

Aus dem Institut für Neurophysiologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Ektope Expression ATP-abhängiger Transportproteine im humanen
resezierten epileptogenen Gewebe“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Raue
aus Bautzen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Uwe Heinemann
2. Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Ahnert-Hilger
3. Prof. Dr. med. Heinz Beck

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	5
1.1 MRP1	9
1.2 MRP2	9
1.3 MRP5	9
1.4 P-GLYKOPROTEIN	10
1.5 MVP	11
2 AUFGABENSTELLUNG	14
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 HERKUNFT UND VORBEREITUNG DES GEWEBES	16
3.1.1 <i>Patienten</i>	16
3.1.2 <i>Gewinnung des Gewebes</i>	16
3.1.3 <i>Histologische Aufarbeitung</i>	17
3.2 IMMUNHISTOCHEMIE	19
3.2.1 <i>Antikörper</i>	19
3.2.2 <i>Färbeprotokoll Einfachfärbung</i>	20
3.2.3 <i>Färbeprotokoll Doppelfärbung</i>	22
3.3 AUSWERTUNG DER FÄRBUNGEN	22
3.3.1 <i>Identifikation von Regionen und Zellen mit dem Mikroskop</i>	22
3.3.2 <i>Quantitative Analyse</i>	26
3.4 STATISTIK	27
4 ERGEBNISSE	29
4.1 MDT-IMMUNREAKTIVITÄT IM HIPPOKAMPUS MIT BERÜCKSICHTIGUNG ZELLULÄRER UND REGIONALER DIFFERENZEN	29
4.1.1 <i>Qualitative Beschreibung der immunhistochemisch erhobenen Befunde im Hippokampus</i>	29
4.1.2 <i>Quantitative Analyse der immunhistochemisch erhobenen Befunde</i>	40
4.1.2.1 <i>Differenzen der MDT-Immunreaktivitäten zwischen Neuronen und Gliazellen</i>	40
4.1.2.2 <i>Regionale Differenzen der MDT-Immunreaktivitätsraten von Neuronen und Gliazellen</i>	44
4.1.2.3 <i>Differenzen zwischen den Immunreaktivitätsraten für die untersuchten Transportproteine in den Regionen des Hippokampus und im Subiculum</i>	46

4.2 VERGLEICH DER MDT-IMMUNREAKTIVITÄT IN SKLEROTISCHEN UND NICHT-SKLEROTISCHEN HIPPOKAMPI	47
4.3 MDT-IMMUNREAKTIVITÄT IM TEMPORALEN KORTEKX MIT BERÜCKSICHTIGUNG ZELLULÄRER UND REGIONALER DIFFERENZEN	51
<i>4.3.1 Qualitative Beschreibung der immunhistochemisch erhobenen Befunde im Temporalen Kortex</i>	<i>51</i>
<i>4.3.2 Quantitative Analyse der Befunde im Temporalen Kortex</i>	<i>59</i>
4.3.2.1 Differenzen zwischen Neuronen und Gliazellen	59
4.3.3.2 Regionale Differenzen zwischen den Schichten II/III und V/VI	61
4.3.2.3 Differenzen zwischen den Transportproteinen	61
4.4 VERGLEICH DER MDT-IMMUNREAKTIVITÄT IN TEMPORALEN KORTICES MIT VERSCHIEDENER PATHOLOGIE	61
4.5 VERGLEICH DER MDT-IMMUNREAKTIVITÄT IM HIPPOKAMPUS UND TEMPORALEN KORTEKX	63
4.6 GEGENÜBERSTELLUNG VON MDT-IMMUNREAKTIVITÄTSRATEN UND ERGEBNISSEN DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN MESSUNGEN	64
4.7 KORRELATION DER MDT-IMMUNREAKTIVITÄT MIT KLINISCHEN PARAMETERN BZW. MERKMALEN DES PATIENTENKOLLEKTIVS	65
5 DISKUSSION	71
5.1 METHODENKRITIK	72
5.2 MDT-EXPRESSION IM HIPPOKAMPUS	73
5.3 MDT-EXPRESSION IM TEMPORALEN KORTEKX	78
5.4 MDT-EXPRESSION UND ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EFFEKTE VON MODULATOREN DER MDT-AKTIVITÄT	82
5.5 MDT-EXPRESSION UND KLINISCHE MERKMALE DES PATIENTENKOLLEKTIVS	83
6 ZUSAMMENFASSUNG	86
7 LITERATURVERZEICHNIS	88
<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	<i>I</i>
<i>ERKLÄRUNG</i>	<i>III</i>
<i>DANKSAGUNG</i>	<i>IV</i>
<i>LEBENS LAUF</i>	<i>V</i>
<i>PUBLIKATION/VORTRÄGE/POSTER</i>	<i>VI</i>

1 Einleitung

Epilepsien gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Weltweit sind mehr als 1% der Bevölkerung betroffen. In Deutschland ist die Inzidenz der Epilepsien geringer. Epilepsien sind phänomenologisch und hinsichtlich der Genese heterogen (fokal, generalisiert, konvulsiv oder nicht konvulsiv, idiopathisch oder symptomatisch, einfach, komplex). In der Gruppe der fokalen Epilepsien stellt die Temporallappenepilepsie (TLE) eine häufige und schwierig zu behandelnde Erkrankung dar. Während sich bei etwa 36 % der Patienten mit fokaler Epilepsie Anfälle durch die Einnahme von Antikonvulsiva kontrollieren lassen, ist das in der TLE-Untergruppe nur bei einem Fünftel der Betroffenen der Fall. Damit gehören die fokalen temporalen Anfälle zu den Syndromen, die eine ungünstige Prognose in Bezug auf Anfallsfreiheit aufweisen (1).

Der Terminus „Pharmakoresistenz“ ist nicht eindeutig definiert und wird in der Literatur zum Thema uneinheitlich benutzt. Entscheidend ist das Erreichen von Anfallsfreiheit, wenngleich die Medikamente auch bei nicht anfallsfreien Patienten die Krankheit modifizieren. Basierend auf Untersuchungen, die zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit Anfallsfreiheit zu erreichen, bei Versagen von 2 Antikonvulsiva („antiepileptic drugs“ = AEDs) der ersten Wahl drastisch sinkt (2, 3), wird ein Epilepsie-Patient im klinischen Alltag meist dann als „pharmakoresistent“ bezeichnet, wenn trotz Verabreichung von 2 oder mehr AEDs der ersten Wahl weiterhin epileptische Anfälle auftreten.

Eine therapeutische Option für pharmakoresistente Patienten ist die Epilepsiechirurgie: TLE-Patienten haben nach einer Teil-Resektion des mesialen temporalen Kortex, des Hippokampus und des Amygdalums, eine etwa 7-mal höhere Chance auf Anfallsfreiheit (4).

Ziel einer Operation ist dabei die Anfallsfreiheit. Die Tatsache, dass dieses Ziel bei fortgesetzter medikamentöser Behandlung für mehr als zwei Drittel der Patienten erreicht wird (5), weist darauf hin, dass das resezierte Gewebe nicht nur epileptogen, sondern auch pharmakoresistent ist. Gelingt es, das entnommene Gewebe vital zu halten, bietet sich die Möglichkeit, die noch wenig verstandenen Ursachen und Mechanismen der Pharmakoresistenz direkt am erkrankten humanen Gewebe zu untersuchen (6, 7). Da AEDs an unterschiedlichen Wirkorten von neuronaler Erregbarkeit und Weiterleitung angreifen, muss man sehr wahrscheinlich von einer multifaktoriellen Genese der Pharmakoresistenz ausgehen. Gegenwärtig existieren zwei Hypothesen, um das Phänomen Pharmakoresistenz des epileptogenen Gewebes auf zellulärer Ebene zu erklären:

(1) Die Target-Hypothese beinhaltet, dass die intrazellulären bzw. membranständigen Angriffspunkte der Antikonvulsiva strukturell bzw. genetisch verändert sind und damit die AEDs ihre Wirkung nicht entfalten können (8).

(2) Die Transporter-Hypothese macht membranständige ATP-abhängige Proteine, die AEDs entgegen dem Konzentrationsgradienten aus der Zelle in den Extrazellulärraum transportieren, für die Pharmakoresistenz verantwortlich.

Diese ATP-abhängigen Proteine existieren im humanen Organismus in zell- und gewebespezifischen Kombinationen in verschiedenen Organen (Darm, Leber, Niere, Kapillarendothel) und konnten auch im ZNS (Endothelzellmembranen, Epithel des Plexus choroideus) nachgewiesen werden (Tabelle I). Man geht daher davon aus, dass im gesunden humanen Hirngewebe diese Transportproteine Teil der Blut-Hirn-Schranke sind bzw. die Funktion der Blut-Liquor-Schranke unterstützen (9-11).

Im Rahmen von Untersuchungen zur Chemoresistenz von malignen Zellen brachte man diese ATP-abhängigen Transportproteine das erste Mal mit dem Phänomen der Pharmakoresistenz in Verbindung. Da in der Plasmamembran dieser chemoresistenten Zellen (12) P-Glykoprotein (Pgp, auch MDR1=Multidrug resistance related protein) gefunden wurde, vermutete man, dass das Protein Chemotherapeutika mithilfe von ATP transportiert und demzufolge die intrazelluläre Konzentration des Chemotherapeutikums nur unzureichend ansteigt.

Fast 20 Jahre später wurden in Gewebeproben pharmakoresistenter TLE-Patienten erstmals erhöhte Spiegel von MDR1-mRNA, eine deutlich erhöhte Immunreaktivität für Pgp in Kapillarendothelzellen und Pgp-immunpositive Astrozyten entdeckt (13). Außerdem führten die Autoren den Nachweis, dass Zelllinien, die MDR1 exprimieren, nur ein Viertel der Menge an Phenytoin anreichern, die Zellen einer MDR1-negativen Zelllinie intrazellulär akkumulieren. Diese Befunde stützten die Hypothese, dass Transportproteine aus der Familie der ABC- (=ATP-binding cassette) Transporter tatsächlich AEDs transportieren und die AED-Konzentration im Parenchym erniedrigen. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Pgp in epileptischem Gewebe über- und ektop exprimiert wird und damit für die Pharmakoresistenz im Rahmen einer Epilepsie ursächlich verantwortlich sein kann.

Neben Pgp könnten auch noch andere Transportproteine der ABC-Familie für die Pharmakoresistenz bei Epilepsie von Bedeutung sein. In humanen Geweben konnten bisher 49 verschiedene Proteine der ABC-Familie, die zu 7 Subgruppen gehören (14), nachgewiesen werden. Sie weisen ein breites Spektrum an Substraten (vorrangig organische Anionen) auf und werden deshalb auch als Multidrug-Transportproteine (MDT) bezeichnet. Ihre

Bindungspartner werden transmembranös transportiert, d.h. entweder nach extrazellulär geschleust oder in intrazelluläre Vesikel sequestriert.

P-Glykoprotein gehört zur Subfamilie B der ABC-Transporter (Gen ABCB1). Die Mitglieder der C-Subfamilie werden auch als MRP-Familie (= multidrug resistance associated proteins) bezeichnet. Zurzeit gehören 13 Proteine in diese letzte Gruppe, von denen aber nur 9 funktionell aktiv sein sollen (14). Mit dem Wissen um die physiologische Expression einiger MDT an der Blut-Hirn-Schranke, wurde zunächst angenommen, dass eine Pharmakoresistenz im epileptischen Gewebe über eine gesteigerte Expression vorhandener Transportproteine oder Neu-Expression sonst nicht in den zerebralen Endothelzellen vorkommender Proteine vermittelt würde. Es konnte gezeigt werden, dass die für Pgp, MRP2 und MRP5 kodierenden Gene in Endothelzellen aus humanen epileptischen Resektaten eine Hochregulation erfahren hatten. Als „gesunde“ Kontrolle diente Gewebe, welches während Aneurysma-Resektionen gewonnen wurde. Für MRP1 war eine erhöhte Expression auf mRNA-Ebene im epileptischen Gewebe nicht nachweisbar (15).

Dass MDT nicht nur an Endothelzellen, sondern auch ektop in Zellen des Hirnparenchyms exprimiert werden, konnte schon kurz darauf demonstriert werden. Mit immunhistochemischen Methoden wurden MRP1 und Pgp in Gliazellen (Astrozyten) von Patienten nachgewiesen, die an Epilepsien verschiedener Genese (Hippokampussklerose = HS, fokale kortikale Dysplasie = FCD, Fehlbildungstumoren/ dysembryoplastische neuroepitheliale Tumoren = DNET) litten. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression nicht das benachbarte normale Gewebe betraf (16). Man sah darin einen Hinweis, dass AEDs und wiederkehrende epileptische Anfälle nicht unbedingt eine ektope Expression von MDR-Proteinen bewirken müssen, denn dann hätte sich eine solche auch im benachbarten nicht epileptogenen Gewebe, welches den selben Einflüssen (epileptische Anfälle und Antikonvulsiva) ausgesetzt war, finden müssen. Die Autoren dieser Arbeit fanden auch Hinweise auf eine Expression von MRP1 in Neuronen, die histopathologisch als verändert eingestuft wurden (z.B. dysplastische Neurone bei fokaler kortikaler Dysplasie).

Von der gleichen Gruppe (17) wurde der Fall eines im Status epilepticus verstorbenen Patienten mit kortikaler Dysplasie veröffentlicht, bei dem eine Expression von Pgp und MRP1 in den Astrozyten beider Hemisphären und in den Neuronen der betroffenen Hemisphäre vorlag, so dass die Autoren die These aufstellten, dass durch einen lang anhaltenden Status epilepticus eine ektope Expression der MDT induziert werden könnte, weshalb eine schnelle Beendigung des Status das Risiko einer Pharmakoresistenz minimieren könne.

Eine systematische Untersuchung mehrerer mit Pharmakoresistenz in Verbindung gebrachter MDT in normalem Hirngewebe und chronisch epileptischem Gewebe (18) zeigte ein Vorkommen von Pgp in kapillären Endothelzellen des normalen Hirngewebes, welches Autopsien von Patienten entstammte, die zu Lebzeiten weder hirnorganische Anfälle noch andere neurologische Erkrankungen aufwiesen. Kein Mitglied der MRP-Proteingruppe war nachweisbar. Im epileptischen, nicht-sklerotischen Gewebe lag eine dem normalen Gewebe vergleichbare MDT-Expression vor, während im sklerotischen Hippokampus Pgp in Astrozyten, MRP1 im Parenchym in der Nähe von Blutgefäßen und in Neuronen des Hilus sowie der CA1-Region und MRP2 in Endothelzellen nachgewiesen wurde. Es existieren aber auch Untersuchungen, die keine positive Korrelation zwischen dem Gliosegrad des Gewebes und den Transportprotein-Expressionsraten zeigen (19).

Neben den beschriebenen Mitgliedern der ABC-Familie könnte auch ein anders konfiguriertes Protein mit abweichendem Wirkmechanismus einen Beitrag zur Pharmakoresistenz leisten. MVP (major vault protein) wurde auf sein Vorkommen im humanen epileptischen Gewebe untersucht und in hypertrophen Hilusneuronen sowie in Endothelzellen detektiert (18).

Eine quantitative Untersuchung mit immunhistochemischen Methoden zeigte, dass in Hirnschnitten von pharmakoresistenten Epilepsie-Patienten etwa zwei Drittel der Neurone und 85 % der parenchymatösen Astrozyten Pgp aufwiesen (20). Diese beträchtliche Rate an Zellen mit ektope Expression von MDT ließ die Autoren vermuten, dass die MDT in Abhängigkeit ihrer Lokalisation verschiedene Funktionen haben könnten: An den Hirnschranken eine Barrierefunktion, im Hirnparenchym eine Schutzfunktion vor Apoptose und potentiell zytotoxischen Substraten, die die im Rahmen epileptischer Aktivität transient gestörte Blut-Hirn-Schranke passieren können (21, 22).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die ektope Expression der MDT im epileptischen Gewebe (Tabelle I) möglicherweise mit der Pharmakoresistenz zusammenhängt. Ob ein kontinuierlich erhöhtes Angebot an AEDs oder epileptische Anfälle als Trigger der Expression dienen, konnte bisher nicht geklärt werden.

