanol entparaffiniert werden. Im Anschluss daran wurde die endogene Peroxidase durch eine 0,5%ige  $H_2O_2$ -Lösung in 85%igen Methanol gehemmt. Die darauf folgende Demaskierung des Antigens erfolgte durch eine 20 min Erhitzung der Schnitte in 10mM Natrium-Citratpuffer (pH 6) bei 700 W in einer Mikrowelle (Bauknecht, Stuttgart). Die weiteren immunhistologischen Färbungsschritte erfolgten dann wie im Standardprotokoll beschrieben.

*Rattengewebe:* Für einen optimalen Nachweis des MDR1 Antigens mussten die Schnitte zunächst 6 h bei Raumluft getrocknet und dann 8 min in frischem Aceton bei Raumtemperatur fixiert werden. Im Anschluss an die Acetonbehandlung wurden die Schnitte erneut über Nacht getrocknet. Nach dieser Vorbehandlung erfolgten die weiteren Färbeschritte wie im Standardprotokoll beschrieben.

Die im Rahmen des Nachweises von Pgp verwendeten primären und sekundären Antikörper und ihre Konzentrationen sind in Tab.4 angegeben.

Gewebe	primäre AK	Hersteller	Konzentration	sekundäre AK	Hersteller	Konzentration
Hundegehirn	Monocl. Mouse-anti-Pgp (C219)	Calbiochem, Darmstadt,	1:50	biot. Donkey-anti-Mouse	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:200
Rattengehirn	Polycl. Goat-anti- MDR1 (SC1517)	Santa Cruz, USA	1:100	biot. Donkey-anti-Goat	Southern Biotech, USA	1:400

**Tab.4: Im Rahmen des immunhistologischen Nachweises von Pgp verwendete primäre und sekundäre Antikörper**

## MATERIAL UND METHODEN

### *Immunhistologischer Nachweis von NMDA-Rezeptoren*

Da für den immunhistochemischen Nachweis von NMDA-Rezeptoren noch kein etabliertes Färbeprotokoll zur Verfügung stand, mussten zunächst verschiedene Vorbehandlungen und Antikörperkonzentrationen getestet werden (Tab.5)

<b>Vor- behandlungen</b>	<b>primärer AK</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>	<b>sekundäre AK</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
10 min -20 °C Aceton, dann 2 d trocknen	Monocl. Mouse- anti-NR1	Upstate Biotechnology USA	1:50, 1:250, 1:500,	biot. Goat- anti-Mouse	DAKO, Hamburg,	1:200
1 h trocken	Monocl. Mouse- anti-NR1	Upstate Biotechnology USA	1:50, 1:250, 1:500,	biot. Goat- anti-Mouse	DAKO, Hamburg,	1:200
30 min bei 95 °C in Na-Citrat (pH9) im Wasserbad	Monocl. Mouse- anti-NR1	Upstate Biotechnology USA	1:50, 1:100, 1:200, 1:500,	biot. Goat- anti-Mouse	DAKO, Hamburg,	1:200
1h trocken	Monocl. Mouse- anti-NR1	Upstate Biotechnology USA	1:50, 1:250, 1:500,	biot. Donkey- anti-Mouse	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:200
10 min 4% Paraformaldehyd	Monocl. Mouse- anti-NR1	Upstate Biotechnology USA	1:50	biot. Donkey- anti-Mouse	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:200
30 min bei 95 °C in Na-Citrat (pH9) im Wasserbad	Monocl. Mouse- anti-NR1	Upstate Biotechnology USA	1:50	biot. Donkey- anti-Mouse	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:200
10min 4% Paraformaldehyd, Demaskierung: 2min Essigsäure/ Ethanol Gemisch	Monocl. Mouse- anti-NR1	Upstate Biotechnology USA	1:50	biot. Donkey- anti-Mouse	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:200
<b>10 min -20 °C Aceton, dann 1h trocknen</b>	<b>Monocl. Mouse- anti-NR1</b>	<b>Upstate Biotechnology USA</b>	<b>1:50</b>	<b>biot. Donkey- anti-Mouse</b>	<b>Jackson Immunoresearch Laboratories, USA</b>	<b>1:200</b>

**Tab.5 Im Rahmen der Etablierung des immunhistologischen Nachweises von NMDA-Rezeptoren verwendete Vorbehandlungen und Antikörperkonzentrationen. (Die Vorbehandlung mit dem besten Resultat ist hervorgehoben.)**

Bei den Testfärbungen hat sich gezeigt, dass eine 10 min Vorbehandlung mit -20 °C kalten Aceton und ein anschließendes einstündiges trocknen bei Raumtemperatur an der Luft, die gleichmäßigste und beste Möglichkeit ist, um die NMDA-Rezeptorsubunit 1 in naiven Rattengehirnschnitten nachzuweisen. Die weiteren Färbungsschritte wurden wie im Standardprotokoll beschrieben, unter Verwendung des primären Antikörpers in einer Konzentration von 1:50 und des sekundären Donkey-anti-Mouse Antikörpers in einer Konzentration von 1:200, durchgeführt.

## MATERIAL UND METHODEN

### *Immunhistologischer Nachweis von COX-2*

Auch für den Nachweis von COX-2 in Endothelzellen des Gehirns stand noch kein etabliertes Färbeprotokoll zur Verfügung. Die in den Testfärbungen verwendeten Vorbehandlungen und Antikörperkonzentrationen sind in Tab.6 angegeben.

<b>Vorbehandlung</b>	<b>primärer Ak</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>	<b>sekundäre AK</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
10min -20°C Aceton	Polycl. Goat- anti-COX-2	Santa Cruz, USA	1:50, 1:100,	biot. Donkey- anti-Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:250, 1:500
10min -20°C Aceton, dann 2d trocknen	Polycl. Goat- anti-COX-2	Santa Cruz, USA	1:50	biot. Donkey- anti-Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:500
1 h trocken	Polycl. Goat- anti-COX-2	Santa Cruz, USA	1:50	biot. Donkey- anti-Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:500
10 min 4% Paraformaldehyd, 2min Essigsäure/ Ethanol Gemisch	Polycl. Goat- anti-COX-2	Santa Cruz, USA	1:50	biot. Donkey- anti-Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:500
2 min bei 95°C in Na-Citrat (pH9) im Wasserbad	Polycl. Goat- anti-COX-2	Santa Cruz, USA	1:50	biot. Donkey- anti-Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:500
5 min bei 95°C in Na-Citrat (pH9) im Wasserbad	Polycl. Goat- anti-COX-2	Santa Cruz, USA	1:50	biot. Donkey- anti-Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:500
10 min 4% Paraformaldehyd	Polycl. Goat- anti-COX-2	Santa Cruz, USA	1:50	biot. Donkey- anti-Goat	Jackson Immunoresearch Laboratories, USA	1:500
<b>30 min bei 95°C in Na-Citrat (pH9) im Wasserbad</b>	<b>Polycl. Goat-anti- COX-2</b>	<b>Santa Cruz, USA</b>	<b>1:50</b>	<b>biot. Donkey-anti- Goat</b>	<b>Jackson Immunoresearch Laboratories, USA</b>	<b>1:500</b>

**Tab.6 Im Rahmen der Etablierung des immunhistologischen Nachweises von COX-2 in Endothelzellen verwendete Vorbehandlungen und Antikörperkonzentrationen. (Die Vorbehandlung mit dem besten Resultat ist hervorgehoben.)**

Zum Nachweis von COX-2 in Endothelzellen wurden die Schnitte für 30 min bei 95°C in Natrium-Citrat (pH 9) in einem Wasserbad erhitzt. Der primäre polyclonale Goat-anti-COX-2 wurde in einer Konzentration von 1:50 und der sekundäre biotinylierte Donkey-anti-Goat-Antikörper in einer Konzentration von 1:500 verwendet. Die an die Vorbehandlung anschließenden Färbeschritte erfolgten wie im Standardprotokoll beschrieben.

*Immunhistochemischer Nachweis von YB-1*

Bei der Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von YB-1 hat sich gezeigt, dass eine einmalige 10 min Vorbehandlung mit -20°C Aceton und im Anschluss daran ein zweitägiges Trocknen, die besten Färbeergebnisse erzielt. Die weiteren Färbeschritte erfolgten, mit den in Tab.7 angegebenen Antikörperkonzentrationen, wie im Standardprotokoll beschrieben.

Vorbehandlung	primärer Ak	Hersteller	Konzentration	sekundäre AK	Hersteller	Konzentration
1h trocknen	Polycl. Rabbit-anti-YB-1	Abcam, UK	1:50, 1:100; 1:200, 1:250,	biot. Goat-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:200
10 min -20°C Aceton, dann 1h trocknen	Polycl. Rabbit-anti-YB-1	Abcam, UK	1:250	biot. Goat-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:200
<b>10 min -20°C Aceton, dann 2d trocknen</b>	<b>Polycl. Rabbit-anti-YB-1</b>	<b>Abcam, UK</b>	<b>1:250</b>	<b>biot. Goat-anti-Rabbit</b>	<b>DAKO, Hamburg</b>	<b>1:200</b>

**Tab.7 Im Rahmen der Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von YB-1 verwendete Vorbehandlungen und Antikörperkonzentrationen. (Die Vorbehandlung mit dem besten Resultat ist hervorgehoben.)**

*Immunhistochemischer Nachweis von YB-1 in Human- und Primatengehirngewebe*

Um YB-1 immunhistochemisch in perfundierten Makakengehirnschnitten nachweisen zu können war keine spezielle Vorbehandlung der Schnitte im Vorfeld der Färbung notwendig. Der primäre AK wurde in einer Konzentration von 1:500 verwendet und der sekundäre, biotinylierte Goat-anti-Rabbit-Ak in einer Konzentration von 1:200.

Die formalinfixierte Humangehirnschnitte mussten zunächst in einer Alkoholreihe entparaffiniert und im Anschluss daran in der Mikrowelle demaskiert werden, um YB-1 im Gewebe nachweisen zu können. Wie bei den Rattengehirnschnitten, wurde der primäre AK in einer Konzentration von 1:250 und der sekundäre AK in einer Konzentration von 1:250 verwendet.

*Immunhistochemischer Nachweis von ZONAB*

In Analogie zu dem immunhistochemischen Nachweis von YB-1, hat sich bei der Etablierung eines Färbeprotokolls für ZONAB gezeigt, dass durch eine einmalige 10 minütige Fixierung mit Aceton bei -20°C mit einer anschließenden zweitägigen



## MATERIAL UND METHODEN

Lufttrocknung bei Raumtemperatur, die besten Färbeergebnisse erzielt werden können (Tab.8).

Vorbehandlung	primärer Ak	Hersteller	Konzentration	sekundäre AK	Hersteller	Konzentration
10 min -20 °C Aceton,	Polycl. Rabbit-anti-ZONAB	Invitrogen, Karlsruhe	1:50; 1:100; 1:200; 1:500;	biot. Pig-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:500
10 min -20 °C Aceton	Polycl. Rabbit-anti-ZONAB	Invitrogen, Karlsruhe	1:50	biot. Goat-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:500
1h trocknen	Polycl. Rabbit-anti-ZONAB	Invitrogen, Karlsruhe	1:50	biot. Goat-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:500
30 min bei 95 °C in NaCitrat (pH9) im Wasserbad	Polycl. Rabbit-anti-ZONAB	Invitrogen, Karlsruhe	1:50	biot. Goat-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:500
10 min 4% Paraformaldehyd 2min Essigsäure/ Ethanol Gemisch	Polycl. Rabbit-anti-ZONAB	Invitrogen, Karlsruhe	1:50	biot. Goat-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:500
10 min 4% Paraformaldehyd	Polycl. Rabbit-anti-ZONAB	Invitrogen, Karlsruhe	1:50	biot. Goat-anti-Rabbit	DAKO, Hamburg	1:500
<b>-20 °C Aceton, 2d trocknen</b>	<b>Polycl. Rabbit-anti-ZONAB</b>	<b>Invitrogen, Karlsruhe</b>	<b>1:50</b>	<b>biot. Goat-anti-Rabbit</b>	<b>DAKO, Hamburg</b>	<b>1:500</b>

**Tab.8 Im Rahmen der Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von ZONAB verwendete Vorbehandlungen und Antikörperkonzentrationen. (Die Vorbehandlung mit dem besten Resultat ist hervorgehoben.)**

### *Immunfluoreszenz und Mehrfachmarkierungen*

Für die immunhistologische Untersuchung der exakten zellulären Lokalisation von COX-2, YB-1 und ZONAB im Bezug zu GLUT1, Pgp und NeuN wurden verschiedene Mehrfachmarkierungen durchgeführt. Nach einer für das jeweilige nachzuweisende Protein spezifischen Vorbehandlung wurden alle Schnitte mehrfach in TBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungen und die Antikörperinkubationen erfolgten wie im Standardprotokoll beschrieben. Als sekundäre Antikörper wurden jeweils ein Carbocyanin 2 (Cy2) oder Carbocyanin 3 (Cy3) und ein Biotin markierter Antikörper verwendet. Die Gehirnschnitte wurden nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper erneut gewaschen und im Anschluss für 60 min mit 1:500 Cy2- oder Cy3- markierten Streptavidin (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) behandelt. Überflüssiges Streptavidin wurde

## MATERIAL UND METHODEN

durch zweimaliges Spülen mit TBS und einmaliges Spülen mit Aqua dest. entfernt. Die Schnitte wurden abschließend über Nacht getrocknet und am darauf folgenden Tag für die Eindeckung mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt) dehydriert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA), sowie die jeweiligen Vorbehandlungen sind in Tab. 9 angegeben.

Mehrfachmarkierung	Gewebe	Vorbehandlung	primäre AK	Hersteller	sekundäre Ak
COX-2/Pgp	natives Rattengehirn	30 min bei 95°C im Wasserbad in NaCitrat (pH9)	Goat-anti-COX-2 (1:50); Mouse-anti-Pgp (1:100)	COX-2: Santa Cruz, USA; Pgp: Calbiochem, Darmstadt	Cy2-Donkey-anti-Mouse (1:500); biot. Donkey-anti-Goat (1:500)
YB-1/Pgp	natives Rattengehirn	10 min -20°C Aceton, 2d trocknen,	Rabbit-anti-YB-1 (1:250); Goat-anti-MDR1 (1:30)	YB-1: Abcam, UK; MDR1: Santa Cruz, USA	Cy3-Donkey-anti-Rabbit (1:500); biot. Donkey-anti-Goat (1:200)
YB-1 / GLUT1	natives Rattengehirn	10 min -20°C Aceton, 1d trocknen,	Rabbit-anti-YB-1 (1:250); Mouse-anti-GLUT1 (1:500)	YB-1: Abcam, UK; GLUT1: Abcam, UK	Cy3-Donkey-anti-Rabbit (1:500); biot. Donkey-anti-Mouse (1:500)
YB-1/NeuN	perf. Rattengehirn	/	Rabbit-anti-YB-1 (1:500); biot. Mouse-anti-NeuN (1:250)	YB-1: Abcam, UK; NeuN: Chemicon, Hofheim	Cy3-Donkey-anti-Rabbit (1:500)
YB-1 / GLUT1	perf. Affengehirn	/	Rabbit-anti-YB-1 (1:250); Mouse-anti-GLUT1 (1:500)	YB-1: Abcam, UK; GLUT1: Abcam, UK	Cy3-Donkey-anti-Rabbit (1:750); biot. Donkey-anti-Mouse (1:500)
YB-1/NeuN	perf. Affengehirn	/	Rabbit-anti-YB-1 (1:500); biot. Mouse-anti-NeuN (1:250)	YB-1: Abcam, UK; NeuN: Chemicon, Hofheim	Cy3-Donkey-anti-Rabbit (1:500)
YB-1 / GLUT1	formalif. Humangehirn	Entparaffinierung, 20 min NaCitrat (pH6) bei 700W in einer Mikrowelle	Rabbit-anti-YB-1 (1:250); Mouse-anti-GLUT1 (1:200)	YB-1: Abcam, UK; GLUT1: Abcam, UK	Cy3-Donkey-anti-Rabbit (1:750); biot. Donkey-anti-Mouse (1:500)

**Tab.9 Übersicht über die in den unterschiedlichen Geweben verwendeten Immunfluoreszenz- und Mehrfachmarkierungen. In der Tabelle sind die verwendeten Vorbehandlungen, die jeweiligen AK, sowie der jeweilige Hersteller des prim. AK angegeben.**

### 4.4 AUSWERTUNG UND STATISTIK

#### 4.4.1 AUSWERTUNGEN

Alle immunhistologischen Auswertungen wurden vom Experimentator verblindet durchgeführt. Die Schnittebenen, die für die jeweiligen Auswertungen der Gehirnregionen herangezogen wurden, wurden nach Paxinos und Watson (2005) definiert (PAXINOS u. WATSON 2005).

#### 4.4.2 QUANTIFIZIERUNG DER PGP-EXPRESSION MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE

##### *Erfassung der Fläche und der optischen Dichte*

Die quantitative Erfassung der Pgp-Expression im Hundehirn und im Rattengehirn erfolgte mit einem von H. A. Volk etablierten computer-gestützten Auswertungssystem (H. A. VOLK et al. 2004). Hierbei wird die Pgp-markierte Fläche und die optische Dichte (OD) der markierten Fläche erfasst. Das Auswertungssystem setzte sich aus einem Olympus BH2-Mikroskop mit einer Plan-Neofluar Linse (Zeiss, Deutschland), einer digitalen Farbkamera (single chip charge coupled device, OCD, AxioCam, Zeiss, Göttingen, Deutschland) und einem AMD Athlon™ Computer mit einem 64er-Rechenprozessor, der mit einer „image capture interface card“ (AxioCam MR Interface Rev. A; Göttingen) bestückt ist, zusammen. Die Auswertung der Gehirnschnitte erfolgte bei einer 400fachen Vergrößerung. Die eingelesenen Bilder hatten eine Größe von 1300 x 1030 Pixel und wurden mit der Bildanalysesoftware KS400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision) ausgewertet. Vor jeder Messung wurde die Kamera für mindestens eine Stunde aufgewärmt, da die Temperatur der Kamera von großer Bedeutung für das Signal-Rausch-Verhältnis und somit für den gesamten Messprozess ist. Der Aufbau der Auswertung ähnelt dem von Rieux et al. (2002) beschriebenen System zur Auswertung des Proteins Fos in Gehirnschnitten (RIEUX et al. 2002). Im Gegensatz zu dem System von Rieux et al. (2002), in dem Grauwerte erfasst und in die OD umgerechnet wurden (RIEUX et al. 2002), wird bei unserem System die OD direkt gemessen. Die direkte Messung wurde durch eine

der Untersuchung vorausgehende Kalibration des Systems mit einem OD-Standard (Calibration of Step Tablet No.1842137, Eastman Kodak Company, USA) ermöglicht. Mittels dieses Standards konnte die Beleuchtungsstärke des Mikroskops überprüft und konstant gehalten werden. Die eingelesenen Bilder wurden auf optische Distorsionen korrigiert („Shading correction“), um Helligkeits-Ungleichheiten bei den Aufnahmen auszugleichen. Für diese Korrektur wurde ein Bild des freien Bereiches des Objektträgers (Hellfeld-Hintergrund) eingelesen und von den für die Messung eingelesenen Bildern abgezogen.

Um ein positives Pgp-Signal deutlich vom Hintergrundsignal unterscheiden zu können, musste vor jeder Messung ein Schwellenwert definiert werden. Der, speziell auf die jeweilige Färbung bezogene Schwellenwert, vermeidet lokale Hintergrundsignalabweichungen, die als positives Pgp-Signal gewertet werden könnten. Er wurde am Beginn einer jeden Messung für mindestens die Hälfte der zu untersuchenden Schnitte und für jede auszuwertende Region separat bestimmt, um im Anschluss daran den Mittelwert der einzelnen Messungen zu errechnen und diesen als Schwellenwert zu definieren. Diese, so ermittelte Schwelle wurde während der gesamten Messreihe einer Region konstant beibehalten. Nur Pixel mit einer optischen Dichte über dem jeweils definierten Schwellenwert wurden in die Auswertung miteinbezogen. Zur Hintergrundkorrektur der OD-Messung wurde der Bereich als Hintergrund definiert, der unterhalb des Schwellenwertes lag. Die mittlere OD des Hintergrundes wurde dann von der mittleren OD des Pgp-positiven Signals abgezogen, um eine Hintergrund korrigierte OD des Pgp-positiven Signals zu erlangen.

Die Pgp-Expression wurde bei jeder zu messenden Gehirnregion im Rattengehirn bilateral und im Hundehirn unilateral erfasst. Die gemessenen Gehirnregionen waren in der Hundestudie der Cortex, die Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus (GD) und der Hilus. In den Rattengehirnen wurden zusätzlich zu den drei genannten Bereichen der piriforme Cortex, und die Cornu ammonis 3 (CA3) Region des Hippocampus ausgewertet. Alle Messungen erfolgten in den Schnittebenen -2.3mm, -3.8mm und -5.8mm relativ zu Bregma (PAXINOS u. WATSON 2005). In einzelnen Fällen konnten nicht alle genannten Regionen eines jeden Individuums gemessen werden (s. Ergebnissteil). Je nach Größe der Region wurden drei bis zehn Messfelder, mit einer Größe von  $43,434 \mu\text{m}^2$ , gemessen. Die gemessene Fläche des positiven Pgp-Signals wurde relativ zur Gesamtgröße des Messfeldes angegeben.

### 4.4.3 BESTIMMUNG DER NEURONENZAHL

Als Grundlage für die Bestimmung der Neuronenzahl dienen 40µm dicke, Thionin gefärbte, Rattengehirnschnitte. Die Neurone wurden in der Region Hilus des GD in seriellen Schnitten (Hippocampus, Schnittebenen relativ zu Bregma: -2.4mm; -3.0mm; -3.6mm; -4.2mm; -4.8mm und -5.4mm) quantitativ erfasst. Hierfür wurde für jeden Schnitt die Begrenzung des Hilus bestimmt. Als Begrenzung des Hilus wurde die Körnerzellschicht des GD und eine Verbindung der Enden der Körnerzellschicht des GD jeweils mit der Spitze der CA3-Region definiert (GORTER et al. 2001). Die Neurone innerhalb des Begrenzungsbereiches wurden vom Experimentator mit dem computer-gestützten Auswertungssystem Stereoinvestigator 6.0 (Microbrightfield Europe, Magdeburg, Deutschland) stereologisch ausgezählt. Das System besteht aus einem Leica DMLB Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland), einer digitalen Farbkamera (single chip charge coupled device, CCD, CX9000, Microbrightfield Europe, Magdeburg, Deutschland) und einem AMD Athlon™ Computer mit einem 64er-Rechenprozessor. Die Auszählung erfolgte mit der Optical Fractionator Methode. Bei dieser Methode wird ein auf den Zählbereich abgestimmtes Raster eingefügt. Die zu zählenden Bereiche werden entlang des Zählbereiches vom Computersystem zufällig bestimmt. Die Tiefe des Zählbereiches ist mit der Schnittdicke, abzüglich eines 10%igen Sicherheitsbereiches vom oberen und unteren Schnitttrand, identisch. Es werden nur Neurone gezählt, die in der Fokusebene und innerhalb des vom Computer vorgegebenen auszuwertenden Bereiches liegen. Nach dieser von West et al. (1991) beschriebenen stereologischen Quantifizierungsmethode kann durch die Verwendung serieller Schnitte die absolute Zellzahl in dem begrenzten Bereich geschätzt werden (WEST et al. 1991). Weiterhin lässt sich auf diese Weise ebenfalls das Volumen von polymorphen Körpern schätzen. Aus der Zellzahl und dem Volumen lässt sich weiterhin eine Aussage über die Zelldichte ableiten (WEST et al. 1991).

