

1 EINLEITUNG

1.1 Die Periode des rapiden Hirnwachstums (Brain Growth Spurt Period)

Das Gehirn von Säugetieren durchläuft während seiner Entwicklung unterschiedliche Phasen. Dobbing beschrieb bereits 1974 als erster eine Periode des rapiden Hirnwachstums, die er als „brain growth spurt period“ bezeichnete. Kennzeichnend für diesen Entwicklungsabschnitt ist eine erhöhte Hirnwachstumsgeschwindigkeit, Migration und Differenzierung von Nervenzellen sowie Synaptogenese. Beobachtet wird auch das Vorkommen eines physiologischen apoptotischen Untergangs von Neuronen und Gliazellen (physiologische Apoptose). Dobbing stellte die Hypothese auf, dass das Säugerhirn in dieser Phase der Entwicklung besonders empfindlich gegenüber äußeren Einwirkungen ist. Dabei stellte er eine besondere Vulnerabilität des Gehirns in der Phase des rapiden Hirnwachstums auf Mangelernährung fest (Dobbing, 1974). Aus Tierexperimenten ist mittlerweile bekannt, dass das Gehirn von Säugetieren in der Phase seines schnellsten Wachstums auch besonders vulnerabel auf verschiedene Insulte wie Hirntrauma, Ischämie, Hypoxie und Status epilepticus mit einer Neurodegeneration reagiert (Felderhoff-Mueser et al.; 2002; Pulera et al.; 1998; Vannucci und Hagberg, 2004).

Die Lebensphase, die mit diesem rapiden Hirnwachstum korreliert, findet bei verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeiten statt (Abb.1). Beim Menschen beginnt sie mit dem 3. Gestationstrimenon (25.-26. Schwangerschaftswoche) und endet zu Beginn des dritten Lebensjahres (Dobbing und Sands, 1979). Die entsprechende Entwicklungsphase bei der Ratte umfasst postnatal die ersten 21 Lebenstage, wobei die maximale Hirnwachstumsgeschwindigkeit zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag zu beobachten ist.

Die für die Versuche und Tiermodelle verwendeten Ratten befanden sich im Alter von sieben Tagen somit in einer ontogenetisch vergleichbaren Phase des rapiden Hirnwachstums des Menschen.

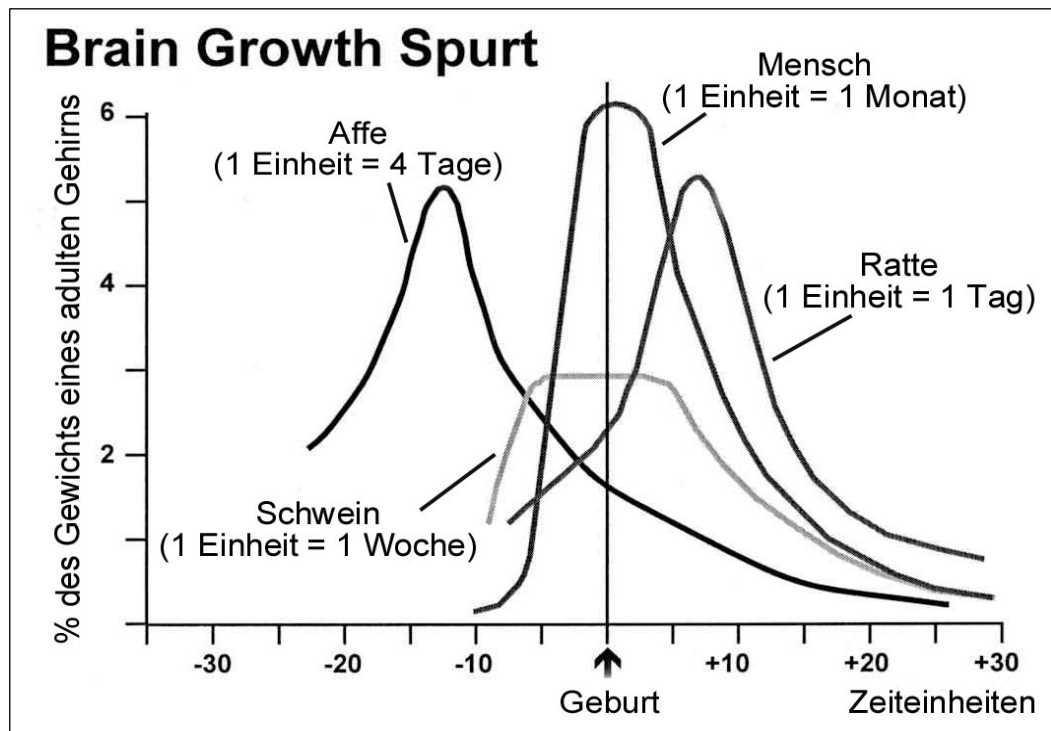


Abb.1: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“ beim Menschen, beim Affen, beim Schwein und bei der Ratte (modifiziert nach Dobbing und Sands, 1974).

1.2 Epilepsie

1.2.1 Epidemiologie und Charakterisierung epileptischer Anfälle

Epilepsie stellt eine heterogene Gruppe von Störungen dar, die als Charakteristikum wiederkehrende, meist nicht provozierbare Anfälle gemein haben. Es kommt zu exzessiven unkontrollierten synchronen neuronalen Entladungen, deren Entstehung noch nicht bis ins Detail geklärt ist. Das Überwiegen exzitatorischer Transmission und eine Verringerung der Wirkung inhibitorischer Neurotransmitter wie γ -Aminobuttersäure (GABA) tragen wesentlich dazu bei.

Weltweit gibt es schätzungsweise 50 Millionen Menschen, die an Epilepsien erkrankt sind. Gerade im Kindes- und Jugendalter stellen sie einen großen Teil der Fälle in der pädiatrischen Praxis dar. Die Inzidenz im Alter zwischen 0-15 Jahren liegt bei etwa 5-7 Fällen pro 10 000 Kindern pro Jahr (Cowan L.D.; 2002). Bei 2-4% aller Kinder in den USA und Europa

manifestiert sich vor dem 5. Lebensjahr mindestens ein epileptischer Anfall. Bis zu 70% der Kinder mit Epilepsien, die sich bereits im ersten Lebensjahr manifestieren, entwickeln einen Status epilepticus (Hauser, 1990), wobei sich 50% davon vor dem 3. Lebensjahr ereignen (Shinnar et al., 1995). Insgesamt erleiden 5-9% aller Menschen weltweit in ihrem Leben einen epileptischen Anfall, wobei die Inzidenz im ersten Lebensjahr mit 120 pro 100 000 Kindern am höchsten ist (Hauser, 1994). Das Wiederholungsrisiko nach einem ersten unprovokierten Anfall liegt bei 34% innerhalb von 5 Jahren (Hauser et al.; 1994).

