

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression neurotropher Faktoren im Thalamus 7 Tage alter Ratten nach Phenobarbital

Neurotrophine liefern trophische Unterstützung für die in der Entwicklung befindlichen Neurone und ihr Entzug kann zu neuronalem Zelltod führen. Um potentielle Mechanismen zu erforschen, die eine apoptotische Neurodegeneration durch GABA-A-Rezeptoragonisten im sich entwickelnden Gehirn bewirken, untersuchten wir, ob und wie Phenobarbitalexposition die Expression der neurotrophen Faktoren BDNF und NT-3 im Thalamus am 7. Lebenstag der Ratte beeinflusst. Dafür wurde den Ratten am 7. Lebenstag Phenobarbital in einer Dosis von 50 mg/kg intraperitoneal injiziert und die Gehirne nach 6, 12 und 24 Stunden analysiert.

3.1.1 Phenobarbital vermindert die Expression von BDNF im Thalamus 7 Tage alter Ratten

Phenobarbital bewirkt eine deutliche Reduktion der mRNA-Konzentrationen von BDNF im Thalamus nach 6, 12 und 24 Stunden im Vergleich zu den Kontrolltieren in der RT-PCR.

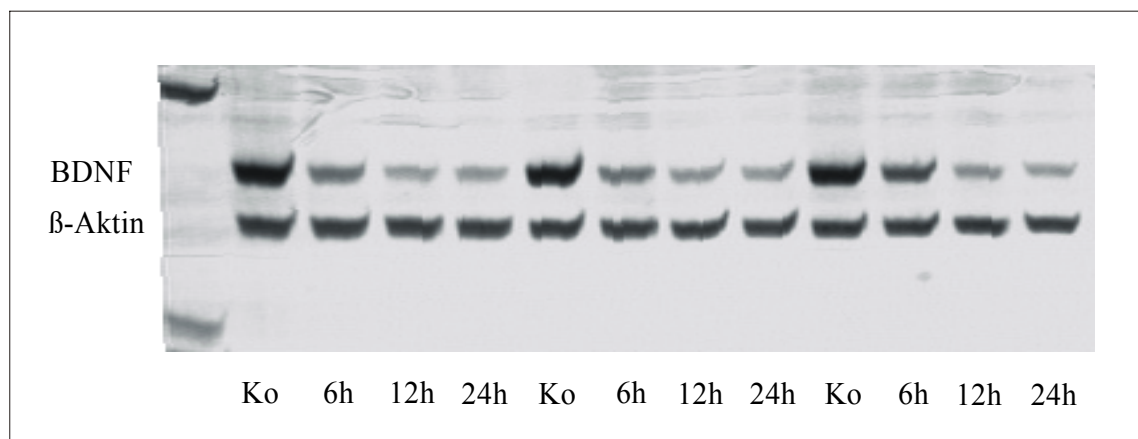


Abb.1: Phenobarbital verringert die mRNA-Konzentrationen für BDNF im neugeborenen Gehirn. 7 Tage alte Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Phenobarbital. Das Thalamushirngewebe wurde zu den verschiedenen angegebenen Zeitpunkten seziiert. Für die RT-PCR-Analyse wurde die gesamte zelluläre RNA isoliert, revers transkribiert und mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidprimer amplifiziert. Die cDNA wurde einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Die verminderte Dichte BDNF-spezifischer Banden ist sichtbar 6, 12 und 24 Stunden nach Verabreichung des Antiepileptikums. Repräsentative Darstellung von Einzeltieren, der Versuch

wurde mit insgesamt 6 Tieren wiederholt.

3.1.2 Phenobarbital vermindert die Expression von NT-3 im Thalamus 7 Tage alter Ratten

Phenobarbital bewirkt ebenfalls eine deutliche Reduktion der mRNA-Konzentrationen von NT-3 im Thalamus 7 Tage alter Ratten. Mittels RT-PCR ist eine deutliche Verminderung der Expression nach 6, 12, und 24 Stunden nach Phenobarbitalexposition zu beobachten.