#### 4.4.4 SCORE-SYSTEM DER YB-1 UND COX-2-EXPRESSION

Die Expression von YB-1 und COX-2 in den immunhistochemisch gefärbten 14 µm dicken Rattengehirnschnitten wurde mittels eines Score-Systems erfasst. Hierbei wurden der Hilus, die CA3-Region, der GD, der parietale Cortex und der piriforme Cortex differenziert voneinander und für die gefäßassoziierte, sowie die neuronale Expression von YB-1 und COX-2 einzeln bewertet. Die Bewertungskriterien wurden für alle Bereiche getrennt festgelegt. Es wurden zur Festlegung der Kriterien alle Schnitte betrachtet und an Hand dieses Eindruckes die basale Expression des jeweiligen Bereiches bestimmt. Das Bewertungssystem wurde einem zur semiquantitativen Erfassung einer Neurodegeneration abgeleiteten Skala entnommen (PEKCEC et al. 2008).

Score-System:

0	Kein Markierung von Neuronen / Keine gefäßassoziierte Färbung
1	basale Expression markierter Neuronen / basale Expression gefäßassoziiertes Färbung
2	ggr. Induktion markierter Neuronen / ggr. Induktion gefäßassoziiertes Färbung
3	hgr. Induktion markierter Neuronen / hgr. Induktion gefäßassoziiertes Färbung

#### 4.4.5 DOPPELMARKIERUNGSSTUDIEN

Das Fluoreszenzsignal von doppelmarkierten Schnitte wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop erfasst (Axiovert 100M, Zeiss, Göttingen, Deutschland). Angeregt wurden die Schnitte durch einen Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm und einem Helium/Neon-1-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm. Die Bilder wurden bei 630facher Vergrößerung eingelesen.

### 4.4.6 STATISTIK

Alle Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 für Windows durchgeführt. Die Angaben der Daten erfolgten im Allgemeinen als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean, Standardfehler) oder als Median. Zu Beginn wurde anhand der Tests von Kolmogorov-Smirnov, D`Agostino und Pearson sowie Shapiro-Wilk geprüft, ob sich die Daten entsprechend einer Gaußschen Normalverteilung verhalten. Bei Vorliegen von parametrischen Daten wurde der Student's t-Test und bei nicht parametrischen Daten der Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Grundsätzlich wurden alle statistischen Tests zweiseitig durchgeführt. Lediglich wenn aufgrund der bekannten Literatur und den Arbeitshypothesen eine Veränderung der Daten nur in eine Richtung zu erwarten war, wurde einseitig getestet.

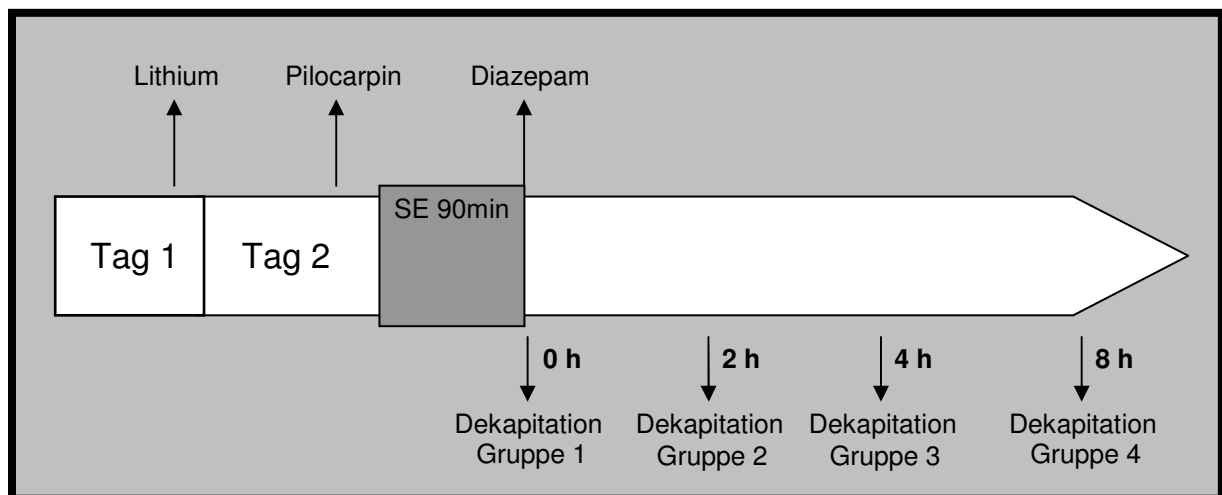
## 4.5 VERSUCHSDESIGN

### 4.5.1 ANFALLSINDUZIETE ÜBEREXPRESSION VON PGP IM HUNDEGEHIRN

Im vorliegenden Projekt sollte die Expression von Pgp im Gehirngewebe von Hunden verschiedenen Alters mit unterschiedlichem Anfallsgeschehen im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Anfallsgeschehen oder Erkrankungen des ZNS nachgewiesen werden. Die Präparate wurden an Hand des in Kap. 4.3.4 beschriebenen Färbeprotokolls immunhistochemisch gefärbt und anschließend computer-gestützt ausgewertet. Hierbei wurde die Pgp-markierte Fläche (Area in %), sowie die OD im Bereich der Körnerzellschicht des GD, des Hilus und des Cortex gemessen.

#### 4.5.2 REGULATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP- ÜBEREXPRESSION

Zur Untersuchung der Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression wurden weibliche Wistar Unilever Ratten verwendet. Die Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt, wobei eine Gruppe (n=8) als Kontrollgruppe ohne SE diente. In der zweiten Gruppe erfolgte die Induktion eines SE durch das Chemikonvulsivum Pilocarpin (Kap.4.2.2). Dieser wurde nach 90 min durch Diazepaminjektionen unterbrochen. Um eine Aussage über Veränderungen im Gehirngewebe nach einem 90 min andauernden SE treffen zu können, wurden die Tiere im Anschluss an den SE in vier Gruppen unterteilt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb.9) nach der Diazepaminjektion dekapitiert und immunhistochemisch untersucht. Zum Vergleich mit einem späteren Zeitpunkt nach einem SE standen uns Gehirnschnitte von Tieren aus einem weiteren Projekt der Arbeitsgruppe zur Verfügung, die 48 h nach der Diazepaminjektion dekapitiert worden sind.



**Abb.9 Versuchsdesign und zeitlicher Verlauf**



4.5.3 MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-  
 ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION MITTELS SC-  
 51089

Für diese Untersuchung wurden weibliche Wistar Unilever Ratten im fraktionierten Lithium-Pilocarpin Modell verwendet. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 (n=9) und Gruppe 2 (n=6) wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils morgens und abends mit Aqua ad injectabilia (A. inj.) (3 ml/kg; i.p.) und Gruppe 3 (n= 9) mit SC-51089 (10 mg/kg gelöst in 3 ml/kg A. inj., i.p.; Biomol, USA) behandelt. Die Induktion eines SE durch Pilocarpin (Kap. 4.2.2) erfolgte bei Gruppe 2 und 3 am ersten Tag der Behandlung. Gruppe 1 diente als Vehikel/Kontrollgruppe, bei der kein SE ausgelöst wurde. Einen Tag nach der letzten Behandlung wurden die Tiere für die immunhistochemischen Untersuchungen dekapitiert (Kap.4.3.1). Abb. 10 gibt den zeitlichen Verlauf des Versuches wieder.

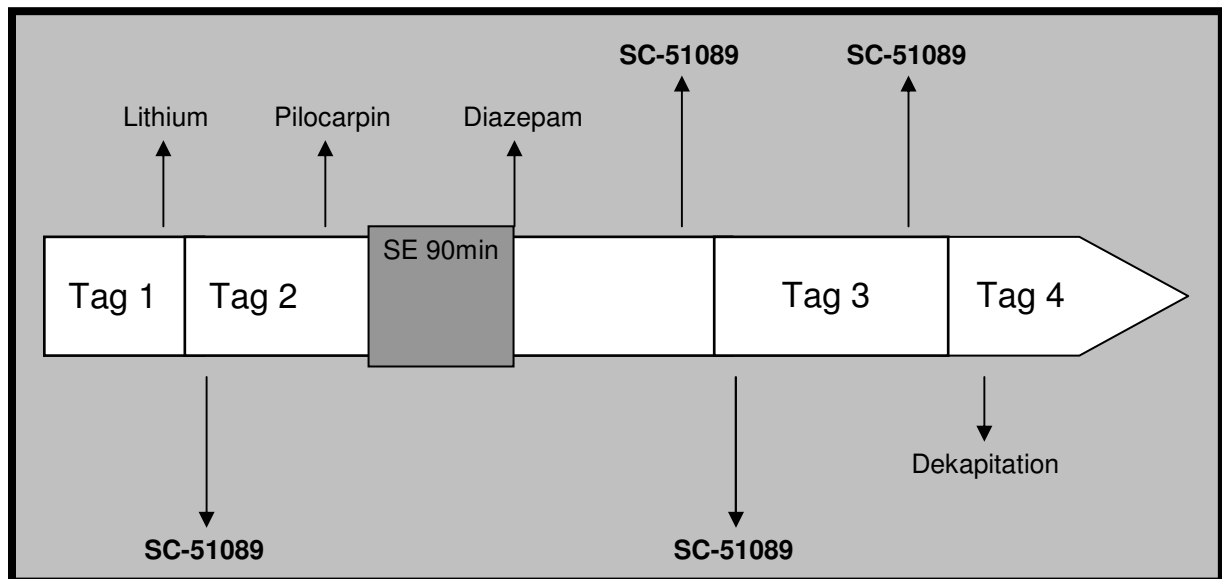


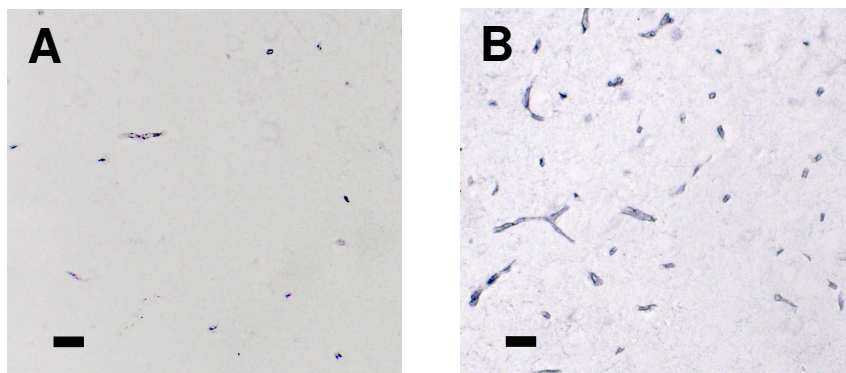
Abb.10 Versuchsdesign und zeitlicher Verlauf

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 ANFALLSINDUZIERTE ÜBEREXPRESSION VON PGP IM KANINEN GEHIRN

Zur Beurteilung des Effektes spontan epileptischer Anfälle bzw. eines spontanen SE auf die Pgp-Expression im kaninen Gehirn, wurden Gehirnschnitte von 29 Hunden (Tab 2, Kap. 4.1) immunhistochemisch gegen den Multidrug-Transporter Pgp gefärbt. (Kap. 4.3.4). Im Anschluss an die Färbung wurden die Regionen Hilus, GD und Cortex Computer-gestützt ausgewertet (Kap. 4.4.2).

Bei der für diese Auswertung verwendeten Färbung waren keine Hinweise für eine parenchymale Expression von Pgp erkennbar. In allen verwendeten Gehirnschnitten konnte Pgp lediglich in Endothelzellen nachgewiesen werden (Abb.11). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der vom Computer gemessenen Fläche ausschließlich um endotheliales Pgp handelt. Es wurde sowohl die Pgp markierte Fläche (Pgp labelled area in %) als auch die optische Dichte (OD) der markierten Fläche ausgewertet (Tab.10).



**Abb.11 Pgp-Expression in Kaninen Gehirnschnitten. A zeigt die Pgp-Expression im Hilus des Hippocampus bei einem Tiere ohne Anfallsgeschehen und B die Pgp-Expression im Hilus des Hippocampus bei einem Tier mit SE. In keinem der Schnitte ist ein Hinweis auf eine parenchymale Pgp-Expression erkennbar. (scale bar = 50  $\mu$ m)**

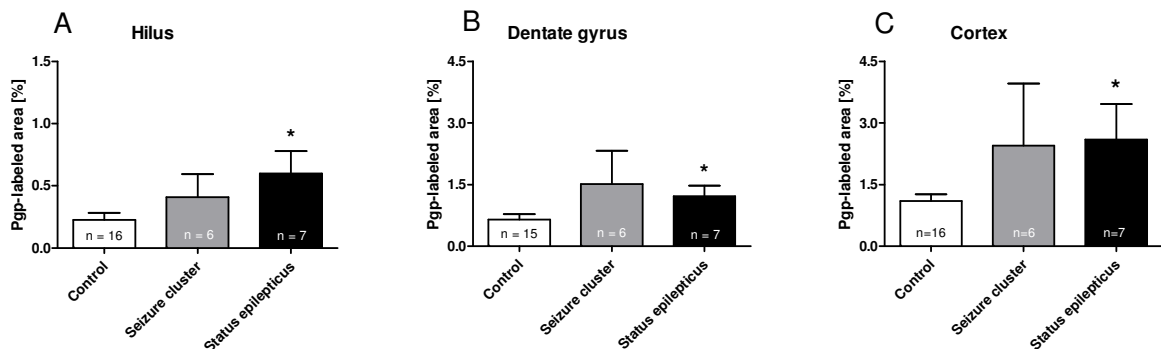
Tier- Nr.	Geschlecht	klinische Diagnose	Pgp-labeled area (Hilus)	Pgp-labeled area (GD)	Pgp-labeled area (Cortex)	OD (Hilus)	OD (GD)	OD (Cortex)
1	m / -	Kontrolle	0,296	0,301	1,092	0,2011	0,149	0,1136
2	m / -	Kontrolle	0,583	1,252	1,163	0,1842	0,1775	0,1177
3	m / -	Kontrolle	0,42	0,814	1,865	0,1758	0,1718	0,1542
4	m / -	Kontrolle	0,07	0,674	0,353	0,1913	0,1392	0,1125
5	m / -	Kontrolle	0,1	1,901	1,201	0,1903	0,1091	0,1387
6	m / -	Kontrolle	0,103	0,298	1,537	0,1975	0,1358	0,1018
7	f / -	Kontrolle	0,453	0,469	0,986	0,1803	0,1595	0,1228
8	f / -	Kontrolle	0,113	0,816	0,274	0,182	0,1245	0,1169
9	f / -	Kontrolle	0,79	-	2,514	0,1915	0,1402	0,1153
10	f / -	Kontrolle	0,083	0,99	0,956	0,1725	0,117	0,1087
11	f / -	Kontrolle	0,033	0,228	0,475	0,1661	0,1614	0,1349
12	f / c	Kontrolle	0,126	0,744	1,37	0,1996	0,1234	0,1685
13	f / ?	Kontrolle	0,3	0,634	1,258	0,2113	0,186	0,1551
14	f / -	Kontrolle	0,006	0,02	0,338	0,1586	0,1165	0,1034
15	f / c	Kontrolle	0,08	0,147	2,017	0,1666	0,178	0,1222
16	m / ?	Kontrolle	0,046	0,496	0,172	0,1847	0,0969	0,0971
17	m / -	Cluster-Anfälle	0,326	0,362	1,175	0,1828	0,1606	0,1815
18	m / -	Cluster-Anfälle	0,083	0,193	0,331	0,1796	0,1538	0,1125
19	m / -	Cluster-Anfälle	1,307	5,34	9,933	0,2222	0,157	0,1132
20	m / -	Cluster-Anfälle	0,11	0,841	0,709	0,1667	0,1347	0,1338
21	m / -	Cluster-Anfälle	0,353	1,924	1,704	0,1816	0,1238	0,1353
22	f / -	Cluster-Anfälle	0,276	0,423	0,848	0,1895	0,1721	0,1547
23	m / -	SE	1,393	1,711	7,582	0,2194	0,2022	0,0998
24	m / -	SE	0,09	0,479	1,215	0,1743	0,1826	0,177
25	m / -	SE	0,953	1,781	2,137	0,2427	0,1717	0,1388
26	m / c	SE	0,326	0,691	1,356	0,2162	0,2076	0,1347
27	m / c	SE	0,77	2,227	1,308	0,1908	0,1104	0,1225
28	f / -	SE	0,12	0,933	1,607	0,181	0,1282	0,1368
29	f / c	SE	0,54	0,709	2,984	0,2016	0,1779	0,1614

**Tab.10 Übersicht der Mittelwerte der Pgp-markierten Fläche (%) und der OD für den Hilus, den GD und den Cortex aller verwendeten Gehirnschnitte.**

## ERGEBNISSE

Bei allen Kontrolltieren lagen die durchschnittlichen Area-Werte der drei Regionen zwischen 0,006% und 2,514% im Verhältnis zur insgesamt ausgewerteten Fläche. Die OD-Werte lagen zwischen 0,0969 und 0,2113. Sowohl die Area-Werte als auch die OD-Werte zeigten zwischen den einzelnen Individuen der Kontrollgruppe nur geringe Variationen. Mit einem Mittelwert für die Area von  $0,220 \pm 0,086$  im Hilus,  $0,506 \pm 0,123$  in der Körnerzellschicht des GD und  $1,132 \pm 0,253$  im Cortex bei weiblichen Tieren und  $0,231 \pm 0,078$  im Hilus,  $0,819 \pm 0,220$  in der Körnerzellschicht des GD und  $1,055 \pm 0,229$  im Cortex bei männlichen Tieren, konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Pgp-Expression aufgedeckt werden.

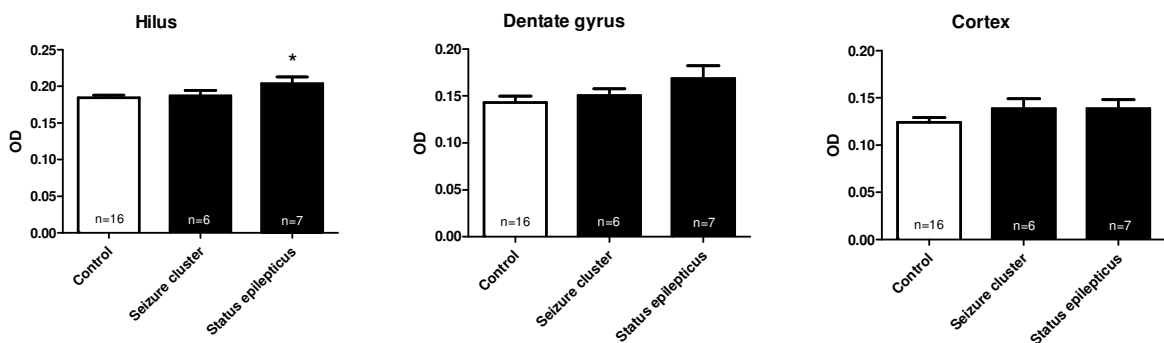
Ein bis fünf Tage im Anschluss an einen spontanen SE war die Pgp-Expression in allen drei ausgewerteten Gehirnregionen signifikant erhöht (Hilus  $p=0,0172$ ; GD  $p=0,0349$ ; Cortex  $p=0,0228$ ) (Abb.12). Im Hilus kam es zu einer Zunahme der Pgp-markierten Fläche um 166%, im GD um 87% und im Cortex um 137%. Es konnte jedoch in keiner der drei Regionen eine signifikante Zunahme von Pgp im Anschluss an Cluster-Anfälle (=Anfallsserien) nachgewiesen werden.



**Abb.12 Pgp markierte Fläche (in % der Gesamtfläche) bei Kontrollhunden, Hunden mit Cluster Anfällen und Hunden mit SE. Sowohl im Hilus (A), als auch im Gyrus dentatus (B) und im Cortex (C) kommt es im Anschluss an einen SE zu einer signifikanten Zunahme der Pgp-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).**

## ERGEBNISSE

Die Intensität der Färbung, welche durch die Messung der OD ausgewertet wurde, zeigte sowohl im Anschluss an Cluster-Anfälle als auch im Anschluss an einen SE im Cortex und im GD keine signifikanten Veränderungen. Lediglich im Hilus konnte zusätzlich zu einer signifikanten Erhöhung der Pgp-markierten Fläche auch eine signifikante Veränderung der OD im Anschluss an einen SE nachgewiesen werden ( $p=0,0265$ ) (Abb.13).



**Abb.13 OD-Werte der Pgp-Färbung bei Kontrollhunden, Hunden mit Cluster Anfällen und Hunden mit SE. Es konnte nur im Hilus des GD im Anschluss an einen spontanen SE eine signifikante Veränderung der OD-Werte festgestellt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. (\* $p < 0,05$ )**

## 5.2 REGULATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION

Eine wichtige Voraussetzung in der Entwicklung neuer Konzepte zur Behandlung der pharmakoresistenten Epilepsie ist die weitergehende Erforschung der grundlegenden Mechanismen, die an der Überexpression der Multidrug-Transporter beteiligt sind.

Zur Untersuchung der Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression wurden 48 weibliche Wistar-Unilever-Ratten in einem fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell verwendet. Die Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt, wobei eine Gruppe ( $n=8$ ) als Kontrollgruppe ohne SE diente. Vierzig Tiere wurden nach einer Vorbehandlung mit Lithiumchlorid bis zur Auslösung eines generalisierten SE mit Pilocarpin behandelt.

## ERGEBNISSE

Die maximale Anzahl der Pilocarpininjektionen wurde dabei auf 12 Injektionen beschränkt (Kap 4.2.2.). Bei 30 Tieren konnte durch die Pilocarpingaben ein generalisierter SE ausgelöst werden, lediglich bei einem Tier führten die wiederholten Injektionen nur zu einem anhaltenden fokalen Anfallsgeschehen. Fünfzehn Tiere mit generalisiertem Anfallsgeschehen verstarben jedoch noch innerhalb der ersten 8 h nach Beendigung des SE durch Diazepam (Tab.11).