1.2.2 Ätiologie epileptischer Anfälle

Zu den Ursachen epileptischer Anfälle zählen angeborene Fehlbildungen des zentralen Nervensystems (ZNS), Infektionen und Tumoren des ZNS, genauso wie Trauma, Blutungen oder Erkrankungen des Gesamtorganismus, die mit einer Funktionsstörung des Gehirns einhergehen (Hypoglykämie, Intoxikation), sowie Stoffwechselerkrankungen, Mitochondriopathien und genetische Faktoren. Diese Ursachen jedoch erklären nur ungefähr 25-45% der Fälle; meistens bleibt die Ätiologie im Unklaren (Cowan LD, 2002).

Aktuelle Ergebnisse der genetischen Grundlagenforschung weisen darauf hin, dass es sich bei einem Teil der Epilepsien um Ionenkanalerkrankungen handelt. Hierbei können verschiedene Subtypen von Kalium-, Natrium- und Calciumkanälen betroffen sein. Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe zum Beispiel sind durch Defekte der spannungsabhängigen Kaliumkanäle KCNQ2 bzw. -3 gekennzeichnet (Singh et al.; 1998, Charlier et al.; 1998).

Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen kann auf einer Mutation des spannungsabhängigen Natriumkanals (Untereinheit SCN1B oder SCN1A) beruhen (Wallace et al.; 1998, Escayg et al.; 2000). Genetische Analysen weisen auch auf eine Beteiligung des GABA-A-Rezeptors bei der Epilepsieentstehung hin. So konnte eine Mutation im Gen für den $\gamma 2$ -Abschnitt des GABA-A-Rezeptors (GABRG2) im Zusammenhang mit der Entstehung von Epilepsie mit Fieberkrämpfen verantwortlich gemacht werden (Baulac et al.; 2001, Wallace et al.; 2001).

1.3 Antiepileptika

1.3.1 Wirkmechanismen von Antiepileptika

In Abhängigkeit ihres Wirkmechanismus kann man Antiepileptika in folgende Gruppen einteilen:

| | Blockade spannungsabhängiger Na-Kanäle | Zunahme der GABA-Konzentration | Potenzierung der GABA-A-Rezeptor vermittelten Antwort | Erleichterung des Chloridionen-Einstroms | Blockade von Calciumkanälen | Andere Mechanismen |
|----------------|--|--------------------------------|---|--|-----------------------------|--------------------|
| Benzodiazepine | - | - | ++ | - | - | - |
| Carbamazepin | ++ | ? | - | - | + | + |
| Ethosuximid | - | - | - | - | ++ | - |
| Phenobarbital | - | + | + | ++ | ? | + |
| Phenytoin | ++ | - | - | - | ? | + |
| Valproat | + | + | ? | - | + | ++ |
| Felbammat | ++ | + | + | - | + | + |
| Lamotrigin | ++ | + | - | - | ++ | + |
| Tiagabin | - | ++ | - | - | - | - |
| Topiramat | ++ | + | + | - | + | + |
| Vigabatrin | - | ++ | - | - | - | - |
| Zonisamid | ++ | ? | - | - | ++ | + |

Tab.1: Zusammenstellung der wichtigsten Antiepileptika und deren Wirkmechanismen (mod. nach Perucca, 2005). ++ Hauptmechanismus; + Nebenmechanismus; - nicht beschrieben; ? widersprüchliche Aussagen.

Benzodiazepine führen durch eine Erhöhung der Öffnungsfrequenz von Chloridkanälen zu einer vermehrten Aktivierung des inhibitorischen GABA-A-Rezeptors (Lambert et al.; 1987), Barbiturate erreichen dies durch eine Verlängerung der Öffnungszeit des Chloridkanals (Akaike et al.; 1990). Vigabatrin modifiziert ebenfalls die GABAerge Transmission, indem es die GABA-Transaminase blockiert und somit die GABA-Konzentration im synaptischen Spalt erhöht (French et al., 1999). Phenytoin blockiert membranpotentialabhängig Na-Kanäle, was

eine verminderte neuronale Aktivität zur Folge hat. Dadurch kommt es auch zu einer verminderten Freisetzung von Glutamat. Phenytoin führt auch zu einer kaliumabhängigen Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration, wodurch überschießende neuronale Aktivität, wie sie bei Anfällen vorkommt, gehemmt wird. Carbamazepin werden die gleichen Natriumkanal blockierenden Eigenschaften zugeschrieben. Ethosuximid verringert spannungsabhängige T-Calcium-Ströme im Thalamus, die für die Generation von 3Hz spike-and-wave Rhythmen bei Absence-Epilepsien verantwortlich sind. Die Wirkweise von Valproat ist vielseitig. Auf der einen Seite kommt es zu einer Erhöhung der GABA-Konzentration durch Beeinflussung der Synthese und Hemmung der GABA-Transaminase, auf der anderen Seite blockiert es das exzitatorische glutamaterge Neurotransmittersystem und vermindert die Wirkung von Glutamat am NMDA- Rezeptor (Löscher 1999).

1.3.2 Teratogene und neurotoxische Wirkungen von Antiepileptika

Die Teratogenität antiepileptischer Medikamente ist seit langem bekannt. So können Kinder, deren Mütter in der Schwangerschaft mit Phenobarbital behandelt wurden, in Abhängigkeit von den Plasmaspiegeln eine Mikrozephalie und Entwicklungsretardierung aufweisen (Reinisch et al.; 1995; Dran and Meador, 1996). Studien belegen, dass es bei medikamentös behandelten Müttern mit epileptischen Anfällen signifikant häufiger zu Embryopathien wie Mittelgesichts- und Fingerhypoplasien, Wachstumsretardierung sowie Mikrozephalie kommt, als in der Kontrollgruppe und in der Gruppe von Müttern mit Epilepsie, die keine medikamentöse Behandlung bekommen (Holmes et al.; 2001). Phenobarbital wirkt sich neben den beschriebenen teratogenen Effekten auch ungünstig auf die Hirnentwicklung aus. So führt Phenobarbital bei der Behandlung rezidivierender Fieberkrämpfe zu Intelligenzdefiziten bei Kleinkindern (Farwell et al.; 1990); die negativen Auswirkungen einer postnatalen Phenobarbitalgabe auf die kognitiven Fähigkeiten sind nach Sulzbacher et al. (1999) bis ins Erwachsenenalter nachzuweisen. Weitere Studien an Kindern mit Epilepsie belegen, dass Beeinträchtigung der Lernfähigkeit und kognitiver Fähigkeiten, Verhaltensstörungen wie zum Beispiel Hyperaktivität und Gedächtnisdefizite auf Phenobarbital zurückzuführen sind (Calandre, 1990; Domizio, 1993). Summative embryotoxische Effekte stellt Dessens et al. (2000) nach gleichzeitiger Phenobarbital- und Phenytoingabe fest. Demnach kommt es bei einer medikamentösen Polytherapie zu signifikant geringeren occipitofrontalen Kopfdurchmessern wie bei der Phenobarbitalmonotherapie-Kontrollgruppe. Des weiteren korrelieren auch

Lernprobleme im Verlauf der Entwicklung mit der pränatalen Antiepileptikaexposition (Dessens et al.; 2000). In Zusammenhang mit Valproatgabe in der Schwangerschaft sind in der Literatur Neuralrohrdefekte und Lippen-Kiefer Gaumenspalten als teratogene Effekte beschrieben. Auch pränatale Phenytoingabe wirkt sich ungünstig auf die Hirnentwicklung aus. So beschreibt Scolnik et al. (1994) signifikant geringere IQ-Werte bei Exponierten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Obwohl die neurotoxischen Effekte von Antiepileptika schon lange bekannt sind, sind die zugrunde liegenden Mechanismen dafür bis jetzt noch nicht verstanden.