1.1 MRP1

MRP1 ist durch das Gen ABCC1 kodiert und wurde zuerst 1992 aus einer pharmakoresistenten SCLC (small cell lung cancer) - Zelllinie isoliert (23). Es handelt sich um ein aus 3 transmembranösen Domänen bestehendes Protein mit 2 zytoplasmatisch lokalisierten ATP-Bindungsstellen. Zu seinen Substraten zählen bevorzugt anionische Stoffe, die an GSH (Glutathion), Glukuronat oder Sulfat gekoppelt sind. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Gen-Familie (z.B. MRP2) ist es in der Leber nur schwach ausgeprägt, findet sich jedoch in hohen Konzentrationen in der Niere, Lunge, Hoden und mononukleären Zellen des Blutes. Im ZNS konnte es physiologisch an den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (15, 24), in den Zellen der Blut-Liquor-Schranke (25) sowie in Astrozyten nachgewiesen werden (26, 27). Widersprüchliche Daten gibt es zur neuronalen Expression im gesunden Hirngewebe. In epileptischem Gewebe wurde eine Expression in histopathologisch veränderten Nervenzellen beschrieben (16, 28, 29).

1.2 MRP2

MRP2, kodiert durch ABCC2 hat eine ähnliche Substrat-Bandbreite und einen vergleichbaren strukturellen Aufbau wie MRP1. Es wird im humanen gesunden Leber-, Nieren- und Darmgewebe gefunden, wo es an der luminalen Seite von Endothelzellen liegt. Die wichtigste physiologische Rolle des MRP2 besteht in der Sekretion von Metaboliten (u.a. konjugiertes Bilirubin) in die Gallenflüssigkeit. Im Gegensatz zu MRP1 ist die Expression von MRP2 im gesunden humanen Hirngewebe strittig. Es gibt Hinweise auf eine Expression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (30) und in den Zellen der Blut-Liquor-Schranke (31). Eine zusätzliche astrozytäre Expression findet sich möglicherweise im epileptischen Gewebe (32).

1.3 MRP5

Dieses Protein, das in der Literatur synonym auch als ABCC5 bezeichnet wird, kommt ubiquitär in humanen Geweben vor (u.a. Herzmuskel und Urogenitaltrakt) und weist im Gegensatz zu MRP1 und MRP2 nur 2 transmembranöse Domänen auf. Zum Substratspektrum gehören organische Anionen, GSH- Konjugate, Nukleosidanaloga und zyklische Nukleotide, was möglicherweise zur Freisetzung von cAMP und cGMP ins extrazelluläre Milieu beiträgt.

Ein Vergleich der Expressionsraten von MRP5 in verschiedenen Geweben der Ratte zeigte die höchsten Werte im Plexus choroideus, während Leber, Niere und Ileum weit niedrigere Mengen an MRP5 enthielten (31). In einer breit angelegten Untersuchung wurde das Vorkommen mehrerer Mitglieder der MRP-Familie (MRP1 bis MRP6) im gesunden, humanen Hirngewebe untersucht, welches Patienten entstammte, die sich aufgrund von Gliomen oder intrazerebralen Blutungen einem neurochirurgischen Eingriff unterziehen mussten (24). Dabei wurde deutlich, dass MRP5 auf mRNA-Ebene in weit höherem Maße exprimiert wurde als die anderen Mitglieder der Proteinfamilie. Es fand sich in Endothelzellen hirneigener Kapillaren, in subkortikalen Astrozyten und Pyramidenzellen. Im humanen epileptischen Gewebe (Temporaler Kortex), welches zur Behandlung einer therapie-refraktären Epilepsie reseziert worden war, konnte das für MRP5 kodierende Gen in Endothelzellen der kortikalen Blutgefäße nachgewiesen werden (15).

1.4 P-Glykoprotein

P-Glykoprotein (Pgp) wird durch das Gen ABCB1 kodiert und weist ein breites Spektrum an Substraten (vorrangig unkonjugierte, kationische Substanzen, u.a. Steroide, Zytokine, Bilirubin, Chemotherapeutika, Immunsuppressiva, Proteaseinhibitoren) auf. Es handelt sich um ein 170 kD schweres Protein mit 2 transmembranös lokalisierten Domänen und 2 im Zytoplasma gelegenen ATP-Bindungsstellen. Es wurde zuerst 1976 von Juliano Ling und Kollegen beschrieben, die es in der Plasmamembran von Multidrug-resistenten Krebszelllinien detektierten (12). Es wurde zudem als erstes Transportprotein in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen (9, 10).

Physiologisch wird es von Geweben mit sekretorischer Funktion exprimiert (Leber, Niere) und im normalen, gesunden Hirngewebe vor allem an Blut-Gewebe-Schranken gefunden (Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, Plexus choroideus-Epithel). Aus diesen Lokalisationen ergeben sich auch die vermeintlichen Aufgaben des Pgp, die in der Limitierung der Aufnahme potentiell toxischer Substanzen in den Körper bzw. in sensitives Gewebe (besonders ZNS) sowie dem schnellen Ausschleusen toxischer Metabolite bestehen. Eine Ausnahme bildet offenbar die Blut-Liquor-Schranke, wo Pgp durch seine luminal Lage (30) eher die Aufnahme von Stoffen in den Liquor vermitteln dürfte und hier möglicherweise eng mit dem basolateral gelegenen MRP1 kooperiert. Durch den Nachweis von Pgp in den astrozytären Fortsätzen um die zerebralen Endothelzellen (33) schreibt man ihm die Funktion einer „second barrier“ in Addition zur Blut-Hirn-Schranke zu (20). Dies ist besonders dann

von Bedeutung, wenn man berücksichtigt, dass durch epileptische Anfälle die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke transient beeinträchtigt wird (21, 22).

In normalem Hirngewebe findet sich Pgp nur in geringem Maße in parenchymatösen Astrozyten und überhaupt nicht in Neuronen. Offenbar ist hier aber in epileptischem Gewebe genau wie bei anderen hirngeweblichen Erkrankungen (Hirntumoren) eine ektope Expression bzw. Überexpression möglich (13, 16, 18, 20, 29, 34).

Über die Ursachen (induziert durch epileptische Anfälle, Status epilepticus oder Antikonvulsiva) kann man nur spekulieren. Auch die Funktion solcher ektop exprimierter Transportproteine im Hirnparenchym ist nicht bekannt - es gibt aber die Theorie, dass es sich um einen adaptiven Mechanismus im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen handelt, zu deren Formenkreis auch die Epilepsie zählt. Demnach sind Pgp-exprimierende Zellen besser vor Apoptose und dem Einfluss zytotoxischer Metabolite geschützt (35).

1.5 MVP

Das Major Vault Protein (MVP) bildet den Hauptanteil der Ribonukleinprotein-Partikel, die im Zytoplasma eukaryoter Zellen gefunden werden. Verschiedentlich wird es in der Literatur auch als Lung-resistance-related protein (LRP) bezeichnet. Die fassförmigen Strukturen wurden Mitte der 80er Jahre erstmals beschrieben. Gewöhnlich finden sich 10 000 bis 100 000 Vaults pro Zelle, die mit dem Zytoskelett interagieren und dadurch am nukleo-zytoplasmatischen Transport teilnehmen.

MVP ist in allen humanen Geweben präsent und man nimmt an, dass es in der Abwehr toxischer Einflüsse auf die Zelle eine wichtige Rolle spielt. Unphysiologisch hohe Konzentrationen konnten in chemoresistenten Krebs-Zelllinien (1993 in Bronchial-Karzinom), die kein Pgp exprimierten, nachgewiesen werden (36). Der Nachweis von MVP gilt als negativer prognostischer Faktor hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemotherapie, besonders bei onkologischen Erkrankungen des hämatologischen Formenkreises (37, 38).

Aufgrund seiner Lokalisation und physiologischen Funktion hat man vermutet, dass MVP über Sequestration von Substraten in Vesikel, die dann der Exozytose zugeführt werden, zur Pharmakoresistenz beitragen könnte. Es ist wahrscheinlich, dass MVP im Gegensatz zu den ABC-Transportern auf die Anwesenheit von ATP nicht angewiesen ist. Ferner ist eine synergistische Zusammenarbeit zwischen MVP und den Mitgliedern der ABC-Familie denkbar.

Im gesunden humanen Hirngewebe wird MVP nicht in Neuronen und Gliazellen exprimiert und nur sehr schwach in Blutgefäßen. In Gangliogliomen dagegen fand man MVP in hohen Konzentrationen in Neuronen (den so genannten Ballon Zellen) sowie in Gliazellen (inklusive den tumoreigenen Astrozyten) und Blutgefäßen, aber nicht in angrenzenden Gebieten, woraus man schlussfolgerte, dass die MVP-Expression eine Art Schutzmechanismus ausgelöst durch Stress (wie etwa Zelluntergang oder hohe Zellteilungsraten in Tumorgewebe) darstellt, aber nicht durch antikonvulsive Behandlung induziert werden kann (39).

Ratten, die einen elektrisch induzierten Status epilepticus durchgemacht hatten, zeigten erhöhte Expressionsraten von MVP, wobei ein Maximum eine Woche nach dem Status zu verzeichnen war und bei chronisch epileptischen Ratten die Konzentration an MVP wieder abnahm (40). Die Autoren konnten das Protein hauptsächlich in Mikrogliazellen nachweisen, insbesondere im entorhinalen Kortex, im Hilus und in den Regionen CA1 und CA3. Dies betraf vorrangig die frühe chronisch-epileptische Phase, in späteren Phasen war die Konzentration von MVP nur noch in der Region CA3 erhöht. Als Ursache für die Dynamik des Expressionsmusters vermuteten die Autoren eine veränderte Anfallsaktivität im zeitlichen Verlauf der induzierten Epilepsie.

Ein Nachweis von MVP in humanem epileptischem Gewebe erfolgte in hypertrophen Hilusneuronen und Blutgefäßen von sklerotisch veränderten Hippokampi. In Astrozyten desselben Gewebes war nur eine schwache Expression erkennbar (18).

Tabelle I : Übersicht zur Expression der untersuchten Transportproteine in verschiedenen Zelltypen von gesundem und epileptischem Hirngewebe.

Modifiziert nach Löscher et. al (41). Die Zitatnummern folgen der Nummerierung im Literaturverzeichnis.

„+“ *Expression vorhanden*; „/“ *keine Expression nachgewiesen*; „?“ *widersprüchliche Daten*

Gewebetyp	Transportprotein	Nervenzellen	Gliazellen	Endothelzellen	Referenz
Normal	Pgp	/	+	+	9, 10, 25
	MRP1	?	+	+	24-27, 31
	MRP2	/	/	?	15, 26, 30, 31
	MRP5	+	+	+	15, 24, 26, 31
	MVP	?	/	+	42
Epileptisch	Pgp	+	+	+	13, 15, 16, 18, 20, 34
	MRP1	+	+	/	15, 16, 28, 29
	MRP2	?	+	+	15, 18
	MRP5	?	?	+	15
	MVP	+	?	?	17, 18

2 Aufgabenstellung

Basierend auf der Annahme, dass Multidrug-Transportproteine (MDT) eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung einer Pharmakoresistenz im Rahmen einer Epilepsie spielen könnten, konzentrierte man sich lange auf die Lokalisation dieser Proteine an den Schranken des Gehirns. Im humanen, gesunden Hirngewebe sind die Transportproteine (Pgp, MRP1) an der Blut-Hirn-Schranke und dem Plexus choroideus eutop lokalisiert. Sie bilden eine physiologische Schutzbarriere des ZNS vor potentiell toxischen Substanzen. Bei Epilepsie (Anfall toxischer Metabolite bei vermehrtem Zelluntergang und AED-Behandlung) könnten die eutop lokalisierten MDT einer vermehrten Expression (Hochregulation) unterliegen und die AED-Konzentration im Hirngewebe auf einem für die Kontrolle bzw. Vermeidung epileptischer Anfälle unzureichendem Niveau halten.

Mehrere Arbeitsgruppen haben berichtet, dass im humanen, epileptischen Gewebe auch eine ektope Expression der ATP-abhängigen Transportproteine in Zellen des Hirnparenchyms (Neuronen und Gliazellen) in einer nicht zu vernachlässigenden Größenordnung stattfindet (16-18, 20, 28, 29, 34, 39, 43). Daher stellt sich die Frage, welche Rolle diese ektope exprimierten Transportproteine im epileptischen Gewebe spielen und ob sie einen Beitrag zur Entwicklung einer Pharmakoresistenz leisten können.

Unsere Gruppe konnte zeigen, dass im Gyrus dentatus humaner vitaler Hirnschnitte aus reseziertem Gewebe pharmakoresistenter Patienten epileptiforme Aktivität auszulösen ist (7, 44). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass diese *in vitro* induzierte epileptiforme Aktivität im sklerotischen und nicht-sklerotischen Gewebe nicht durch die Applikation therapeutischer Konzentrationen von Carbamazepin supprimierbar ist (45). Wenn die Pharmakoresistenz der Patienten nur auf die in der Blut-Hirn-Schranke, also eutop exprimierten Transportproteine zurückzuführen wäre, so müssten die Hirn-Schnitte *in vitro*, die keine Blut-Hirn-Schranke mehr aufweisen, bei freier Perfusion durch die Badlösungen auf die applizierten Antikonvulsiva ansprechen. Da dem nicht so ist, kann man vermuten, dass auch parenchymatös, d.h. ektope exprimierte Transportproteine eine Rolle bei der Entwicklung der Pharmakoresistenz spielen.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes, welches versucht, sich dem Thema der durch Transportproteine vermittelten Pharmakoresistenz im humanen epileptogenen Gewebe über verschiedene Ansätze zu nähern. Im resezierten Gewebe wird die Wirkung verschiedener AEDs auf induzierte epileptogene Aktivität *in vitro* elektrophysiologisch getestet. Zudem kann durch Einwaschen potentieller spezifischer und unspezifischer Inhibitoren der

Transportproteine untersucht werden, ob diese Transportproteine zur Pharmakoresistenz beitragen.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung verschiedener Transportproteine in Nerven- und Gliazellen in zuvor elektrophysiologisch untersuchten Geweben. Ferner sollen statistische Zusammenhänge zwischen den Expressionsraten bestimmter MDT und elektrophysiologischen Effekten der applizierten Inhibitoren auf die AED-resistente epileptiforme Aktivität nachgewiesen werden. Liegt eine ektope Expression in einer bestimmten Größenordnung vor und bestehen signifikante Zusammenhänge mit den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen, so ist davon auszugehen, dass die MDT in Nerven- und Gliazellen eine Rolle im Rahmen der Pharmakoresistenz spielen. Lässt sich ein Zusammenhang trotz bestehender ektope Expression nicht erhärten, so ist eine andere Rolle der MDT im Rahmen der Epilepsie zu diskutieren.

Neben der Untersuchung der oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen MDT-Expressionsraten und elektrophysiologischen Effekten ist meine Arbeit auf die Beantwortung folgender Fragen fokussiert:

(1) Werden im epileptogenen Gewebe, d.h. resezierten Hippokampus und Temporalen Kortex MDT ektop exprimiert und wenn dem so ist, existieren Unterschiede zwischen den Expressionsraten der einzelnen Transportproteine?

(2) Existieren Unterschiede der Expression zwischen Neuronen und Gliazellen?

(3) Gibt es regionale Differenzen der Expression im Hippokampus oder Temporalen Kortex?

(4) Differieren die Expressionsraten in Abhängigkeit vom Sklerosegrad des hippokampalen Gewebes?

(5) Werden im Temporalen Kortex mit klar umschriebener Pathologie (Tumor, Kontusion, Atrophie, Dysplasie) verstärkt Transportproteine exprimiert?

(6) Sind Unterschiede in der Expression zwischen Hippokampus und Temporalen Kortex feststellbar?

(7) Bestehen statistische Zusammenhänge zwischen klinischen Daten der Patientenstichprobe (Dauer der Epilepsie, Anfallsfrequenz, zugrunde liegende Pathologie, Art und Dauer der antikonvulsiven Therapie, Plasmaspiegel der AEDs) und Expressionsraten der Transportproteine?