	<b>Kontrollen</b>	<b>Pilocarpin</b>
<b>Anzahl Tiere pro Gruppe</b>	n=8	n=40
<b>Anzahl Tiere mit generalisiertem SE (Tiere mit generalisiertem SE in %)</b>	/	n=30 (75%)
<b>anhaltende fokale Anfallsaktivität (Tiere mit anhaltender fokaler Anfallsaktivität in %)</b>	/	n=1 (2,5%)
<b>Anzahl Tiere ohne SE (Tiere ohne SE in %)</b>	/	n=9 (22,5%)
<b>Anzahl verstorbener Tiere mit generalisiertem SE (Mortalität in %)</b>	/	n=15 (37,5%)

**Tab.11 Übersicht über die Tierzahlen und Tiergruppen im verwendeten fraktionierten Lithium-Pilocarpin Modell.**

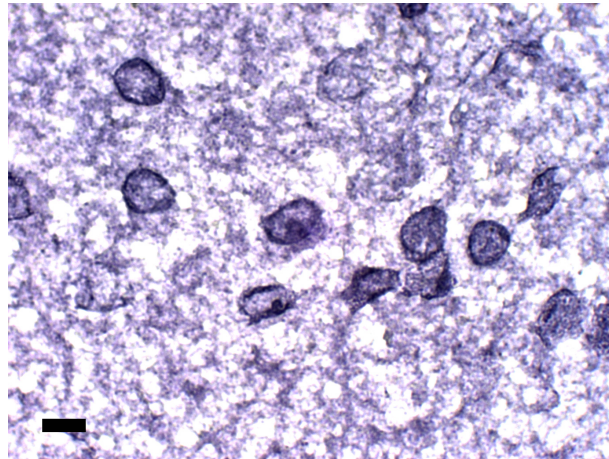
Während des gesamten Versuchsverlaufes wurden die Tiere beobachtet und es wurde ihr Verhalten aufgezeichnet. Die Tiere benötigten durchschnittlich  $3,267 \pm 0,3488$  Pilocarpininjektionen bis zur Auslösung eines generalisierten SE. Zur Unterbrechung des SE nach 90 min mit Diazepam wurden durchschnittlich  $4,833 \pm 0,2304$  Injektionen benötigt. Erst nach Beendigung des SE durch Diazepam wurden die Tiere in weitere Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (n=2) wurde 2 h nach Ende des SE, die zweite Gruppe (n=6) 4 h nach Ende des SE und die dritte Gruppe (n=7) 8 h nach Ende des SE dekapitiert und die Gehirne wurden für weitere immunhistochemische Untersuchungen entnommen (Kap 4.3.1).

### 5.2.1 NMDA-REZEPTOREN

Um eine Aussage über das Vorhandensein und die quantitative Expression von NMDA-Rezeptoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE an Endothelzellen des Gehirns treffen zu können, wurden verschiedene immunhistochemische Färbeprotokolle getestet. Die Etablierung der Färbung erfolgte sowohl an den Kontrolltieren als auch an den SE-Tieren, die 2, 4 oder 8 h nach einem SE dekapitiert worden sind. Es wurde für die Färbung ein primärer AK benutzt, der in *in vitro* Präparationen isolierter Endothelzellen mit positiven Resultaten verwendet worden ist.

Bei den Testfärbungen hat sich gezeigt, dass eine 10 minütige Vorbehandlung mit -20°C kaltem Aceton und ein anschließendes einstündiges trocknen bei Raumtemperatur, die gleichmäßigste und beste Möglichkeit ist, um die Rezeptorsubunit-1 (NR1) in nativen Rattengehirnschnitten nachzuweisen (Kap.4.3.4). Die weiteren getesteten Färbeprotokollen ergaben entweder keine spezifische Markierung oder die Schnitte waren durch die jeweilige Vorbehandlungen so stark angegriffen, dass an ihnen keine Aussage über die Lokalisation und quantitative Expression der NMDA-Rezeptoren getroffen werden konnte.

Im Gegensatz zu verschiedenen Western-Blot Untersuchungen von *in vitro* isolierten Gehirndothelzellen (SHARP et al. 2003; ANDRAS et al. 2007; BAUER et al. 2008), ließen sich jedoch bei keiner der Färbungen auf immunhistochemischen Wege NMDA-Rezeptoren in Endothelzellen darstellen. Sowohl bei den Kontrolltieren, als auch bei den SE-Tieren, konnten NMDA-Rezeptoren ausschließlich in der Zellmembran von Neuronen dargestellt werden (Abb.14), Aus diesem Grund war es mit den verwendeten immunhistochemischen Methoden nicht möglich eine Aussage über die quantitative Expression von NMDA-Rezeptoren an Endothelzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE zu treffen.



**Abb.14 Expression der NMDA-Rezeptorsubunit NR1 in der Zellmembran von Neuronen des Cortex von einem Kontrolltier ohne SE. Es sind morphologisch keine Hinweise für eine endotheliale Lokalisation der NR1-Rezeptorsubunit zu erkennen. (scale bar = 10µm)**

### 5.2.2 COX-2

Da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Anwendung eines COX-2-Hemmers zu einer deutlichen Reduktion der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression führt (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe), sollte in dieser Studie untersucht werden, ob immunhistochemisch eine Expression von COX-2 in Endothelzellen nachweisbar ist, und ob es anfallsinduziert zu einer Expressionsveränderung der COX-2 kommt.

Aus bisher unveröffentlichten *in vitro* Versuchen unserer kooperierenden Arbeitsgruppe (Björn Bauer, UMD, MN, USA) ist bekannt, dass es Glutamat-induziert *in vitro* in kultivierten Endothelzellen nicht zu einer vermehrten Expression von COX-2 kommt, sondern lediglich zu einer verstärkten Liberalisierung von AA. Um eine Aussage über die Expression von COX-2 *in vivo* zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE treffen zu können wurden Gehirnschnitte von Kontrolltieren und SE-Tiere, die 2, 4, 8 h und 48 Stunden nach einem 90 min SE dekapitiert wurden (Kap. 5.2), immunhistochemisch für COX-2 gefärbt (Kap. 4.3.4). Da auch für den immunhistochemischen Nachweis von COX-2 in Endothelzellen noch kein etabliertes Färbeprotokoll zur Verfügung stand, wurden verschiedene Testfärbungen durchgeführt (Kap. 4.3.4). Nur bei einer Vorbehandlung der Schnitte



## ERGEBNISSE

für 30 min bei 95°C in Natrium-Citrat (pH 9) war es möglich immunhistologisch COX-2 sowohl in Endothelzellen, als auch in Neuronen darzustellen. Bei allen anderen Vorbehandlungen konnte COX-2 lediglich in Neuronen nachgewiesen werden.

Die Lokalisation von COX-2 in Endothelzellen bei einer Vorbehandlung für 30 min bei 95°C in Natrium-Citrat (pH 9) konnte durch eine Doppelmarkierung von COX-2 mit Pgp bestätigt werden (siehe Abb. 22; Kap.10.1 im Anhang) (Kap 4.3.4.).

Zur Charakterisierung der COX-2-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE wurden alle gefärbten Schnitte mit Hilfe eines Score-Systems ausgewertet (Kap. 4.4.4.). Die verwendete Skala reichte von 0 (keine gefäßassoziierte Färbung) bis 3 (hgr. Induktion gefäßassoziierter Färbung). Da im Hilus, in der CA3-Region und im GD bei allen Schnitten nur sehr vereinzelt eine gefäßassoziierte Färbung erkennbar war, wurden zur Auswertung lediglich die Regionen piriformer Cortex und parietaler Cortex verwendet. Es wurde für jeden Schnitt die rechte und die linke Gehirnhemisphäre getrennt voneinander bewertet und im Anschluss daran aus den beiden Werten der Mittelwert für den Schnitt ermittelt. Der Gesamtwert für ein Tier ergab sich aus den Mittelwerten der drei ausgewerteten Ebenen -2.3; -3.8 und -5.8.

	Piriformer Cortex				Parietaler Cortex			
	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt
Kontrolltiere (n=4)	2.19 ± 0.45	2.06 ± 0.16	2.56 ± 0.28	2.32 ± 0.15	2.5 ± 0.29	0.75 ± 0.14	1.00 ± 0.20	2.06 ± 0.07
2h (n=2)	2.00 ± 1.00	0.88 ± 0.38	1.25 ± 0.25	1.38 ± 0.55	1.13 ± 0.88	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.50	1.13 ± 0.55
4h (n=4)	1.58 ± 0.30	1.69 ± 0.24	2.06 ± 0.06	1.77 ± 0.14	1.17 ± 0.44	1.94 ± 0.06	1.50 ± 0.20	1.48 ± 0.20
8h (n=4)	1.38 ± 0.38	1.75 ± 0.14	1.75 ± 0.32	1.67 ± 0.21	1.13 ± 0.52	1.88 ± 0.13	1.69 ± 0.24	1.00 ± 0.27

**Tab.12 Endotheliale COX-2-Expression bei Kontrolltieren und SE-Tieren im piriformen Cortex und im parietalen Cortex. Die Auswertung erfolgte in den Ebenen -2.3, -3.8 und -5.8 relativ zu Bregma mit einem Score-System. Der Mittelwert aller Schnitte der jeweiligen Gruppe ist in der Spalte „Gesamt“ angegeben. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der endotheliale COX-2-Expression 2, 4 oder 8h nach einem SE im Vergleich zu Kontrolltieren ohne SE zu erkennen ( $p>0,05$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.**

Ein Vergleich der Kontrolltiere ohne SE mit den SE-Tieren, welche 2h, 4h oder 8h nach dem SE dekapitiert worden sind, ergab hinsichtlich der gescorten endothelialen COX-2-Expression in keiner der drei ausgewerteten Ebenen signifikante Unterschiede (Tab.12). Auch bei der Färbung eines Tieres, das 48 h nach einem SE dekapitiert worden ist, konnten keine Unterschiede in der COX-2-Expression festgestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die *in vitro* Ergebnisse unserer kooperierenden Arbeitsgruppe und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass anfallsinduziert in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke keine vermehrte Expression von COX-2 nachweisbar ist.

Die zusätzliche Auswertung der neuronalen COX-2-Expression mittels Score-System (Kap. 4.4.4) bestätigte die von verschiedenen Arbeitsgruppen getätigte Aussage, dass anfallinduziert eine verstärkte Expression von COX-2 in Neuronen nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt) (STRAUSS u. MARINI 2002; TU u. BAZAN 2003; KAWAGUCHI et al. 2005; HEWETT et al. 2006; JUNG et al. 2006; KIM u. JANG 2006).

### 5.2.3 TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Da für YB-1 und ZONAB in verschiedenen Studien ein Zusammenhang mit der Expression von MDR1-Genen nachgewiesen werden konnte (Kap.2.3.4), soll in dieser Studie untersucht werden, ob sich die beiden Faktoren in Endothelzellen des Gehirns nachweisen lassen. Zudem ist von Interesse ob anfallsinduziert eine Veränderung der Expression dieser Transkriptionsfaktoren nachweisbar ist. Zusätzlich zu den SE-Tieren, die 2 h, 4 h und 8 h nach einem SE dekapitiert worden sind, standen uns, zur Untersuchung eines späteren Zeitpunktes nach einem SE, Gehirnschnitte von Ratten, die 48 h nach einem SE dekapitiert worden sind zur Verfügung. Bei diesen Tieren wurde ebenfalls das fraktionierte Lithium-Pilocarpin-Modell verwendet und auch alle weiteren den Versuchsablauf betreffenden Vorgänge waren mit den in Kap. 4.5.2 beschriebenen Abläufen identisch.

## ERGEBNISSE

### YB-1

Bei der Etablierung eines Färbeprotokolls für YB-1 stellte sich heraus, dass eine einmalige 10 min Vorbehandlung mit -20°C Aceton und im Anschluss daran ein 2 d trocknen, die besten Färbeergebnisse erzielt. YB-1 konnte im Rattengehirn sowohl in Neuronen als auch gefäßassoziiert nachgewiesen werden (Abb.15). Zur Charakterisierung der neuronalen und der gefäßassoziierten YB-1-Expression wurde ebenfalls das in Kap. 4.4.4 bzw. Kap. 5.2.2 beschriebene Score-System verwendet. Da im Bereich des GD bei vielen Tieren eine sehr starke neuronale YB-1 Färbung vorlag und bei allen Tieren lediglich eine ggr. endotheliale Markierung zu erkennen war, konnte in diesem Bereich die gefäßassoziierte YB-1-Expression nicht ausgewertet werden. Bei der Auswertung konnte in keiner der vier betrachteten Bereiche (Hilus, CA3, piriformer Cortex, parietaler Cortex) eine SE induzierte, signifikante Veränderung der gefäßassoziierten YB-1-Expression im Rattengehirn nachgewiesen werden (Tab.13)

	CA3				Hilus			
	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt
Kontroll-tiere (n=8)	0.62 ± 0.16	0.91 ± 0.16	0.75 ± 0.12	0.76 ± 0.09	0.66 ± 0.20	0.47 ± 0.12	0.62 ± 0.08	0.60 ± 0.09
2h (n=2)	0.87 ± 0.87	1.12 ± 0.62	0.25 ± 0.25	0.75 ± 0.58	0.37 ± 0.37	0.5 ± 0.50	0.5 ± 0	0.46 ± 0.29
4h (n=6)	0.45 ± 0.23	0.75 ± 0.22	0.75 ± 0.17	0.64 ± 0.14	0.55 ± 0.25	0.35 ± 0.13	0.58 ± 0.14	0.50 ± 0.11
8h (n=7)	0.68 ± 0.09	0.75 ± 0.18	1.11 ± 0.16	0.79 ± 0.09	0.53 ± 0.08	0.75 ± 0.18	0.75 ± 0.09	0.58 ± 0.05
48h (n=6)	1.12 ± 0.29	1.15 ± 0.30	1.33 ± 0.31	1.26 ± 0.25	1.04 ± 0.30	1.15 ± 0.30	1.21 ± 0.28	1.07 ± 0.24

	Piriformer Cortex				Parietaler Cortex			
	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt
Kontroll-tiere (n=8)	1.81 ± 0.30	1.66 ± 0.28	1.31 ± 0.22	1.59 ± 0.20	1.97 ± 0.10	2.13 ± 0.24	2.22 ± 0.19	2.10 ± 0.12
2h (n=2)	2.25 ± 0.75	1.5 ± 0.5	0.88 ± 0.13	1.54 ± 0.46	1.13 ± 0.13	1.75 ± 0.25	1.63 ± 0.63	1.50 ± 0.25
4h (n=6)	1.4 ± 0.06	1.1 ± 0.28	1.25 ± 0.18	1.42 ± 0.09	1.40 ± 0.29	1.90 ± 0.38	1.83 ± 0.31	1.81 ± 0.30
8h (n=7)	1.46 ± 0.18	1.17 ± 0.30	1.21 ± 0.17	1.29 ± 0.15	1.64 ± 0.15	2.25 ± 0.09	1.93 ± 0.25	1.88 ± 0.18
48h (n=6)	2.13 ± 0.46	1.38 ± 0.36	1.29 ± 0.21	1.46 ± 0.27	2.08 ± 0.27	2.15 ± 0.38	2.13 ± 0.29	2.17 ± 0.25

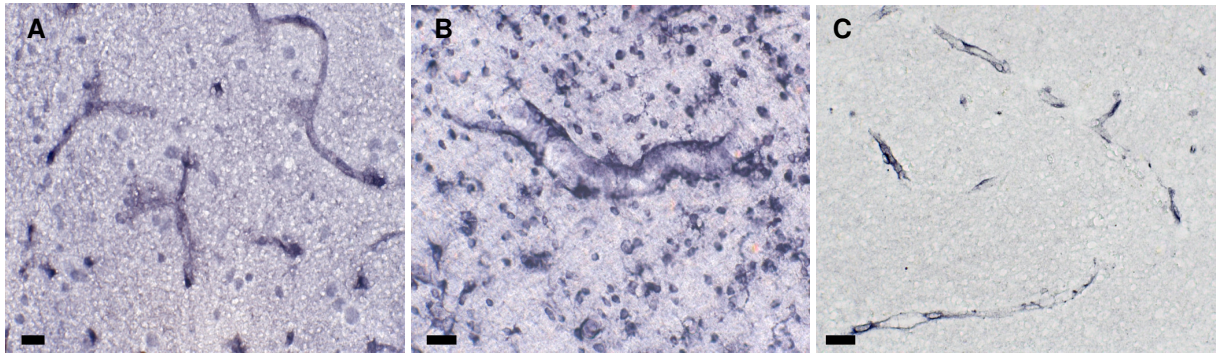
**Tab.13 Gefäßassoziierte YB-1-Expression bei Kontrolltieren und Tieren mit SE, die nach 2, 4, 8 oder 48 h dekapitiert wurden. Die endotheliale YB-1-Expression wurde in der CA3-Region, im Hilus, im piriformen Cortex und im parientalen Cortex mit einem Score-System ausgewertet. Die Auswertung erfolgte in den Ebenen -2.3, -3.8 und -5.8 relativ zu Bregma. Der Mittelwert aller Schnitte der jeweiligen Gruppe ist in der Spalte „Gesamt“ angegeben. In keiner der vier ausgewerteten Regionen sind signifikante Unterschiede in der gefäßassoziierten YB-1-Expression im Vergleich von SE-Tieren und Kontrolltieren erkennbar ( $p>0,05$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.**

Bei der zusätzlichen Auswertung der neuronalen YB-1-Expression mittels Score-System (Kap. 4.4.4) zeigte sich, dass 4 h nach einem SE im Hilus des Hippocampus eine signifikante Zunahme der YB-1 exprimierenden neuronalen Zellen um 68% nachweisbar war ( $p=0,04$ ) (Tab.14). Im Gegensatz dazu war sowohl im piriformen als auch im parietalen Cortex 48 h nach einem SE eine signifikante Reduktion der YB-1 markierten Zellen erkennbar. Im piriformen Cortex reduzierte sich die Zahl der markierten Zellen um 54% ( $p=0,002$ ) und im parietalen Cortex um 18% ( $p=0,01$ ) (Tab.14).

Da zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Studien dazu vorlagen, ob YB-1 auch im Gehirnparenchym von Primaten und in humanem Gehirngewebe nachweisbar ist, wurden zusätzlich zu den Rattengehirnschnitten, Gehirnschnitte von Primaten (Kap.4.3.2 und Kap.4.3.4) und formalinfixierte humane Gehirnschnitte (Kap.4.3.2) immunhistochemisch gegen YB-1 gefärbt (Abb.15).

Um YB-1 immunhistochemisch in perfundierten Makakengehirnschnitten nachweisen zu können, war keine spezielle Vorbehandlung der Schnitte im Vorfeld der Färbung notwendig (Kap.4.3.4). YB-1 ließ sich auch im Primatengehirn sowohl in Neuronen, als auch gefäßassoziiert nachweisen (Abb.15). Die uns zur Verfügung gestellten formalinfixierten Humangehirnschnitte, mussten zunächst entparaffiniert und im Anschluss daran in der Mikrowelle demaskiert werden, um YB-1 im Gewebe nachweisen zu können. Die durchgeführten Färbungen zeigten, dass YB-1 auch in humanem Gehirngewebe, sowohl bei neuropathologisch gesunden Personen als auch bei an Alzheimer erkrankten Personen neuronal und gefäßassoziiert nachweisbar ist (Abb.15).

## ERGEBNISSE



**Abb. 15 YB-1-Expression im Cortex eines Rattengehirnes (A), eines Primatengehirnes (B) und eines Humangehirnes (C). (Scale-bar = 20  $\mu$ m.)**

	Piriformer Cortex				Parietaler Cortex			
	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt
Kontroll-tiere (n=8)	1,97 $\pm$ 0,07	2,38 $\pm$ 0,2	1,88 $\pm$ 0,08	2,08 $\pm$ 0,09	2,25 $\pm$ 0,16	2,63 $\pm$ 0,16	2,75 $\pm$ 0,13	2,58 $\pm$ 0,09
2h (n=2)	1,75 $\pm$ 0,75	2 $\pm$ 0	1,13 $\pm$ 0,38	1,63 $\pm$ 0,38	1,5 $\pm$ 0,5	2,25 $\pm$ 0,25	1,5 $\pm$ 0,5	1,92 $\pm$ 0,09
4h (n=6)	1,85 $\pm$ 0,20	2,05 $\pm$ 0,32	1,25 $\pm$ 0,18*	1,97 $\pm$ 0,11	2,6 $\pm$ 0,25	2,5 $\pm$ 0,22	2,58 $\pm$ 0,20	2,5 $\pm$ 0,14
8h (n=7)	2,54 $\pm$ 0,18*	1,83 $\pm$ 0,20	1,82 $\pm$ 0,18	2,36 $\pm$ 0,18	2,71 $\pm$ 0,18	2,75 $\pm$ 0,17	2,54 $\pm$ 0,16	2,71 $\pm$ 0,1
48h (n=6)	1,31 $\pm$ 0,31	1 $\pm$ 0,20*	1,17 $\pm$ 0,18*	0,96 $\pm$ 0,07*	2,42 $\pm$ 0,24	2,4 $\pm$ 0,25	1,63 $\pm$ 0,13*	2,13 $\pm$ 0,09*

	Hilus				CA3			
	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt
Kontroll-tiere (n=8)	0,81 $\pm$ 0,10	0,53 $\pm$ 0,31	0,78 $\pm$ 0,13	0,69 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,2	0,91 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,13	0,82 $\pm$ 0,13
2h (n=2)	0,63 $\pm$ 0,13	0,5 $\pm$ 0	0,75 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,13	0,5 $\pm$ 0	0,42 $\pm$ 0,09
4h (n=6)	1,3 $\pm$ 0,11*	1,05 $\pm$ 0,17*	1,29 $\pm$ 0,32	1,16 $\pm$ 0,17*	1,2 $\pm$ 0,2	1,15 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,10
8h (n=7)	0,79 $\pm$ 0,21	0,67 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,21	0,79 $\pm$ 0,17	1,25 $\pm$ 0,12	1,13 $\pm$ 0,16	1,04 $\pm$ 0,16	1,16 $\pm$ 0,13
48h (n=6)	0,54 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,19	0,54 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,14	0,7 $\pm$ 0,29	0,67 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,12

## ERGEBNISSE

	DG			
	-2,3	-3,8	-5,8	Gesamt
Kontroll- tiere (n=8)	1,66 ± 0,16	1,78 ± 0,09	1,56 ± 0,06	1,67 ± 0,08
2h (n=2)	1,5 ± 0	1,13 ± 0,13	1,13 ± 0,13	1,25 ± 0
4h (n=6)	1,8 ± 0,2	1,55 ± 0,12	1,5 ± 0	1,6 ± 0,08
8h (n=7)	1,75 ± 0,09	1,83 ± 0,11	1,89 ± 0,07*	1,83 ± 0,08
48h (n=6)	1,33 ± 0,21	1,45 ± 0,23	1,33 ± 0,22	1,4 ± 0,2