1.3.3 Phenobarbital

Der Einsatz von Phenobarbital in der Behandlung epileptischer Anfälle im Säuglings- und Kindesalter ist vielfältig. Durch seine geringe systemische Toxizität und die gut steuerbare Pharmakokinetik ist Phenobarbital vor allem bei Neugeborenenkrämpfen sowie Krampfanfällen im ersten Lebensjahr oft Mittel der ersten Wahl (Rennie et al.; 2003). Die Initialdosis bei der Behandlung eines Status epilepticus liegt bei 15-20 mg/kg/KG als Kurzinfusion über 10 min., die Erhaltungsdosis bei Säuglingen bei 3-8 mg/kg/Tag und bei Kindern bei 2-5 mg /kg/Tag (Bourgeois, 1995).

Phenobarbital ist ein langwirksames Barbiturat. Bei oraler Gabe werden Spitzenblutwerte nach 6-18 Stunden gemessen, die Wirkdauer liegt bei ungefähr 24 Stunden. Die Halbwertszeit beträgt bei Erwachsenen 86 und bei Kindern 50 Stunden. Langwirksame Barbiturate sind im Blut kaum an Proteine gebunden. Phenobarbital wird zu 75% in der Leber metabolisiert und 25 % werden direkt über die Niere ausgeschieden. Während der Schwangerschaft passieren Barbiturate frei die Plazentaschranke und es herrschen gleiche Konzentrationen in mütterlichem und fetalem Blut (Coupey, 1997).

1.4 Der GABA-A-Rezeptor

Pharmakologisch lassen sich drei Typen von GABA-Rezeptoren unterscheiden; sie werden mit GABA-A, GABA-B und GABA-C bezeichnet. Die Unterscheidung der verschiedenen Rezeptortypen kann pharmakologisch mit Hilfe einer selektiven Aktivierung durch receptorspezifische Agonisten oder eine Blockierung durch spezifische Antagonisten vorgenommen werden. GABA-A- und GABA-C-Rezeptoren führen über die direkte Öffnung

von Ionenkanälen zu einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit für Chloridionen, sind also ionotrop. Ein Anstieg der Chloridleitfähigkeit führt zu einer Hyperpolarisation der Membran, was die Reizschwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials anhebt. Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) wirkt somit inhibitorisch. Die beiden wichtigsten Transmitter, denen eine hemmende Funktion im ZNS zugeordnet wird, sind GABA und Glycin. Fast alle Zellen des ZNS der Vertebraten besitzen Rezeptoren für GABA (Kaila, 1994). Bei Säugetieren sind je nach Gehirnregion 20-50% der Synapsen GABAerg; GABA-Rezeptoren kommen ebenfalls auf Gliazellen vor (Fraser et al.; 1995).

Für GABA-B-Rezeptoren wurden ionotrope und metabotrope Mechanismen beschrieben (Bormann, 1988). Ihre Aktivierung kann zu einer Erhöhung der Kalium- oder zu einer Verminderung der Calciumleitfähigkeit führen. Durch eine GABA-B-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C hat GABA die Möglichkeit, Einfluß auf intrazelluläre Prozesse zu nehmen. Bicucullin hemmt selektiv die Funktion der GABA-A-Rezeptoren, was sie von GABA-B- und GABA-C-Rezeptoren abgrenzt (Bormann, 1988).

GABA-A-Rezeptoren sind von entscheidender Bedeutung bei der Regulation von Erregung im ZNS. Verschiedenste Medikamente und Stoffgruppen wie Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroid, Ethanol, Antiepileptika und Anästhetika interagieren mit diesem Rezeptor und vermitteln dadurch ihre pharmakologischen Effekte. Auch wird gerade der GABA-A-Rezeptor in Zusammenhang mit der Entstehung von Epilepsien gebracht. Daher wurden in letzter Zeit viele molekularbiologischen Arbeiten zur Strukturaufklärung von Membranrezeptoren durchgeführt um Ursachen der Epilepsieentstehung zu verstehen und neue Therapiekonzepte und Medikamente zu entwickeln, die sich gezielt die Mannigfaltigkeit der verschiedenen Untereinheiten zu nutze machen.

GABA-A-Rezeptoren gehören, wie auch Glycin- und nikotinische Acetylcholinrezeptoren, zu einer gemeinsamen Familie der ligandengesteuerten Chlorid-Ionenkanälen (Bormann J.; 1988). Der GABA-A-Rezeptor ist eine pentamere Struktur mit fünf membrandurchspannenden Untereinheiten (Schofield, 1987). Sie formen das Ionophor, durch das die Chloridionen einströmen. Jede der fünf Untereinheiten besteht aus vier Transmembranregionen, wobei je eine dieser Regionen am Aufbau der Ionenkanalpore beteiligt ist (MacDonald und Olsen, 1994). Bei der Klonierung des GABA-A-Rezeptors wurden mittlerweile 7 verschiedene Untereinheiten mit mindestens 18 Subtypen identifiziert: $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 3$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$, δ , ϵ , π , $\rho 1$ - $\rho 3$. Des Weiteren sind noch zusätzliche Subtypen aus Tierexperimenten bekannt (Mehta und Ticku, 1999). Daraus ergibt sich eine große strukturelle Vielfalt, die eine ebenso große

funktionelle Vielfalt nach sich zieht. Von den tausenden theoretischen Kombinationsmöglichkeiten sind im ZNS vermutlich nur wenige realisiert (Sieghart, 2002). Die meisten GABA-A-Rezeptoren im ZNS sind aus α -, β - und γ - Untereinheiten zusammengesetzt (Rudolph und Mohler, 2004).