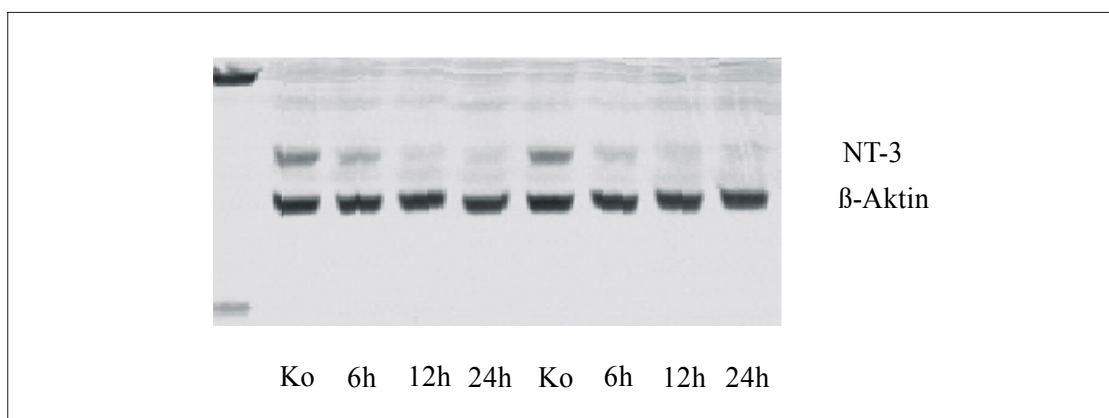


Abb. 2: Deutlich verringerte mRNA-Konzentrationen von NT-3-spezifischen Banden in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese 6, 12 und 24 Stunden nach intraperitonealer Gabe von 50 mg/kg Phenobarbital. Die RT-PCR Analyse wurde wie unter Abb.1 beschrieben durchgeführt. Als Kontrollen (Ko) dienten ebenfalls 7 Tage alte Ratten, die Kochsalzlösung intraperitoneal als Vehikel injiziert bekamen. Repräsentative Darstellung von Einzeltieren, der Versuch wurde mit insgesamt 6 Tieren wiederholt.

3.1.3 Zeitabhängige Veränderungen der Gen-spezifischen mRNA-Expression nach Phenobarbital

Bereits sechs Stunden nach Injektion von 50 mg/kg Phenobarbital war eine signifikante Verminderung der Expression der neurotrophen Faktoren BDNF und NT-3 im Thalamus sieben Tage alter Ratten nachweisbar. Die verminderte Expression nahm nach 12 Stunden weiter zu und erreichte ihr Maximum nach 24 Stunden. Zu späteren Zeitpunkten war kein weiterer Effekt festzustellen.