**Tab. 14 Neuronale YB-1-Expression bei Kontrolltieren und Tieren mit SE, die nach 2, 4, 8 oder 48 h getötet wurden. Die neuronale YB-1-Expression wurde in der CA3-Region, im Hilus, im GD, im piriformen Cortex und im parientalen Cortex mit einem Score-System ausgewertet. Die Auswertung erfolgte in den Ebenen -2.3, -3.8 und -5.8 relativ zu Bregma. Der Mittelwert aller Schnitte der jeweiligen Gruppe ist in der Spalte „Gesamt“ angegeben. Signifikante Unterschiede in der neuronalen YB-1-Expression im Vergleich von SE-Tieren und Kontrolltieren sind durch \* gekennzeichnet ( $p > 0,05$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.**

Zum Nachweis der genauen Lokalisation der YB-1-Expression im Gehirnparenchym wurden verschiedene Doppelmarkierungsstudien durchgeführt. Die neuronale Expression von YB-1 wurde durch eine Doppelmarkierung mit dem panneuronalen Marker NeuN untersucht und die gefäßassoziierte Färbung durch eine Doppelmarkierung mit dem endothelspezifischen Marker Glut-1. Glut-1 wird im Gehirn nur in Endothelzellen der Gefäße exprimiert, so dass bei einer Doppelmarkierung von einer spezifischen endothelassoziierten Färbung von YB-1 ausgegangen werden kann. Bei der Doppelmarkierung von YB-1 mit NeuN konnte sowohl im Rattengehirn, als auch im Primatengehirn eine Doppelmarkierung festgestellt werden (siehe Abb. 25; Kap 10.1 im Anhang). Eine Doppelmarkierung von YB-1 und NeuN im Humangehirn war durch eine unspezifische Bindung des NeuN-AK an Erythrozyten, die sich noch in dem Gewebe befanden, nicht möglich. Bei der Betrachtung der Doppelmarkierungen, sowohl im Ratten- als auch im Makakengehirn, zeigte sich, dass YB-1 offenbar in einigen der Neuronen zytoplasmatisch und in anderen intranukleär vorliegt (siehe Abb.25; Kap.10.1 im Anhang). Die Doppelmarkierung von YB-1 und Glut-1 bestätigte die Expression von YB-1 an der Blut-Hirn-Schranke, jedoch nicht die Expression von YB-1 in

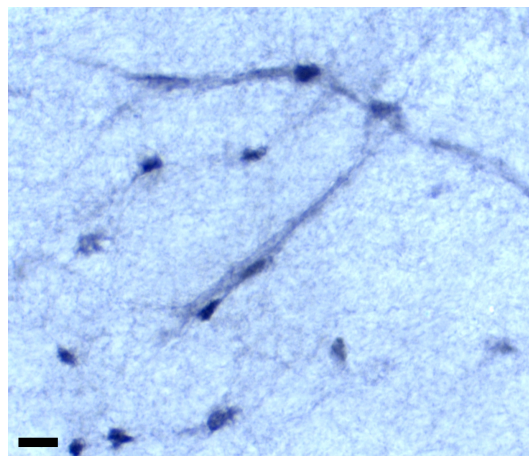
## ERGEBNISSE

---

Endothelzellen. YB-1 scheint demnach den Endothelzellen lediglich basal aufzuliegen und nicht in den Endothelzellen selbst exprimiert zu sein (siehe Abb.22; Kap.10.1 im Anhang). In welchen Zellen YB-1 dort genau exprimiert ist, sollen zukünftige immunhistologische Untersuchungen klären. Auch bei einer immunhistochemischen Doppelmarkierung von YB-1 mit dem endothelialen Multidrug-Transporter Pgp konnte sowohl im Rattengehirn als auch in humanen Gehirngewebe keine spezifische endotheliale Doppelmarkierung nachgewiesen werden (siehe Abb.22; Kap.10.1 im Anhang). Eine Doppelmarkierung mit Pgp im Primatengehirn war auf Grund unspezifischer Bindungen des Pgp Antikörpers mit dem Primatengehirngewebe nicht möglich.

### ZONAB

Bei der Etablierung eines Färbeprotokolls für ZONAB hat sich gezeigt, dass durch eine einmalige 10 minütige Fixierung mit Aceton bei -20°C mit anschließender zweitägiger Lufttrocknung bei Raumtemperatur, die besten Färbeergebnisse erzielt werden können. ZONAB konnte sowohl bei den Kontrolltieren, als auch bei Ratten die einen SE ausgebildet haben in Neuronen nachgewiesen werden. Lediglich vereinzelt ließ sich ZONAB an der Blut-Hirn-Schranke darstellen, wobei es in Analogie zu YB-1 den Endothelzellen basal aufzuliegen scheint (Abb.16) Da Ratten 2 h, 4 h, 8 h und 48 h post SE keine offensichtlichen Expressionunterschiede von ZONAB aufwiesen, wurde auf eine Auswertung der Expression mittels eines Score-Systems verzichtet.



**Abb. 16 Gefäßassoziierte Expression von ZONAB im piriformen Cortex eines Kontrolltieres. ZONAB scheint den Endothelzellen basal aufzuliegen. (Scale-bar = 10 µm)**

### 5.3 MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP- ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION DURCH SC-51089

In vorausgegangenen *in vitro* Versuchen ergaben sich Hinweise für eine Beeinflussung der Glutamat-induzierten Pgp-Expression durch den EP-1-Rezeptorantagonisten SC-51089 (unveröffentlichte Daten unserer kooperierenden Arbeitsgruppe). Des weiteren konnten Kawano et al. (2006) zeigen, dass SC-51089 in einem Schlaganfallmodell eine neuroprotektive Wirkung hat (KAWANO et al. 2006). Aus diesem Grund soll SC-51089 in diesem Dissertationsvorhaben *in vivo* in einem SE-Modell getestet werden. Zur Beurteilung der Effekte von SC-51089 auf die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression und Neurodegeneration wurde das fraktionierte Lithium-Pilocarpin SE Modell verwendet (Kap. 4.2.2).

Insgesamt wurde für die Studie 73 Ratten verwendet, von denen 64 Tiere mit Lithium und anschließend mit Pilocarpin behandelt worden sind. Um eine Aussage über die Wirkung von SC-51089 treffen zu können, wurden 27 der Pilocarpintiere mit SC-51089 und die restlichen 37 Pilocarpintiere mit Aqua ad injectabilia (A. inj.) behandelt. Als Vehikellösung wurde A. inj. gewählt, da das verwendete SC-51089 in A. inj. gelöst worden war. Die fraktionierte Pilocarpingabe führte insgesamt bei 30 Tieren zu einem generalisierten SE (Tab. 15).

	Kontrollen	Pilocarpin / A. inj.	Pilocarpin / SC-51089
<b>Anzahl Tiere pro Gruppe</b>	n=9	n=37	n=27
<b>Anzahl Tiere mit generalisiertem SE / Anzahl in %</b>	/	17 / 45,95%	13 / 48,15%
<b>Durchschnittliche Anzahl an benötigten Pilocarpinapplikationen bis SE-Beginn</b>	/	6,18 ± 0,75	5,69 ± 0,75
<b>Durchschnittliche Anzahl an benötigten Diazepamapplikationen</b>	1	3,29 ± 0,17	3,62 ± 0,24
<b>Anzahl verstorbener Tiere mit generalisiertem SE / Mortalität in %</b>	/	11 / 64,70%	4 / 30,77%
<b>Latenzzeit bis zur Manifestation eines generalisierten SE (min)</b>	/	167 ± 23,29	157 ± 20,98



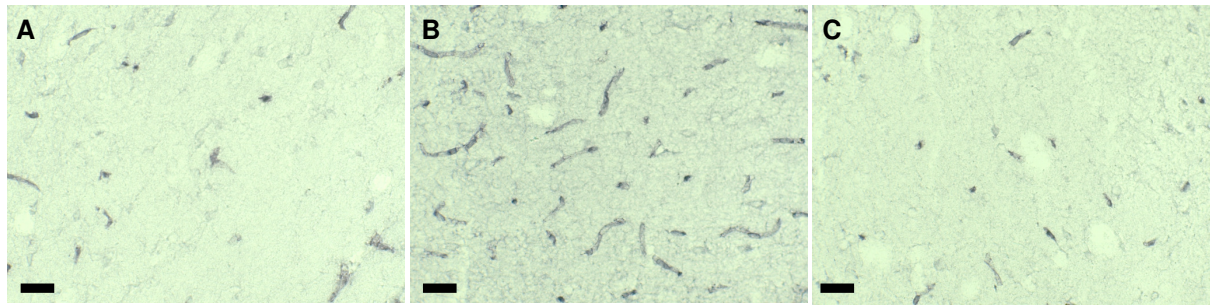
**Tab.15 Übersicht über die Tierzahlen und Beobachtungsparameter im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell. Angegeben sind die Anzahl von Tieren pro Behandlungsgruppe, die Anzahl der Tiere mit generalisiertem SE, sowie die durchschnittliche Anzahl an benötigten Pilocarpin- und Diazepaminjektionen (Mittelwert  $\pm$  SEM). Zusätzlich ist die Anzahl verstorbener Tiere pro Tiergruppe und die Mortalität in % dargestellt.**

Es konnte bei der Auslösung des SE kein Unterschied zwischen der SC-51089 und der Vehikelkontrollgruppe festgestellt werden. Die Vehikelkontrollgruppe benötigte durchschnittlich  $6,18 \pm 0,75$  Pilocarpininjektionen und die SC-51089 Gruppe durchschnittlich  $5,69 \pm 0,75$  Pilocarpininjektionen. Auch bei der benötigten Anzahl von Diazepaminjektionen zur Unterbrechung des SE konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Vehikeltiere benötigten durchschnittlich  $3,29 \pm 0,17$  und die SC-51089 Tiere  $3,62 \pm 0,24$  Diazepaminjektionen (Tab.15). Die Tiere wurden während des gesamten Versuchsverlaufes durchgehend beobachtet und ihr Verhalten wurde aufgezeichnet. Auch für die Latenzzeit bis zur Manifestation eines generalisierten SE zeigte sich zwischen den Gruppen kein Unterschied (Tab. 15).

### 5.3.1 MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP- ÜBEREXPRESSION

Zur Beurteilung des Einflusses von SC-51089 auf die anfallsinduzierte Pgp Überexpression wurden von jedem Tier Gehirnschnitte hergestellt. Für die Untersuchung der Pgp-Expression wurden jeweils Gehirnschnitte verschiedener Ebenen (-2,3mm; -3,8mm und -5,8mm relativ zu Bregma) immunhistochemisch gefärbt (Kap. 4.3.4). Im Anschluss an die Pgp-Färbung erfolgte eine computer-gestützte Auswertung (Kap. 4.4.2). Als Maß für die Höhe der Pgp-Expression wurden erneut die optische Dichte (OD), sowie die Pgp-markierte Fläche in % der Gesamtfläche verwendet. Bei der Auswertung der Schnitte zeigte sich, dass bei allen Schnitten sowohl eine deutliche endotheliale Pgp-Färbung, als auch eine ggr. parenchymale Pgp-Färbung vorlag, die sich aus dem gegenüber der Kaninen Pgp-Färbung veränderten Färbeprotokoll erklären lässt (H. VOLK et al. 2005).

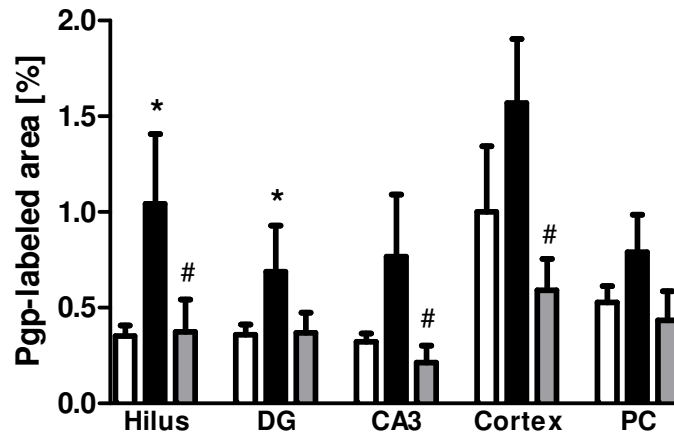
## ERGEBNISSE



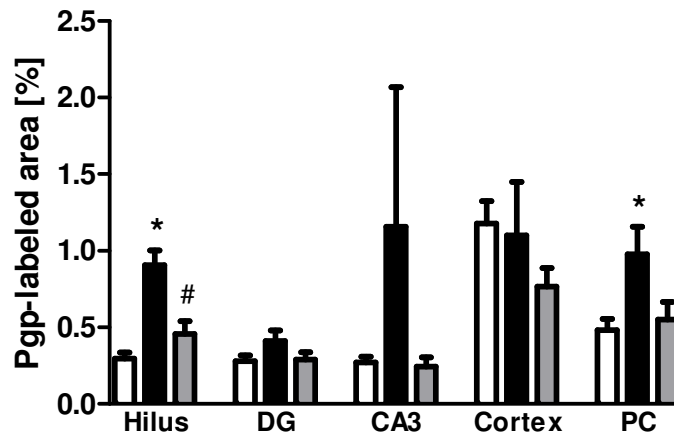
**Abb.17 Endotheliale Pgp-Expression im Cortex eines Kontrolltieres (A), eines SE-Vehikel Tieres (B) und eines mit SC-51089 behandelten SE-Tieres (C). (Scale-bar = 50  $\mu$ m)**

Die Quantifizierung der Pgp-Expression erfolgt in den Regionen Hilus, GD, CA3, parietaler Cortex und piriformer Cortex in den Ebenen -2.3mm, -3.8mm und -5.8mm relativ zu Bregma. In allen drei Ebenen kam es anfallsinduziert im Hilus des GD bei den Pilocarpin/Vehikel-Tieren zu einer signifikanten Zunahme der Pgp-markierten Fläche (Ebene -2.3:  $p=0,036$ ; Ebene -3,8:  $p=0,0018$ ; Ebene -5,8:  $p=0,036$ ). Zusätzlich war in der Ebene -2,3 mm relativ zu Bregma auch im GD eine signifikante Zunahme der Pgp-markierten Fläche nachweisbar ( $p=0,0496$ ). In der Ebene -3,8 mm relativ zu Bregma war ebenfalls in allen Regionen eine Zunahme der Pgp-markierten Fläche erkennbar, die jedoch lediglich im piriformen Cortex signifikant war ( $p=0,0156$ ). Nur in der Ebene -5,8 mm relativ zu Bregma konnte in den vier zusätzlich zum Hilus ausgewerteten Regionen keine signifikante Zunahme der Pgp-markierten Fläche nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Pilocarpin/Substanz-Tiere zeigt sich, dass eine Behandlung der Ratten mit SC-51089 in verschiedenen Ebenen und Regionen zu einer signifikanten Reduktion der anfallsinduzierten Zunahme der Pgp-markierten Fläche geführt hat. Bei einem Vergleich der SE/Vehikel-Tiere mit den SE/Substanz-Tieren konnte in der Ebene -2.3 sowohl im Hilus ( $p=0,036$ ), als auch in der CA3-Region ( $p=0,0256$ ) und im parietalen Cortex ( $p=0,0176$ ) eine signifikante Reduktion der Pgp-markierten Fläche nachgewiesen werden. Auch in der Ebene -3,8 mm relativ zu Bregma konnte im Hilus eine signifikante Reduktion ( $p=0,012$ ) der Pgp-markierten Fläche bei den Substanz behandelten SE-Tieren im Vergleich mit den SE/Vehikel-Tieren nachgewiesen werden. Diese Reduktion bestätigte sich tendentiell auch in den anderen vier ausgewerteten Regionen. In der Ebene -5.8 relativ zu Bregma zeigte sich sogar eine signifikante Reduktion ( $p=0,0244$ ) der Pgp-markierten Fläche durch SC-51089 im Vergleich zu Kontrolltieren ohne SE.

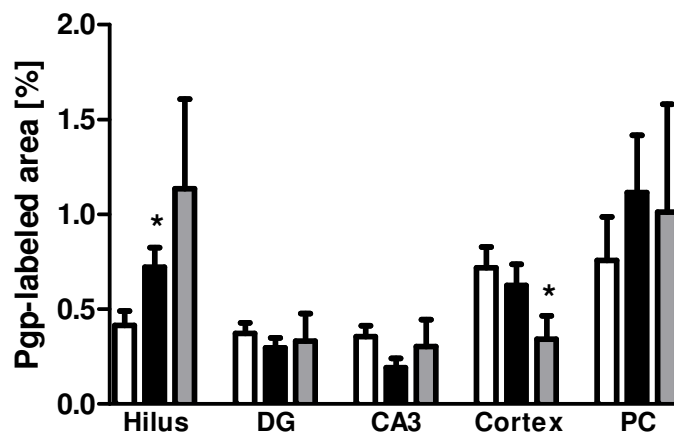
**Ebene -2.3**



**Ebene -3.8**



**Ebene -5.8**



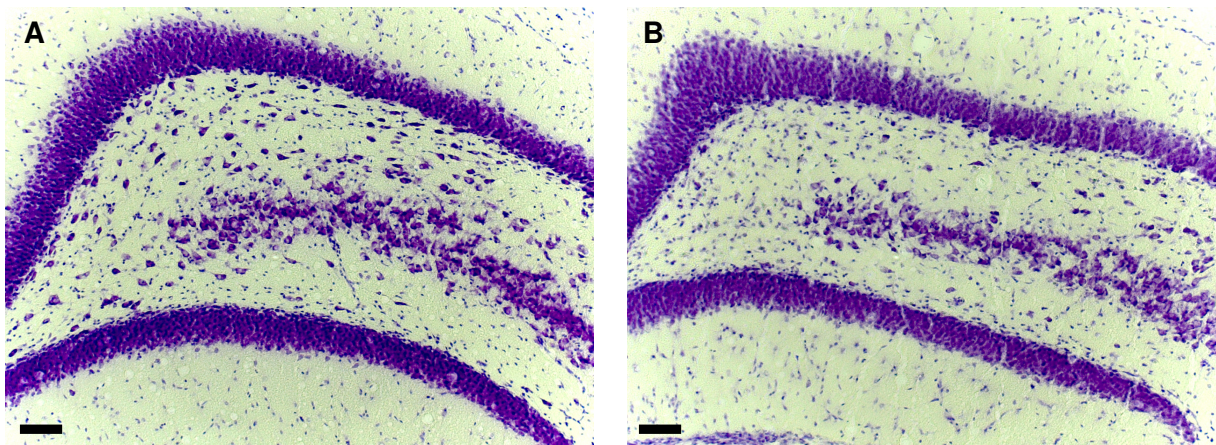
- Kontrolltiere n=9
- Pilo / Vehikel n=6
- ▒ Pilo / SC-51089 n=9

**Abb.18 Pgp markierte Fläche (in % der Gesamtfläche) in den Regionen Hilus, GD, CA3, parietaler Cortex (Cortex) und piriformer Cortex ca. 48 h nach einem 90 minütigem SE. Pro Region wurden drei Ebenen (-2.3mm, -3.8mm und -5.8 mm relativ zu Bregma) ausgewertet. In verschiedenen Regionen der drei Ebenen kam es zu anfallsinduziert zu einer signifikanten Zunahme der Pgp-markierten Fläche. Diese Zunahme ließ sich durch die Gabe von SC-51089 signifikant reduzieren. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. (\* / #  $p \leq 0,05$ ).**

Bei der Auswertung der OD stellte sich heraus, dass es bei den SE-Tieren in diesem Versuch offenbar zu einer so starken Beanspruchung des gesamten Gehirngewebe gekommen ist, dass die OD anfallsinduziert reduziert war. Auf Grund dieser, im Vergleich zu unterschiedlichen vorausgegangen Studien kontroversen Daten wurde die OD nicht weiter ausgewertet und interpretiert (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.2 MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN NEURODEGENERATION

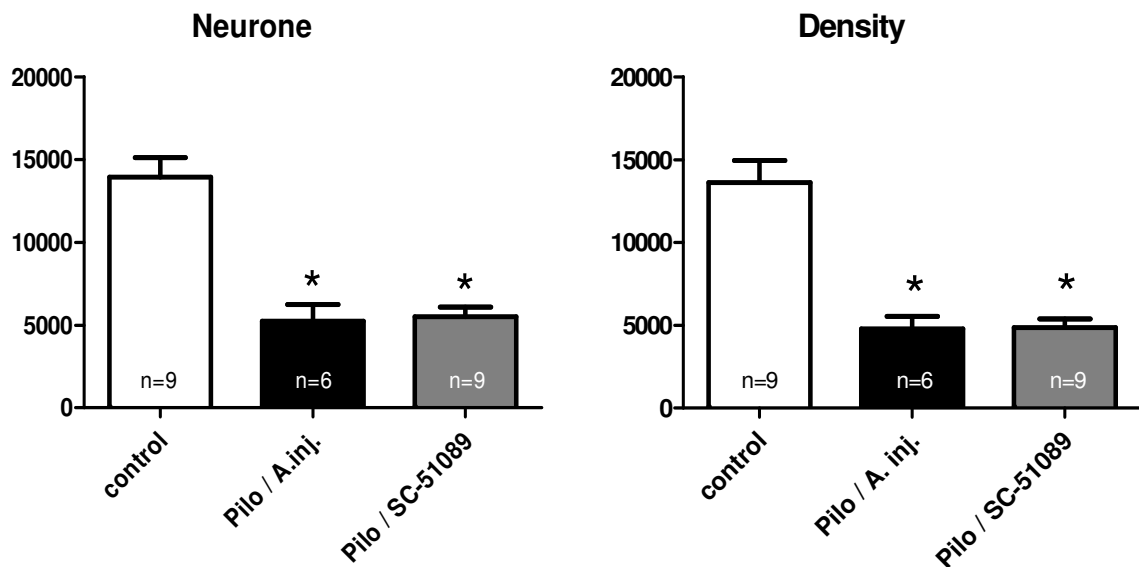
Um eine Aussage über die Wirkung von SC-51089 auf die anfallsinduzierte Neurodegeneration zu machen, wurde eine Thionin-Färbung durchgeführt (Kap. 4.3.3). Die Auszählung der thioningefärbten Neuronen erfolgte durch ein computer-gestütztes stereologisches Verfahren (optical fractionator) im Hilus des Hippocampus (Kap.4.4.3) (Abb. 19).



## ERGEBNISSE

**Abb.19** Thionin gefärbte Neurone im Hilus eines Kontrolltieres (A) und eines SE-Tieres (B) in der Ebene -3,6mm relativ zu Bregma. Es ist eine deutliche anfallinduzierte Neurodegeneration im Hilus des SE-Tieres im Vergleich mit dem Hilus des Kontrolltieres erkennbar. (Scale-bar = 100  $\mu$ m.)

