

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Neurotoxizität von Phenobarbital im Gehirn infantiler  
Ratten: Untersuchungen zur Expression von Neurotrophinen  
und abhängigen Proteinen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Ellen Knierim

aus Nürnberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Ikonomidou  
2. Prof. Dr. med. U. Brandl  
3. Prof. Dr. med. I. Bechmann

Datum der Promotion: 19.01.2007

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Die Periode des rapiden Hirnwachstums (Brain Growth Spurt Period)	1
1.2	Epilepsie	2
1.2.1	Epidemiologie und Charakterisierung epileptischer Anfälle	2
1.2.2	Ätiologie epileptischer Anfälle	3
1.3	Antiepileptika	4
1.3.1	Wirkmechanismen von Antiepileptika	4
1.3.2	Teratogene und neurotoxische Wirkungen von Antiepileptika	5
1.3.3	Phenobarbital	6
1.4	Der GABA-A-Rezeptor	6
1.5	Apoptose	8
1.5.1	Allgemeines	8
1.5.2	Morphologische Kennzeichen der Apoptose	9
1.5.3	Genetische Regulation	9
1.5.4	Bedeutung der physiologischen Apoptose bei der Entwicklung des Nervensystems	12
1.6	Neurotrophine	13
1.6.1	Funktionen	13
1.6.2	Spezifische und unspezifische Neurotrophin- Rezeptoren	14
1.6.3	Neurotrophinabhängige Signaltransduktionskaskaden	15
1.7	Apoptose und Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn	17
1.7.1	Neurotransmitter und Apoptose	17
1.7.1.1	Apoptose durch NMDA-Antagonisten	18
1.7.1.2	Apoptose durch GABA-A-Agonisten	18
1.7.2	Apoptose und das fetale Alkoholsyndrom	19
1.8	Zentrale Aufgabenstellung der Arbeit	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Chemikalien	21
2.1.3	Häufig verwendete Lösungen	23
2.1.4	Testkit	25
2.1.5	Enzyme	25

2.1.6	Oligonukleotide für die Amplifizierung spezifischer mRNAs	25
2.1.7.	Molekulargewichtsmarker	26
2.1.8	Antikörper	26
2.1.9	Tiere	26
2.1.10	Sonstige Hilfs- und Verbrauchsmittel	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Päparation von Hirngewebe	28
2.2.2	Isolierung und Reinigung von RNA aus Hirngewebe	28
2.2.3	RNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.2.4	DNase-Behandlung der RNA	29
2.2.5	RNA-Kontrollelektrophorese	30
2.2.6	Semiquantitative Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	31
2.2.7	Reverse Transkription spezifischer Gene	31
2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion zur cDNA Amplifikation	32
2.2.9	Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA- Fragmente	33
2.2.10	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	34
2.2.11	Densitometrische Auswertung von silbergefärbten Polyacrylamidgelen	34
2.2.12	Isolierung und Reinigung von Proteinen aus Hirngewebe	34
2.2.13	DNase- und RNase- Behandlung	35
2.2.14	Proteinbestimmung nach BCA-Methode	35
2.2.15	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.2.16	Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Membranen	37
2.2.17	Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)	37
2.2.18	Röntgenfilmentwicklung	38
2.2.19	Densitometrische Analyse	38
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
3.1.	Expression neurotropher Faktoren im Thalamus 7 Tage alter Ratten nach Phenobarbital	39
3.1.1	Phenobarbital vermindert die Expression von BDNF im Thalamus 7 Tage alter Ratten	39
3.1.2	Phenobarbital vermindert die Expression von NT-3 im Thalamus 7 Tage alter Ratten	40
3.1.3	Zeitabhängige Veränderungen der Gen-spezifischen mRNA-Expression nach Phenobarbital	40
3.2.	Expression neurotropher Faktoren im Hippocampus 7 Tage alter Ratten nach Phenobarbital	42

3.3	Expression von Proteinen im Thalamus 7 Tage alter Ratten nach Phenobarbital	42
3.3.1	Phenobarbital vermindert die Menge der phosphorylierten aktiven Isoformen ERK 1/2 (p-ERK 1/2) und c-RAF im Thalamus	43
3.3.2	Phenobarbital vermindert die Menge der phosphorylierten aktiven Isoform der Serin-Threonin-Kinase AKT (p-AKT, Protein Kinase B) im Thalamus	44
3.3.3	Zeitabhängige quantitative Darstellung der Proteinexpression im Thalamus nach Phenobarbital	45
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	
4.1	Phenobarbital verursacht eine apoptotische Neurodegeneration im unreifen Gehirn der Ratte durch Verlust trophischer Unterstützung	47
4.2	Phenobarbital verursacht ein Ungleichgewicht zwischen neuroprotektiven und neurodestruktiven Faktoren	48
4.3	Auch andere Antiepileptika verursachen den Verlust trophischer Unterstützung im unreifen Gehirn der Ratte und eine apoptotische Neurodegeneration	50
4.4	Die Kombination von Antiepileptika hat einen supraadditiven neurotoxischen Effekt	50
4.5	Abhängigkeit des Ausmaßes der Schädigung von der erreichten Plasmakonzentration	51
4.6	Altersabhängigkeit der Phenobarbital-induzierten apoptotischen Neurodegeneration bei der Ratte und die vergleichbare Phase der Vulnerabilität beim Menschen	51
4.7	Effekte, die Phenobarbital und andere GABA-A- Rezeptorantagonisten auf das adulte Säugerhirn ausüben	52
4.8	Hinweise für toxische Nebenwirkungen von Phenobarbital und weiterer Antiepileptika im unreifen menschlichen Gehirn	53
4.9	Andere Mechanismen, die für die neurologischen Defizite verantwortlich sein können	54
4.10	Neugeborenenkrämpfe - Aus Mangel an Alternativen ist Phenobarbital immer noch das Mittel der ersten Wahl	56
4.11	Topiramamat - eine Alternative?	57
4.12	Prävention neurotoxischer Nebenwirkungen	58
4.13	Östrogene- eine erfolgversprechende Möglichkeit der adjuvanten neuroprotektiven Therapie	58
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>60</b>

<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>74</b>
<b>8.</b>	<b>LEBENS LAUF UND PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>76</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>78</b>
	Danksagung	78
	Erklärung an Eides statt	79