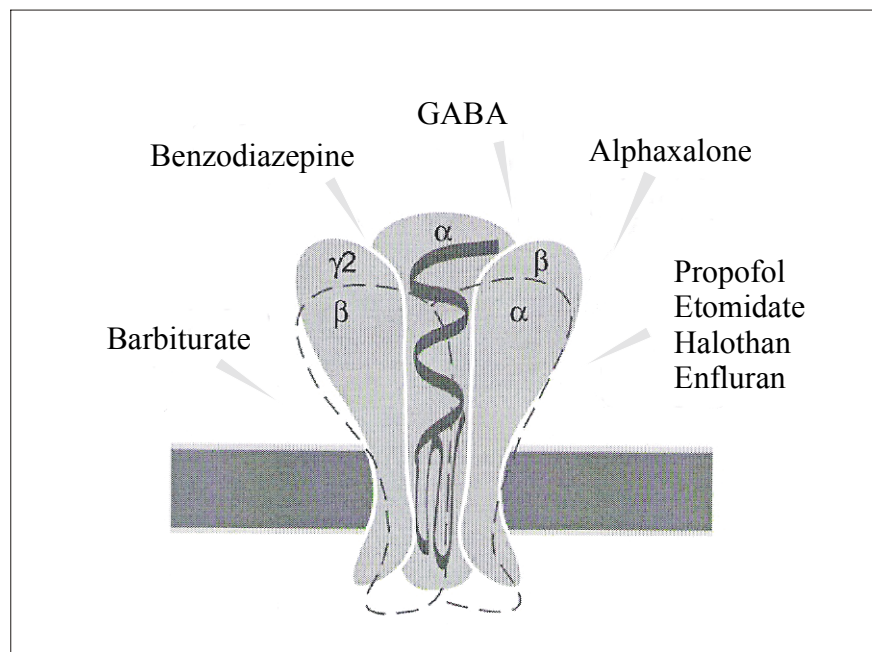


Abb. 2: Der GABA-A-Rezeptor. Schematische Abbildung des GABA-A-Rezeptors und seiner Bindungsstellen. Die meisten GABA-A-Rezeptoren sind aus alpha-, beta- und zwei gamma Untereinheiten zusammengesetzt (Aus Rudolph und Möhler: Analyses of the GABA-A-receptor function; 2004).

1.5 Apoptose

1.5.1 Allgemeines

Zellen können durch Apoptose sterben. Bei der Apoptose setzt ein intrazelluläres Programm den gezielten „Zell-Selbstmord“ in Gang, der in der Regel einzelne Zellen betrifft. Sie ist ein aktiver biochemischer Prozeß und läuft nach einem genetisch festgelegten Programm ab. Physiologische Apoptose spielt eine fundamentale Rolle in der Entwicklung eines Organismus

(Burek und Oppenheim, 1996), vor allem des Nerven- und Immunsystems. Das Wort Apoptose stammt aus dem Griechischen und bezeichnet das Fallen der Blätter im Herbst und gibt damit einen bildlichen Vergleich für das selbstlose Absterben einzelner Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus. Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen Vorgang im Laufe der Entwicklung. Im sich entwickelnden Gehirn kann Apoptose aber auch der vorwiegende Modus des Zelltodes nach einem schädigenden Insult sein, der in einer verzögerten Form Tage und Wochen später auftreten kann (Hamrick, 2003). Eine Störung des fein ausbalancierten Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und –elimination verursacht zwangsläufig pathologische Zustände. So ist im adulten Gehirn vorzeitige oder verstärkte Apoptoseaktivität ursächlich für eine Anzahl von akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen (Friedlander, 2003).

1.5.2 Morphologische Kennzeichen der Apoptose

Die Apoptose ist durch eine Vielzahl morphologischer Veränderungen definiert (Kerr et al.; 1972). Es kommt zur Schrumpfung der Zelle, Kondensation des Chromatins und DNA-Fragmentation durch Endonukleasen in charakteristische Stücke in der Länge von ca. 200 Basenpaaren. Die Membranstabilität geht verloren und es werden apoptotische Körperchen abgeschnürt („blebbing“) (Duvall und Wyllie, 1985). Eine inflammatorische Reaktion mit einhergehenden Gewebsschädigungen ist nicht zu beobachten, da apoptotische Zellen im Körper aufgrund von Membranänderungen schnell erkannt und phagozytiert werden, womit die Apoptose deutlich von der Nekrose zu unterscheiden ist (Ishimaru et al.; 1999).

1.5.3 Genetische Regulation

Verschiedene extra- und intrazelluläre Signale können den programmierten Zelltod in Gang setzen. Je nach Apoptosestimulus kann man zwischen dem Rezeptor-vermittelten extrinsischen und dem mitochondrialen intrinsischen Weg unterscheiden (Abb.3). Beide Wege resultieren in einer Aktivierung von Proteasen, sogenannten Caspasen, welche wichtige Schlüsselenzyme auf dem Weg der Exekution der Zelle darstellen (Thornberry et al.; 1998).

Die Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose geschieht über die Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren („Death Receptors“) der Plasmamembran wie zum Beispiel Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) an den TNF-Rezeptor (Carswell et al.; 1975) oder

des Fas-Liganden an den Fas-(CD95/Apo-1)Rezeptor (Krammer 1999). Nach Wechselwirkungen an sogenannten Todesdomänen („Death domains“) kommt es zu einer Aktivierung der Caspasen, die von nun an eine wesentliche Rolle spielen und als intrazelluläre Schaltstellen fungieren. Dabei ist bei der Fas-induzierten Apoptose Caspase 8 ein Schlüsselenzym, das wiederum sogenannte Effektorcaspasen, die für die Exekution der Zelle verantwortlich sind, aktiviert (Peter 2003).

Der intrinsische Weg der Apoptose wird durch DNA-Strangbrüche bei Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren (Mesner et al., 1995) oder bei Zellschädigung durch freie Radikale im Rahmen von oxidativem Streß (Maroto et al., 1997) in Gang gesetzt. Aus dem Mitochondrium freigesetztes Cytochrom C bildet zusammen mit der Caspase-9 und dem Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) das Apoptosom (Yuan und Yankner, 2000). Dieses aktiviert wiederum die Caspase-3 und setzt die apoptotische Kaskade in Gang, bei der es in der Folge zur Aktivierung mehrerer Proteinkinasen und zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren kommt. Proteine der Bcl-2 Familie spielen eine wichtige Rolle; sie regulieren die Freisetzung von pro- und antiapoptotischen Faktoren, so dass sie regulierend in die Kaskade eingreifen können (Hengartner, 2000). Letztendlich vollstrecken die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 die apoptotische Zellzerstörung, womit die gemeinsame Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem Weg beschritten wird.