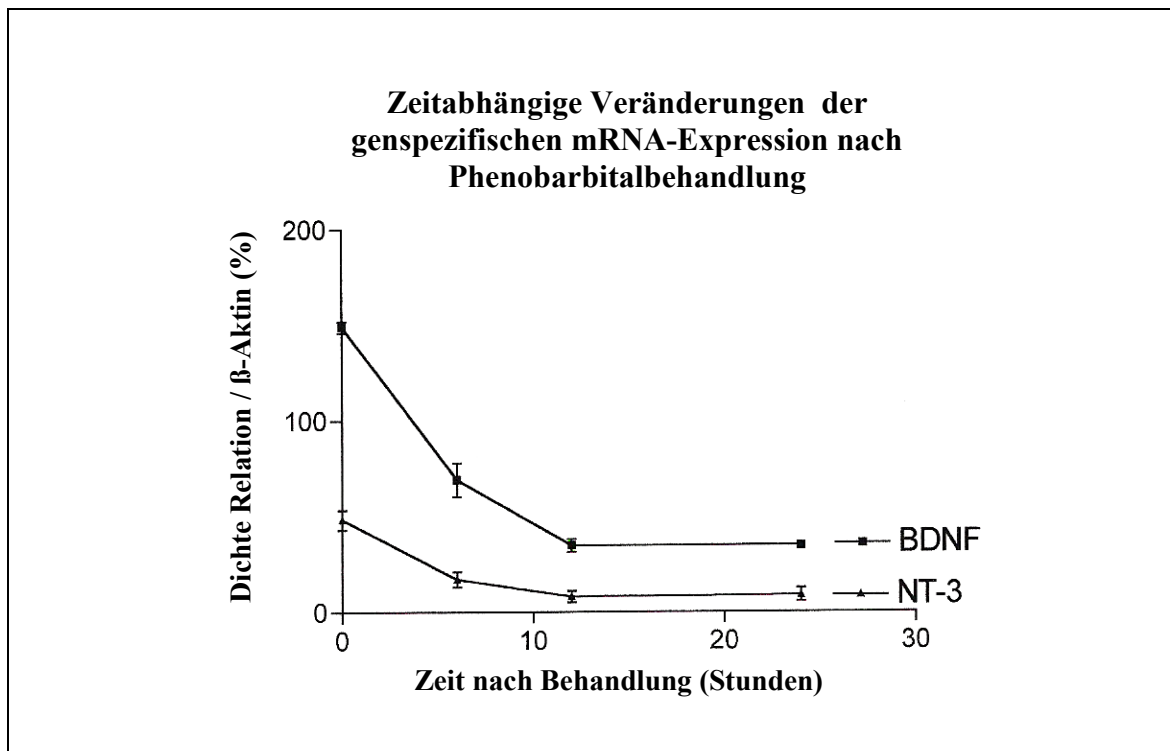


Abb.3: Quantifizierung der Verminderung der mRNA-Konzentrationen von BDNF und NT-3 durch Phenobarbital im Thalamus junger Ratten. 7 Tage alten Ratten wurde 50 mg/kg Phenobarbital injiziert (n=9) oder Kochsalz als Vehikel (n=3). Die Tiere wurden 6, 12 oder 24 Stunden nach der Behandlung getötet und die Gehirne analysiert (n=3 pro Gruppe). Die m-RNA-Konzentrationen für BDNF, NT-3 und β -Aktin wurden analysiert mittels PAGE und densitometrisch quantifiziert. Die Werte stellen gemittelte Verhältnisse der Dichten der BDNF- und NT-3-Banden zu den β -Aktin-Banden dar (n=3 pro Punkt, Mittelwert plus/ – SEM). Die Varianzanalyse (ANOVA) der auf diese Weise ermittelten Werte ergab einen signifikanten Effekt der Behandlung mit Phenobarbital auf die Expression von BDNF ($F(1,12)_{\text{Phenobarbital}} = 838.2, p < 0,0001$) und NT-3 ($F(1,12)_{\text{Phenobarbital}} = 109.2, p < 0,0001$). Die hier ermittelte Abweichung der einzelnen Tiere entspricht einer 3-10% igen Schwankung um den Mittelwert. Dies entsprach dem Ergebnis, das in den anderen Experimenten nachzuweisen war.

3.2 Expression neurotropher Faktoren im Hippocampus 7 Tage alter Ratten nach Phenobarbital

Phenobarbital bewirkt auch im Hippocampus eine sichtbare Reduktion der mRNA-Konzentrationen von BDNF nach 6 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Bereits nach 12 Stunden kommt es wieder zu einem Anstieg der mRNA-Konzentrationen von BDNF auf Kontroll-Niveau.