3 Material und Methoden

3.1 Herkunft und Vorbereitung des Gewebes

3.1.1 Patienten

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben von humanen Hippokampi (n= 27 Patienten) und Temporalen Kortexen (n=13 Patienten) wurden während epilepsiechirurgischer Operationen gewonnen, denen sich Patienten mit pharmakologisch nicht vollständig kontrollierbarer Temporallappenepilepsie (n=25) bzw. Neoplasien (n=3, davon 2 dysembryoplastische neuroepitheliale Tumoren in unmittelbarer Nähe des Hippokampus, 1 extrahippokampales Astrozytom ohne Resektion von Hippokampusgewebe) im Zeitraum März 2005 bis Dezember 2006 unterzogen. Alle Operationen wurden von einem Neurochirurgen (T.-N. Lehmann) ausgeführt, so dass eine identische Resektions- und Dissektionstechnik garantiert werden kann.

Die Patienten wurden hinsichtlich ihrer mesialen Temporallappenepilepsie den Deutschen und Europäischen Richtlinien folgend im Epilepsie-Zentrum Berlin-Brandenburg (46, 47) evaluiert. Einige der Tumorpatienten unterzogen sich präoperativer Diagnostik und Vorbereitung in der Abteilung für Neurochirurgie/Campus Virchow-Klinikum der Charité. Von jedem Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung zum operativen Eingriff und zur Verwendung des resezierten Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen vor. Weiterhin sind die Experimente im Rahmen dieser Studie durch ein Ethikvotum der Charité legitimiert.

3.1.2 Gewinnung des Gewebes

Im Operationsaal wurden sofort nach Entnahme zwei bis drei koronare Schnitte des Hippokampuskopfes und –korpus von je einem halben Zentimeter Durchmesser angefertigt. Die resezierten Anteile des Temporalen Kortex werden ebenfalls in ähnlich große Gewebestücke geteilt. Alle durch uns zu untersuchenden Gewebeproben werden sofort nach ihrer Entnahme in einer kalten (1°C) mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begasten Transportlösung inkubiert, welche die folgenden Bestandteile enthält (in mM): 3 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 10 Glukose, 2 MgSO₄, 2 MgCl₂, 1.6 CaCl₂, 21 NaHCO₃, 200 Saccharose und 0.1 alpha-Tocopherol (pH 7,4). Der Transport zum Labor erfolgte in einem luftdicht verschlossenen Kühlbehälter und dauerte nicht länger als 30 Minuten.

Nach der Ankunft im Labor wurden mithilfe eines Vibratoms (Campden Instruments, Leicester/UK) 500 µm dicke koronare Gewebeschnitte angefertigt, die entweder elektrophysiologischen Messungen unterzogen oder direkt in 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA, Paraformaldehyd in 0,1M PB; pH 7,4) für die folgenden immunhistochemischen Untersuchungen überführt wurden. Bei der Auswahl der Schnitte für die Färbungen wurden jene bevorzugt, die den besten Gewebeerhalt zeigten und möglichst dem Korpus des Hippokampus entstammten. Dies waren häufiger die Schnitte, die zuvor elektrophysiologisch untersucht worden waren.

Insgesamt wurden pro Patient etwa 3 bis 4 Geweblöcke (500 µm) für die folgenden CV-Färbungen und die immunhistochemischen Untersuchungen verwendet. Dabei wurden je 21 Schnitte zu 10 µm Dicke für den Nachweis der Multidrug-Transportproteine (MDT) benötigt. Die Anzahl verwendeter Schnitte für die CV-Färbungen variierte, im Durchschnitt wurden 2 bis 3 Objektträger mit je 3 Schnitten angefertigt.

3.1.3 Histologische Aufarbeitung

Die resezierten Hippokampi ließen sich entsprechend dem erlittenen Zellverlust in den verschiedenen Regionen unterschiedlichen Wyler-Graden (48) zuordnen. Hierbei wird ein histopathologisch normaler Hippokampus als Wyler 0 klassifiziert, ein Nervenzellverlust von 10 %, 10-50 % und mehr als 50 % in den Regionen CA1 (Tafel 1; Abb. G und H), CA3 und CA4 bzw. Hilus (Tafel 1; Abb. E und F) wird als Grad 1,2 bzw. 3 bezeichnet. Sind alle Regionen (inklusive Gyrus dentatus, Subiculum und Gyrus parahippocampalis) von einem Zellverlust betroffen der mehr als 50 % beträgt, so wird das als Grad 4 klassifiziert. Ein weiteres Charakteristikum einer Hippokampussklerose, welches jedoch kein Klassifizierungsmerkmal im Rahmen des Wyler-Graduierungssystems darstellt, ist eine Dispersion der Körnerzellen des Gyrus dentatus (Tafel 1; Abb. C und D). Synonym werden die Grade 3 und 4 als klassische und totale Hippokampussklerose (HS) bezeichnet und nur Gewebe dieser Graduierungen wurden in dieser Untersuchung in die HS-Guppe (Tafel 1; Abb. A) eingeordnet. Hippokampale Gewebeproben, die als Wyler-Grad 1 oder 2 klassifiziert wurden, wurden im Rahmen dieser Untersuchung als nicht-sklerotische Hippokampi geführt (nHS; Tafel 1; Abb. B).

Proben aller Patienten wurden parallel zu den im Institut für Neurophysiologie angefertigten Cresylviolett-Färbungen zur Wylergraduierung auch im Institut für Neuropathologie der Charité hinsichtlich ihres Sklerosegrades untersucht.

Tafel 1 Histopathologische Veränderungen bei Hippokampussklerose

(Schnittdicke 30µm
Cresylviolett-Färbung)

A, B: Übersichtsaufnahmen einer sklerotischen (**A**) und einer nicht-sklerotischen Gewebeprobe (**B**).

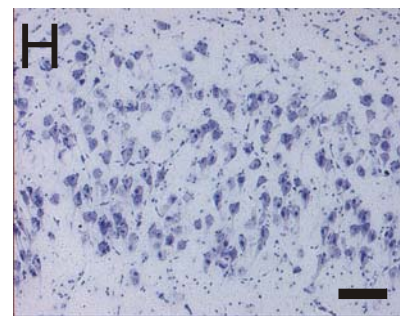
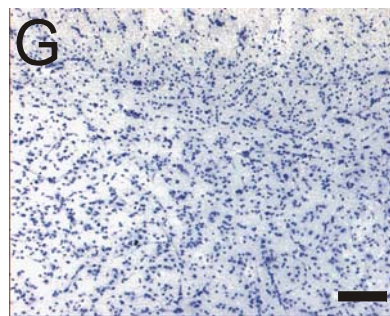
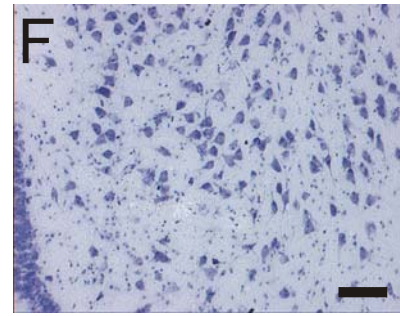
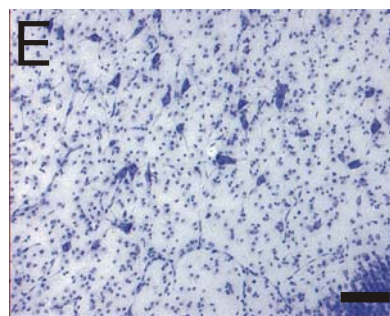
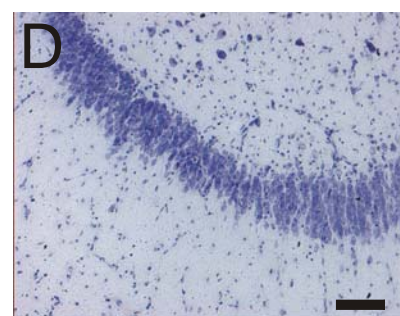
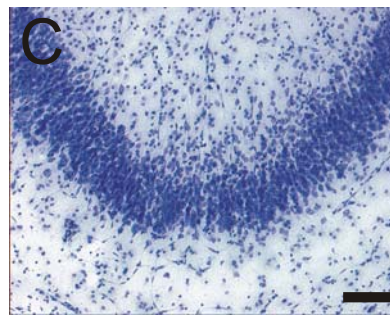
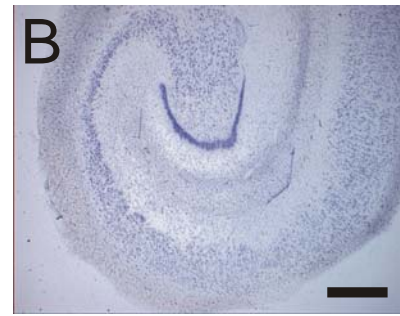
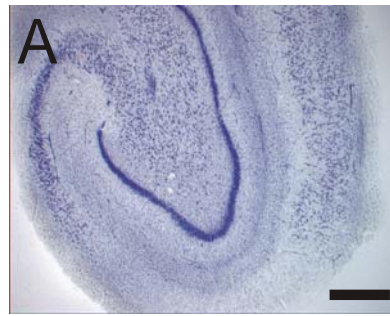
C, D: Gyrus dentatus mit Körnerzelldispersion im sklerotischen Hippokampus (**C**) im Vergleich zum nicht-sklerotischen Gewebe (**D**).

E, F: Im Hilus zeigen sich ein Nervenzellverlust und eine Zunahme glialer Zellen im sklerotischen Gewebe (**E**) gegenüber dem nicht-sklerotischen Gewebe (**F**).

G, H: Nervenzellverlust und reaktives Auftreten von Astrozyten in der Region CA 1 bei Hippokampussklerose (**G**).

In der nicht-sklerotischen Probe (**H**) findet sich ein aufgelockertes Zellband mit wenig Astrozyten.

Maßstab in **A** und **B**: 1 mm; in **C-H**: 100µm.



3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Antikörper

Für den Nachweis der MDT kamen gut beschriebene monoklonale Antikörper (mAK) zur Anwendung. Die Verwendung monoklonaler Antikörper, die jeweils nur gegen eine Antigen-Bindungsstelle (Epitop) gerichtet sind, erfolgt unter der Annahme, dass damit eine hohe Spezifität der Färbung erzielt und falsch positive Ergebnisse minimiert werden. Die wichtigsten Merkmale der verwendeten Antikörper (AK) sind in Tabelle II zusammengefasst. In einer breit angelegten Untersuchung verglich die Gruppe um Scheffer die Detektion von u.a. MRP1, MRP2, MRP5 und Pgp mit jeweils verschiedenen mAK (49). Zudem stellten sie die Reaktivitäten der mAK für verschiedene Anwendungen (u.a. in Gefrierschnitten, Paraffinschnitten, Western Blots) und in Geweben von verschiedenen Spezies (u.a. humanes Gewebe, Maus, Ratte) gegenüber. Dabei zeigten sich für JSB-1 (anti-ABCB1 human MAb), MRPr1 (anti-ABCC1 MAb), M²III-6 (anti-ABCC2 MAb) und M51-1 (anti-ABCC5 MAb) jeweils eine sehr gute Reaktivität in Gefrierschnitten und in humanen Schnitten (M²III-6 mit guter Reaktivität in humanen Schnitten). Bezüglich des immunhistochemischen Nachweises von MVP konnte gezeigt werden, dass der Ratten-mAK LMR-5 in Gefrierschnitten eine sehr gute Reaktivität zeigt (50).

Alle in dieser Untersuchung verwendeten monoklonalen Antikörper (siehe Tabelle II) erkennen zytoplasmatisch gelegene Epitope des jeweiligen Transportproteins. Es ist anzumerken, dass durch die Erkennung eines zytoplasmatischen Epitops eine Färbereaktion nach Applikation des fluoreszierenden Sekundär-AK bzw. des DAB auch im Zytoplasma zu lokalisieren ist, trotz Lokalisation der MDR-Proteine Pgp, MRP1, MRP2 und MRP5 in der Zellmembran. Bei dem verwendeten Zweitantikörper handelt es sich um einen biotinylierten anti-mouse- bzw. anti-rat-Antikörper (Vector Laboratories), der jeweils in einer Konzentration von 1:200 appliziert wurde.

Für die Doppel-Fluoreszenz-Färbungen kommen als Primär-AK die zelltyp-spezifischen Antikörper anti-GFAP (polyclonal-rabbit, DAKO Cytomation, Glostrup/Dänemark 1:250) und anti-NeuN (mouse, biotinyliert, Chemicon International, 1:100) zum Einsatz. Das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) ist Bestandteil des Zytoskeletts reifer Astrozyten im humanen ZNS und der spezifischste Marker für Zellen astrozytären Ursprungs. Das neuronenspezifische nukläre Protein NeuN (Neuronal Nuclei) ist Bestandteil postmitotischer Nervenzellen im murinen und humanen ZNS und PNS. Als Sekundär-AK werden Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- bzw. Cyanine3 (Cy3)-konjugierte fluoreszierende

Antikörper (1:200, Jackson-ImmunoResearch, FITC: anti-mouse IgG1, anti-rabbit IgG; Cy3: anti-mouse IgG2a, anti-rat IgG, anti-mouse IgG) eingesetzt.

Tabelle II: Übersicht über die eingesetzten monoklonalen Antikörper.

Die Nummerierung der Referenzangaben entspricht der Nummerierung im Literaturverzeichnis.

Protein	Antikörper	Typ	Kreuzreaktivität	Hersteller	Verdünnung	Referenz
Pgp	JSB - 1	Mouse IgG1	Keine mit murinem Pgp	Alexis Biochemicals	1 : 50	13, 18, 29
MRP1	MRPr1	Rat IgG2a	Keine mit humanem MRP2, MRP5 und Pgp	Alexis Biochemicals	1 : 20	16, 28, 29, 51
MRP2	M ² III - 6	Mouse IgG2a	Keine mit humanem Pgp, MRP1 und MRP5	Alexis Biochemicals	1 : 50	18, 24
MRP5	M51-1	Rat IgG2a	Keine mit humanem Pgp, MRP1 und MRP2	DCS/Signet, Hamburg	1 : 20	24, 51
MVP	LMR5	Rat IgG	Keine Angabe	DCS/Signet, Hamburg	1 : 20	52

3.2.2 Färbeprotokoll Einfachfärbung

Nach mindestens 24 Stunden in 4 %iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung werden die 500 µm dicken Schnitte in Sacharose-Lösung (30 % in 0,1M PB) überführt. Der Nachweis der ATP-abhängigen Transportproteine erfolgt in 10 µm dünnen Gefrierschnitten, die mit einem Kryostaten (Leica, Jung CM 1800) angefertigt werden.

Je 3 Schnitte (alle vom selben Block) werden auf einen Superfrost-Objektträger (Thomas Geyer/Berlin) aufgezogen. Eine Fixierung nach dem Schneiden und Aufziehen erfolgt nicht, da auf diese Weise eine bessere Erhaltung des Antigens garantiert ist. Die Färbungen erfolgen erst, nachdem die Schnitte auf den Objektträgern 24 Stunden bei 4°C getrocknet wurden und orientieren sich an im Institut für Neurophysiologie erprobten Standardprotokollen, die nach in der Literatur beschriebenen Färbeprotokollen für den immunhistochemischen Nachweis von MDT (18, 29, 39) modifiziert wurden.