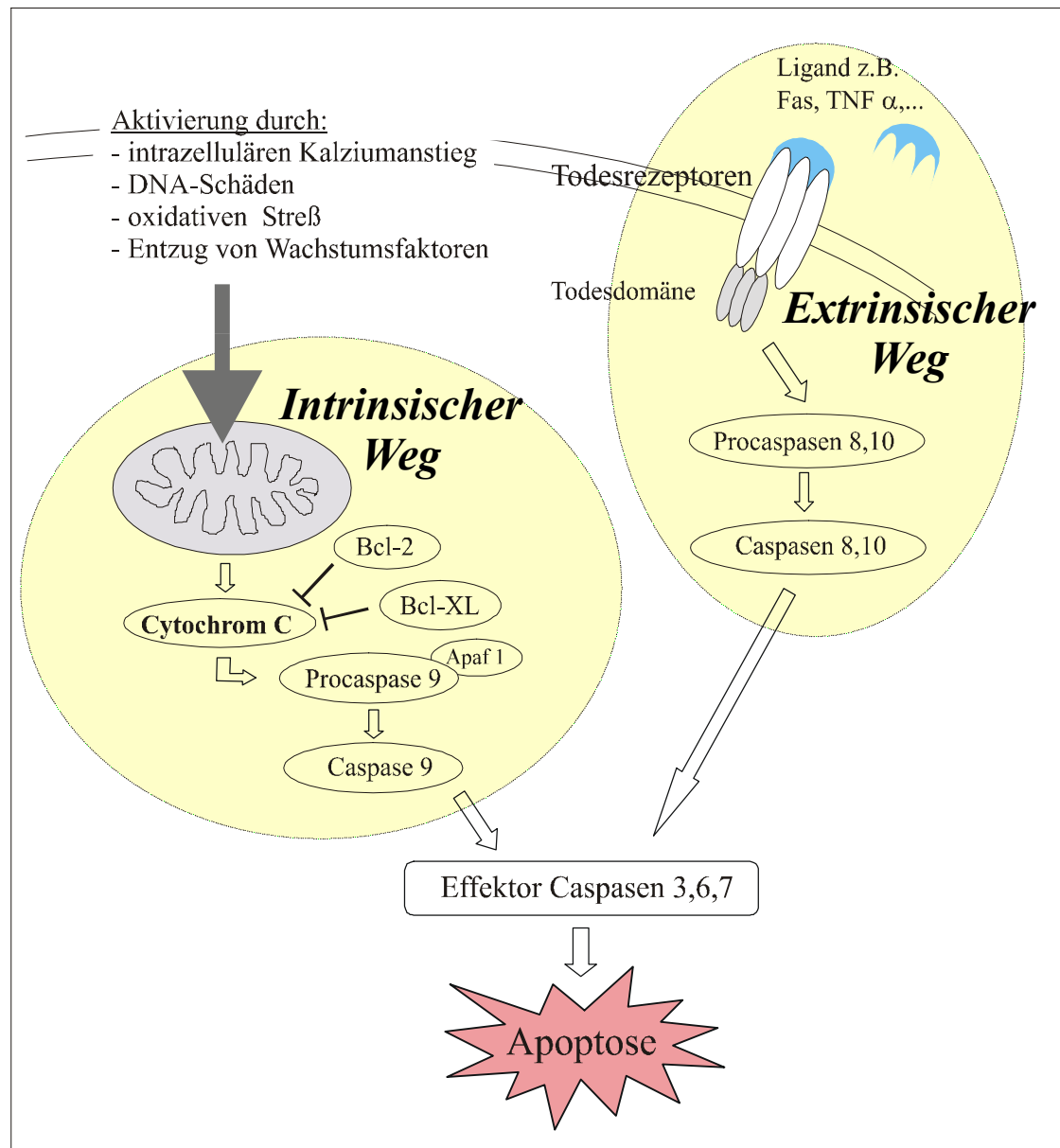


Abb. 3: Die Mechanismen der Apoptose können über den extrinsischen oder über den intrinsischen Weg vermittelt ablaufen. Der Rezeptor vermittelte extrinsische Weg wird über sogenannte Todesrezeptoren (z.B. FAS/CD95) initiiert, die zur TNF- (tumornecrosis factor) Rezeptorfamilie gehören. Die Vorstufen der Initiatorcaspasen 8 und 10 werden an den Rezeptor-Liganden-Komplex gebunden und dort aktiviert. Der spezifischen Liganden-vermittelten Aktivierung des extrinsischen Weges steht die unspezifische Aktivierung des intrinsischen Weges durch eine Vielzahl von Stimuli gegenüber. Am Beginn der intrinsischen Apoptosekaskade steht die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Die Balance zwischen pro- und antiapoptotisch (z.b. bcl-2) wirksamen bcl-Proteinen beeinflusst hierbei die Permeabilität der Mitochondrienmembran für Cytochrom c. Gemeinsame Endstrecke beider Apoptosekaskaden stellt die Aktivierung der Effektorcaspasen bzw. die konsekutive Spaltung von Targetproteinen dar (Abb. modifiziert nach Padosch, Vogel und Böttinger, 2001).

1.5.4 Bedeutung der physiologischen Apoptose bei der Entwicklung des Nervensystems

Während der Entwicklung des Nervensystems sterben zwischen 40 und 80 Prozent aller gebildeten Neurone. Da Neurone im Überschuß produziert werden, ist der programmierte Zelltod ein fundamentales und essentielles Merkmal der Entwicklung des Nervensystems. Durch den kontrollierten apoptotischen Zelltod kommt es zur Anpassung der Zahl von Neuronen und Oligodendrozyten an die Anzahl der zu innervierenden Neurone und Zellen des Zielgewebes und zu einer Entfernung fehlerhaft gebildeter neuronaler Verbindungen. Daher ermöglicht der programmierte Zelltod eine sinnvolle neuronale Netzwerkbildung. Überflüssige Zellen werden entfernt, sowie Zellen früherer Entwicklungsstufen und ektope Zellen. Des weiteren dient der programmierte Zelltod der Morphogenese und Plastizität (Burek und Oppenheim, 1996).

Während der Entwicklung des Nervensystems kann der programmierte Zelltod von Neuronen durch eine Reihe von Faktoren verhindert werden. Neurone benötigen beispielsweise im Rahmen der Synaptogenese zum Überleben trophische Faktoren, die nach Bindung an einen Tyrosinkinaserzeptor eine endogene Kaskade der Selbstzerstörung verhindern (siehe 1.6.3).

Diese trophischen Faktoren werden lokal vom Zielgewebe produziert. Präsynaptische Neurone konkurrieren untereinander um die trophische Unterstützung der Zielzellen. Schaffen sie es nicht, die Zielzellen zur ausreichenden Produktion von Wachstumsfaktoren anzuregen, sterben sie den programmierten Zelltod (Raff, 1992).

Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch das Zielgewebe ist ein wichtiger, aber nicht der einzige Mechanismus, durch den das Überleben der Neurone gesteuert werden kann. Afferente Signale innervierender Neuronen sind ebenfalls für das Überleben vieler Neurone wichtig. Die Entfernung der afferenten Neurone oder die Blockierung der afferenten Aktivität führt zu einem erhöhten Ausmaß des programmierten neuronalen Zelltodes. Die Depolarisation durch diese innervierenden Neurone ist zum Überleben der Neurone wichtig. In Übereinstimmung mit diesem überlebensfördernden, depolarisierenden Effekt *in vivo*, sind einige Neurone, wie die Körnerzellen des Kleinhirns, in Zellkultur auf hohe depolarisierende Kaliumkonzentrationen im Medium angewiesen (Chang und Wang, 1997). Die Depolarisation könnte zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Neurone gegenüber trophischen Faktoren oder zu einer erhöhten endogenen Synthese dieser Neurone führen.

1.6 Neurotrophine

1.6.1 Funktionen

Neurotrophine gehören zu einer Gruppe strukturell und funktionell verwandter Proteine, die den Zytokinen zugeordnet werden. Bisher bekannt sind der „nerve growth factor“ (NGF), sowie der „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF), das Neurotrophin 3 (NT-3) und das Neurotrophin 4/5 (NT 4/5) (Levi-Montalcini, 1987; Leibrock et al., 1989; Hohn et al., 1990; Berkemeier et al., 1991).