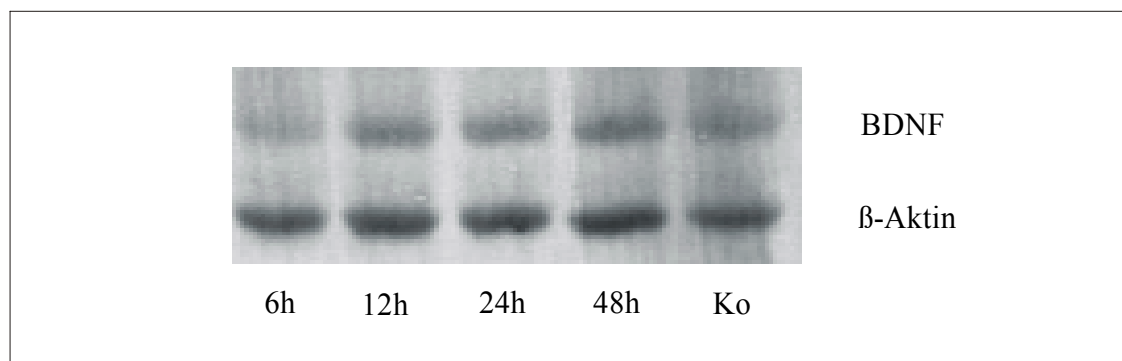


Abb.4: Phenobarbital verringert mRNA-Konzentrationen für BDNF im neugeborenen Gehirn. 7 Tage alte Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Phenobarbital. Das Hippocampushirngewebe wurde zu den verschiedenen angegebenen Zeitpunkten seziiert. Für die RT-PCR-Analyse wurde die gesamte zelluläre RNA isoliert, revers transkribiert und mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidprimer amplifiziert. Die cDNA wurde einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Die verminderte Dichte BDNF-spezifischer Banden ist sichtbar 6 Stunden nach Verabreichung des Antiepileptikums.

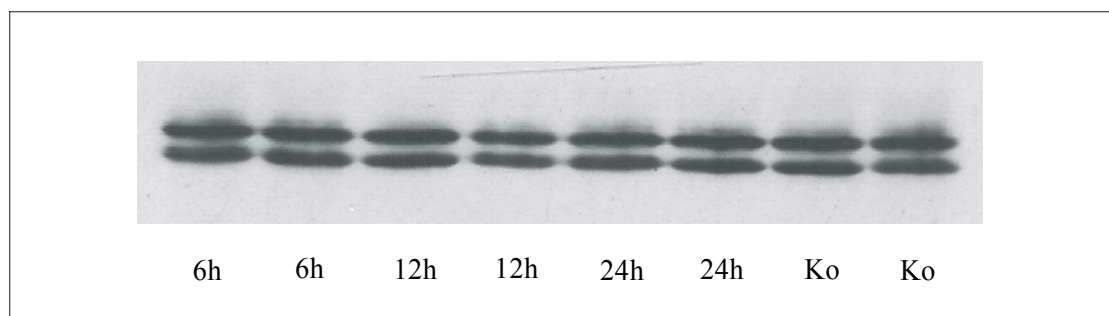
3.3 Expression von Proteinen im Thalamus 7 Tage alter Ratten nach Phenobarbital

Die Kinasen ERK 1/2 und Akt (Protein Kinase B) sind Mitglieder zweier bedeutsamer Wege, die durch Neurotrophine aktiviert werden und neuronales Überleben kontrollieren, nämlich des mitogen-aktivierten extrazellulären Protein-Kinase-Pfads (MAPK) und des Phosphatidylinositol-3-Kinase Pfads (PI3-Kinase). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass aktivierte ERK1/2 die Caspase-9, eine Schlüssel-Caspase bei der Aktivierung des intrinsischen Apoptosepfades, zu phosphorylieren und inhibieren vermögen (Allan et al.; 2003).

3.3.1 Phenobarbital vermindert die Menge der phosphorylierten aktiven Isoformen ERK 1/2 (p-ERK 1/2) und p-RAF im Thalamus

Um herauszufinden, welchen Einfluß die Behandlung mit Phenobarbital auf die Konzentrationen der phosphorylierten (aktiven) Formen von ERK1/2 und p-RAF hat, wurden Thalamusgewebeproben sieben Tage alter Ratten mittels Western Blot Verfahrens analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Mitglieder des mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Pfades, p-RAF und ERK 1/2 (p-ERK 1/2), in der aktiven phosphorylierten vermindert exprimiert werden. Diese beiden Proteine vermitteln intrazelluläre Signaltransduktion infolge Tyrosinkinaserzeptoraktivierung durch Bindung von Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren.