Zudem erfolgten Cresylviolett-Färbungen aller Schnittserien, um die oben erwähnte Wyler-Graduierung vorzunehmen. Eine Negativkontrolle wurde für alle Schnitte der untersuchten Patientenproben parallel angefertigt, indem statt des Primär-AK ein gleiches Volumen an Normal Goat Serum (NGS) appliziert wurde und der übrige Färbegang dem beschriebenen Standardprotokoll folgte. Die Objektträger wurden in einer 0,1M Phosphat-Buffer (PB) -Lösung (pH 7,4) 4mal für je 10 Minuten gewaschen, anschließend in einer 0,3 %igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um die gewebeeigene Endoperoxidase zu inaktivieren. Nach erneutem Waschen erfolgt die Zugabe von 10 %iger Normal Goat Serum (NGS)-Lösung (in 0,1M PB, pH 7,4), um freie reaktive Gruppen im Gewebe abzusättigen und damit falsch positive Reaktionen zu minimieren. Einem ähnlichen Zweck dient die Zugabe von Bovine Serum Albumine (BSA = Rinderserumalbumin, Vector Laboratories) zu den jeweiligen Inkubationslösungen. Der Primär-AK wird in einer Lösung mit NGS (10 %), Triton X-100 (0,3 %), BSA und 0,1M PB für 24 Stunden bei 4°C appliziert. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1M PB und dem Auftragen des biotinylierten Sekundär-AK für 1 Stunde bei Raumtemperatur werden die Schnitte 3mal für je 10 Minuten mit 5mM Tris-HCl gewaschen. Im Anschluss erfolgt mithilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase Methode (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA/USA) und Diaminobenzidin (DAB Substrate Kit für Peroxidase; Vector Laboratories) als Farbstoff die Entwicklung des Färbeergebnisses. DAB ergibt eine braune, sehr haltbare Färbung und ist daher für diese Art der seriellen Untersuchung gut geeignet. Die Vorbereitung und Verwendung der in den Kits enthaltenen Reagenzien erfolgte laut Herstellerangaben. Je ein Schnitt pro Objektträger wird mit Hematoxylin (Vector Hematoxylin Nuclear Counterstain, Vector Laboratories) gegengefärbt, nachdem die DAB-Entwicklung mit Leitungswasser gestoppt worden ist. Versuche, das Färbeergebnis mit DAB-Enhancing-Solution (Vector Laboratories) bzw. Nickelzugabe (Vector Laboratories) zu intensivieren, führten zu einer verstärkten Hintergrundfärbung mit schlechterem Kontrast und wurden daher aufgegeben. Nach Durchlaufen der Alkoholreihe aufwärts zur Dehydratation (70 %, 90 %, 96 %, 100 %) werden die Objektträger mit einem handelsüblichen Schnelleinschlussmittel (Depex) eingedeckt.

Einige Autoren empfehlen zur besseren Erkennung des Antigens durch den Primär-AK eine Vorbehandlung des Gewebes mit einem Essigsäure-Ethanol-Gemisch bei -20°C (53) oder Erhitzen der Schnitte (18, 29). Im Rahmen meiner Untersuchungen erbrachten diese Methoden im humanen Gewebe für keinen der Antikörper verbesserte Immunreaktivität bei schlechterer morphologischer Beurteilbarkeit, so dass keine Art der Vorbehandlung erfolgte.

3.2.3 Färbeprotokoll Doppelfärbung

Ergänzend zu den seriell durchgeführten Einfachfärbungen wurden für einzelne repräsentative Hippokampus- und Kortex-Proben Doppelfärbungen mit fluoreszierenden Farbstoffen angefertigt. Die Arbeitsschritte folgen dem oben erläuterten Standardprotokoll, jedoch werden jeweils 2 Primär- und Sekundär-AK in unterschiedlichen Kombinationen parallel aufgetragen (18, 29, 39). Damit sollen Ko-Lokalisationen von Transportproteinen und bestimmten Gewebemarkern sichtbar gemacht und damit die Expression eines jeweiligen Transportproteins eindeutig einem Zelltyp zugeordnet werden.

Als zelltypspezifische Antikörper kommen die im Kapitel 3.2.1 beschriebenen anti-GFAP und anti-NeuN zum Einsatz, die als Primär-AK jeweils in Kombination mit allen 5 oben beschriebenen Primär-AK für die Transportproteine aufgetragen werden. Als Sekundär-AK werden Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- bzw. Cyanine3 (Cy3)-konjugierte fluoreszierende Antikörper eingesetzt, d.h. jeweils ein FITC- und ein Cy3-konjugierter Sekundär-AK, um später am konfokalen Mikroskop grün und rot fluoreszierende immunreaktive Zellen im selben Hirnschnitt beobachten zu können. Die Objektträger werden nach Abschluss der Färbung mit einem nichtfluoreszierenden Medium eingedeckt (Citifluor AF-1, W. Planet GmbH, Deutschland).

3.3 Auswertung der Färbungen

3.3.1 Identifikation von Regionen und Zellen mit dem Mikroskop

Da die Expression der MDT in verschiedenen Regionen und Zelltypen beider untersuchter Gewebe erfolgen soll, müssen vor der Quantifizierung der Immunreaktivität Richtlinien für die Abgrenzung der Regionen und Zelltypen definiert werden. Die Identifizierung der Regionen des Hippokampus (Tafel 2; Abb. B) folgt den Beschreibungen von Duvernoy (54) sowie Lorente de No (55), wonach im Cornu ammonis (CA) 4 Felder unterschieden werden können, deren Hauptunterscheidungsmerkmal die Form und Ausrichtung bzw. Anordnung der Nervenzellen im Stratum pyramidale ist. Demnach sind die Somata der Nervenzellen in CA1 klein und verstreut liegend (Tafel 2; Abb. G), die Anordnung der Nervenzellen der gesamten Region CA1 präsentiert sich im humanen Hippokampus aufgelockert. Die Abgrenzung zu CA2 (Tafel 2; Abb. F) ist sehr scharf, denn

Tafel 2 Regionen des Hippokampus

(nicht-sklerotische Gewebeprobe; Schnittdicke 30µm; Cresylviolett-Färbung)

A, B:

Übersichtsaufnahmen:
In Abb. **B** sind die Regionen mit den im Text verwendeten Abkürzungen gekennzeichnet.

C-H: Die 6 Regionen in Vergrößerungsaufnahmen:

C: Gyrus dentatus (GD) mit Körnerzellen

D: Hilus (HIL)

E-G: Cornu ammonis:

E: CA3-Region (CA3)

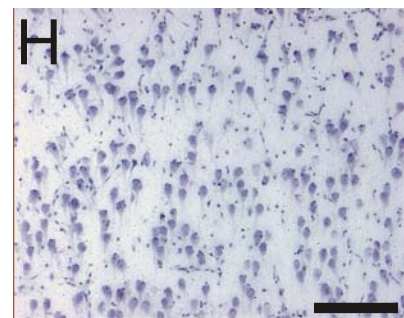
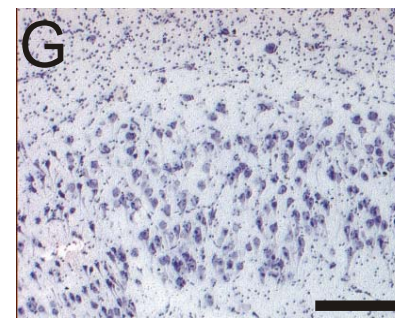
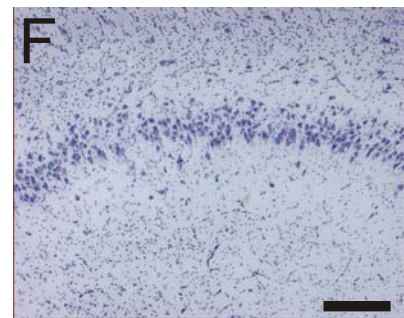
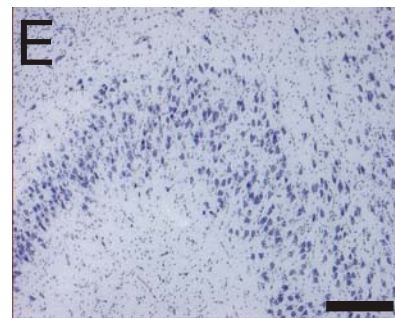
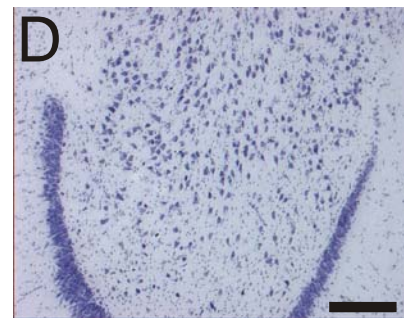
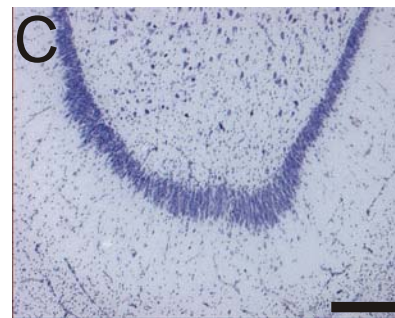
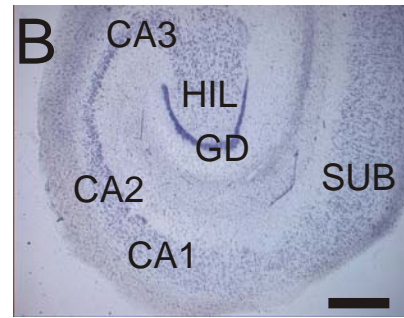
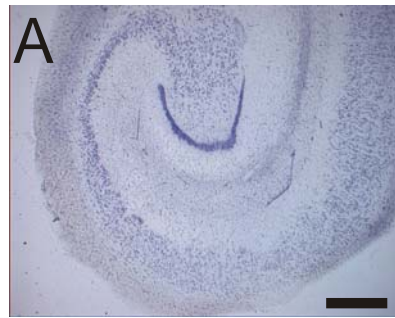
F: CA2-Region (CA2)

G: CA1-Region (CA1)

H: Subiculum (SUB)

Maßstab **A** und **B:** 1mm;

C-H: 0,2 mm.



die Nervenzellen sind hier größer und dicht gepackt, während die Region CA3 (Tafel 2; Abb. E) sich im Knie des Cornu ammonis befindet, wo das Zellband in die Area dentata mündet. CA4 wird in dieser Arbeit als Hilus (Tafel 2; Abb. D) bezeichnet und befindet sich innerhalb der Konkavität des Gyrus dentatus (GD). Die Nervenzellen dieser Region liegen verstreut und sind nicht ausgerichtet, wie die der anderen CA-Regionen. Das Subiculum (Tafel 2; Abb. H) erscheint als Verlängerung der Region CA1, gehört aber anatomisch zum Gyrus parahippocampalis und nicht zum Hippokampus. Dennoch ist auch diese Region im Rahmen der Arbeit auf das Vorhandensein von Transportproteinen untersucht worden, wobei der Fokus dabei auf die sich unmittelbar an die CA1-Region anschließenden Areale gelegt wurde, die auch als Prosubiculum bezeichnet werden. Der Gyrus dentatus (Tafel 2; Abb. C) oder Fascia dentata ist ein 3lagiges Zellband, welches anhand der kleinen, runden, dicht gepackten Zellen des Stratum granulosum leicht identifiziert werden kann und in typischer Weise zu den CA-Regionen angeordnet ist. Beide Zellbänder sind ineinander aufgerollt.

Im Temporalen Kortex wurde das Hauptaugenmerk auf die Schichten II/III (Lamina pyramidalis externa/granularis interna) und V/VI (Lamina pyramidalis interna/ multiformis) gelegt (Tafel 3; Abb. A und B), da sie den Hauptanteil der Nervenzellen enthalten. Nach Gloor (56) befinden sich in Schicht II hauptsächlich kleine und in Schicht III mittelgroße Pyramidenzellen (Tafel 3; Abb. C, E, G), während Schicht V große und Schicht VI atypisch konfigurierte Pyramidenzellen (Tafel 3; Abb. D, F, H) enthält.

Mithilfe eines Mikroskops (Zeiss Axioskop, Zeiss, Oberkochen/Deutschland, Objektiv 20x) und einer angeschlossenen Kamera (DX 30, Kappa Optoelectronics, Gleichen/Deutschland) werden digitale Aufnahmen der zu untersuchenden Subregionen des Hippokampus (Tafel 2; Abb. B) bzw. der zellreichsten Schichten des Neokortex (Laminae II/III und V/VI) mit einem 20x-Objektiv angefertigt und als TIF (tagged image file) - Dateien gespeichert. Im gleichen Aufnahmemodus wird jeweils das Objektmikrometer aufgenommen und der resultierende Maßstab sofort in das digitale Bild eingefügt, so dass trotz Differenz zwischen Bildschirm- und Kameradiagonale die Größe der Zellen und die Areale in denen gezählt wird anhand des Maßstabes eindeutig zu bestimmen sind.

Unter Berücksichtigung der Fragestellung nach ektopen und hier vor allem neuronaler Expression von Transportproteinen erfolgte im Cornu ammonis nach unten beschriebenen Modus die Anfertigung repräsentativer Aufnahmen des Stratum pyramidale und im Gyrus dentatus des Stratum granulosum.

**Tafel 3 Schichten des
Temporalen Kortex**

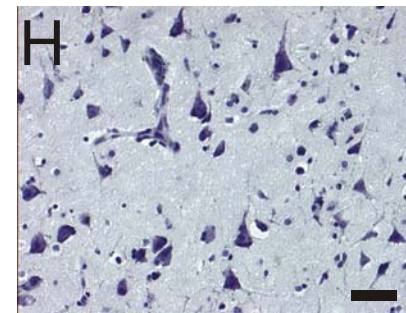
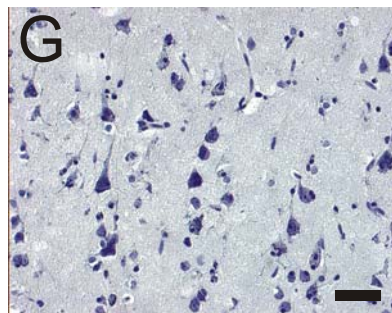
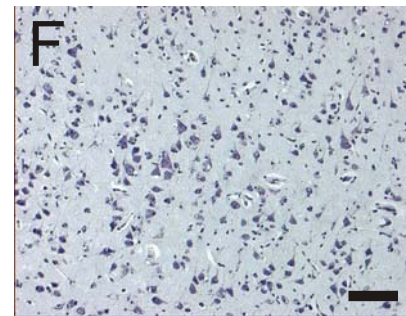
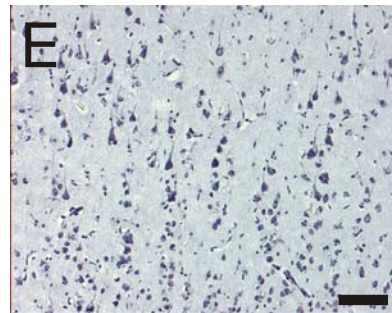
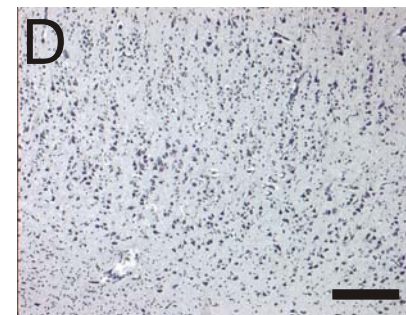
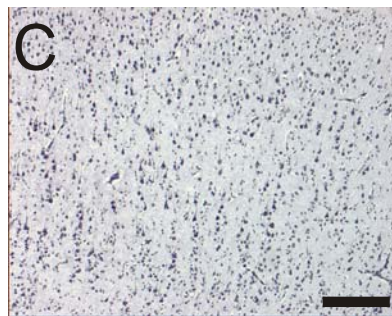
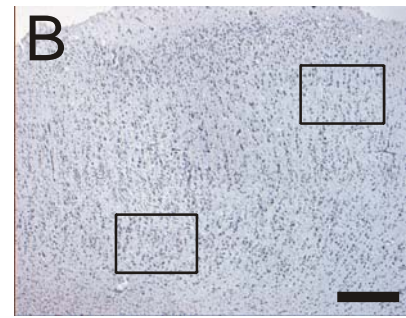
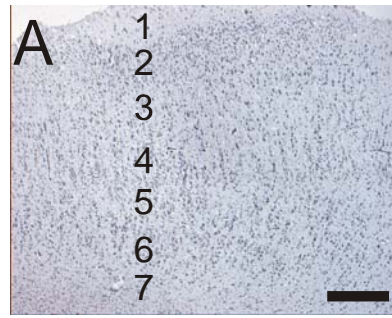
(Schnittdicke 10µm;
Cresylviolett-Färbungen)

A, B: Übersichtsaufnahmen
zur Verdeutlichung der 6
Schichten des Neokortex
(**1-6** in **A**). Zudem ist die
Rinden-Mark-Grenze
(**7** in **A**) zu erkennen.