Neurone sind zum Überleben auf trophische Unterstützung angewiesen. Neurotrophe Faktoren und auch einige Zytokine fördern das Überleben von Nervenzellen und bewirken Wachstum und Differenzierung von Neuronen im unreifen Gehirn (Venters et al., 2000). Neurotrophine spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Modulation synaptischer Plastizität (Bonhoeffer 1996). Erstmals stellten Hamburger et al. 1949 apoptotische Neurodegeneration von Ganglienzellen nach Entzug von NGF fest. Darauf aufbauend wurde die Neurotrophin-Hypothese formuliert, die besagt, dass unreife Neurone im ZNS während der Synaptogenese um trophische Unterstützung von ihren Zielzellen und ihren Afferenzen konkurrieren (Rosa et al.; 2000). Freigesetzt durch neuronale Aktivität modulieren sie ihrerseits Freisetzung und postsynaptische Wirkung von Neurotransmittern.

Der Entzug neurotropher Wachstumsfaktoren kann zum apoptotischen Untergang abhängiger Zellpopulationen führen (Huang und Reichardt, 2001). Durch den fehlenden Einfluss der Neurotrophine kommt es zu einem langsamen Ansteigen der JNK (c-Jun-Amino-Kinase) und der p38MAP (mitogen-aktivierte-Protein)-Kinase Aktivität. Dies führt zu einer Phosphorylierung von c-Jun, welches die Induktion von Apoptose über Bax und Cytochrom C-Freisetzung bewirkt (Hengartner, 2000).

Neben der ursprünglichen Identifizierung als neuronale Überlebenssignale, werden ihnen inzwischen multiple biologische Funktionen wie Proliferation, synaptische Modulation und axonaler Transport zugeschrieben. Auch konnte gezeigt werden, dass Neurotrophinorstufen je nach Aktivierungsgrad pro- und antiapoptotische Prozesse triggern können (Chao, 2002).

1.6.2 Spezifische und unspezifische Neurotrophin-Rezeptoren

Bislang konnten ein allgemeiner nicht spezifischer niedrigaffiner Rezeptor, und drei untereinander verwandte spezifische hochaffine Rezeptoren nachgewiesen werden. Bei ersterem handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kD, das als p75NTR (NTR = Neurotrophin Rezeptor) bezeichnet wird und strukturell verwandt ist mit der Fas/TNF Rezeptorfamilie.

Als spezifische hochaffine Neurotrophin-Rezeptoren wurden bisher TrkA, TrkB, und TrkC (Trk = tropomyocin related kinase) als Mitglieder der Tyrosin-Kinase-Rezeptorfamilie identifiziert (Klein et al., 1989; Lamballe et al., 1991; Martin-Zanca et al., 1989).

TrkA ist der bevorzugte Rezeptor für NGF, bindet jedoch auch mit einer geringen Affinität NT-3 oder NT-4/5. TrkB bindet BDNF und NT-4 und mit einer geringeren Affinität NT-3 (Klein et al.; 1991). TrkC bindet als einzigen Liganden NT-3 (Lamballe et al.; 1991), während der „low affinity Rezeptor p75 NTR alle genannten Neurotrophine bindet (Meakin et al.; 1992). Die Liganden-Rezeptor-Bindungen sind in Abb.4 schematisch wiedergegeben.

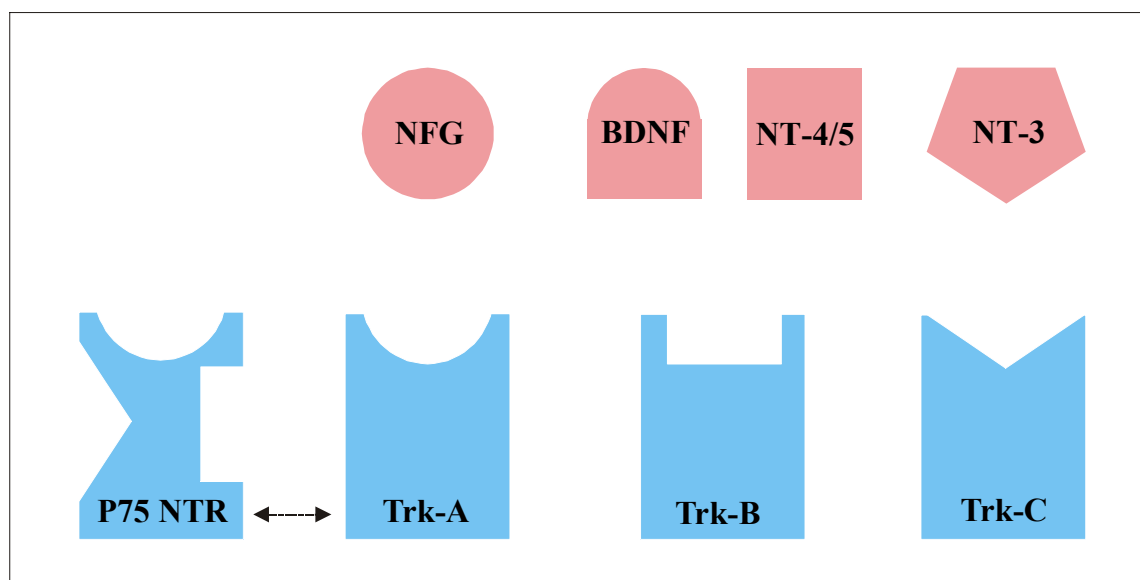


Abb. 4: Die Mitglieder der Neurotrophinfamilie und ihre Rezeptoren. Trk-A ist der hochaffine Rezeptor für NGF, Trk-B für BDNF und Trk-C für NT-3; p75 ist ein niedrig affiner Rezeptor für alle Neurotrophine, der mit den hochaffinen Rezeptoren in Wechselwirkung steht.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurde beim Menschen die Verteilung von Trk-Rezeptoren im sich entwickelnden und im adulten Nervensystem untersucht. Bereits in sehr frühen Stadien der Entwicklung ist eine intensive Trk-Immunoreaktivität der Nervenzellen im Hippocampus, im Kleinhirn, im Rückenmark und in den Spinalganglien feststellbar (Masana et al.; 1993).

Während die Trk-Rezeptoren Wachstum und Vitalität der Neuronen vermitteln, kann die durch p75NTR vermittelte Signaltransduktion entweder ebenfalls Neuritenwachstum und Überleben der Neurone bewirken oder aber auch unter bestimmten Umständen zum programmierten Zelltod führen. Der p75-Rezeptor wird besonders während der frühen neuronalen Entwicklung exprimiert. Seine Funktion wird hauptsächlich nach Aktivierung über NGF vermittelt (Troy et al.; 2002). Ebenso kann auch NT-4 eine Neurodegeneration fördern (Lobner und Ali, 2002).