Die absolute Anzahl hilarer Neurone war bei allen Tieren, in denen ein SE induziert wurde, signifikant geringer als in den Kontrolltieren (Kontrolle/Pilo-Vehikel  $p=0,002$ ; Kontrolle/Pilo-SC-51089  $p<0,0001$ ) (Abb.20). Auch die Auswertung der Neuronendichte zeigte, dass bei Tieren mit einem SE signifikant weniger Neurone vorhanden waren als bei den Kontrolltieren (Kontrolle/Pilo-Vehikel  $p=0,002$ ; Kontrolle/Pilo-SC-51089  $p<0,0001$ ). Ein Vergleich der Substanz behandelten und Vehikel behandelten Tiere mit SE ergab sowohl hinsichtlich der absoluten Neuronenzahl als auch hinsichtlich der Neuronendichte keine Unterschiede (Abb.20)



**Abb.20** Absolute Neuronenzahl und Neuronendichte bezogen auf das Volumen des Hilus. Die Neuronenzahl wurde stereologisch in den Ebenen -2.4 mm, -3.0 mm, -3.6 mm, -4.2 mm, -4.8 mm, -5.4 mm und -6.0 mm relativ zu Bregma im Hilus ausgewertet. Die errechneten Ergebnisse wurden addiert und gemittelt. Die Neuronendichte ergab sich aus der Anzahl der Neuronen im Verhältnis zu dem gemessenen Volumen des Hilus. Die Dichte ist hier im Bezug auf eine Volumen von 1mm<sup>3</sup> gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. (\*  $p \leq 0,05$ ).

## 6 Diskussion

### 6.1 ANFALLSINDUZIERTER ÜBEREXPRESSION VON PGP IM KANINEN GEHIRN

Verschiedene Studien in elektrisch- oder chemisch-induzierten Epilepsiemodellen der letzten Jahre zeigen, dass anfallsinduziert eine Überexpression des Multidrug-Transporters Pgp nachweisbar ist (VAN VLIET et al. 2004; H. A. VOLK et al. 2004; HOFFMANN et al. 2006). Bei diesen Studien kann jedoch ein Einfluss der chemischen oder elektrischen Stimulation auf die Pgp-Expression nicht ausgeschlossen werden. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen außer Studien in Tiermodellen lediglich Untersuchungen zur Pgp-Expression an intraoperativ entnommenem oder post mortem Gehirngewebe von Humanpatienten mit schwer behandelbarer Epilepsie vor. Um eine mögliche Relevanz der Pgp-Expression für eine Pharmakoresistenz bei Hunden zu prüfen sollte im Rahmen dieser Dissertation überprüft werden, ob es auch im kaninen Gehirn nach spontanen Anfällen zu einer Überexpression von Pgp kommt.

In der Studie konnte gezeigt werden, dass in Folge eines spontanen SE eine signifikante Zunahme der Pgp-Expression zu beobachten war. Diese Überexpression war sowohl in den Endothelzellen der Körnerzellschicht des GD, als auch in Kapillaren des Hilus des GD und im Cortex nachweisbar. Auch im Anschluss an spontane Cluster-Anfälle einer weiteren Gruppe von Hunden war tendenziell eine Zunahme der Pgp-Expression in diesen drei Gehirnregionen zu beobachten. Diese erwies sich jedoch bei einem Vergleich mit Kontrolltieren ohne Anfallsaktivität und Neuropathologie als nicht signifikant. Diese Studie liefert den ersten quantitativen Beweis dafür, dass auch bei Hunden in Folge eines spontan ablaufenden SE eine Induktion der Pgp-Expression in den Endothelzellen des Gehirns nachweisbar ist. Sie deutet ferner darauf hin, dass die im Tiermodell beobachteten molekularen Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke keine unmittelbare Folge der chemischen oder elektrischen Induktion des SE sind, sondern anfallsspezifisch sind. Die Studie bestätigt demnach einen Fallbericht, in dem von einer vermehrten Pgp-Expression in

## DISKUSSION

---

intraoperativ entnommenem Gehirngewebe eines an pharmakoresistenter Epilepsie erkrankten Kindes berichtet wird (LAZAROWSKI et al. 2004).

Da trotz vieler neuer Erkenntnisse in der Therapie von Epilepsie zum jetzigen Zeitpunkt immer noch bei 30-40% der erkrankten Patienten und Haustiere durch eine Pharmakotherapie keine ausreichende Kontrolle der Anfälle erreicht werden kann, besteht ein großes Interesse die an der Pharmakoresistenz beteiligten Mechanismen genauer zu erforschen (KWAN u. BRODIE 2006). Es gibt viele Hinweise für eine grundlegende Beteiligung einer Überexpression von Pgp an der Ausbildung einer pharmakoresistenten Epilepsie. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Epilepsie assoziierte Überexpression von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke mit einer verminderten Gehirnpenetration von verschiedenen AE im Zusammenhang steht (RIZZI et al. 2002; VAN VLIET et al. 2006; VAN VLIET et al. 2007). Zusätzlich zeigte sich, dass eine Inhibition von Pgp durch Tariquidar den antikonvulsiven Effekt von Phenytoin erhöht (VAN VLIET et al. 2006). In einem chronischen Rattenmodell mit spontanen epileptischen Anfällen bei PB resistenten Tieren ließ sich mittels einer zusätzlichen Tariquidar-Behandlung sogar die Resistenz gegenüber PB überwinden (BRANDT et al. 2006).

Basierend auf diesen Ergebnissen scheint der Grad der Pgp-Überexpression von funktioneller Relevanz für eine Behandlung zu sein und deutlichen Einfluss auf die Pharmakosensitivität von Patienten zu nehmen. Diese Erkenntnis ist von spezifischer Relevanz für eine anhaltende Therapie einer chronischen Epilepsie. Es könnte demnach so sein, dass sich eine Kontrolle der Anfälle im Anschluss an eine Episode mit wiederkehrenden Anfällen oder einem nicht therapierten SE deutlich verschlechtert, obwohl der Patient vor den Anfällen bzw. dem SE gut auf seine Therapie reagiert hat. Eine vermehrte Pgp-basierte Restriktion von AEs an der Blut-Hirn-Schranke kann demnach auch der Grund für ein nicht oder nur unzureichendes Ansprechen einzelner Patienten auf ein AE bereits zu Therapiebeginn sein.

Einen weiteren Hinweis für eine grundlegende Beteiligung von Pgp an der Pharmakoresistenz lieferte ein Fallbericht von Iannetti et al. (2005). In diesem wird beschrieben, dass ein zuvor pharmakoresistenter SE eines Jungen, durch die zusätzliche Gabe des kompetitiven Pgp Modulators Verapamil am Tag 37 des anhaltenden SE beendet werden konnte (IANNETTI et al. 2005).

Zwar war die SE-bedingte Zunahme der Pgp-markierten Fläche in der hiesigen Studie signifikant, jedoch sind starke interindividuelle Unterschiede auffällig (Tab.10).

Diese könnten sowohl durch pathophysiologische aber auch durch genetische Unterschiede begründet sein, die in einer differierenden Ausprägung der Pgp-Induktion resultieren. Weiterhin könnten auch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Euthanasie einen wesentlichen Einfluss auf das individuelle Expressionsprofil von Pgp genommen haben. Daher wäre es in weiterführenden Studien von Interesse den Einfluss der zu Grunde liegenden Pathologie der Epilepsie auf die Pgp-Expression genauer zu betrachten, sowie den Zeitverlauf der Pgp-Expression nach einem SE zu untersuchen.

Da unter den Haustieren Hunde am häufigsten an Epilepsie erkranken und auch bei ihnen bei ca. 20-40% der Erkrankten durch eine AE keine bzw. keine mehr als 50%ige Reduktion der Anfälle hervorgerufen werden kann, besteht ein großes Interesse an weiterführenden Studien (LOSCHER 1997). Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass es anscheinend auch bei Hunden mit spontanen Anfällen zu einer anfallsinduzierte Pgp-Überexpression kommt und dass die molekularen Veränderungen die an der Blut-Hirn-Schranke anfallsinduziert ablaufen, mit denen von pharmakoresistenten Humanpatienten vergleichbar zu sein scheinen. Aus diesem Grund kann auch davon ausgegangen werden, dass sich epileptische Hunde mit spontanen Anfällen optimal für die Validierung von neuen therapeutischen Strategien sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin eignen.

### 6.2 REGULATION DER ANFALLSINDUZierten PGP-ÜBEREXPRESSION

Ein viel versprechender Behandlungsansatz der letzten Jahre besteht darin, der Multidrug-Transporter basierten Pharmakoresistenz präventiv entgegen zu steuern. Um jedoch neue Strategien zur Prävention der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression zu entwickeln, ist es essentiell genaue Kenntnisse über anfallsinduzierte molekulare Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke zu erlangen. Diese molekularen Veränderungen könnten letztlich als potentielle Angriffstellen für ein frühzeitiges Entgegenwirken einer Pgp-bedingten Pharmakoresistenz verwendet werden. Aus diesem Grund sind im Rahmen dieser Dissertation verschiedene möglicherweise an der Überexpression von Pgp beteiligte Faktoren auf ihre



Expression bzw. anfallsinduzierte Expressionsveränderungen in Endothelzellen des Gehirns untersucht worden.

### *NMDA-Rezeptoren*

Zum jetzigen Zeitpunkt standen lediglich verschiedene RT-PCR oder Western-Blot Untersuchungen zur Expression von NMDA-Rezeptoren an der Blut-Hirn-Schranke zur Verfügung. Sie zeigte, dass NMDA-Rezeptoren, zusätzlich zu ihrer bereits bekannten Expression an Neuronen, auch an Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert sind (KRIZBAL et al. 1998; SHARP et al. 2003; ANDRAS et al. 2007). Der Nachweis von NMDA-Rezeptoren an Endothelzellen erfolgt dabei nicht nur an Nagergewebe, sondern auch an Human- und Schweinegehirnendothelzellen (KOENIG et al. 1992; PARFENOVA et al. 2003; SHARP et al. 2003). Mit diesen Daten stimmen aktuelle Daten unserer Arbeitsgruppe überein, in denen per Western-Blot Untersuchungen die NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 an den Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen wurden (BAUER et al. 2008). Da aus verschiedenen Studien bekannt ist, dass es im Anfallsgeschehen durch die starke Depolarisation von Neuronen zu einer massiven Freisetzung und Akkumulation von Glutamat in der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns kommt (HOLMES 2002; STRAUSS u. MARINI 2002) und daraus resultierend zu einer vermehrten Stimulation der NMDA-Rezeptoren (COLE-EDWARDS u. BAZAN 2005), wurde die Wirkung von Glutamat an isolierten Kapillarendothelzellen getestet (BAUER et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation der Endothelzellen mit Glutamat zu einer deutlichen Induktion und Aktivitätssteigerung von Pgp führt. Diese Induktion ließ sich durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 verhindern, was die Annahme zulässt, dass die in Kap. 2.3 beschriebene Zunahme der Pgp-Expression durch Glutamat direkt über, in der Kapillarmembran exprimierten, NMDA-Rezeptoren abläuft (BAUER et al. 2008).

Im Gegensatz zu den beschriebenen *in vitro* Daten, ließ sich jedoch bei keiner der im Rahmen dieses Dissertationsprojektes angefertigten Färbung die NMDA-Rezeptorsubunit NR1 in Endothelzellen bzw. Kapillarmembranen darstellen. Trotz der Verwendung des gleichen monoklonalen C-terminalen NR1 Antikörpers, mit dem *in vitro* im Western-Blot der Nachweis von NMDA-Rezeptoren in Endothelzellen der

Blut-Hirn-Schranke gelang, war es nicht möglich NR1 immunhistochemisch in Gehirndothelzellen darzustellen. Aus diesem Grund konnte *in vivo* auch keine Aussage über eine mögliche anfallsinduzierte Expressionveränderung von endothelialen NMDA-Rezeptoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE getroffen werden. Eine nicht vorhandene Funktionalität des bisher immunhistochemisch noch nicht getesteten Antikörpers konnte durch die deutliche neuronale Markierung von NR1 ausgeschlossen werden. Das ein immunhistochemischer Nachweis von NMDA-Rezeptoren an Endothelzellen jedoch trotzdem nicht möglich war, könnte an einer deutlich geringeren endothelialen Expression des NR1-Antikörperepitopes liegen. Weiterhin ist es denkbar, dass kapilläre NMDA-Rezeptoren mehrheitlich in intrazellulären Kompartimenten gespeichert werden und erst bei Bedarf an die Plasmamembran gelangen. Eine immunhistochemische Darstellung plasmatischer Proteine und insbesondere ihrer intrazellulären plasmatischen Epitope ist häufig erschwert. Trotz der Prüfung verschiedener Vorbehandlungen ist es somit denkbar, dass keine ausreichende Freilegung bzw. Demaskierung des NR1-Epitopes an den Endothelzellen gelang. Eine weitere Erklärung könnte eine Konformationsänderung des nachzuweisenden zytosolischen NR1-Epitopes durch die gewählten Vorbehandlungen sein, so dass es aus diesem Grund zu einem vollständigen Verlust der möglichen Immunreaktivität kam. Um eine genaue immunhistochemische Aussage über die Lokalisation von NMDA-Rezeptoren *in vivo* treffen zu können sind demnach weitere immunhistochemische Untersuchungen, möglichst mit gegen andere NMDA-Epitope gerichteten Antikörpern, notwendig. Auch ein Test weiterer, bisher nicht durchgeführter Vorbehandlungen, wie z.B. enzymatische Vorbehandlung, könnte eine Möglichkeit eines zukünftigen immunhistochemischen Nachweises von NMDA-Rezeptoren an Endothelzellen erbringen.

### *COX-2-Expression*

Unserer Arbeitsgruppe (Heidrun Potschka, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, LMU München) gelang es in den letzten Jahren in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Björn Bauer (UMD, MN, USA) und David Miller (NIEHS/NIH, NC, USA) einen Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Signalweg in Endothelzellen des Gehirns zu identifizieren. Dieser scheint an der anfallsinduzierten Überexpression

von Pgp beteiligt zu sein (BAUER et al. 2008). In Untersuchungen an isolierten Kapillarendothelzellen konnte dabei gezeigt werden, dass COX-2 eine entscheidende Rolle bei der Glutamat-induzierten Aktivierung von Pgp spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Glutamat bei einer zusätzlichen Inkubation der Kapillarendothelzellen mit dem COX-2-Inhibitor Celecoxib nicht zu einer erhöhten Pgp-Expression führt. Weiterhin bewirkt eine Glutamatinkubation von Kapillaren COX-2 defizienter Mäusen keine Induktion von Pgp (BAUER et al. 2008). Eine Bestätigung für diese Ergebnisse lieferten durchgeführte *in vivo* Studien. In ihnen konnte gezeigt werden, dass sowohl der COX Hemmer Indomethacin (BAUER et al. 2008), als auch der COX-2-Hemmer Celecoxib (unveröffentlichte Daten) die anfallsinduzierte Überexpression von Pgp in einem Pilocarpin SE-Modell verhindern. Sowohl in verschiedenen Epilepsiemodellen, als auch in humanem epileptischen Gewebe konnte eine transkriptionelle Aktivierung für die COX-2 kodierenden Gene in Neuronen nachgewiesen werden (VOUTSINOS-PORCHE et al. 2004; KAWAGUCHI et al. 2005; TAKEMIYA et al. 2006; LEE et al. 2007). Aus diesem Grund sollte in diesem Dissertationsvorhaben untersucht werden, ob COX-2 immunhistochemisch endothelial nachweisbar ist und ob es anfallsinduziert zu einer Expressionsveränderung der endothelialen COX-2-Expression kommt.

Durch die Prüfung verschiedener Vorbehandlungen für eine geeignete COX-2 Färbung, stellte sich heraus, dass COX-2 lediglich nach einem 30minütigen Kochvorgang in Na-Citrat immunhistochemisch endothelial nachweisbar war. Diese spezielle Vorbehandlung liefert eine Erklärung dafür, warum COX-2 bisher in den meisten immunhistochemischen Untersuchungen in Endothelzellen nicht nachweisbar war und lediglich Takemiya et al. (2006) von einer fokalen Induktion endothelialer COX-2 24h nach einer hippocampalen Injektion von Kainat berichtet haben (TAKEMIYA et al. 2006). Die endotheliale Lokalisation von COX-2 konnte durch eine Doppelmarkierung mit dem an der Blut-Hirn-Schranke lokalisierten Efflux-Transporter Pgp nachgewiesen werden. Die kooperierende Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Inkubation isolierter Kapillarendothelzellen mit Glutamat nicht zu einer Induktion von COX-2 führt (unveröffentlichte Daten). In Analogie zu diesen *in vitro* Daten konnte auch in diesem Dissertationsprojekt im Anschluss an einen Pilocarpin induzierten SE, zu untersuchten Zeitpunkten, keine signifikante Veränderung in der COX-2-Expression festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es anfallsinduziert nicht zu einer vermehrten Expression von COX-2

in Endothelzellen kommt. Stattdessen scheint eine erhöhte COX-Aktivität in Folge einer vermehrten Liberalisierung von AA und dessen Umsetzung zu PGE<sub>2</sub> in einer Induktion von Pgp zu resultieren. Einen weiteren Hinweis für diese These lieferte die direkte Inkubation von Kapillarendothelzellen mit AA, PGH<sub>2</sub> oder PGE<sub>2</sub>, die ebenfalls in einer vermehrten Pgp-Expression resultierte (unveröffentlichte Daten unserer kooperierenden Arbeitsgruppe). An Hand dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die anfallsinduzierte Regulation der Pgp-Expression nicht aus einer vermehrten COX-2-Expression resultiert, sondern aus einer verstärkten Liberalisierung von AA. Durch die vermehrte Liberalisierung von AA steht der bestehenden COX-2 vermehrt Substrat zur Verfügung. In Folge der Akkumulation der AA wird es dann wahrscheinlich zu einer verstärkten Aktivierung der bestehenden COX-2 kommen, und daraus resultierend zu einem Anstieg der Prostaglandinsynthese. Eine weitere Möglichkeit der anfallsinduzierten Pgp-Expression unter Berücksichtigung der Daten dieser Arbeit bestände darin, dass die nachgewiesene, anfallsinduziert vermehrte COX-2-Expression in den Neuronen und den Gliazellen das Substrat für die endotheliale Pgp-Expression liefert.

### *Transkriptionsfaktoren*

Von YB-1 ist aus unterschiedlichen vorausgegangenen Studien bekannt, dass dieses multifunktionale DNA/RNA-bindende Protein in verschiedenen Zellen des Körpers exprimiert wird. Zum jetzigen Zeitpunkt berichteten jedoch lediglich Miwa et al. (2006) von einer Expression von YB-1 im embryonalen bzw. juvenilen Mäusegehirn, die sich offenbar mit zunehmendem Alter der Tiere deutlich verringerte und in adulten Mäusen nicht mehr nachweisbar war (MIWA et al. 2006). Aus diesem Grund sollte in diesem Dissertationsvorhaben untersucht werden, ob auch im Gehirn von Ratten, bzw. Makaken und in humanem Gehirngewebe eine Expression von YB-1 nachweisbar ist. In weiteren Schritten sollte dann die genaue zelluläre Lokalisation geklärt werden, um im Anschluss daran zu untersuchen, ob es anfallsinduziert, zu einer gefäßassoziierten Expressionsveränderung des Proteins im Gehirngewebe kommt. Durch immunhistochemische Untersuchungen war es in den Gehirngeweben aller drei Spezies möglich eine deutliche, sowohl neuronale als auch gefäßassoziierte Färbung darzustellen. In weiterführenden Doppelmarkierungsstudien mit dem neuronalen Marker NeuN, dem endothelialen

Marker Glut-1 und Pgp konnte gezeigt werden, dass YB-1 in Neuronen, jedoch nicht, wie zunächst durch die gefäßassoziierte Markierung angenommen, in Endothelzellen exprimiert wird. Die neuronale Expression scheint dabei sowohl zytoplasmatisch als auch intranukleär exprimiert zu sein. Eine Auswertung der gefäßassoziierten Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE im Vergleich mit Kontrolltieren ergab, dass es offenbar anfallsinduziert nicht zu einer quantitativ sichtbaren Expressionsveränderung im Rattengehirn kommt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Ergebnissen verschiedener Studien an Tumorgewebe, in denen ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Expression von YB-1 und der Pgp-Expression nachgewiesen werden konnte. So konnte z.B. an Brustkrebsgewebe gezeigt werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der YB-1-Expression und der Pgp-Expression in diesem Gewebe besteht (HUANG et al. 2005). Huang et al. (2005) konnten an Rezidivpatienten, die nach einer Anthracycline (ein Pgp Substrat) enthaltenden Chemotherapie, erneut an Brustkrebs erkrankten, einen deutlich höheren YB-1-Score zeigen, als an Patienten, die mit einem Cyclophosphamid/Methotrexat/5-Fluorouracil-Regime behandelt wurden (HUANG et al. 2005). Janz et al. (2002) konnten sogar einen direkten Zusammenhang zwischen einer Überexpression und einer nukleären Lokalisation von YB-1 und der Tumoraggressivität bei Brustkrebs feststellen (JANZ et al. 2002). Zusätzlich konnte in verschiedenen anderen Tumorarten ein Zusammenhang zwischen der Pgp-Expression des Tumors und einer nukleären Lokalisation von YB-1 gezeigt werden (BARGOU et al. 1997; ODA et al. 1998; ODA et al. 2008). Dieser Zusammenhang konnte sowohl in Brustkrebsgewebe, als auch bei Rhabdomyosarcomen, und in humanen Osteosarcomen nachgewiesen werden. Das nukleär lokalisierte YB-1 scheint dabei die Expression von Pgp direkt zu regulieren (BARGOU et al. 1997; ODA et al. 1998; ODA et al. 2008). Aus diesem Grund geht man in der Tumorforschung davon aus, dass die Expression von YB-1 ein prognostisch signifikantes Merkmal für die Malignität eines Tumors ist. Entgegen dieser Hypothese konnten jedoch Kaszubiak et al. (2007) in einer Studie zeigen, dass offenbar kein direkter, regulatorischer Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von YB-1 und Pgp besteht (KASZUBIAK et al. 2007). Durch Verwendung spezifischer anti-YB-1 siRNA erbrachten sie den Nachweis, dass eine Modulation der YB-1-Expression in Tumorzellen keine direkte Beeinflussung der Pgp-Expression nach

sich zieht. Dieses Ergebnis deutet auf eine parallele, jedoch unabhängige Aktivierung von YB-1 und Pgp hin (KASZUBIAK et al. 2007).