- 1** - Lamina molecularis
- 2** - Lam. granularis externa
- 3** - Lam. pyramidalis ext.
- 4** - Lam. granularis interna
- 5** - Lam. pyramidalis int.
- 6** - Lam. multiformis

Die Bildausschnitte in
Abb. **B** sind in den
folgenden Abbildungen
vergrößert dargestellt und
stellen die in der
quantitativen Auswertung
berücksichtigten
Laminae II/III (**C, E, G**)
und V/VI (**D, F, H**) dar.
Deutlich erkennt man die
Pyramiden- bzw.
Körnerzellen, die den
Schichten ihren Namen
geben.

Maßstab **A, B:** 0,5 mm;
C, D: 0,2 mm;
E, F: 100 µm;
G, H: 50µm.



Die Identifizierung der verschiedenen Zelltypen erfolgt nach morphologischen Kriterien, wie sie unter anderem von van Paesschen definiert und angewendet wurden (57): Ein Neuron ist eine große Zelle (im Mittel Durchmesser von 20 μm), die einen Nukleus besitzt und in den Regionen CA1 bis CA3 eine Pyramidenform aufweist und im Hilus dreieckig ist. Die Körnerzellen sind im Stratum granulosum des Gyrus dentatus lokalisiert und von kleiner (5-8 μm) und runder Gestalt. Astrozyten sind kleine Zellen (8-10 μm) mit einem Nukleus. Ihre sternförmige Konfiguration ist nur in den GFAP-Färbungen auszumachen.

Die Aufnahmen der Doppelfärbungen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop (Leica DM2500, Single-Photon-Laser, Detektionsbereich 430-750 nm, Leica Microsystems, Wetzlar/Deutschland) durchgeführt. Verwendung fand ein 63x-Objektiv (Öl-Immersion), der entsprechende Maßstab wurde über eine Bildbearbeitungssoftware (LCS, Leica Confocal Software, Leica Microsystems) unmittelbar nach Entstehen der Aufnahme eingefügt. Für die Färbungen mit FITC wurde Licht mit einem Exzitationsspektrum von 450-490 nm, für Cy3-Färbungen mit 515-560 nm verwendet. Aufgrund der begrenzten Haltbarkeit der Präparate und Färbeergebnisse erfolgte keine quantitative Erfassung, sondern ergänzend zu den Daten der seriellen Untersuchungen mit DAB-Färbungen eine Aussage über das Vorliegen oben beschriebener Ko-Lokalisationen, die jeweils in Kontext zu den Einfachfärbungen und deren Aussagen hinsichtlich zellulärer Expression gesetzt wurden.

3.3.2 Quantitative Analyse

Die quantitative Auswertung erfolgt mithilfe eines speziellen Zell-Zähl-Programms (Kappa Image Metro Software, Kappa Optoelectronics) basierend auf den DAB-Einfachfärbungen. Der Zählmodus folgt den Kriterien von West und Gundersen (58). Dazu wird ein repräsentatives Bild einer jeden Region des Hippokampus bzw. Schicht des Temporalen Kortex ausgewählt und ein Gitter aus 10 Kästchen mit einer Seitenlänge von 100 μm pro Kästchen platziert. Die Platzierung des Gitters erfolgt hierbei zufällig in der ausgewählten Region. Es werden 10 Kästchen gezählt und die Mittelwerte gebildet, um Fehler durch Schwankungen mit zellärmeren und zell dichteren Arealen zu vermeiden. Zudem erfolgte die Zählung in Unkenntnis der Wyler-Graduierung, um systematische Fehler zu vermeiden. Zellen, die die untere oder rechte Kante des Kästchens berühren, werden in der Zählung nicht berücksichtigt.

Die Ermittlung der Expressionsraten der untersuchten Transportproteine erfolgt über das Erstellen des Quotienten aus immunreaktiven Zellen zur totalen Zellzahl in der jeweiligen Subregion des Hippokampus bzw. kortikalen Zellschicht. Auf diese Weise ist eine

Vergleichbarkeit der Expressionsdaten aller Gewebeproben unabhängig von deren Wylgrad sichergestellt. Es werden die totalen Zellzahlen für eine Fläche von 0,01 mm² (100 x 100 µm) pro untersuchte Region ermittelt und nach Abercrombie (59) korrigiert, um keine falsch hohen Zelldichten durch angeschnittene Zellen im jeweils betrachteten Bildausschnitt zu erhalten. Die Korrektur erfolgte nach der Formel: $N = n [t / (t + d)]$ (60), wobei t die Schnittdicke (10 µm), n die Anzahl gezählter Zellen und d der Durchmesser des Referenzkörpers ist (Nervenzelle 20 µm, Astrozyt 10 µm, Körnerzelle 8 µm).

Um eine Einheitlichkeit und Vergleichbarkeit mit den Angaben in der Literatur zu hippokampalen und kortikalen Zellzahlen zu erreichen, wurde ausgehend von der korrigierten Zellzahl pro 0,01 mm² Fläche und der Schnittdicke von 0,01 mm (10 µm) die Zellzahl im Volumen 0,0001 mm³ errechnet und als Zelldichte (Anzahl Zellen pro 1 mm³) angegeben. Die ermittelten totalen Zellzahlen werden allerdings in der folgenden Darstellung der Ergebnisse nur insofern aufgeführt, wie sie zur Beantwortung der Fragestellung relevant sind, so z.B. zur Abgrenzung der sklerotischen von den nicht-sklerotischen Hippokampus-Stichproben.

Als immunreaktiv werden Zellen gewertet, die sowohl in den nicht gegengefärbten Schnitten wie auch in den Hematoxylin-gefärbten Schnitten eine deutliche braune Färbung im Zytoplasma (MVP) oder der Zellmembran (Pgp, MRP1, MRP2, MRP5) aufweisen. Da es sich bei den verwendeten Antikörpern um solche handelt, die zytoplasmatische Epitope erkennen, ist eine Färbung der Zellen auch für die transmembranös lokalisierten Transportproteine (Pgp, MRP1, MRP2, MRP5) als positive Immunreaktivität zu werten.

Ergänzend ist zu sagen, dass in manchen Fällen eine Entscheidung hinsichtlich einer Immunreaktivität schwer zu treffen war. In diesen Fällen wurde immer die Intensität der Hintergrundfärbungen in Betracht gezogen und Immunpositivität nur dann angenommen, wenn eine deutliche Differenz zwischen potentiell immunreaktiver Zelle und Hintergrund zu beobachten war.

3.4 Statistik

Für jedes Transportprotein und jede Gewebeprobe werden die Mittelwerte für immunpositive Zellen und Gesamtzellzahl aus 3 Vergleichsschnitten, die mit einem identischen Färbeprotokoll behandelt werden, gebildet. Die statistische Auswertung erfolgt mit der SPSS-Software Version 12.0.1 (SPSS, Chicago, IL).

Neben Mittelwertvergleichen mittels univariater ANOVA und parametrischen Tests wurden, da es sich um kleine Stichproben handelt und demnach eine Normalverteilung nicht

garantiert werden kann, im Anschluss nicht-parametrische Tests durchgeführt und deren Ergebnisse im Ergebnisteil angeführt. Dabei kam für den Vergleich unabhängiger Stichproben der Mann-Whitney-U-Test und bei der Gegenüberstellung von zwei verbundenen Stichproben der Wilcoxon-Test zur Anwendung. Für die Untersuchung eines statistischen Zusammenhangs mehrerer unabhängiger Variablen wurde der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt, handelte es sich um verbundene Variablen wurde der Friedman-Test gewählt.

Für die Untersuchung statistischer Zusammenhänge zwischen Expressionsdaten und klinischen Daten wurden diese metrisch skalierten Daten miteinander korreliert. Aufgrund der kleinen Größe der Stichprobe wurde der Rangkorrelationskoeffizient Spearman-Rho für die Berechnung und Angabe signifikanter Korrelationen im Ergebnisteil gewählt.

Als statistisch signifikant wird jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ angesehen. Im Ergebnisteil werden die Signifikanzen der nicht-parametrischen Tests angegeben. Signifikanzen auf dem Niveau von $p < 0.05$ werden in den graphischen Abbildungen mit einem Stern, $p < 0.01$ mit zwei Sternen und $p < 0.001$ mit drei Sternen gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

In der folgenden Darstellung der Ergebnisse werden für die Regionen des Hippokampus und die jeweiligen Transportproteine die schon in der Einleitung eingeführten Abkürzungen verwendet. Sofern von den Transportproteinen allgemein die Rede ist, werden diese als MDT (= Multidrug-Transportproteine) abgekürzt. Die Gliederung der Ergebnisdarstellung orientiert sich an den im Kapitel 2 formulierten Fragen.

4.1 MDT-Immunreaktivität im Hippokampus mit Berücksichtigung zellulärer und regionaler Differenzen

4.1.1 Qualitative Beschreibung der immunhistochemisch erhobenen Befunde im Hippokampus

Die 5 Transportproteine wurden immunhistochemisch in Neuronen und Astrozyten in hippokampalen Hirnschnitten nachgewiesen, wie die Tafeln 5-10 beispielhaft zeigen. Der qualitativen Beschreibung der Expression der MDT soll eine Darstellung der Negativkontrollen (Tafel 4) vorangestellt werden, in der die 6 Regionen (Tafel 4; Abb. A-G) sowie ein Gefäß des Hippokampus (Tafel 4; Abb. H) dargestellt sind. Es sind keine Immunpräzipitate, d.h. Anteile brauner Farbe als Reaktion mit dem DAB sichtbar. MRP1 konnte sowohl in Nervenzellen (Tafel 5) als auch Astrozyten (Tafel 6) des humanen Hippokampus nachgewiesen werden. Die Körnerzellen des GD (Tafel 5; Abb. A, C, E) zeigten nur selten MRP1-positive Neurone. In den anderen Regionen, wie z.B. CA1 (Tafel 5; Abb. B) oder Hilus (Tafel 5; Abb. D, F) stellten sich MRP1-positive Pyramidenzellen dar. Eine neuronale Immunreaktivität war mithilfe verschiedener Färbemethoden verifizierbar, sowohl in DAB/HE - (Tafel 5; Abb. B) und DAB-Färbungen (Tafel 5; Abb. D) als auch nach Applikation von fluoreszierenden Farbstoffen (Tafel 5; Abb. F).

Eine Immunreaktivität in Gliazellen war in parenchymatösen (Tafel 6; Abb. A) und perivaskulären Astrozyten (Tafel 6; Abb. C) ersichtlich. Da die astrozytären Fortsätze bis an die Endothelzellen heranreichen, wie die GFAP-Fluoreszenz-Färbung zeigt (Tafel 6; Abb. E), wäre ein Vorhandensein von MDT in diesen perivaskulären Astrozyten (Tafel 6; Abb. C) mit dem Wissen um die alterierte Blut-Hirn-Schranke bei Epilepsie (21, 22) für die Pharmakoresistenzentwicklung im epileptischen Gewebe von Bedeutung.

Tafel 4 Negativkontrollen im Hippokampus

(Schnittdicke 10 μ m)

A-D: Verschiedene Regionen des Hippokampus, die mit dem biotinylierten Maus-Zweitantikörper und DAB behandelt und mit HE gegengefärbt wurden. Ein Labeling ist in keinem der Beispiele zu erkennen.

A: Gyrus dentatus

B: Hilus

C: CA2-Region

D: Subiculum

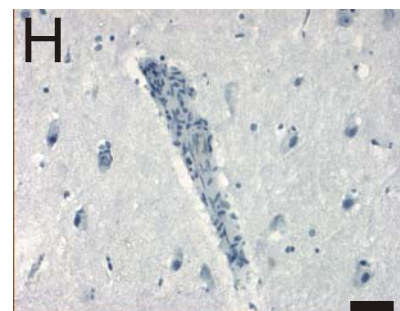
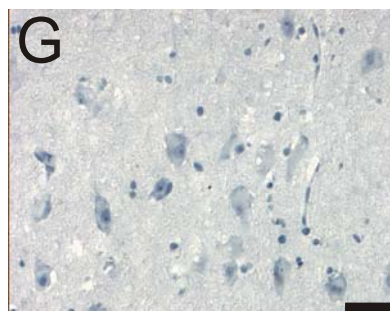
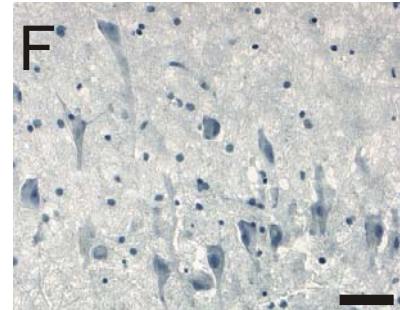
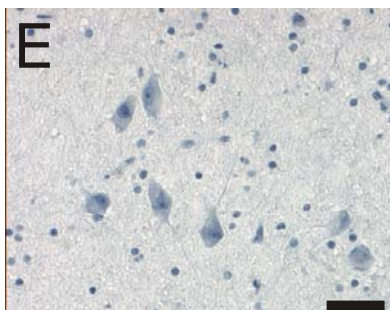
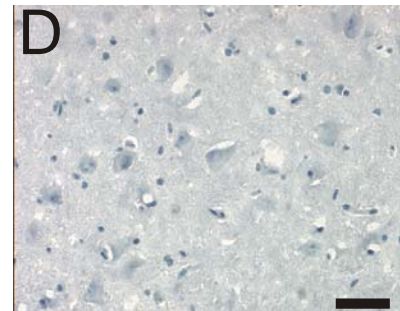
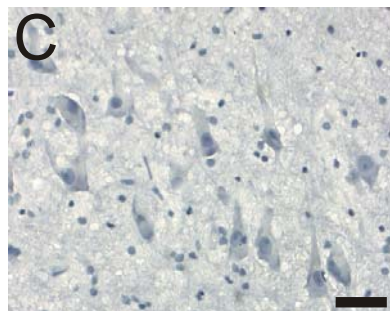
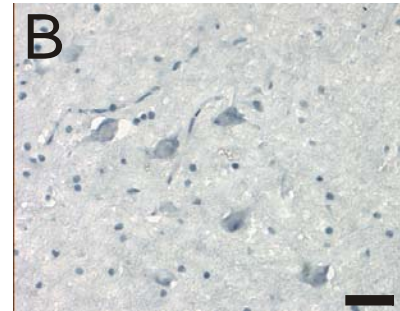
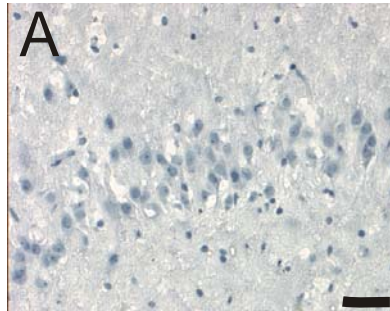
E-H: Beispiele für Färbungen mit dem biotinylierten Ratten-Zweitantikörper ohne Applikation des Primär-Antikörpers. Eine Immunreaktivität findet sich nicht. Auch diese Schnitte sind mit HE gegengefärbt, weil sonst keine zellulären Strukturen zu erkennen wären.