1.6.3 Neurotrophinabhängige Signaltransduktionskaskaden

Neurotrophine entfalten ihre Wirkung, nämlich die aktive Inhibition neuronaler Apoptose, nach Bindung an plasmamembranständige Tyrosinkinase-Rezeptoren. Dabei werden Signalkaskaden aktiviert, die Gentranskription und zelluläre Proteinsynthese beeinflussen.

Nach der Neurotrophin-Bindung an den Rezeptor erfolgt eine Rezeptordimerisierung einhergehend mit einer Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste. Zwei unterschiedliche Wege sind bis jetzt beschrieben. Ein Weg, der nun besprochen wird, führt über die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase zur Phosphorylierung von Akt (Protein Kinase B). Aktiviertes Akt spielt eine entscheidende Rolle: zum einen inhibiert es den zur Bcl-2 Familie gehörenden proapoptotischen Faktor Bad, es hemmt direkt die Caspase-9-Aktivität und zusätzlich phosphoryliert und inaktiviert es proapoptotische Forkhead Proteine. Des Weiteren aktiviert Akt antiapoptotisch wirksame Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und CREB (cAMP-response-element-binding protein) (Yuan und Yankner, 2000). Ein weiterer Weg ist der mitogen-aktivierte-Protein- (MAP) Kinase Pfad, eine über Ras, ein kleines G-Protein, induzierte Signalkaskade. Durch die Annäherung von Shc, einem Adaptor-Protein, an aktivierte Trk-Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung von Ras, welches die nun folgende Kaskade von Raf (MAP Kinase-Kinase-Kinase), MEK1/2 (MAP-Kinase-Kinase) und ERK (MAP-Kinase)-Phosphorylierungen in Gang setzt (Cobb, 1999). Phosphorylierte ERK (durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase) bewirken einerseits die Aktivierung von Proteinen der RSK-Familie (pp90 ribosomal S6 Kinase) im Cytosol, die wiederum den Faktor Bad in seiner proapoptotischen Aktivität hemmen. Andererseits phosphoryliert es eine Vielzahl von

Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die die Genexpression antiapoptotischer Proteine bewirken, wie zum Beispiel CREB. Phosphoryliertes CREB fördert das Überleben von Neuronen im Hippocampus (Young et al.; 1999). Es vermag die Transkription von bcl-2 direkt zu aktivieren. Mitglieder der bcl-2 Familie verhindern Cytochrom-C-Freisetzung aus dem Mitochondrium und die darauf folgende Aktivierung von Caspase 9 (Bonni et al.; 1999).

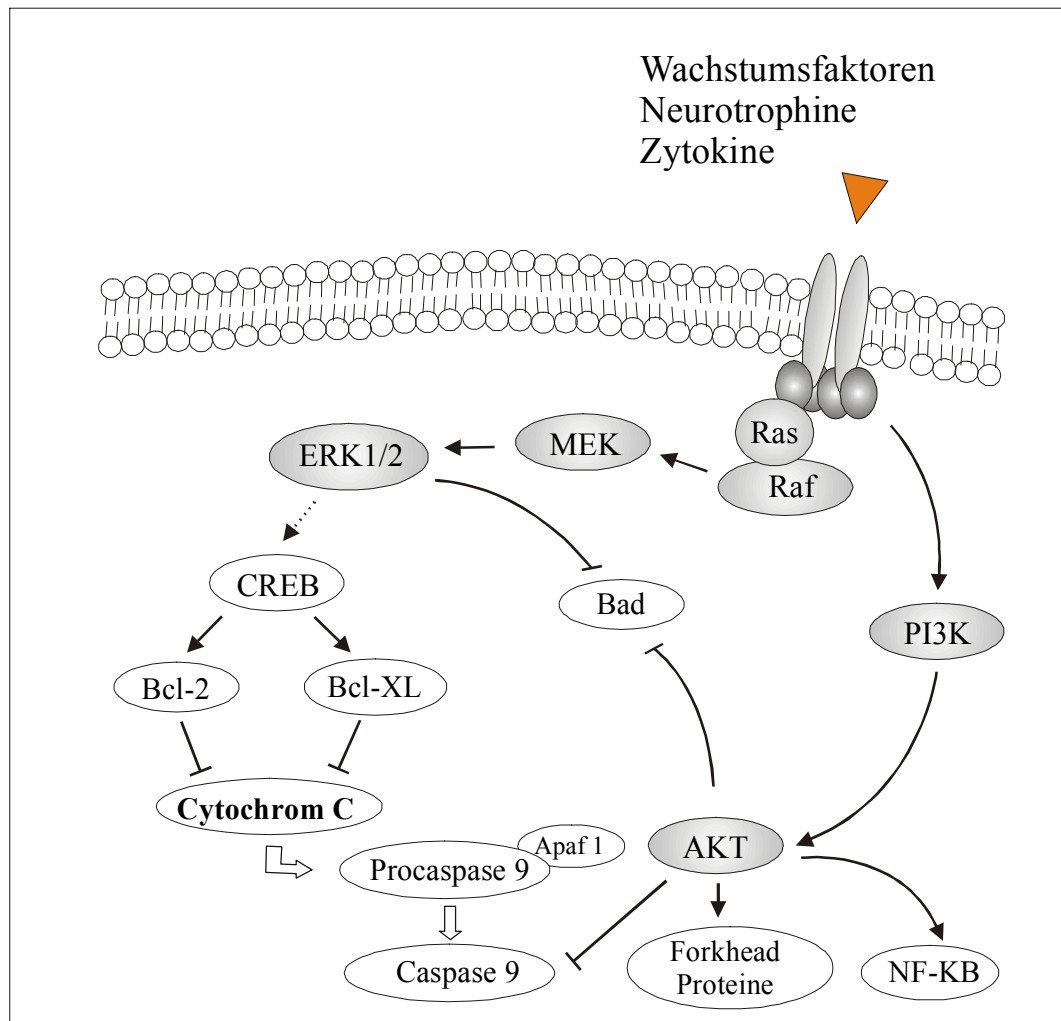


Abb.5: Aktive Inhibition der Apoptose durch Bindung von Neurotrophinen etc. an den Rezeptor. Der PI3K-Pfad führt zu einer Aktivierung von Akt, einem zentralem Dreh- und Angelpunkt bei der Regulation der Apoptose. Aktiviertes Akt inhibiert direkt Caspase 9, den proapoptotischen Faktor Bad sowie Forkheadproteine. Zusätzlich kommt es zu einer Phosphorylierung von CREB und IKK, welche die Transkription von überlebenswichtigen Faktoren stimulieren (z.B. NF-κB). In einem parallel ablaufenden Weg kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung von CREB, welches die Expression der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-XL induziert (Abb. modifiziert nach Yuan und Yankner, 2000).