Im Gegensatz zu einer deutlich sichtbaren Erhöhung der Expression von YB-1 in Tumorgewebe konnte im Rahmen diese Dissertationsprojektes anfallsinduziert keine gefäßassoziierte Expressionsveränderung im Gewebe der SE-Tiere nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen können die Zeitpunkte zu denen eine Untersuchung des Gewebes durchgeführt wurde noch zu früh sein, oder aber mit dem frühesten Zeitpunkt von 2h nach einem SE bereits zu spät. Es könnte jedoch auch so sein, dass sowohl die physiologische als auch die pathophysiologische Regulation von Pgp an der Blut-Hirn-Schranke grundlegend anders abläuft, als die Pgp-Regulation in Tumorzellen. Es ist somit denkbar, dass YB-1 trotz seiner Expression im Gehirn keinen Einfluss auf die Pgp-Expression an der Blut-Hirn-Schranke nimmt. Ein weiteren Grund für die nicht vorhandene Expressionsveränderung könnte sein, dass YB-1 anfallsinduziert lediglich seine Lokalisation wechselt und von einer zuvor eher zytoplasmatischen Expression, SE induziert, in den Nukleus translokiert. Da jedoch bei der Betrachtung der Kontrolltieren und der Tiere mit SE bei allen Tieren sowohl eine zytoplasmatische neuronale als auch eine intranukleäre neuronale Expression nachgewiesen werden konnte, ist die Translokationshypothese von YB-1 eher unwahrscheinlich. Um diese Theorie jedoch definitiv ausschließen zu können, könnten immunhistochemische Doppelmarkierungsstudien hilfreich sein, die eine quantitative Erfassung der zellulären YB-1 Lokalisation vor und nach einem SE zulassen. Da YB-1 jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht in Endothelzellen nachgewiesen wurde ist es unwahrscheinlich, dass es durch eine nukleäre Lokalisation von YB-1 in gefäßassoziierten Zellen zu einer Überexpression von Pgp an den Endothelzellen der Blut-Gehirn-Schranke kommt. In weiterführenden Studien ist deshalb zunächst einmal zu klären in welchen gefäßassoziierten Zellen YB-1 im Gehirn genau exprimiert ist, und ob diese Zellen direkten Einfluss auf das zelluläre Geschehen von Endothelzellen nehmen können. An Hand der Ergebnisse dieser Studie kann dementsprechend eine Beteiligung von YB-1 an der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression in Endothelzellen nicht vollständig ausgeschlossen werden, sie ist jedoch als relativ unwahrscheinlich zu beurteilen

Bei der Auswertung der neuronalen YB-1-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE hat sich gezeigt, dass YB-1 im Anschluss an einem SE

## DISKUSSION

---

transient in Neuronen des Hilus induziert wird. Es ist bekannt, dass YB-1 eine Schlüsselrolle, sowohl in der Regulation von Transkriptions- als auch von Translationsprozessen übernehmen kann (KOHNO et al. 2003). Demnach ist es nicht unwahrscheinlich, dass YB-1 an den komplexen, anfallsinduzierten neuronalen Veränderungen im Hippokampus beteiligt ist. Ein erhöhtes YB-1-Signal könnte z.B. einen Einfluss auf den Zelltod von hilaren Neuronen nehmen. In verschiedenen Studien wird z.B. berichtet, dass nukleär lokalisiertes YB-1, p53, durch eine Unterbindung der Transaktivierung verschiedener proapoptotischer Gene, davon abhält, eine Apoptose zu induzieren (HOMER et al. 2005; BRAITHWAITE et al. 2006). Für p53 ist unter anderem bekannt, dass es anfallsinduziert sowohl in Humangewebe als auch in Rattengewebe überexprimiert ist (MORRISON et al. 2003; T. ENGEL et al. 2007; XU et al. 2007).

Die im Kontrast zu der Induktion im Hilus stehende, anfallinduzierte Reduktion der YB-1-Expression im piriformen und parietalen Cortex 48h nach einem SE lässt sich wahrscheinlich aus der starken Neurodegeneration in diesen Bereichen erklären (YILMAZER-HANKE et al. 2000; BRANDT et al. 2003). Es scheint demnach so zu sein, dass die nachgewiesene Reduktion, nicht aus einer Reduktion der YB-1-Expression in den einzelnen Neuronen resultiert, sondern lediglich eine Folge der stattfindenden Neurodegeneration in diesen Bereichen ist. Um jedoch eine exakte Aussage über eine mögliche Beteiligung von YB-1 an anfallsinduzierten, neuronalen Veränderungen treffen zu können, sind weitere Studien notwendig.

Die Betrachtung der Expression von ZONAB im Gehirn von Ratten brachte keine Hinweise für eine endotheliale Expression dieses Proteins. Zudem beeinflusste die Induktion eines SE das Expressionsprofil von ZONAB nicht. Aus diesen Gründen wurden keine weiteren Untersuchungen zur genaueren Lokalisation der Expression von ZONAB im Gehirn von Ratten und anderen Spezies durchgeführt. Aus der Tatsache, dass bei einer ersten Betrachtung der Schnitte keine anfallsinduzierte Expressionsveränderung und keine deutliche endothelassozierte Färbung ersichtlich war, kann davon ausgegangen werden, dass ZONAB keinen Einfluss auf die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression ausübt.

---

### 6.3 MODIFIKATION DER ANFALLSINDUZIERTEN PGP-ÜBEREXPRESSION UND NEURODEGENERATION MITTELS SC-51089

In verschiedenen Studien an Tiermodellen und an Gewebe von pharmakoresistenten Patienten konnte in den letzten Jahren ein Zusammenhang zwischen einer anfallsinduzierten Pgp-Überexpression und einer Resistenz gegenüber verschiedenen AEs nachgewiesen werden (POTSCHKA et al. 2004; VAN VLIET et al. 2006). In Einklang mit diesen Ergebnissen stehen neuste PET-Untersuchungen von Langer et al. (2007), in denen bei pharmakoresistenten Humanpatienten eine exzessive Pgp-Transportaktivität in jeweiligen epileptischen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden konnte (LANGER et al. 2007). Verschiedene Studien unserer und unserer kooperierenden Arbeitsgruppe konnten in den letzten Jahren zeigen, dass die anfallsinduzierte Pgp Überexpression offenbar über einen Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Signalweg induziert wird (BAUER et al. 2008). Eine Exposition von isolierten Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke mit Glutamat oder NMDA führte zu einer deutlichen Induktion von Pgp: Diese konnte wiederum durch eine Inkubation mit MK-801, einem NMDA-Rezeptor-Hemmer, oder durch einen COX-2-Hemmer verhindert werden (BAUER et al. 2008). Auch in *in vivo* Studien konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (BAUER et al. 2008). Die vorhandenen Ergebnisse führten zu der Annahme, dass offenbar eines der Produkte der COX-2 Wirkung für die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression verantwortlich sein muss. In weiterführenden *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Pgp-Expression durch eine Inkubation mit PGE<sub>2</sub> induzieren lässt (unveröffentlichte Daten). Zudem verhinderte eine Hemmung der PGE<sub>2</sub> Wirkung durch den EP-1-Rezeptor Hemmer SC-51089 eine Glutamat-induzierte Pgp-Überexpression an isolierten Kapillarendothelzellen (unveröffentlichte Daten). Diese Daten konnten durch die Ergebnisse der in diesem Dissertationsprojekt durchgeführten *in vivo* Studien belegt werden. Die Gabe von SC-51089 konnte die in verschiedenen Bereichen des Gehirns anfallinduzierte Pgp-Überexpression signifikant hemmen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich entnehmen, dass es offenbar durch die exzessive Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat während eines epileptischen Anfalls, über eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und COX-2 zu einer vermehrten Bildung von PGE<sub>2</sub> kommt. PGE<sub>2</sub> bewirkt dann durch eine Bindung



## DISKUSSION

---

an EP-1-Rezeptor eine Induktion von Pgp. Deshalb müsste eine Inhibition der PGE<sub>2</sub>-Wirkung am EP-1-Rezeptor, durch die deutliche Reduktion der Pgp-Expression an der Blut-Hirn-Schranke zu einer erhöhten Effizienz verschiedener AEs führen. Es könnte sogar dazu führen, dass schon deutlich geringere Konzentrationen eines AEs ausreichen würden, um eine therapeutische Konzentration eines AEs im Gehirn zu erhalten. Hierdurch könnten die Gefahren von Nebenwirkungen der AEs stark reduziert werden. Ein Beispiel für eine Modulation der Transporterwirkung lieferte ein Fallbericht eines Jungen, dessen refraktärer SE lediglich durch die zusätzliche Gabe des kompetitiven Pgp Modulators, Verapamil, unterbrochen werden konnte (IANNETTI et al. 2005). In Analogie dazu könnte die Unterbrechung der Pgp-induzierenden Kaskade durch die Gabe eines EP-1-Rezeptor-Hemmers bei als pharmakoresistenten Patienten ein Wideransprechen auf eine Therapie mit einem AE ermöglichen. Es würde durch die Behandlung also lediglich die anfallsinduzierte Induktion von Pgp verhindert und nicht, wie bei einer Hemmung der Transporterfunktion durch spezifische Pgp-Inhibitoren auch die basale Schutzfunktion von Pgp. Dadurch könnten die protektiven Effekte der basalen Pgp Funktion sowohl an der Blut-Hirn-Schranke, als auch an Blut-Gewebe-Schranken anderer empfindlicher Organe erhalten bleiben. Ein zusätzlicher positiver Effekt ist, dass im Gegensatz zur Hemmung von COX-2 deutlich weniger Nebenwirkungen zu erwarten sind. Bei einer Hemmung der COX-2 zur Modulation der Pgp-Expression würde die komplette weitere Prostaglandinkaskade ausgeschaltet. Im Gegensatz dazu wäre bei einer Behandlung mit SC-51089 lediglich die Wirkung von PGE<sub>2</sub> am EP-1-Rezeptor nicht mehr vorhanden. Darüber hinaus bliebe der gewünschte neuroprotektive Effekt von PGE<sub>2</sub>, der über EP-2- und EP-3-Rezeptoren bedingt wird (BILAK et al. 2004), bei einer singulären Hemmung des EP-1-Rezeptors jedoch erhalten. Es sollte jedoch beachtet werden, dass EP-1-Rezeptor vermittelt in anderen Organen, z.B. im Magen, protektive Funktionen ausgeübt werden, die von einer Hemmung ebenfalls betroffen wären (SUZUKI et al. 2001).

In verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass der beschriebene Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Signalweg in Neuronen für eine anfallsinduzierte Neurodegeneration verantwortlich ist und dass durch Hemmung unterschiedlicher Schritte dieses Weges ein deutlicher neuroprotektiver Effekt erzielt werden kann (BRANDT et al. 2003; GOBBO u. O'MARA 2004; HEWETT et al. 2006). Aus diesem Grund sollte in diesem Dissertationsvorhaben untersucht werden, ob durch die Gabe

von SC-51089 zusätzlich zur Modifikation der Pgp-Expression auch eine Modulation der Neurodegeneration erreicht werden kann. Eine zusätzliche Modifikation der anfallsinduzierten Neurodegeneration würde dazu beitragen, eine mögliche Entstehung eines größeren epileptischen Netzwerkes zu verhindern. Aus Studien von Gendron et al. (2005) und Ahmad et al. (2005) ist bekannt, dass es über eine Wirkung von PGE<sub>2</sub> am EP-1-Rezeptor zu einer deutlichen Neurodegeneration kommt (GENDRON et al. 2005; AHMAD et al. 2006). Kawano et al. (2006) konnten zudem zeigen, dass die Gabe von SC-51089 im Schlaganfallmodell mit einer deutlichen Reduktion der neuronalen Läsionen einhergeht (KAWANO et al. 2006). Dieses Ergebnis konnte jedoch im Pilocarpin SE-Modell in diesem Dissertationsprojekt nicht bestätigt werden. Die Behandlung mit SC-51089 bewirkte keine Verhinderung der anfallssinduzierten Neurodegeneration im Hilus des Hippocampus. Aus diesem Ergebnis lässt sich jedoch nicht direkt schließen, dass SC-51089 im SE-Modell keine Wirkung auf die anfallsinduzierte Neurodegeneration hat. Brandt et al. (2003) konnten z.B. einen neuroprotektiven Effekt von MK-801 in allen Strukturen des limbischen Systems, außer dem Hilus nachweisen (BRANDT et al. 2003). Um eine abschließende Aussage über die Wirkung von SC-51089 bzgl. einer Neuroprotektion treffen zu können, wäre es zudem interessant weitere SC-51089-Konzentrationen und ein längeres Behandlungsintervall zu testen.

## 6.4 SCHLUSSBETRACHTUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression genauer zu charakterisieren. In einem ersten Teil der Dissertation wurde deshalb die Spezifität der molekularen Veränderungen des verwendeten Tiermodells untersucht. Hierfür wurde die Wirkung von spontanen Anfällen und eines SE auf die Pgp-Expression im Kaninen Gehirn untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass wie im Tiermodell auch nach einem spontan ablaufenden SE eine deutliche Induktion des Mutlidrug-Transporters Pgp an der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar ist. Durch dieses Ergebnis konnte ein zusätzlicher Hinweis dafür erbracht werden, dass die im Tiermodell beobachtete Induktion von Pgp eine direkte Folge der Anfallsaktivität ist

und nicht ein unspezifischer Nebeneffekt der chemischen oder elektrischen Induktion des SE.

Bisherige Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe weisen auf eine besondere Bedeutung des Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Weges in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke für die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression hin. Daher wurden eingehende Untersuchungen in diesem Dissertationsprojekt durchgeführt, die darauf abzielten diesen Signalweg weiter aufzuklären. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es anfallsinduziert nicht zu einer Expressionsveränderung der endothelialen COX-2 kommt. Vermutlich ist die Pgp-Induktion eher Folge einer erhöhten COX-2 Aktivität, die infolge einer vermehrten Zufuhr ihres Substrates AA, welches zu PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> und weiter zu PGE<sub>2</sub> umgesetzt wird, auftritt. Durch vorausgegangene *in vitro* Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass die weitere Pgp-Induktion über den EP-1-Rezeptor von PGE<sub>2</sub> abläuft. Diese Annahme konnte durch die Verwendung des EP-1-Rezeptor Hemmers SC-51089 *in vivo* im Rahmen dieses Dissertationsprojektes bestätigt werden. Die Behandlung von Ratten mit SC-51089 konnte die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression signifikant verhindern. Ein neuroprotektiver Effekt dieser Substanz konnte jedoch bei der verwendeten Konzentration von SC-51089 in diesem SE Modell im Hilus nicht nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden Untersuchungen zu möglichen Downstream-Elementen des EP-1-Rezeptors angeschlossen, den Transkriptionsfaktoren YB-1 und ZONAB. Erstmals konnte eine Expression dieser Transkriptionsfaktoren im adulten Gehirn unterschiedlicher Spezies nachgewiesen werden, die jedoch vermutlich nicht mit der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression im Zusammenhang steht.

Die bisherigen Ergebnisse demonstrieren jedoch eindrucksvoll, dass durch eine genaue Kenntnis, der an der Regulation der Pgp-Überexpression beteiligten Faktoren, eine Modulation bzw. Inhibition der anfallsinduzierten Induktion von Pgp möglich ist, und dadurch eine hoffnungsvolle Möglichkeit zur Behandlung und zur Prävention einer Multidrug-Transporter basierten Pharmakoresistenz geschaffen werden kann.

### **7 ZUSAMMENFASSUNG**

Bernadette Unkrüer

#### **Regulation der P-Glycoprotein-Expression im epileptischen Gehirn**

Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des Menschen, aber auch der Hunde und Katzen. Sie sind mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität und Lebenserwartung verbunden und führen zu einer fortschreitenden Schädigung des gesamten Nervensystems. Gegenwärtig ist die wichtigste Therapieform der Epilepsie nach wie vor die Pharmakotherapie. Ungeachtet einer Vielzahl neuer Antiepileptika kann jedoch bei über 30% der Menschen, aber auch der Hunde oder Katzen mit Epilepsien durch eine medikamentelle Therapie keine ausreichende Kontrolle der Anfälle herbeigeführt werden. Diese Pharmakoresistenz stellt ein schwerwiegendes Problem dar und macht neue Therapie- und Behandlungsstrategien unbedingt erforderlich.

Es wird vermutet, dass es sich bei der Pharmakoresistenz um einen multifaktoriellen Prozess handelt. Eine, der in diesem Zusammenhang am häufigsten erwähnten Thesen, ist die Multidrug-Transporter-Hypothese. Hier wird davon ausgegangen, dass es, durch an der Blut-Hirn-Schranke überexprimierte Efflux-Transporter, nicht zu einer ausreichend hohen Konzentration eines Antiepileptikums im neuronalen Gewebe kommt. Dem Multidrug-Transporter P-Glycoprotein (Pgp) wird dabei eine besondere Bedeutung beigemessen. Basierend auf der Multidrug-Transporter-Hypothese war es ein Ziel dieses Dissertationsvorhabenes die Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression genauer zu charakterisieren, um daraus resultierend mögliche neue Angriffspunkte für eine Modulation der Pgp-Überexpression zu identifizieren.

In einem ersten Teil der Dissertation wurde deshalb die Spezifität der molekularen Veränderungen des verwendeten Tiermodells untersucht. Hierfür wurde die Wirkung von spontanen Anfällen und eines SE auf die Pgp-Expression im Kaninen Gehirn untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass wie im Tiermodell auch nach einem spontan ablaufenden SE eine deutliche Induktion des Multidrug-Transporters Pgp an der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar ist. Durch dieses Ergebnis konnte ein

## ZUSAMMENFASSUNG

---

zusätzlicher Hinweis dafür erbracht werden, dass die im Tiermodell beobachtete Induktion von Pgp eine direkte Folge der Anfallsaktivität ist und nicht ein unspezifischer Nebeneffekt der chemischen oder elektrischen Induktion des SE.

In den letzten Jahren konnte ein Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Signalweg in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden, der offensichtlich an der anfallsinduzierten Induktion von Pgp beteiligt ist. Trotz eines Western-Blot-Nachweises von NMDA-Rezeptoren an Endothelzellen, konnte jedoch im Rahmen dieses Dissertationsprojektes kein immunhistochemischer Nachweis der NMDA-Rezeptoren erbracht werden und daraus resultierend auch keine Aussage über eine evtl. anfallsinduzierte Expressionsveränderung gegeben werden.

Durch die Etablierung einer speziellen Vorbehandlung war es möglich COX-2 immunhistochemisch in Endothelzellen darzustellen. Bei einer Untersuchung der endothelialen COX-2-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem SE konnten jedoch keine signifikanten Expressionsveränderungen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt *in vitro* Ergebnisse unserer kooperierenden Arbeitsgruppe. Es ist ein Hinweis darauf, dass die anfallsinduzierte Überexpression von Pgp offenbar nicht durch eine vermehrte COX-2-Expression, sondern durch stärkere Zufuhr von COX-2-Substraten hervorgerufen wird.

Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang in der letzten Zeit durch eine Inhibition der Pgp Funktion im Tiermodell bereits eine Überwindung von Pharmakoresistenz. Die komplette Inhibition der Pgp Funktion bringt jedoch den Nachteil einer vollständigen Pgp Hemmung in allen Körperregionen mit sich. Aus diesem Grund scheint es eine deutlich bessere Strategie zu sein, lediglich die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression zu hemmen. Dieses gelang in vorausgegangenen Studien schon durch eine Hemmung der NMDA-Rezeptoren oder eine Inhibition von COX-2. Auch in diesem Dissertationsprojekt konnte durch den EP-1-Rezeptor-Hemmer SC-51089 eine Hemmung erreicht werden. Bei einer zusätzlichen Auswertung der anfallsinduzierten Neurodegeneration zeigte sich, anders als aus Studien im Schlaganfallmodell erwartet, dass SC-51089 im SE-Modell offenbar keine neuroprotektive Effekte zeigt.

Um weitere bisher noch unbekanntes, der Glutamat/NMDA-Rezeptoren/COX-2/PGE<sub>2</sub>-Kaskade nachgeschaltete Faktoren, welche als potentielle Angriffspunkte zur Überwindung der Transporter basierten Pharmakoresistenz dienen könnten, aufzudecken, wurden zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Durch Studien an Tumorgewebe wird für die Transkriptionsfaktoren

## ZUSAMMENFASSUNG

---

YB-1 und ZONAB eine Beteiligung an einer Pgp-Überexpression angenommen. Sowohl YB-1 als auch ZONAB ließen sich in diesem Dissertationsprojekt in Gehirngewebe in Neuronen nachweisen. Es konnte jedoch nur bei YB-1 eine deutliche gefäßassoziierte Markierung dargestellt werden, die sich in Doppelmarkierungsstudien jedoch als nicht endothelial erwies. ZONAB war, ergänzend zu der neuronalen Expression, lediglich an einigen Gefäßen, dem Endothel basal aufliegend, nachzuweisen. In weiterführenden immunhistologischen Untersuchungen konnte YB-1 auch in Primaten- und in Humangehirngewebe dargestellt werden. Bei der quantitativen Auswertung der gefäßassoziierten YB-1-Expression im Rattengehirn zeigte sich jedoch, dass anfallsinduziert keine Expressionsveränderung nachzuweisen ist. Lediglich bei der neuronalen YB-1-Expression war anfallsinduziert eine transiente Induktion im Hilus des Hippokampus nachweisbar. Um nach diesen Ergebnissen eine Beteiligung von YB-1 an der anfallsinduzierten Induktion von Pgp vollständig ausschließen zu können, sind jedoch weiterführende funktionelle Untersuchungen z.B. unter Verwendung von siRNA notwendig.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen demonstrieren einheitlich, dass die anfallsinduzierte Pgp-Überexpression über einen Glutamat/NMDA-Rezeptor/COX-2-Signalweg in den Endothelzellen induziert wird. Resultierend aus einer erhöhten COX-2-Aktivität scheint es zu einer verstärkten Freisetzung von PGE<sub>2</sub> zu kommen, was über seine Wirkung am EP-1-Rezeptor, die Induktion von Pgp hervorruft. Es konnte gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der Induktionskaskade von Pgp durch SC-51089 eine geeignete Möglichkeit bietet, die Multidrug-Transporter bedingte Pharmakoresistenz präventiv zu unterbinden bzw. zu behandeln.

Ob auch YB-1 als Zielstruktur für eine Modifikation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression dienen kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die bisherigen Ergebnisse demonstrieren jedoch eindrucksvoll, dass die Modulation der Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression eine elegante und hoffnungsvolle Möglichkeit zur Überwindung der Transporter basierten Pharmakoresistenz bietet, und dass es aus diesem Grund unerlässlich ist, weitere Informationen zur Regulation der anfallsinduzierten Pgp-Überexpression zu gewinnen.

## 8 **SUMMARY**

Bernadette Unkrüer

### **Regulation of P-glycoprotein-expression in the epileptic brain**

Epilepsy is the most common chronic neurological disease in humans and animals such as dogs and cats. It is associated with considerable limitations in quality of life and lifespan and leads to progressive brain damage. Despite the variety of new antiepileptic drugs in human and veterinary medicine, one third of all patients with epilepsy are pharmaco-resistant. This intractable type of epilepsy remains a major, unsolved problem and necessitates new therapeutic strategies.

There is cumulating evidence that a seizure-induced overexpression of multidrug transporters at the blood brain barrier contributes to limited brain access of antiepileptic drugs and insufficient concentration of antiepileptic drugs in the epileptic tissue. The multidrug transporter P-glycoprotein (Pgp) seems to be of specific relevance in association with intractable epilepsy. Based on the multidrug-transporter-hypothesis, one goal of this study was to characterize the molecular mechanisms underlying seizure-induced induction of Pgp expression at the blood brain barrier. To know all steps of regulation will offer new targets for the development of new strategies to overcome pharmaco-resistance. Therefore, the consequences of spontaneous status epilepticus and seizure cluster on endothelial Pgp expression were quantitatively determined in epileptic dogs. The data demonstrate that status epilepticus but not seizure clusters significantly induce endothelial Pgp expression in brain regions involved in seizure onset and spread. Our findings indicate that molecular changes in dogs with seizure activity reflect those in animal models, thereby substantiating that the seizure-induced up-regulation of Pgp expression seems to be a direct effect of seizure activity and not a bias by chemical or electrical induction of seizures in these models.