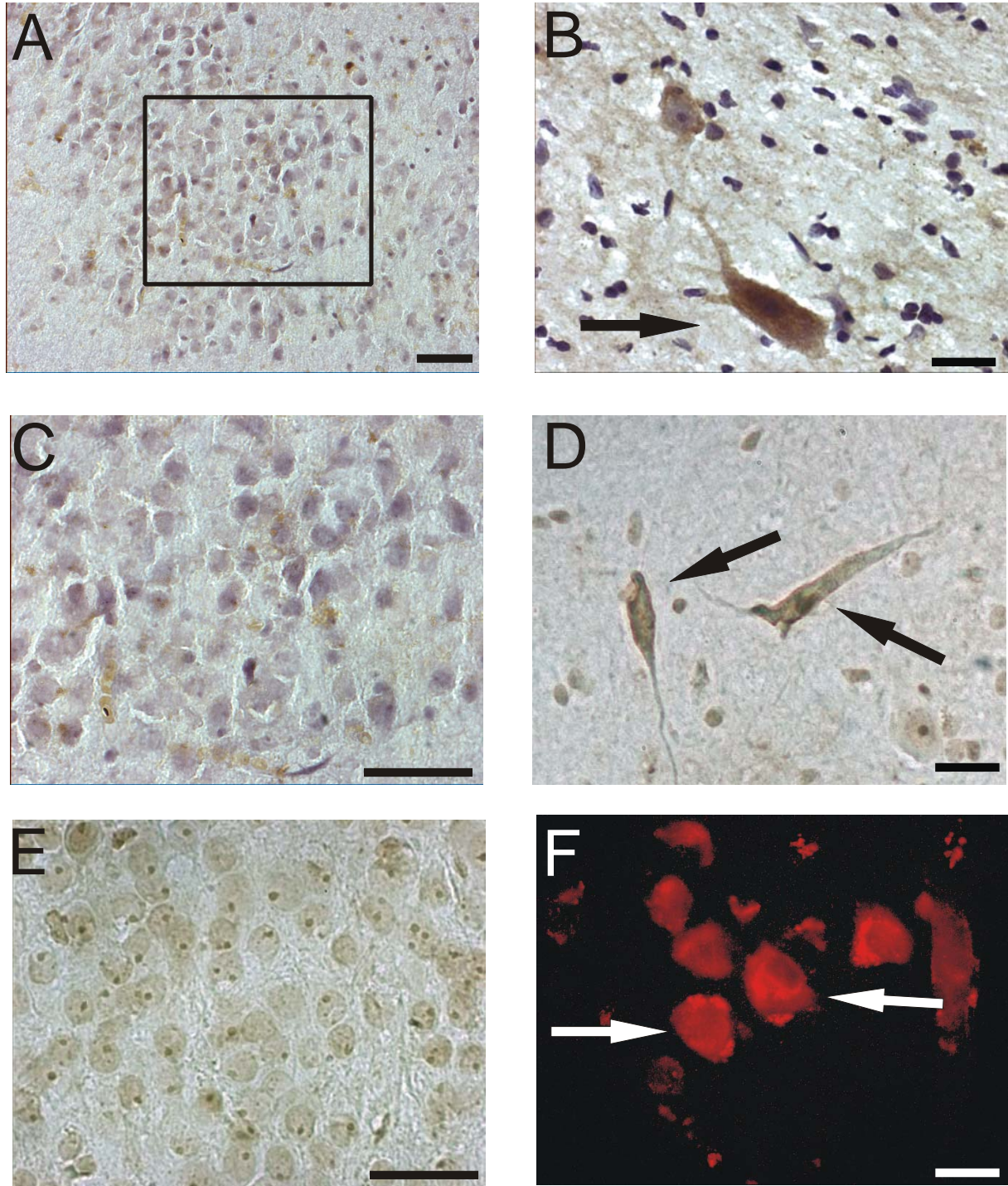
E: Hilus

F: CA2-Region

G: Subiculum

H: Gefäß im Subiculum
Maßstab in **A-H:** 50 μ m.



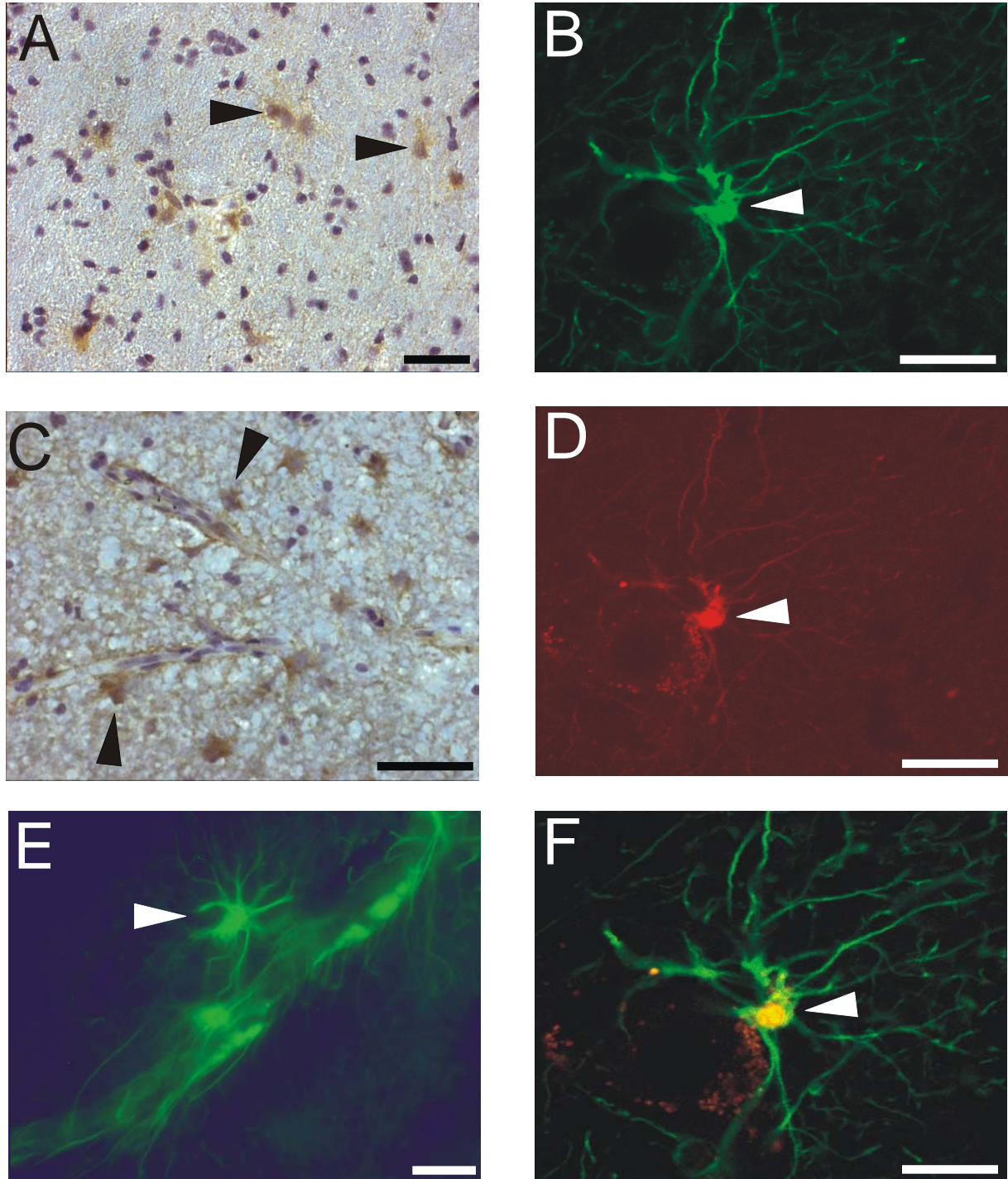


Tafel 5 Die Expression von MRP1 in den Neuronen des Hippokampus

(Schnittdicke 10 μ m; A-F: nHS)

A, C, E: Die Körnerzellen des GD zeigen keine Immunreaktivität für MRP1 (**A, C** DAB/HE; **E** DAB). Der Bildausschnitt in **A** ist in Abb. **C** vergrößert dargestellt.

B, D, F: Pyramidenzellen (*Pfeile*) verschiedener Regionen sind MRP1-positiv: CA 1-Region (**B** DAB/HE) und Hilus (**D** DAB; **F** Cy3-Einfach-Fluoreszenz-Färbung). Maßstab **A-F**: 30 μ m.



Tafel 6 Astrozytäre Expression von MRP1 im Hippokampus

(Schnittdicke 10µm; A, C, E: nHS; B, D, F: HS)

A, C: MRP1 wird von parenchymatösen (A DAB/HE; Hilus) und perivaskulären Astrozyten (C DAB/HE; Subiculum) exprimiert (Pfeilspitzen). Fortsätze perivaskulärer Astrozyten reichen bis an die Endothelzellen hippocampaler Gefäße heran (E GFAP; grün mit FITC; Subiculum).
B, D, F: Doppel-Fluoreszenz-Färbung mit GFAP (B grün mit FITC) und MRP1 (D rot mit Cy3). In der Bildfusion (F) wird durch die resultierende gelbe Fluoreszenz deutlich, dass eine Ko-Lokalisation von GFAP und MRP1 in diesem hilären Astrozyten vorliegt, während die benachbarte Nervenzelle nur schwach rot fluoresziert.
 Maßstab A, C, E: 30µm; B, D, F: 20µm.

Durch die Doppel-Fluoreszenz-Färbungen kann die Immunreaktivität für MRP1 eindeutig den Zellen glialen Ursprungs zugeordnet werden. Mit grünem Fluoreszenz-Farbstoff werden jeweils die GFAP-enthaltenden Astrozyten (Tafel 6; Abb. B) markiert, während MRP1-exprimierende Strukturen rot fluoreszieren (Tafel 6; Abb. D). Durch die Aufnahme von fusionierten Bildern kann man aus einer resultierenden gelben Fluoreszenz (Tafel 6; Abb. F) auf die Ko-Lokalisation von GFAP und MRP1 schließen.

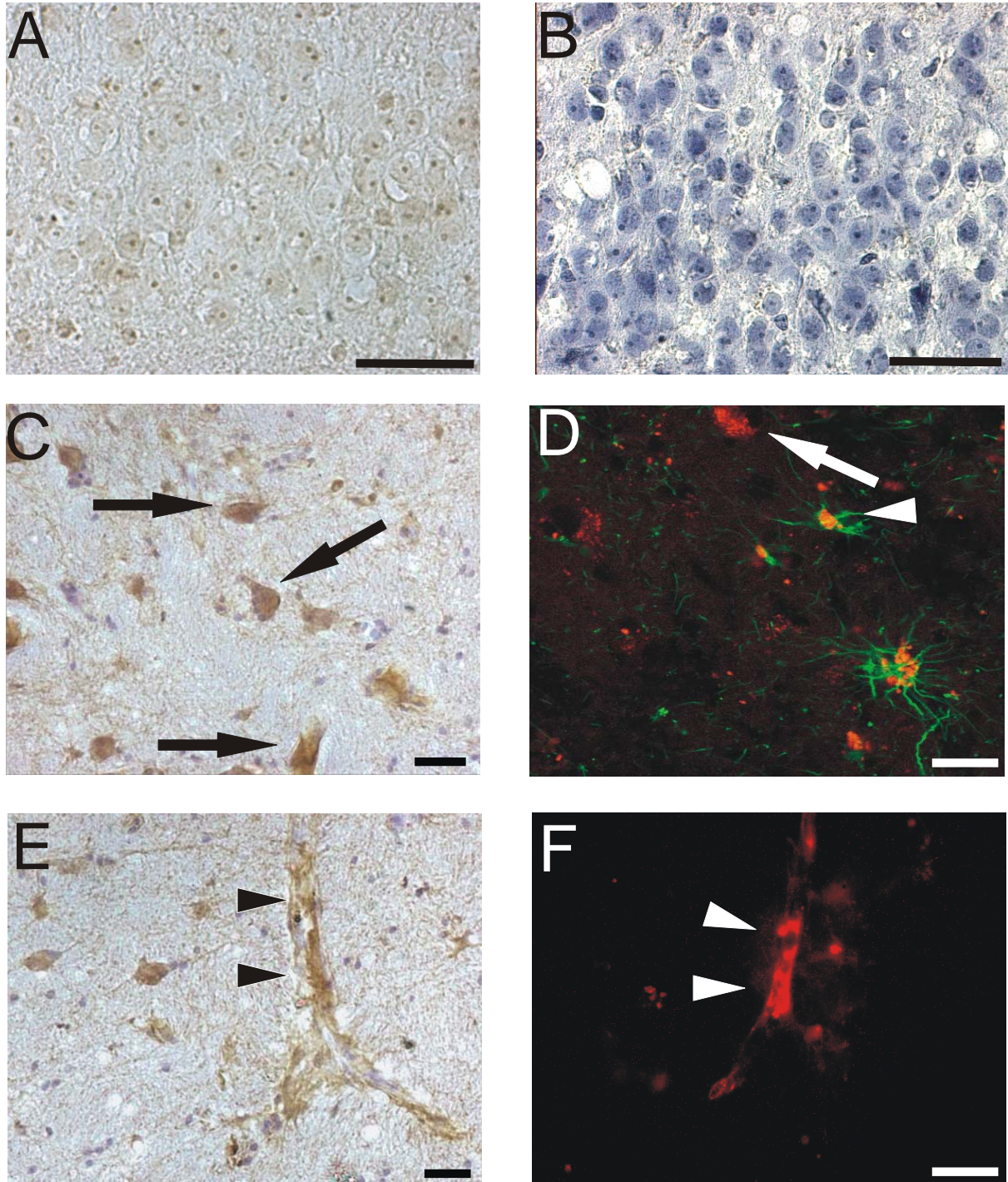
MRP2 fand sich in Nerven- und Gliazellen verschiedener hippocampaler Subregionen, wie CA3 (Tafel 7; Abb. C) und Subiculum (Tafel 7; Abb. D). Erneut konnte in den Körnerzellen eine Immunreaktivität nur zu einem geringen Prozentsatz festgestellt werden (in Tafel 7; Abb. A, B sind keine MRP2-positiven Zellen zu erkennen). Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (18, 19, 32), präsentierten sich die Endothelzellen hippocampaler Gefäße (Tafel 7; Abb. E, F) häufiger immunreaktiv für MRP2 als für andere MDT. Auch Fluoreszenz-Färbungen bestätigten ein Vorkommen von MRP2 in Endothelzellen (Tafel 7; Abb. F) sowie Glia- und Nervenzellen (Tafel 7; Abb. D).

Die Untersuchung der Immunreaktivität für MRP5 offenbarte ein Vorkommen in hippocampalen Pyramidenzellen mit ähnlich hohen Raten an Immunpositivität wie MRP1 und ohne regionale Unterschiede (Tafel 8; Abb. C, D, E). Für die Körnerzellen bestätigte sich der Befund der mangelnden Immunreaktivität auch für MRP5 (Tafel 8; Abb. A, B). In Zellen glialen Ursprungs (nicht dargestellt) und Endothelzellen (Tafel 8; Abb. F) war MRP5 nachweisbar.