ERK 1/2 (A)



Phos-ERK 1/2 (B)

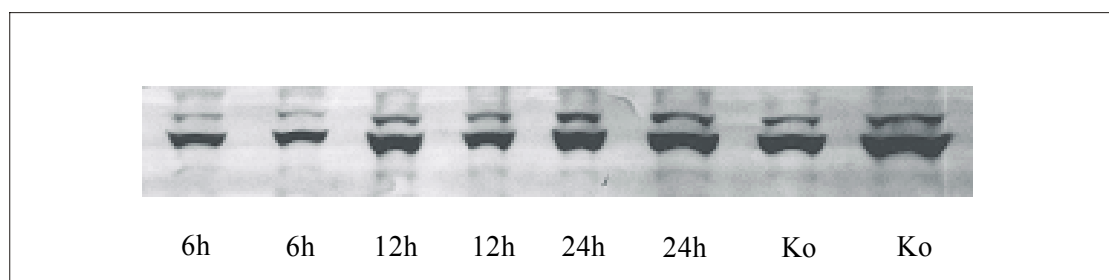


Abb.5: Phenobarbital verringert die Menge der phosphorylierten Isoformen von ERK1/2 im neugeborenen Gehirn. 7 Tage alte Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Phenobarbital. Das Thalamushirngewebe wurde zu den verschiedenen angegebenen Zeitpunkten sezert. Für die Proteinanalyse wurden die Thalamusproben lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Immunoblot wurde mit anti-phospho-ERK 1/2 (B) und ERK 1/2(gesamt) Antikörpern (A) durchgeführt. Sechs Stunden nach Phenobarbitalexposition ist eine deutliche Verminderung in der Expression der aktiven phosphorylierten-ERK 1/2 festzustellen (B), wohingegen die Gesamtmenge von ERK 1/2 nicht beeinflusst wird (A).

P-RAF

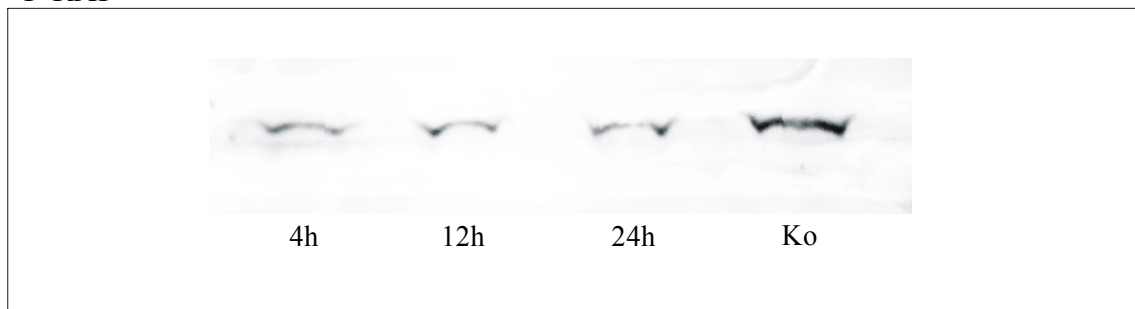
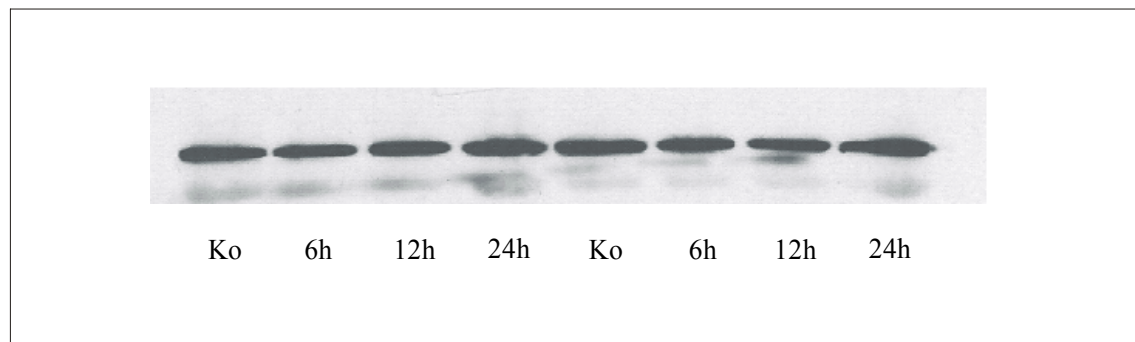


Abb. 6: Phenobarbital verringert die Menge des phosphorylierten cRAF im neugeborenen Gehirn. 7 Tage alte Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Phenobarbital. Das Thalamushirngewebe wurde zu den verschiedenen angegebenen Zeitpunkten seziiert. Für die Proteinanalyse wurden die Thalamusproben lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Immunoblot wurde mit anti-c-RAF-Antikörpern durchgeführt. Sechs Stunden nach Phenobarbitalexposition ist eine deutliche Verminderung in der Expression von c-RAF im Thalamus festzustellen.