Recent studies demonstrate a Glutamat/NMDA-receptor/COX-2 signaling pathway in endothelial cells of the blood brain barrier which is obviously involved in the seizure-induced up-regulation of Pgp expression. Despite the detection of the NMDA-receptor subunit, NR-1, in endothelial cells by western blot analysis, we were unable

## SUMMARY

---

to demonstrate this receptor subtype in brain tissue by immunohistology. However, by using a specific pretreatment of brain sections, we were able to demonstrate for the first time endothelial expression of COX-2 by immunohistology. Analysis of the endothelial COX-2 expression pattern in animals euthanized at different time points following status epilepticus revealed no differences in expression. This indicates that seizure-induced up-regulation of Pgp is not due to induced COX-2 expression, but to increased feeding of COX-2 with its substrate thereby confirming recent *in vitro* findings.

Recent studies in animal models of pharmaco-resistant epilepsy demonstrated that it is possible to overcome drug-refractoriness by specific inhibitors of Pgp. But systemic inhibition of Pgp function by inhibitors is associated with an obstruction of its tissue protective properties leading to severe intoxication. Strategies inhibiting only the seizure-induced up-regulation of Pgp expression at the blood brain barrier without interfering with Pgp function in other organs thus seem to be more favorable. Administration of SC-51089, an antagonist at the EP-1 receptor, anticipated the seizure-induced up-regulation of endothelial Pgp expression. Even though EP-1 receptor blockade was associated with neuroprotection in different models of CNS diseases, it had no neuroprotective efficacy on seizure-induced neurodegeneration of hilar neurons in a status epilepticus model.

To identify further downstream effectors of this cascade additional immunohistochemical analysis were performed. Based on a described link between expression of the transcription factors YB-1 and ZONAB with the expression of Pgp in cancer cells, we hypothesized that these transcription factors may also regulate Pgp expression in brain capillary endothelial cells. Analysis of the expression of YB-1 and ZONAB in rat brain tissue revealed a strong expression of both transcription factors in neuronal cells and an endothelial association of YB-1 expression. Double-labeling studies with the endothelial cell marker Glut-1 did not indicate a co-localization of YB-1 with endothelial cells. Analogous expression patterns of YB-1 were additionally observed in macaques and human brain tissue. Moreover, YB-1 expression proved not to be inducible in rat brain capillary cells following different time points of status epilepticus. These results strongly suggest a lack of involvement of transcriptional and translational regulation of Pgp expression in brain capillary endothelial cells.



## SUMMARY

---

The results clearly demonstrate the relevance of the Glutamat/NMDA-receptor/COX-2 signaling pathway for the seizure-induced up-regulation of Pgp expression in endothelial cells. Increased COX-2 activity but not an increased expression seems to induce a significant seizure-induced PGE<sub>2</sub> release, which leads to an induction of endothelial Pgp expression via activation of the EP-1 receptors. Therefore, disruption of the induction of Pgp by SC-51089 seems to be a suitable opportunity to overcome or to prevent multidrug transporter-induced pharmacoresistance. YB-1 might be an additional suitable target structure for modification of seizure-induced overexpression of Pgp; however, further studies have to evaluate its relevance in this regard.

The results of this thesis demonstrate that modulations of the signaling pathway of seizure-induced overexpression of Pgp seem to be an exclusive and promising way to overcome multidrug-transporter based pharmacoresistance. Consequently, it is important to further characterize this pathway and to gain specific information about its modification by pharmacological intervention.

## 9 LITERATURÜBERSICHT

ABBOTT, N. J., L. RONNBACK u. E. HANSSON (2006):  
Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.  
Nat Rev Neurosci 7, 41-53

AHMAD, A. S., S. SALEEM, M. AHMAD u. S. DORE (2006):  
Prostaglandin EP1 receptor contributes to excitotoxicity and focal ischemic brain damage.  
Toxicol Sci 89, 265-270

ANDRAS, I. E., M. A. DELI, S. VESZELKA, K. HAYASHI, B. HENNIG u. M. TOBOREK (2007):  
The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells.  
J Cereb Blood Flow Metab 27, 1431-1443

ARONIADOU-ANDERJASKA, V., B. FRITSCH, F. QASHU u. M. F. BRAGA (2008):  
Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy.  
Epilepsy Res 78, 102-116

BALDA, M. S., M. D. GARRETT u. K. MATTER (2003):  
The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density.  
J Cell Biol 160, 423-432

BALDA, M. S. u. K. MATTER (2000):  
The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression.  
EMBO J 19, 2024-2033

BARAN, H., M. GRAMER, D. HONACK u. W. LOSCHER (1995):  
Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats.  
Eur J Pharmacol 286, 167-175

BARGOU, R. C., K. JURCHOTT, C. WAGENER, S. BERGMANN, S. METZNER, K. BOMMERT, M. Y. MAPARA, K. J. WINZER, M. DIETEL, B. DORKEN u. H. D. ROYER (1997):  
Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression.  
Nat Med 3, 447-450

BAUER, B., A. M. HARTZ u. D. S. MILLER (2007):  
Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier.  
Mol Pharmacol 71, 667-675

BAUER, B., A. M. HARTZ, A. PEKCEC, K. TOELLNER, D. S. MILLER u. H. POTSCSKA (2008):

Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling.

Mol Pharmacol 73, 1444-1453

BILAK, M., L. WU, Q. WANG, N. HAUGHEY, K. CONANT, C. ST HILLAIRE u. K. ANDREASSON (2004):

PGE2 receptors rescue motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis.

Ann Neurol 56, 240-248

BOENISCH, T. (2003):

Handbuch: Immunchemische Färbemethoden.

DakoCytomation Corp. Carpinteria, CA, USA,

BRAITHWAITE, A. W., G. DEL SAL u. X. LU (2006):

Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death.

Cell Death Differ 13, 984-993

BRANDT, C., K. BETHMANN, A. M. GASTENS u. W. LOSCHER (2006):

The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy.

Neurobiol Dis 24, 202-211

BRANDT, C., H. POTSCSKA, W. LOSCHER u. U. EBERT (2003):

N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy.

Neuroscience 118, 727-740

BREYER, R. M. (2001):

Prostaglandin EP(1) receptor subtype selectivity takes shape.

Mol Pharmacol 59, 1357-1359

BREYER, R. M., C. K. BAGDASSARIAN, S. A. MYERS u. M. D. BREYER (2001):

Prostanoid receptors: subtypes and signaling.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 41, 661-690

BRODIE, M. J. u. P. KWAN (2002):

Staged approach to epilepsy management.

Neurology 58, S2-8

BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):

Epilepsy.

N Engl J Med 344, 1145-1151

CAGGIANO, A. O., C. D. BREDER u. R. P. KRAIG (1996):

Long-term elevation of cyclooxygenase-2, but not lipoxygenase, in regions synaptically distant from spreading depression.

J Comp Neurol 376, 447-462

- CAZEVIEILLE, C., A. MULLER, F. MEYNIER, N. DUTRAIT u. C. BONNE (1994):  
Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons.  
*Neurochem Int* 24, 395-398
- CHANG, B. S. u. D. H. LOWENSTEIN (2003):  
Epilepsy.  
*N Engl J Med* 349, 1257-1266
- CHOI, S. H., R. LANGENBACH u. F. BOSETTI (2006):  
Cyclooxygenase-1 and -2 enzymes differentially regulate the brain upstream NF-  
kappa B pathway and downstream enzymes involved in prostaglandin biosynthesis.  
*J Neurochem* 98, 801-811
- CLIFFORD, D. B., J. W. OLNEY, A. MANIOTIS, R. C. COLLINS u. C. F. ZORUMSKI  
(1987):  
The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose  
pilocarpine seizures.  
*Neuroscience* 23, 953-968
- CLINCKERS, R., I. SMOLDERS, A. MEURS, G. EBINGER u. Y. MICHOTTE (2005):  
Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug transporters on  
the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: concomitant use of hippocampal  
monoamines as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant activity.  
*J Pharmacol Exp Ther* 314, 725-731
- COLE-EDWARDS, K. K. u. N. G. BAZAN (2005):  
Lipid signaling in experimental epilepsy.  
*Neurochem Res* 30, 847-853
- COLLACO-MORAES, Y., B. ASPEY, M. HARRISON u. J. DE BELLEROCHE (1996):  
Cyclo-oxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia.  
*J Cereb Blood Flow Metab* 16, 1366-1372
- COULTER, D. A. (2001):  
Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression,  
function, and inhibitory synaptic properties.  
*Int Rev Neurobiol* 45, 237-252
- COULTER, D. A., D. C. MCINTYRE u. W. LOSCHER (2002):  
Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us?  
*Brain Pathol* 12, 240-256
- CUCULLO, L., M. HOSSAIN, E. RAPP, T. MANDERS, N. MARCHI u. D. JANIGRO  
(2007):  
Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain  
penetration of antiepileptic drugs.  
*Epilepsia* 48, 505-516
- DALBY, N. O. u. I. MODY (2001):  
The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.  
*Curr Opin Neurol* 14, 187-192

DINGLELINE, R., K. BORGES, D. BOWIE u. S. F. TRAYNELIS (1999):  
The glutamate receptor ion channels.  
Pharmacol Rev 51, 7-61

ENGEL (2007):  
Bericht der Klassifikations-Kerngruppe der Internationalen Liga gegen Epilepsie.  
Z Epileptol 20, 15-30

ENGEL, A. BERG, F. ANDERMANN, G. AVANZINI, S. BERKOVIC, W. BLUME, O. DULAC, W. VAN EMDE BOAS, N. FEJERMAN, P. PLOUIN, I. SCHEFFER, M. SEINO, P. WILLIAMSON u. P. WOLF (2006):  
Are epilepsy classifications based on epileptic syndromes and seizure types outdated?  
Epileptic Disord 8, 159-160

ENGEL, T., B. M. MURPHY, C. K. SCHINDLER u. D. C. HENSHALL (2007):  
Elevated p53 and lower MDM2 expression in hippocampus from patients with intractable temporal lobe epilepsy.  
Epilepsy Res 77, 151-156

FELIX, R. A. u. M. A. BARRAND (2002):  
P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress.  
J Neurochem 80, 64-72

FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL, JR. (2005):  
Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).  
Epilepsia 46, 470-472

FOLDVARY, N., W. E. BINGAMAN u. E. WYLLIE (2001):  
Surgical treatment of epilepsy.  
Neurol Clin 19, 491-515

FROMM, M. F. (2004):  
Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.  
Trends Pharmacol Sci 25, 423-429

FUJITA, T., K. ITO, H. IZUMI, M. KIMURA, M. SANO, H. NAKAGOMI, K. MAENO, Y. HAMA, K. SHINGU, S. TSUCHIYA, K. KOHNO u. M. FUJIMORI (2005):  
Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel.  
Clin Cancer Res 11, 8837-8844

FURTINGER, S., S. PIRKER, T. CZECH, C. BAUMGARTNER u. G. SPERK (2003):  
Increased expression of gamma-aminobutyric acid type B receptors in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy.  
Neurosci Lett 352, 141-145

GENDRON, T. F., E. BRUNETTE, J. S. TAUSKELA u. P. MORLEY (2005):

The dual role of prostaglandin E(2) in excitotoxicity and preconditioning-induced neuroprotection.

Eur J Pharmacol 517, 17-27

GLIEN, M., C. BRANDT, H. POTSCHKA, H. VOIGT, U. EBERT u. W. LOSCHER (2001):

Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy.

Epilepsy Res 46, 111-119

GOBBO, O. L. u. S. M. O'MARA (2004):

Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration.

Neuroscience 125, 317-327

GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET, E. ARONICA u. F. H. LOPES DA SILVA (2001):

Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons.

Eur J Neurosci 13, 657-669

HAIMEUR, A., G. CONSEIL, R. G. DEELEY u. S. P. COLE (2004):

The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation.

Curr Drug Metab 5, 21-53

HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. L. T. KURLAND (1993):

Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984.

Epilepsia 34, 453-468

HEWETT, S. J., J. M. SILAKOVA u. J. A. HEWETT (2006):

Oral treatment with rofecoxib reduces hippocampal excitotoxic neurodegeneration.

J Pharmacol Exp Ther 319, 1219-1224

HOFFMANN, K., A. M. GASTENS, H. A. VOLK u. W. LOSCHER (2006):

Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats.

Epilepsy Res 69, 1-14

HOLMES, G. L. (2002):

Seizure-induced neuronal injury: animal data.

Neurology 59, S3-6

HOMER, C., D. A. KNIGHT, L. HANANEIA, P. SHEARD, J. RISK, A. LASHAM, J. A. ROYDS u. A. W. BRAITHWAITE (2005):

Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function.

Oncogene 24, 8314-8325

HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):

Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.

Science 220, 323-325

HUANG, J., P. H. TAN, K. B. LI, K. MATSUMOTO, M. TSUJIMOTO u. B. H. BAY (2005):

Y-box binding protein, YB-1, as a marker of tumor aggressiveness and response to adjuvant chemotherapy in breast cancer.

Int J Oncol 26, 607-613

IANNETTI, P., A. SPALICE u. P. PARISI (2005):

Calcium-channel blocker verapamil administration in prolonged and refractory status epilepticus.

Epilepsia 46, 967-969

JANZ, M., N. HARBECK, P. DETTMAR, U. BERGER, A. SCHMIDT, K. JURCHOTT, M. SCHMITT u. H. D. ROYER (2002):

Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1.

Int J Cancer 97, 278-282

JULIANO, R. L. u. V. LING (1976):

A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.

Biochim Biophys Acta 455, 152-162

JUNG, K. H., K. CHU, S. T. LEE, J. KIM, D. I. SINN, J. M. KIM, D. K. PARK, J. J. LEE, S. U. KIM, M. KIM, S. K. LEE u. J. K. ROH (2006):

Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus.

Neurobiol Dis 23, 237-246

KASZUBIAK, A., A. KUPSTAT, U. MULLER, R. HAUSMANN, P. S. HOLM u. H. LAGE (2007):

Regulation of MDR1 gene expression in multidrug-resistant cancer cells is independent from YB-1.

Biochem Biophys Res Commun 357, 295-301

KAWAGUCHI, K., R. W. HICKEY, M. E. ROSE, L. ZHU, J. CHEN u. S. H. GRAHAM (2005):

Cyclooxygenase-2 expression is induced in rat brain after kainate-induced seizures and promotes neuronal death in CA3 hippocampus.

Brain Res 1050, 130-137

KAWANO, T., J. ANRATHER, P. ZHOU, L. PARK, G. WANG, K. A. FRY, A. KUNZ, S. CHO, M. ORIO u. C. IADECOLA (2006):

Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity.

Nat Med 12, 225-229

KIM, D. K. u. T. J. JANG (2006):

Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in flurothyl-induced neonatal seizure.

Int J Exp Pathol 87, 73-78

KOENIG, H., J. J. TROUT, A. D. GOLDSTONE u. C. Y. LU (1992):  
Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown.  
Brain Res 588, 297-303

KOHNO, K., H. IZUMI, T. UCHIUMI, M. ASHIZUKA u. M. KUWANO (2003):  
The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1.  
Bioessays 25, 691-698

KRIZBAI, I. A., M. A. DELI, A. PESTENACZ, L. SIKLOS, C. A. SZABO, I. ANDRAS u.  
F. JOO (1998):  
Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells.  
J Neurosci Res 54, 814-819

KURUMBAIL, R. G., A. M. STEVENS, J. K. GIERSE, J. J. MCDONALD, R. A.  
STEGEMAN, J. Y. PAK, D. GILDEHAUS, J. M. MIYASHIRO, T. D. PENNING, K.  
SEIBERT, P. C. ISAKSON u. W. C. STALLINGS (1996):  
Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory  
agents.  
Nature 384, 644-648

KUWANO, M., T. UCHIUMI, H. HAYAKAWA, M. ONO, M. WADA, H. IZUMI u. K.  
KOHNO (2003):  
The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-  
1) and angiogenesis-related factors in human malignancies.  
Cancer Sci 94, 9-14

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2002):  
Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition?  
Seizure 11, 77-84

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2006):  
Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.  
Expert Rev Neurother 6, 397-406

LABIALLE, S., L. GAYET, E. MARTHINET, D. RIGAL u. L. G. BAGGETTO (2002):  
Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views.  
Biochem Pharmacol 64, 943-948

LANGER, O., M. BAUER, A. HAMMERS, R. KARCH, E. PATARAIA, M. J. KOEPP, A.  
ABRAHIM, G. LUURTSEMA, M. BRUNNER, R. SUNDER-PLASSMANN, F.  
ZIMPRICH, C. JOUKHADAR, S. GENTZSCH, R. DUDCZAK, K. KLETTER, M.  
MULLER u. C. BAUMGARTNER (2007):  
Pharmacoresistance in epilepsy: a pilot PET study with the P-glycoprotein substrate  
R-[(11)C]verapamil.  
Epilepsia 48, 1774-1784

LAZAROWSKI, A., M. MASSARO, A. SCHTEINSCHNAIDER, S. INTRUVINI, G.  
SEVLEVER u. A. RABINOWICZ (2004):



Neuronal MDR-1 gene expression and persistent low levels of anticonvulsants in a child with refractory epilepsy.  
Ther Drug Monit 26, 44-46

LEE, B., H. DZIEMA, K. H. LEE, Y. S. CHOI u. K. OBRIETAN (2007):  
CRE-mediated transcription and COX-2 expression in the pilocarpine model of status epilepticus.  
Neurobiol Dis 25, 80-91

LEPPIK, I. E. (1992):  
Intractable epilepsy in adults.  
Epilepsy Res Suppl 5, 7-11

LITMAN, T., T. E. DRULEY, W. D. STEIN u. S. E. BATES (2001):  
From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance.  
Cell Mol Life Sci 58, 931-959

LOSCHER, W. (1997):  
Animal models of intractable epilepsy.  
Prog Neurobiol 53, 239-258

LOSCHER, W. (2002):  
Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.  
Epilepsy Res 50, 105-123

LÖSCHER, W. (1994):  
Neue Antiepilepika - ein Fortschritt für die Behandlung epileptischer Tiere?  
Kleintierpraxis 39, 239-258

LÖSCHER, W. (2003):  
Pharmacological basis of the treatment of epilepsy in dogs and cats.  
Praktische Tierarzt 84, 574-586

LOSCHER, W. u. H. POTSCSKA (2002):  
Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.  
J Pharmacol Exp Ther 301, 7-14

LOSCHER, W. u. H. POTSCSKA (2005a):  
Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family.  
NeuroRx 2, 86-98

LOSCHER, W. u. H. POTSCSKA (2005b):  
Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters.  
Nat Rev Neurosci 6, 591-602

LOSCHER, W. u. H. POTSCSKA (2005c):  
Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases.

Prog Neurobiol 76, 22-76

LOSCHER, W. u. D. SCHMIDT (2002):  
New horizons in the development of antiepileptic drugs.  
Epilepsy Res 50, 3-16

MALMBERG, A. B., M. F. RAFFERTY u. T. L. YAKSH (1994):  
Antinociceptive effect of spinally delivered prostaglandin E receptor antagonists in the formalin test on the rat.  
Neurosci Lett 173, 193-196

MALMBERG, A. B. u. T. L. YAKSH (1992):  
Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat.  
J Pharmacol Exp Ther 263, 136-146

MANEV, H., T. UZ u. T. QU (2000):  
5-Lipoxygenase and cyclooxygenase mRNA expression in rat hippocampus: early response to glutamate receptor activation by kainate.  
Exp Gerontol 35, 1201-1209

MARCHI, N., G. GUIISO, M. RIZZI, S. PIRKER, K. NOVAK, T. CZECH, C. BAUMGARTNER, D. JANIGRO, S. CACCIA u. A. VEZZANI (2005):  
A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine.  
Epilepsia 46, 1613-1619

MAWATARI, K., Y. YASUI, K. SUGITANI, T. TAKADERA u. S. KATO (1996):  
Reactive oxygen species involved in the glutamate toxicity of C6 glioma cells via xc antiporter system.  
Neuroscience 73, 201-208

MCNAMARA, J. O. (1994):  
Cellular and molecular basis of epilepsy.  
J Neurosci 14, 3413-3425

MEALEY, K. L., S. A. BENTJEN, J. M. GAY u. G. H. CANTOR (2001):  
Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene.  
Pharmacogenetics 11, 727-733

MELDRUM, B. S. (2000):  
Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology.  
J Nutr 130, 1007S-1015S

MIWA, A., T. HIGUCHI u. S. KOBAYASHI (2006):  
Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice.  
Biochim Biophys Acta 1760, 1675-1681

MORRISON, R. S., Y. KINOSHITA, M. D. JOHNSON, W. GUO u. G. A. GARDEN (2003):

p53-dependent cell death signaling in neurons.

Neurochem Res 28, 15-27

ODA, Y., K. KOHASHI, H. YAMAMOTO, S. TAMIYA, K. KOHNO, M. KUWANO, Y. IWAMOTO, T. TAJIRI, T. TAGUCHI u. M. TSUNEYOSHI (2008):

Different expression profiles of Y-box-binding protein-1 and multidrug resistance-associated proteins between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma.

Cancer Sci 99, 726-732

ODA, Y., A. SAKAMOTO, N. SHINOHARA, T. OHGA, T. UCHIUMI, K. KOHNO, M. TSUNEYOSHI, M. KUWANO u. Y. IWAMOTO (1998):

Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma.

Clin Cancer Res 4, 2273-2277

PAOLETTI, P. u. J. NEYTON (2007):

NMDA receptor subunits: function and pharmacology.

Curr Opin Pharmacol 7, 39-47

PARDRIDGE, W. M. (1999):

Blood-brain barrier biology and methodology.

J Neurovirol 5, 556-569

PARDRIDGE, W. M. (2005):

The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development.

NeuroRx 2, 3-14

PARDRIDGE, W. M., P. L. GOLDEN, Y. S. KANG u. U. BICKEL (1997):

Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein.

J Neurochem 68, 1278-1285

PARFENOVA, H., A. FEDINEC u. C. W. LEFFLER (2003):

Ionotropic glutamate receptors in cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase.

J Cereb Blood Flow Metab 23, 190-197

PASINETTI, G. M. u. P. S. AISEN (1998):

Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain.

Neuroscience 87, 319-324

PATEL, V. A., M. J. DUNN u. A. SOROKIN (2002):

Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2.

J Biol Chem 277, 38915-38920

PAXINOS u. WATSON (2005):

The rat brain stereotaxic coordinates.