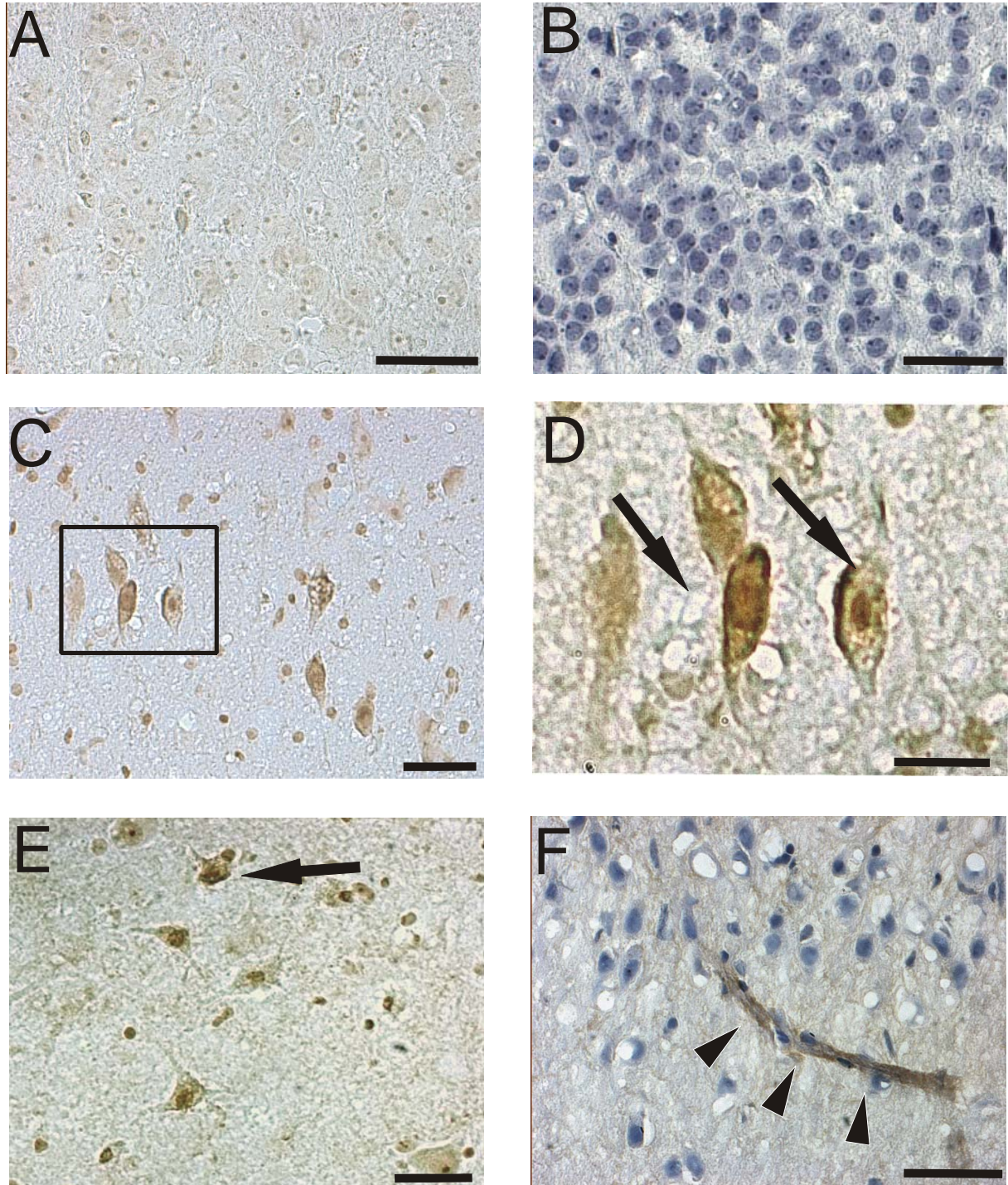
MVP zeigte im Vergleich zu den anderen untersuchten Transportproteinen eine geringere Immunreaktivitätsrate im Hippokampus (Tafel 9; Abb. A, B), fand sich aber auch in Nerven- (Tafel 9; Abb. C, D, F) und Gliazellen verschiedener Regionen, wie CA3 (Tafel 9; Abb. C, D) oder dem Hilus (Tafel 9; Abb. F). Ein Vorkommen von MVP in Endothelzellen (Tafel 9; Abb. E) und Körnerzellen (nicht dargestellt) konnte nicht beobachtet werden.

Eine Pgp-Immunreaktivität wurde in Nervenzellen (Tafel 10; Abb. C) und Astrozyten (Tafel 10; Abb. D) in verschiedenen Regionen des Hippokampus detektiert, ebenfalls unter weitgehender Aussparung der Körnerzellen des Gyrus dentatus (Tafel 10; Abb. A). Die Pyramidenzellen zeigten in den hippocampalen Regionen keine deutlichen Unterschiede des Pgp-Gehalts, aber wie auch für die anderen MDT waren viele Zellen des Hilus (Tafel 10; Abb. B) immunreaktiv. Endothelzellen hippocampaler Gefäße stellten sich in vielen Fällen immunpositiv für Pgp dar (Tafel 10; Abb. E, F).

Tafel 11 enthält eine Zusammenstellung repräsentativer Bilder von Doppel-Fluoreszenz-Färbungen in hippocampalen Gewebeproben. Die Ko-Lokalisation von Gewebemarkern wie GFAP (Gliazellen) und NeuN (Neurone) und MDT-Immunreaktivität zeigt noch einmal deutlich, dass die Expression verschiedener Transportproteine Nervenzellen (Tafel 11; Abb. A, C, E) und Astrozyten (Tafel 11; Abb. B, D, F) zugeordnet werden kann.



Tafel 7 Expression von MRP2 im Hippokampus (Schnittdicke 10 μ m; A-C, E, F: nHS; D: HS)
A, B: Die Körnerzellen des GD zeigen keine Immunreaktivität für MRP2 (**A** DAB; **B** DAB/HE).
C, D: Nervenzellen (*Pfeile*) in anderen Regionen (**C** CA 3, DAB/HE; **D** Subiculum, Doppel-Fluoreszenz mit *GFAP grün* und *MRP2 rot*) sind für MRP2 hingegen positiv gelabelt. In Abb. **D** erkennt man zudem eine Ko-Lokalisation von GFAP und MRP2, also MRP2-exprimierende Astrozyten (*Pfeilspitzen*).
E, F: Endothelzellen (*Pfeilspitzen*) in allen untersuchten Hippokampusproben zeigen regelhaft ein Vorhandensein von MRP2 (**E** DAB/HE; **F** Einfach-Fluoreszenz-Färbung mit Cy3).
 Maßstab **A-F**: 30 μ m.



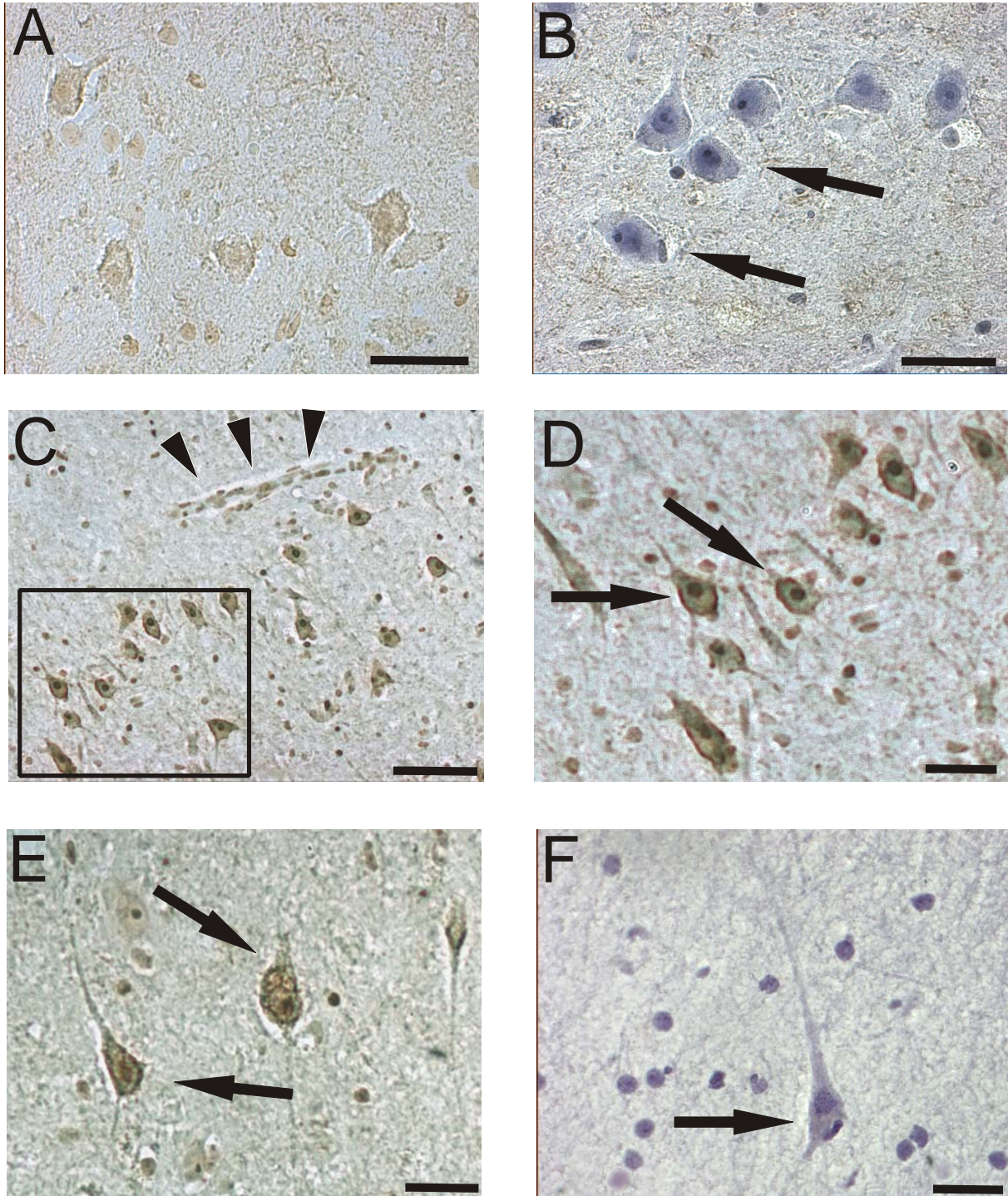
Tafel 8 Expression von MRP5 im Hippokampus

(Schnittdicke 10µm; A, B, E: nHS; C, D, F: HS)

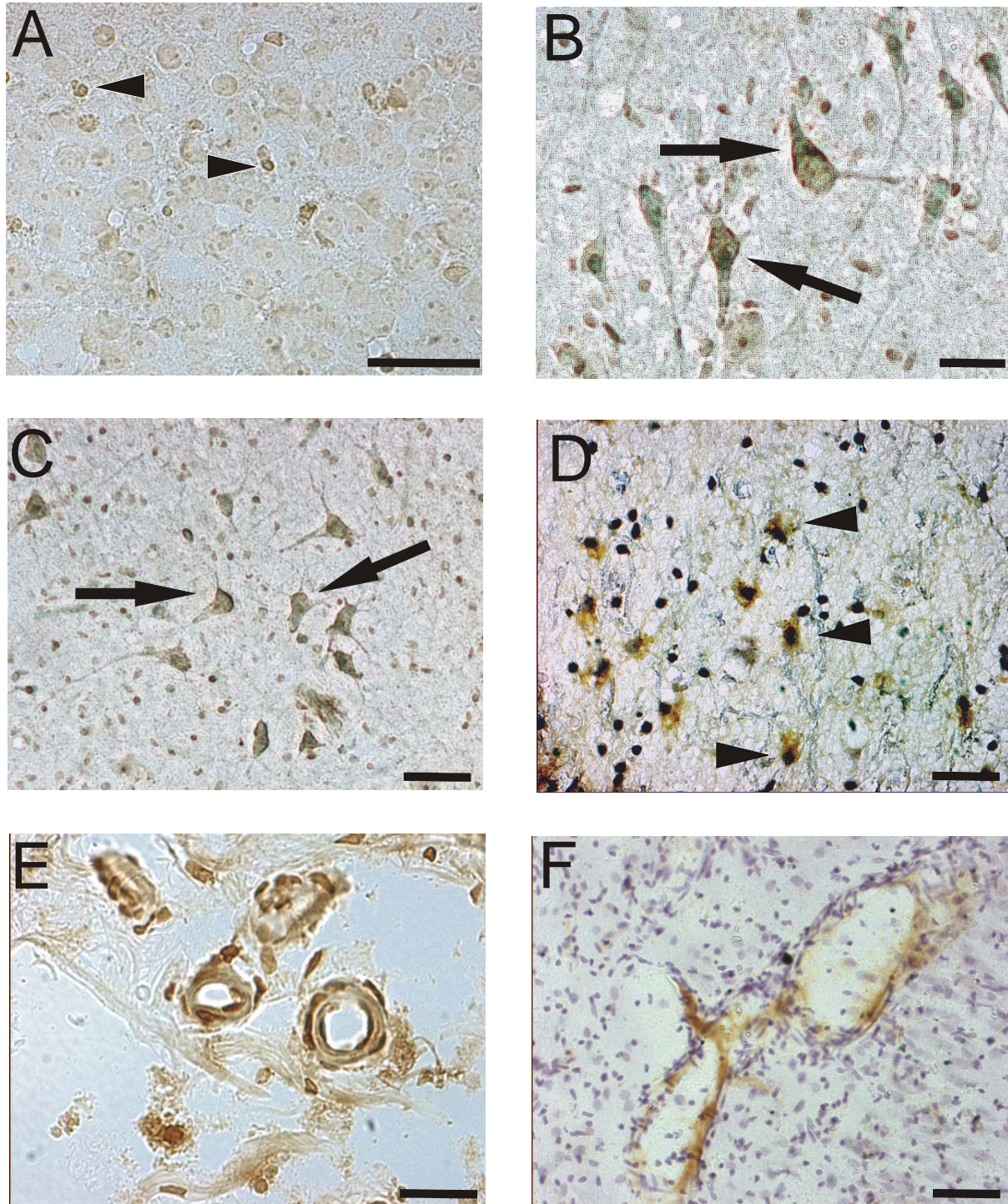
A, B: Die Körnerzellen des GD zeigen keine Immunreaktivität für MRP5 (A DAB; B DAB/HE).
 C-E: Die Neurone (Pfeile) anderer hippocampaler Regionen zeigen jedoch Immunpositivität für MRP5 (C und D CA 2, DAB; E HIL, DAB). Der Bildausschnitt in C ist in Abb. D vergrößert dargestellt.

F: Endothelzellen (Pfeilspitzen) hippocampaler Gefäße weisen ebenfalls MRP5 auf (F HIL DAB/HE).

Maßstab A: 20µm; B, C, E: 50µm; D, F: 30µm.



Tafel 9 Expression von MVP im Hippokampus (Schnittdicke 10 μ m; A-E: nHS, F: HS)
A, B: Die Körnerzellen des GD zeigen keine Immunreaktivität für MVP (nicht dargestellt) genau wie diese Hilusneurone (A DAB; B DAB/HE).
C, D: Die hier abgebildeten Nervenzellen (*Pfeile*) der Region CA 3 sind immunpositiv für MVP (beide DAB), während Endothelzellen (DAB, *Pfeilspitzen*) keine Präsenz von MVP zeigen. Der Bildausschnitt in C ist in Abb. D vergrößert dargestellt.
E, F: MVP-positives (E; DAB; *Pfeil*) und MVP-negatives (F; DAB/HE; *Pfeil*) Neuron des Hilus im Vergleich.
 Maßstab **A, B, D-F:** 30 μ m; **C:** 100 μ m.