3.3.2 Phenobarbital vermindert die Menge der phosphorylierten aktiven Isoform der Serin-Threonin-Kinase AKT (p-AKT, Protein Kinase B) im Thalamus

Um herauszufinden, welchen Einfluß die Behandlung mit Phenobarbital auf den Phosphatidylinositol-3-Kinase Pfad hat, wurden Thalamusgewebeproben sieben Tage alter Ratten mittels Western Blot Verfahrens analysiert und die Menge der aktiven (phosphorylierten) Isoform der Serin-Threonin-Kinase AKT (p-AKT) gemessen. Dabei zeigte sich, dass p-AKT sechs Stunden nach Phenobarbitalexposition deutlich vermindert exprimiert wird. Dieses Protein vermittelt intrazelluläre Signaltransduktion infolge Tyrosinkinasezeptoraktivierung durch Bindung von Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren.

Akt (A)



Phos-Akt (B)

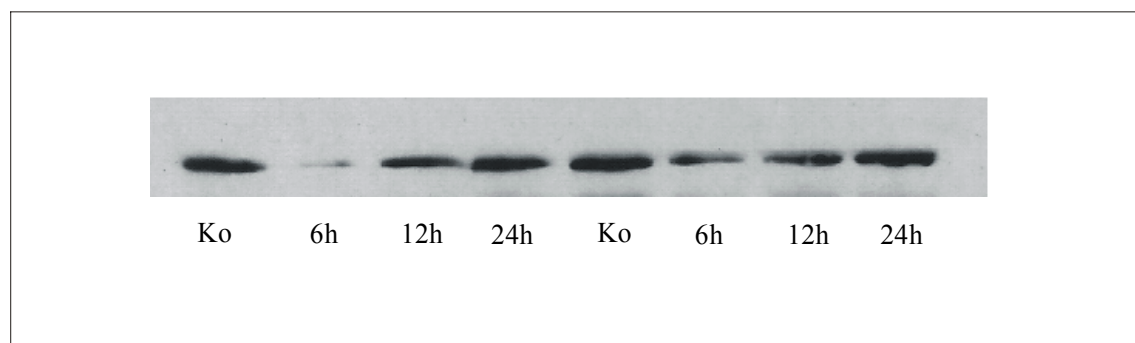


Abb.7: Phenobarbital verringert die Menge der phosphorylierten (aktiven) Isoform von AKT im neugeborenen Gehirn. 7 Tage alte Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Phenobarbital. Das Thalamushirngewebe wurde zu den verschiedenen angegebenen Zeitpunkten seziiert. Für die Proteinanalyse wurden die Thalamuproben lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Immublot wurde mit anti-phospho-AKT (B) und AKT(gesamt) Antikörpern (A) durchgeführt. Sechs Stunden nach Phenobarbitalexposition ist eine deutliche Verminderung in der Expression des aktiven phosphorylierten-AKT festzustellen (B), wohingegen die Gesamtmenge von AKT nicht beeinflusst wird (A).

3.3.3 Zeitabhängige quantitative Darstellung der Proteinexpression im Thalamus nach Phenobarbital

Bereits sechs Stunden nach Injektion von 50 mg/kg Phenobarbital war eine signifikante Verminderung der Proteinexpression der phosphorylierten (aktiven) Formen von AKT, pRAF und ERK1/2 im Thalamus sieben Tage alter Ratten nachweisbar. Nach 12 und 24 Stunden normalisieren sich die Konzentrationen wieder, erreichen aber noch nicht das Niveau der Kontrollen. Bei den Gesamtmengen von AKT und ERK ½ war zu keinem Zeitpunkt eine

Beeinflussung durch die Phenobarbitalbehandlung festzustellen.