Academic Press 5,

- PEKCEC, A., C. FUEST, M. MUHLENHOFF, R. GERARDY-SCHAHN u. H. POTSCHKA (2008):  
Targeting epileptogenesis-associated induction of neurogenesis by enzymatic depolysialylation of NCAM counteracts spatial learning dysfunction but fails to impact epilepsy development.  
J Neurochem 105, 389-400
- PEPICELLI, O., E. FEDELE, M. BERARDI, M. RAITERI, G. LEVI, A. GRECO, M. A. AJMONE-CAT u. L. MINGHETTI (2005):  
Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus.  
J Neurochem 93, 1561-1567
- PHILLIS, J. W., L. A. HORROCKS u. A. A. FAROOQUI (2006):  
Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders.  
Brain Res Rev 52, 201-243
- PIRKER, S., C. SCHWARZER, T. CZECH, C. BAUMGARTNER, H. POCKBERGER, H. MAIER, B. HAUER, W. SIEGHART, S. FURTINGER u. G. SPERK (2003):  
Increased expression of GABA(A) receptor beta-subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy.  
J Neuropathol Exp Neurol 62, 820-834
- POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2001):  
P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain.  
Neuroreport 12, 3557-3560
- POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LOSCHER (2002):  
P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats.  
Neurosci Lett 327, 173-176
- POTSCHKA, H. u. W. LOSCHER (2001):  
In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats.  
Epilepsia 42, 1231-1240
- POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. W. LOSCHER (2004):  
Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats.  
Neuroreport 15, 1657-1661
- RACINE, R. J., J. G. GARTNER u. W. M. BURNHAM (1972):  
Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures.  
Brain Res 47, 262-268
- RECKZIEGEL, G., H. BECK, J. SCHRAMM, B. W. URBAN u. C. E. ELGER (1999):

Carbamazepine effects on Na<sup>+</sup> currents in human dentate granule cells from epileptogenic tissue.  
*Epilepsia* 40, 401-407

REGESTA, G. u. P. TANGANELLI (1999):  
Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies.  
*Epilepsy Res* 34, 109-122

REMY, S., S. GABRIEL, B. W. URBAN, D. DIETRICH, T. N. LEHMANN, C. E. ELGER, U. HEINEMANN u. H. BECK (2003):  
A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy.  
*Ann Neurol* 53, 469-479

RIEUX, C., R. CARNEY, D. LUPI, O. DKHISSI-BENYAHYA, K. JANSEN, N. CHOUNLAMOUNTRI, R. G. FOSTER u. H. M. COOPER (2002):  
Analysis of immunohistochemical label of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification.  
*J Biol Rhythms* 17, 121-136

RIZZI, M., S. CACCIA, G. GUIISO, C. RICHICHI, J. A. GORTER, E. ARONICA, M. ALIPRANDI, R. BAGNATI, R. FANELLI, M. D'INCALCI, R. SAMANIN u. A. VEZZANI (2002):  
Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance.  
*J Neurosci* 22, 5833-5839

SAKAEDA, T., T. NAKAMURA u. K. OKUMURA (2004):  
Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy.  
*Curr Top Med Chem* 4, 1385-1398

SCHINKEL, A. H. (1997):  
The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins.  
*Semin Cancer Biol* 8, 161-170

SCHINKEL, A. H. (1999):  
P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.  
*Adv Drug Deliv Rev* 36, 179-194

SCHINKEL, A. H. u. J. W. JONKER (2003):  
Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview.  
*Adv Drug Deliv Rev* 55, 3-29

SCHINKEL, A. H., C. A. MOL, E. WAGENAAR, L. VAN DEEMTER, J. J. SMIT u. P. BORST (1995):  
Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice.  
*Eur J Cancer* 31A, 1295-1298

SCHWARTZ-PORSCHKE, D., W. LOSCHER u. H. H. FREY (1985):  
Therapeutic efficacy of phenobarbital and primidone in canine epilepsy: a comparison.

J Vet Pharmacol Ther 8, 113-119

SCOTTO, K. W. (2003):  
Transcriptional regulation of ABC drug transporters.  
Oncogene 22, 7496-7511

SHAREEF, M. M., B. BROWN, S. SHAJAHAN, S. SATHISHKUMAR, S. M. ARNOLD,  
M. MOHIUDDIN, M. M. AHMED u. P. M. SPRING (2008):  
Lack of P-glycoprotein expression by low-dose fractionated radiation results from loss  
of nuclear factor-kappaB and NF-Y activation in oral carcinoma cells.  
Mol Cancer Res 6, 89-98

SHARP, C. D., I. HINES, J. HOUGHTON, A. WARREN, T. H. T. JACKSON, A.  
JAWAHAR, A. NANDA, J. W. ELROD, A. LONG, A. CHI, A. MINAGAR u. J. S.  
ALEXANDER (2003):  
Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through  
activation of NMDA receptor.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 285, H2592-2598

SILLS, G. J., P. KWAN, E. BUTLER, E. C. DE LANGE, D. J. VAN DEN BERG u. M. J.  
BRODIE (2002):  
P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in mdr1a  
knockout mice.  
Epilepsy Behav 3, 427-432

SISODIYA, S. M., W. R. LIN, B. N. HARDING, M. V. SQUIER u. M. THOM (2002):  
Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common  
causes of refractory epilepsy.  
Brain 125, 22-31

SMITH, W. L., D. L. DEWITT u. R. M. GARAVITO (2000):  
Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.  
Annu Rev Biochem 69, 145-182

SMITH, W. L., R. M. GARAVITO u. D. L. DEWITT (1996):  
Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2.  
J Biol Chem 271, 33157-33160

SPERLING, M. R. (2004):  
The consequences of uncontrolled epilepsy.  
CNS Spectr. 9, 98-99

STEFAN, H., F. H. LOPES DA SILVA, W. LOSCHER, D. SCHMIDT, E. PERUCCA,  
M. J. BRODIE, P. A. BOON, W. H. THEODORE u. S. L. MOSHE (2006):  
Epileptogenesis and rational therapeutic strategies.  
Acta Neurol Scand 113, 139-155

STRAUSS, K. I. u. A. M. MARINI (2002):  
Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from  
glutamate-mediated cell death.  
J Neurotrauma 19, 627-638

SUZUKI, K., H. ARAKI, H. MIZOGUCHI, O. FURUKAWA u. K. TAKEUCHI (2001):  
Prostaglandin E inhibits indomethacin-induced gastric lesions through EP-1 receptors.  
*Digestion* 63, 92-101

TAKADERA, T., Y. SHIRAISHI u. T. OHYASHIKI (2004):  
Prostaglandin E2 induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation  
of EP2 receptors in cultured hippocampal neurons.  
*Neurochem Int* 45, 713-719

TAKEMIYA, T., M. MAEHARA, K. MATSUMURA, S. YASUDA, H. SUGIURA u. K.  
YAMAGATA (2006):  
Prostaglandin E2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron  
loss after seizure in the CA3 region.  
*Neurosci Res* 56, 103-110

TISHLER, D. M., K. I. WEINBERG, D. R. HINTON, N. BARBARO, G. M. ANNETT u.  
C. RAFFEL (1995):  
MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy.  
*Epilepsia* 36, 1-6

TREPANIER, L. A., A. VAN SCHOICK, W. S. SCHWARK u. J. CARRILLO (1998):  
Therapeutic serum drug concentrations in epileptic dogs treated with potassium  
bromide alone or in combination with other anticonvulsants: 122 cases (1992-1996).  
*J Am Vet Med Assoc* 213, 1449-1453

TU, B. u. N. G. BAZAN (2003):  
Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2  
expression in neocortex.  
*Exp Neurol* 179, 167-175

TURSKI, W. A., E. A. CAVALHEIRO, M. SCHWARZ, S. J. CZUCZWAR, Z.  
KLEINROK u. L. TURSKI (1983):  
Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural,  
electroencephalographic and neuropathological study.  
*Behav Brain Res* 9, 315-335

VAIMAN, A. V., T. P. STROMSKAYA, E. Y. RYBALKINA, A. V. SOROKIN, S. G.  
GURYANOV, T. N. ZABOTINA, E. B. MECHETNER, L. P. OVCHINNIKOV u. A. A.  
STAVROVSKAYA (2006):  
Intracellular localization and content of YB-1 protein in multidrug resistant tumor cells.  
*Biochemistry (Mosc)* 71, 146-154

VAN VLIET, E. A., E. ARONICA, S. REDEKER, N. MARCHI, M. RIZZI, A. VEZZANI  
u. J. GORTER (2004):  
Selective and persistent upregulation of mdr1b mRNA and P-glycoprotein in the  
parahippocampal cortex of chronic epileptic rats.  
*Epilepsy Res* 60, 203-213

VAN VLIET, E. A., R. VAN SCHAİK, P. M. EDELBROEK, S. REDEKER, E.  
ARONICA, W. J. WADMAN, N. MARCHI, A. VEZZANI u. J. A. GORTER (2006):

Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats.  
*Epilepsia* 47, 672-680

VAN VLIET, E. A., R. VAN SCHAİK, P. M. EDELBROEK, R. A. VOSKUYL, S. REDEKER, E. ARONICA, W. J. WADMAN u. J. A. GORTER (2007):  
Region-specific overexpression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier affects brain uptake of phenytoin in epileptic rats.  
*J Pharmacol Exp Ther* 322, 141-147

VOLK, H., H. POTSCSKA u. W. LOSCHER (2005):  
Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables.  
*J Histochem Cytochem* 53, 517-531

VOLK, H. A., H. POTSCSKA u. W. LOSCHER (2004):  
Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats.  
*Epilepsy Res* 58, 67-79

VOUSINOS-PORCHE, B., E. KONING, H. KAPLAN, A. FERRANDON, M. GUENOUNOU, A. NEHLIG u. J. MOTTE (2004):  
Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.  
*Neurobiol Dis* 17, 385-402

WARNER, T. D. u. J. A. MITCHELL (2004):  
Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic.  
*FASEB J* 18, 790-804

WEST, M. J., L. SLOMIANKA u. H. J. GUNDERSEN (1991):  
Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.  
*Anat Rec* 231, 482-497

XU, S., Q. PANG, Y. LIU, W. SHANG, G. ZHAI u. M. GE (2007):  
Neuronal apoptosis in the resected sclerotic hippocampus in patients with mesial temporal lobe epilepsy.  
*J Clin Neurosci* 14, 835-840

YAMAGATA, K., K. I. ANDREASSON, W. E. KAUFMANN, C. A. BARNES u. P. F. WORLEY (1993):  
Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids.  
*Neuron* 11, 371-386

YILMAZER-HANKE, D. M., H. K. WOLF, J. SCHRAMM, C. E. ELGER, O. D. WIESTLER u. I. BLUMCKE (2000):  
Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy.  
*J Neuropathol Exp Neurol* 59, 907-920



## LITERATURVERZEICHNIS

---

ZAHRAOUI, A. (2004):

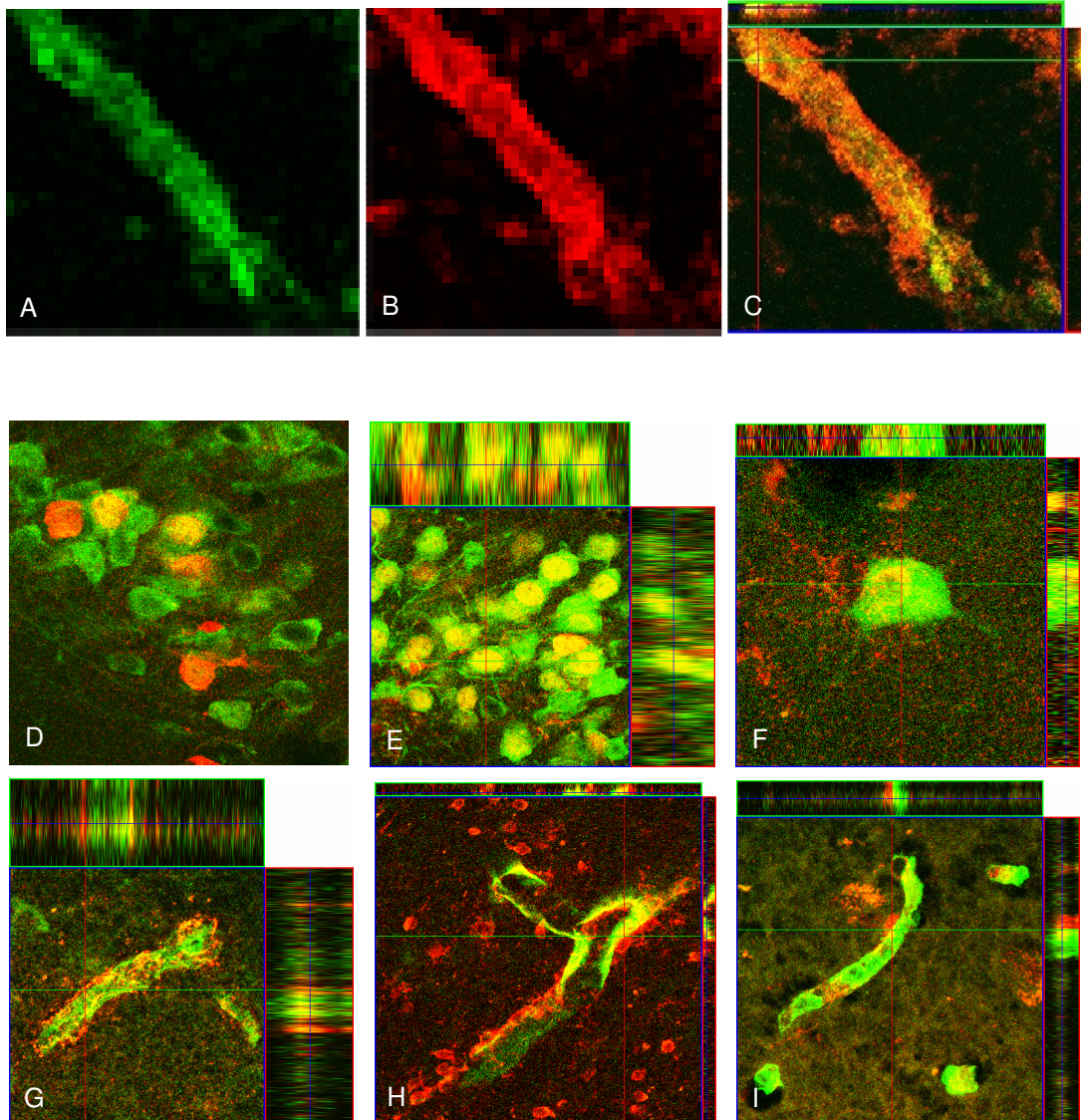
[Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity].

Med Sci (Paris) 20, 580-585

ZHU, H. J. u. G. Q. LIU (2004):

Glutamate up-regulates P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells by an NMDA receptor-mediated mechanism.

Life Sci 75, 1313-1322

**10 ANHANG****10.1 IMMUNFLUORESZENZ UND MEHRFACHMARKIERUNGEN**

**Abb. 21 COX-2 und YB-1 Doppelmarkierungsstudien. A und B zeigen die endotheliale Expression von Pgp (A) und COX-2 (B). Es ist eine deutliche endotheliale Co-lokalisierung von Pgp und COX-2 zu erkennen (C). Die Co-lokalisierung war vor allem in den Endothelzellen des Hippocampus und des Cortex nachweisbar. D, E und F zeigen die Co-lokalisierung von YB-1 (rot) und NeuN (grün) in Neuronen von Ratten- (D, E) und Makakengehirngewebe (F). YB-1 ist sowohl zytoplasmatisch als auch intranukleär in Neuronen nachweisbar. Bei der Doppelmarkierung von YB-1 (rot) mit Pgp (grün) im Rattengehirn zeigte sich, dass keine Co-lokalisierung nachweisbar war (G). YB-1 scheint den Pgp exprimierenden Endothelzellen basal aufzuliegen. Dieses Ergebnis konnte durch Doppelmarkierungsstudien von YB-1 und Glut-1 bestätigt werden (H, I). Sowohl im Rattengehirn (nicht gezeigt), als auch im Primaten- (H) und im Humangehirn (I) lag YB-1 (rot) den Endothelzellen (Glut-1, grün) basal auf.**

## 10.2 PUFFER UND LÖSUNGEN

### **0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)**

- 5,7%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 1,2%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- in Aqua dest.
- mit 1M NaOH auf pH 7,4 einstellen

### **0,01 M phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung (PBS)**

- 0,9% NaCl
- 0,1 M Phosphatpuffer
- mit HCL auf pH 7,6 einstellen

### **8% Paraformaldehyd-Stammlösung**

- 800ml Aqua dest. auf 60-70°C erhitzen
- 80g Paraformaldehyd unter Rühren hinzufügen
- 1M NaOH bis zur Klärung zusetzen
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- Lösung filtrieren
- ad 1000 ml mit Aqua dest.

### **4% Paraformaldehyd (200ml)**

- 100 ml 8% Paraformaldehyd-Stammlösung
- 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer

### **0,05 M Tris gepufferte Saline (TBS)**

- 0,9% NaCl
- 0,05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- mit HCL auf pH 7,6 einstellen

### **Na-Citratpuffer (pH 6)**

- 1,9 g tri-Natriumcitrat-dihydrat
- in 1000 ml Aqua dest.
- mit 2M HCL pH einstellen

### **Na-Citratpuffer (pH 9)**

- 2.94 g tri-Natriumcitrat-dihydrat
- in 1000 ml Aqua dest.
- mit 0,5M NaOH pH einstellen

### **TRIS-Nickel-Lösung**

- 0,6% Ammonium-Nickel-Sulfat
- in 0,05 M TBS
- mit 1M NaOH auf pH 7,6 einstellen

### **2 M DAB Stammlösung**

- 500 mg 3,3'-DAB
- in 7,5 ml Aqua dest.

### **DAB-Färbelösung**

- 1125 µl DAB Stammlösung
- 150 ml Tris-Nickel-Lösung
- 37,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### **Carrier-Lösung**

- in TBS
- 1% Normalserum (Esel, Kaninchen, Ziege, Schwein)
- 1% Rinderserumalbumin (BSA)
- 0,3% Triton X-100
- pH 7,4-7,6

### **Blocking-Lösung**

- in Carrier-solution
- 11% Normalserum (Esel, Kaninchen, Ziege, Schwein)
- 2% BSA
- pH 7,4-7,6

### **Gefriermedium**

- 4,28 g Glukose
- 0,07 g MgCl-Hexahydrat
- in 25 ml 0,1 M PBS lösen
- ad 50 ml 87%iges Glycerin

### **Thionin- Färbelösung**

- 100 ml 1M Essigsäure
- 36 ml 1 M NaOH
- auf 1L mit Aqua dest. auffüllen
- auf 60-70°C erhitzen
- darin 1,25 g Thionin lösen
- 1h auf dem Magnetrührer rühren
- heiß filtrieren
- Lösung ist dann bei 60°C 1 Monat haltbar

### **Nissel- (Thionin-) Färbung**

- 3 min in 100% Alkohol inkubieren
- 3 min in 95% Alkohol inkubieren
- 3 min in 70% Alkohol inkubieren
- 3 min in 50% Alkohol inkubieren
- 3 min in Aqua dest. inkubieren
- 45 min in Thionin-Färbelösung inkubieren
- 3 min in 50% Alkohol inkubieren
- 3 min in 70% Alkohol inkubieren
- 3 min in 95% Alkohol inkubieren
- 3 min in 100% Alkohol inkubieren
- 3 min Terpeneol/Xylol 1:1 inkubieren
- 3 min in Xylol inkubieren
- 3 min in frischem Xylol inkubieren
- mit Entellan eindecken

## 10.3 SUBSTANZEN

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammonium Nickel Sulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
3,3`Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)	Ratiopharm, Ulm
Entellan-Eindeckmedium	E. Merck AG, Darmstadt
Essigsäure 99,8%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glucosemonohydrat	AppliChem, Darmstadt
2-Methyl-butan	AppliChem, Darmstadt
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Methylscopolamin-bromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchloridlösung 0,9%(isoton)	Delta Select, Dreieich
Natriumchlorid p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Riedel de Häen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pilocarpinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Serum (Esel, Ziege, Kaninchen, Schwein)	DAKO, Dänemark
Terpineol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thionin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tissue Freezing Medium	Jung, Nussloch
Toluol	E. Merck AG, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	AppliChem, Darmstadt
Xylol	AppliChem, Darmstadt

## **11 PUBLIKATIONEN**

Over-expression of P-glycoprotein in the canine brain following spontaneous status epilepticus or cluster seizures.

A. Pekcec, B. Unkrüer, V. Stein, J. Bankstahl, A. Tipold, W. Baumgärtner, and H. Potschka  
Eingereicht bei Epilepsy Res.

Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition.

G. Zibell, B. Unkrüer, A. Pekcec, B. Bauer, A. M. Hartz, D. S. Miller, and H. Potschka  
Eingereicht bei JCBFM

Cellular localisation of Y-box binding protein1 in brain tissue of rats, macaques, and humans.

B. Unkrüer, A. Pekcec, C. Fuest, A. Wehmeyer, M. S. Balda, A. Horn, W. Baumgärtner, and  
H. Potschka

Manuskript in Vorbereitung

### **12 DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Bereitstellung des Themas, die jederzeit gute Betreuung, die wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft und die Korrektur meiner Arbeit. Zudem möchte ich mich für ihr Vertrauen, ihr persönliches Engagement und ihre Unterstützung nicht nur im Bezug auf alle wissenschaftlichen Projekte, sondern auch im Bezug auf nicht berufliche Aktivitäten bedanken.

Dr. Anton Pekcec, PhD möchte ich für seine Freundschaft, seinen unermüdlichen Einsatz, seine unendliche Geduld bei der Beantwortung unzähliger Fragen und seine große Hilfestellung bei der Anfertigung der Dissertation danken.

Dr. Petra Winter danke ich für ihre Freundschaft, ein immer offenes und interessiertes Ohr, so wie viele aufmunternde Worte. Ihre Gabe für alles immer eine Lösung zu finden und als ruhender Pol zwischen allem zu wirken, hat maßgeblich dazu beigetragen ein wunderbares Arbeitsklima zu schaffen.

Insbesondere möchte ich mich bei Christina, Guido und Sylvia, dem großartigsten Doktorandenteam überhaupt, für ihre Freundschaft und für die wunderschöne, unterhaltsame Zeit in München bedanken. Sie waren mir nicht nur bei der täglichen Arbeit, sondern auch im Privatleben eine große Hilfe und standen mir bei jedweden Fragen mit Rat und Tat zur Seite.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Jonna Sørensen, Heidi Zankl, Andrea Wehmeyer, Marion Fisch, Carmen Meyer und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die tägliche, freundliche und kompetente Unterstützung. Sie waren mir mit ihrem Wissen und ihrem unermüdlichen Einsatz eine große Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.



## DANKSAGUNG

---

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren stets begleitet haben und zu jeder Tages- und Nachtzeit immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir durch ihren vorbehaltlosen Rückhalt und ihre ständige Unterstützung das Studium und die Anfertigung dieser Dissertation erst möglich gemacht haben. Danke.