1.7 Apoptose und Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn

Apoptose bzw. programmierter Zelltod findet während der normalen Entwicklung des zentralen Nervensystems statt. Sie ist charakterisiert durch eine Reihe von kennzeichnenden morphologischen Veränderungen des untergehenden Neurons (Ishimaru et al.; 1999). Es ist wichtig, ein besseres Verständnis für die Mechanismen zu entwickeln, welche die physiologische Apoptose im sich entwickelnden Gehirn regulieren, da eine Störung dieser physiologischen Prozesse möglicherweise ursächlich für Krankheiten ist, die die Entwicklung des Gehirns betreffen. Zahlreiche Erkrankungen des Kindesalters, wie die perinatale Asphyxie, ischämische Insulte, Hirn- und Rückenmarkstraumen, der Status epilepticus aber auch systemische inflammatorische Vorgänge in der Neonatalzeit, gehen mit irreversiblen Nervenzelluntergängen einher. Bekannt ist bei all diesen Erkrankungen, dass ein primär schädigendes Ereignis einen sekundären autodestruktiven Prozeß auslöst, der über mehrere Stunden und Tage abläuft, auch wenn die auslösende Ursache bereits beseitigt wurde. Zwei wichtige Pathomechanismen neuronaler Schädigung sind die Exzitotoxizität und die Apoptose. Dabei stellt die Apoptose im unreifen Gehirn die wichtigere Form der Neurodegeneration dar. Diese Effekte beschränken sich auf einen Entwicklungsperiode, die durch rapides Hirnwachstum und aktive Synaptogenese charakterisiert ist.

1.7.1 Neurotransmitter und Apoptose

Eine vorübergehende Interferenz in der Aktion verschiedener Neurotransmitter kann im sich entwickelnden Gehirn eine apoptotische Neurodegeneration auslösen. Änderungen des neuronalen Aktivitätszustandes führen zu einer Störung der physiologischen Informationsvermittlung durch Neurotransmitter und triggern somit während einer kritischen Phase der Entwicklung, in der Milliarden von synaptischen Verbindungen geknüpft werden, massive apoptotische Neurodegeneration, die ansonsten im unreifen Gehirn nicht stattgefunden hätte. Einige Neurotransmittersysteme sind in dieser Hinsicht in der Perinatal- und Neonatalzeit von besonderer Bedeutung; dazu gehören das N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-glutamaterge System und das GABA-erge inhibitorische System.

1.7.1.1 Apoptose durch NMDA-Antagonisten

Glutamat, das seine Wirkung am NMDA-Rezeptor entfaltet, hat trophische Funktionen im unreifen Gehirn. Glutamat fördert die Proliferation und Migration neuronaler Vorstufen und hat Einfluß auf die synaptische Plastizität. Während der „growth spurt period“ machen NMDA-Rezeptoren eine Phase der Hypersensitivität durch, in welcher NMDA-Rezeptoren überaus sensibel für neurotoxische Degeneration sind. Während genau dieser Entwicklungsperiode bewirkt die pharmakologische Blockade des NMDA-Rezeptors eine ausgedehnte apoptotische Neurodegeneration im Gehirn (Ikonomidou et al.; 1999). Die Gabe von NMDA-Antagonisten, die sich protektiv auf exzitotoxische Zellschädigungen auswirkt, bewirkte eine massive apoptotische Neurodegeneration (Pohl et al.; 1999). Verschiedene NMDA-Antagonisten, Dizocilpin (MK 801), Phencyclidin (PCP) und Ketamin können diesen Effekt auslösen. Nach systemischer Gabe dieser Substanzen kommt es in weiten Teilen des Kortex, des Striatums, des Thalamus, in Hypothalamus-Kerngebieten und im Hippocampus zum programmierten neuronalen Zelltod.

1.7.1.2 Apoptose durch GABA-A-Agonisten

Ausgehend von der Tatsache dass die Blockade von NMDA-Rezeptoren während der Synaptogenese zu einer ausgedehnten Neurodegeneration führt, stellte sich die Frage, ob auch die Interferenz mit anderen Transmittersystemen neuronalen Zelltod zu triggern vermag. Dabei zeigte sich, dass eine Hemmung synaptischer Transmission mittels Verstärkung der inhibitorischen Neurotransmission am GABA-A-Rezeptor ebenfalls eine dosisabhängige apoptotische Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn der Ratte bewirkt (Ikonomidou et al.; 2000a). Die Gehirne wurden histopathologisch mit Hilfe einer Kupfer-Silber-Färbung, der TUNEL Färbung und elektronenmikroskopisch untersucht. Besonders stark betroffene Hirnareale waren der frontale, parietale, cinguläre, retrospleniale und entorhinale Kortex, der Nucleus caudatus, laterodorsale, mediodorsale und ventrale Thalamuskern, der ventromediale Hypothalamus, das Septum, die CA1-Region des Hippocampus, der Gyrus dentatus und das Subiculum. Pharmaka, die die inhibitorische Wirkung des Neurotransmitters GABA verstärken, finden in der Klinik breite Anwendung als Antiepileptika, Sedativa und Anxiolytika.

1.7.2 Apoptose und das fetale Alkoholsyndrom

Ethanol beeinflusst mehrere Neurotransmittersysteme im Gehirn. Es blockiert unter anderem den exzitatorischen NMDA-Rezeptor (Lovinger et al.; 1989) und aktiviert gleichzeitig den inhibitorischen GABA-A-Rezeptor (Harris et al.; 1995). Dieses Zusammenspiel ist mitunter dafür verantwortlich, dass Ethanol das Gehirn während der Phase der Synaptogenese irreversibel schädigen kann. In infantilen Ratten konnte gezeigt werden, dass die systemische Applikation von Ethanol zu apoptotischen Nervenzelluntergängen führt (Ikonomidou et al.; 2000a). Dabei besteht eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe und Dauer der erreichten Blut-Alkohol-Konzentration und dem Ausmaß des Schadens. Das Schädigungsmuster nach Ethanol stellte eine Überlagerung der Degenerationsmuster nach Gabe von NMDA-Antagonisten und GABA-A-Agonisten dar.

1.8 Zentrale Aufgabenstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle neurotropher Faktoren und ihrer Effektorsignalproteine bei der Pathogenese apoptotischer Neurodegeneration im infantilen Rattengehirn verursacht durch GABA-A-Rezeptor-Aktivierung.

Untersucht werden Veränderungen auf mRNA- und Proteinebene nach Gabe von Phenobarbital im infantilen Rattenhirn.

Die Hypothese, dass eine verminderte Expression neurotropher Faktoren und der daraus folgende Verlust trophischer Unterstützung den zu Grunde liegenden Mechanismus des proapoptischen Effektes von Phenobarbital darstellt, wird überprüft.

Zum Nachweis der Expression von Neurotrophinen in Hirngewebe werden molekularbiologische Untersuchungen mittels RT-PCR durchgeführt, die abhängigen Neurotrophin-vermittelten Signaltransduktionskaskaden werden in Hirnregionen, die von apoptotischer Neurodegeneration betroffen sind, mittels Western Blotting analysiert.

Als Parameter für die Auswirkung von Phenobarbital auf Neurotrophin-aktivierte intrazelluläre Signale wird die Relation der phosphorylierten (aktiven) und nicht-phosphorylierten (inaktiven) Formen der abhängigen Proteine untersucht.