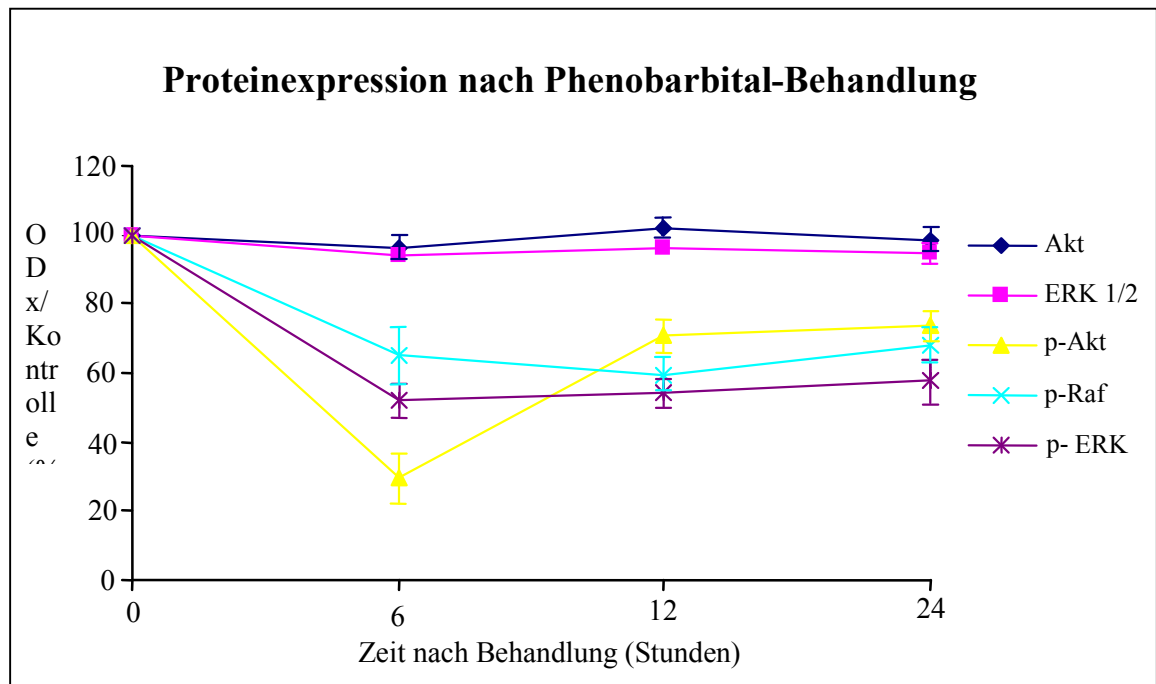


Abb.8: Quantifizierung der Verminderung der Proteinexpression von p-RAF, p-ERK1/2 und p-AKT durch Phenobarbital im Thalamus junger Ratten. 7 Tage alten Ratten wurde 50 mg/kg Phenobarbital (n=16) oder Kochsalz als Vehikel injiziert (n=4). Die Tiere wurden 0, 6, 12 oder 24 Stunden nach der Behandlung getötet und die Gehirne untersucht (n=4 pro Gruppe). Die Protein-Konzentrationen für p-RAF, p-ERK1/2, p-AKT, ERK ½ und AKT wurden mittels Western Blot analysiert und densitometrisch quantifiziert. Die Werte stellen gemittelte Verhältnisse der Dichten der p-RAF, p-ERK1/2, p-AKT, ERK ½ und AKT Banden verglichen mit der Dichte der dazugehörigen Bande bei 0h dar (in Prozent; n=4 pro Punkt, +/- SEM). Die Varianzanalyse (ANOVA) der auf diese Weise ermittelten Werte ergab einen signifikanten Effekt der Behandlung mit dem Antiepileptikum auf die Konzentration für p-RAF ($F(1,24)_{\text{Phenobarbital}} = 243.3, p < 0.0001$), p-ERK 1/2 ($F(1,24)_{\text{Phenobarbital}} = 477.4, p < 0.0001$) und p-AKT ($F(1,24)_{\text{Phenobarbital}} = 254.3, p < 0.0001$). AKT und ERK ½ (gesamt) Mengen werden durch die Behandlung nicht beeinflusst.