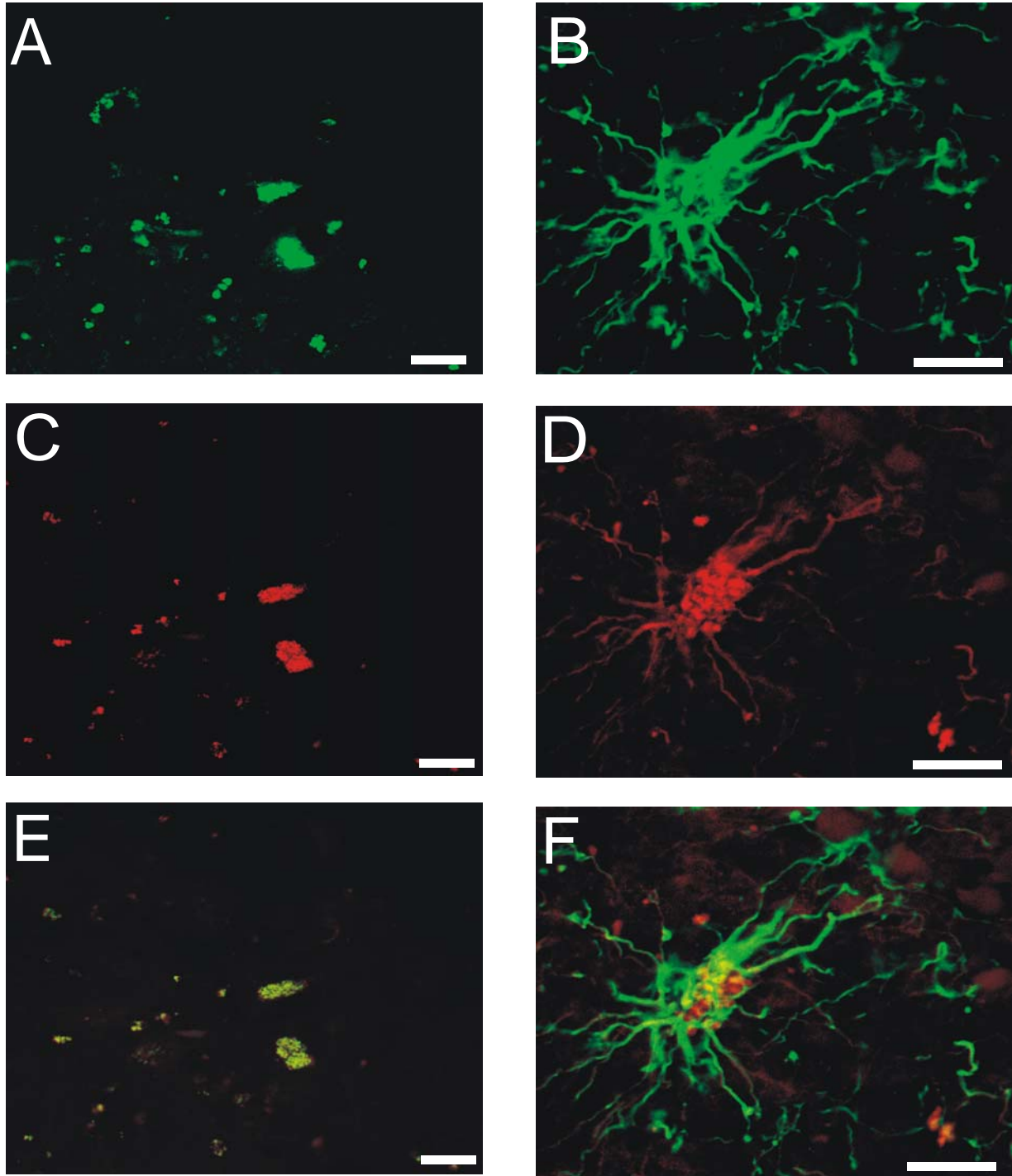


Tafel 10 Expression von Pgp im Hippokampus (Schnittdicke 10 μ m; A-D, F: nHS; E: HS)

A, B - Regionale Differenzen: Pgp zeigt wie alle anderen Transportproteine kein Vorkommen in den Körnerzellen des GD (A DAB), die dortigen Astrozyten hingegen exprimieren Pgp (Pfeilspitzen). In anderen Regionen des Hippokampus hingegen, hier exemplarisch der Hilus (B DAB, Pfeile) zeigen sich die dortigen Nervenzellen positiv gelabelt für Pgp.

C - F Zelluläre Differenzen: Pgp-positive Neurone (C DAB, Pfeile) sowie Astrozyten (D DAB/HE, Pfeilspitzen) des Subiculum, die Immunreaktivität für Pgp zeigen. Endothelzellen hippokampaler Gefäße exprimieren Pgp (E Plexus choroideus DAB; F GD DAB/HE).

Maßstab A, D: 20 μ m; B: 30 μ m; C, E: 50 μ m; F: 100 μ m.



Tafel 11 Doppel-Fluoreszenz-Färbungen im Hippokampus (Schnittdicke 10 μ m)

A, C, E: Ko-Lokalisation von NeuN (**A**; grün mit FITC) und Pgp (**C**; rot mit Cy3) in **E** (resultierende gelbe Fluoreszenz der Strukturen in CA2-Region) läßt annehmen, dass Nervenzellen des Cornu ammonis Pgp exprimieren.

B, D, F: Auch Astrozyten zeigen eine Pgp-Expression, wie hier in der CA 3-Region. Die Ko-Lokalisation von GFAP (**B**; grün mit FITC) und Pgp (**D**; rot mit Cy3) macht es deutlich (**F**). Maßstab in **A, C, E**: 30 μ m; **B, D, F**: 15 μ m.

4.1.2 Quantitative Analyse der immunhistochemisch erhobenen Befunde

Die quantitative Analyse erfolgte mit dem Ziel Unterschiede in den Raten MDT-immunpositiver Zellen aufzudecken:

- (1) zwischen Neuronen und Gliazellen
- (2) zwischen den Regionen GD, Hilus, CA3, CA2, CA1 und Subiculum
- (3) zwischen den Transportproteinen.

4.1.2.1 Differenzen der MDT-Immunreaktivitäten zwischen Neuronen und Gliazellen

Die über alle Regionen und Transportproteine gemittelten Raten immunpositiver Neurone und Astrozyten betragen $31 \pm 2.4 \%$ und $26 \pm 2.8 \%$. Der relativ geringe Unterschied von 5 % erreicht gerade das Signifikanzniveau ($p=0.049$, $n=27$, Wilcoxon-Test). Die Histogramme (Abb.1) deuten auf eine geringfügig asymmetrische Verteilung bei den Neuronen und auf eine bimodale Verteilung bei den Astrozyten.

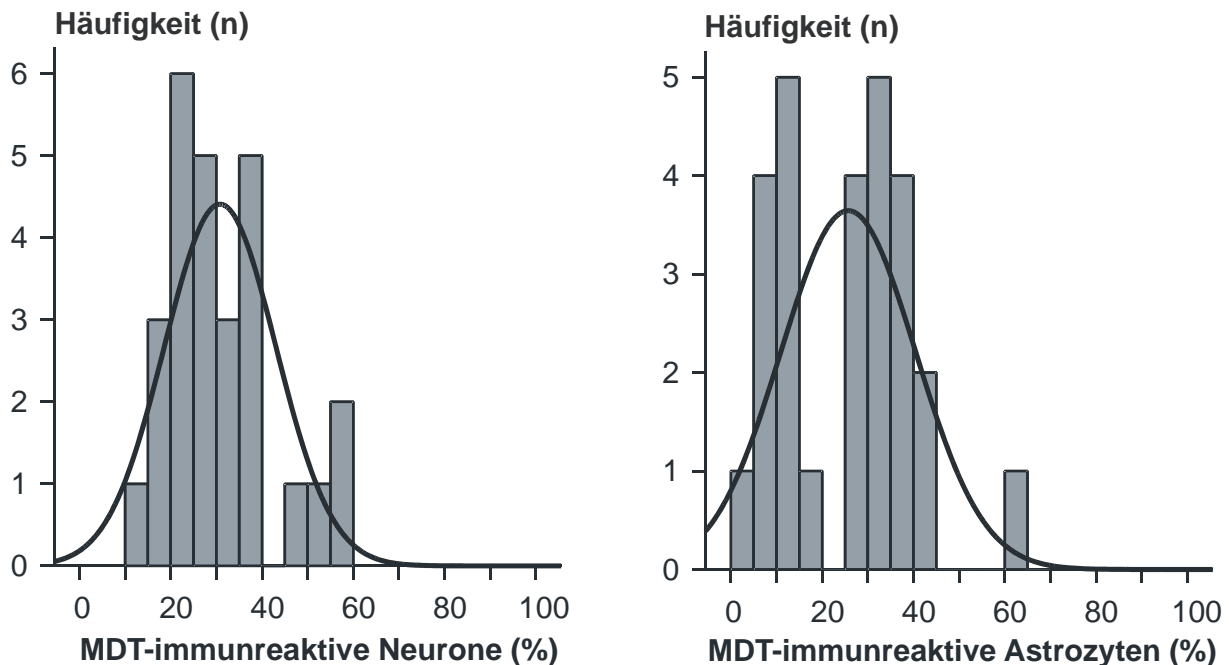


Abb. 1: Histogramme der für alle Regionen und Transportproteine gemittelten Raten immunpositiver Neurone und Gliazellen

Wenn man die Raten immunpositiver Neurone und Gliazellen für die 5 Transportproteine in den Regionen Gyrus dentatus (GD), Hilus (HIL), Abschnitte 1 bis 3 des Cornu ammonis (CA1-3) und Subiculum (SUB) separat vergleicht, ergeben sich wesentliche Unterschiede im Gyrus dentatus und im Hilus (Abb.2, Tabellen IIIa und IIIb). Da es sich um relativ kleine Stichproben handelt und Normalverteilung nicht vorausgesetzt werden kann, wurde zur statistischen Prüfung der Unterschiede der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verwendet.

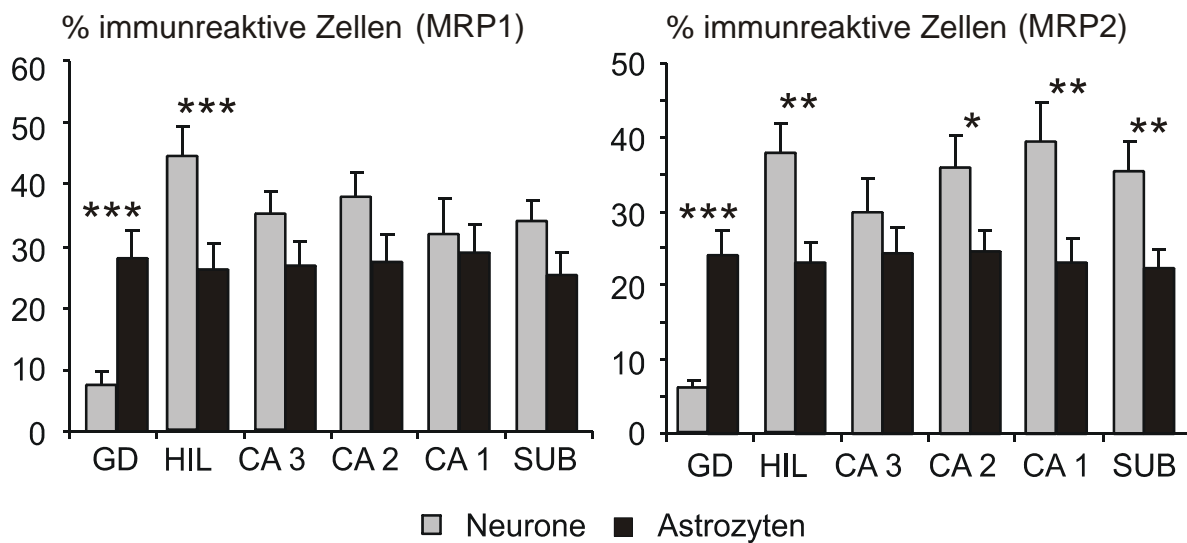


Abb. 2: Zelluläre Expressionsunterschiede für MRP1 und MRP2 im Hippokampus und im Subiculum. Während MRP1, ähnlich wie die anderen Transportproteine (nicht abgebildet) eine Zelltyp-abhängige Expression nur im GD und Hilus zeigt, findet sich eine solche für MRP2 in fast allen Regionen des Hippokampus und des Subiculum. Es fällt außerdem auf, dass für beide Transportproteine im GD immunpositive Astrozyten dominieren.

In Abb. 2 und Tabelle IIIa zeigen sich signifikante Unterschiede der Immunreaktivitätsraten zwischen Neuronen und Astrozyten im Gyrus dentatus und im Hilus für alle Transportproteine. Im Gyrus dentatus waren die Immunreaktivitätsraten der Neurone signifikant niedriger als die der Astrozyten (mittlere Differenzen zwischen 14 und 20 %). Im Hilus ließen sich signifikant höhere Immunreaktivitätsraten der Neurone im Vergleich zu den Astrozyten statistisch sichern (mittlere Differenzen zwischen 11 und 18 %). In der Area CA3 ergaben sich im Vergleich zu den Astrozyten höhere neuronale Immunreaktivitätsraten für MRP5 und Pgp (mittlere Differenzen von 12 und 10 %). Tabelle IIIb weist aus, dass in den Regionen CA2, CA1 und Subiculum lediglich die Immunreaktivitätsrate der Neurone für MRP2 größer war als die der Astrozyten (mittlere Differenzen 11, 16 und 13 %).

Tabelle IIIa: Zelluläre Expression der Transportproteine in den Regionen Gyrus dentatus, Hilus und CA3 (n.s. = nicht signifikant, die Anteile der Fälle in % sind gerundet)

Protein Region	N	Expressionsrate (% Neurone)	Anteil Fälle in %	Expressionsrate (% Astrozyten)	Anteil Fälle in %	Signifikanz
		Mittelwert (± Standardfehler)	11-40 %/ >40 %	Mittelwert (± Standardfehler)	11-40 %/ >40 %	Wilcoxon p
MRP1 GD	25	7.6 (± 1.95)	24/0	28.0 (± 4.55)	20/44	<0.001
MRP2 GD	25	6.0 (± 1.05)	16/0	24.0 (± 3.31)	60/16	<0.001
MRP5 GD	20	11.3 (± 2.72)	30/5	31.5 (± 4.66)	35/45	<0.001
Pgp GD	25	8.4 (± 1.95)	24/0	28.3 (± 3.94)	40/28	<0.001
MVP GD	17	9.0 (± 1.55)	29/0	21.7 (± 3.50)	65/6	0.004
MRP1 Hil	26	44.3 (± 4.85)	46/50	26.2 (± 4.16)	31/35	0.004
MRP2 Hil	27	37.6 (± 4.17)	52/41	23.2 (± 2.62)	70/11	0.004
MRP5 Hil	19	35.6 (± 4.95)	32/47	24.2 (± 3.79)	60/20	0.027
Pgp Hil	26	44.6 (± 4.92)	27/62	26.9 (± 3.59)	63/22	<0.001
MVP Hil	17	29.8 (± 3.36)	71/24	18.3 (± 3.21)	59/0	0.039
MRP1 CA3	25	34.9 (± 3.73)	52/36	26.7 (± 3.93)	32/32	n.s.
MRP2 CA3	25	30.0 (± 4.50)	48/32	24.3 (± 3.51)	58/19	n.s.
MRP5 CA3	20	38.0 (± 4.65)	50/40	25.7 (± 4.45)	50/20	0.016
Pgp CA3	26	37.6 (± 4.79)	46/42	27.4 (± 3.49)	73/15	0.026
MVP CA3	15	22.8 (± 4.25)	80/7	20.6 (± 4.20)	40/20	n.s.

Der prozentuale Anteil der Proben mit mäßiger und starker Expression bezieht sich auf den jeweiligen Stichprobenumfang, nicht auf das Paarvergleichs-N in Spalte 2.

Tabelle IIIb: Zelluläre Expression der Transportproteine in den Regionen CA2, CA1 und Subiculum (n.s. = nicht signifikant; die Anteile der Fälle in % sind gerundet)

Protein Region	N	Expressionsrate (% Neurone)	Anteil Fälle in %	Expressionsrate (% Astrozyten)	Anteil Fälle in %	Signifikanz
		Mittelwert (± Standardfehler)	11-40 %/ >40 %	Mittelwert (± Standardfehler)	11-40 %/ >40 %	Wilcoxon p
MRP1 CA2	25	38.0 (± 3.88)	52/40	27.5 (± 4.36)	36/28	n.s.
MRP2 CA2	26	35.9 (± 4.18)	62/35	24.6 (± 2.91)	65/15	0.017
MRP5 CA2	20	37.4 (± 5.17)	65/25	28.2 (± 3.80)	50/30	n.s.
Pgp CA2	25	33.8 (± 4.57)	48/36	25.5 (± 3.67)	56/20	n.s.
MVP CA2	15	23.4 (± 2.81)	80/7	21.7 (± 4.43)	53/20	n.s.
MRP1 CA1	21	32.0 (± 5.65)	38/38	29.0 (± 4.55)	24/40	n.s.
MRP2 CA1	22	39.4 (± 5.33)	46/41	23.1 (± 3.22)	56/19	0.004
MRP5 CA1	18	36.9 (± 6.51)	33/44	33.1 (± 4.29)	45/35	n.s.
Pgp CA1	21	34.2 (± 6.66)	38/38	34.6 (± 4.52)	39/42	n.s.
MVP CA1	17	31.1 (± 6.81)	71/18	24.7 (± 4.85)	47/24	n.s.
MRP1 Sub	26	34.0 (± 3.32)	54/35	25.4 (± 3.50)	42/23	n.s.
MRP2 Sub	27	35.4 (± 4.10)	48/37	22.4 (± 2.42)	67/11	0.002
MRP5 Sub	20	27.6 (± 4.55)	50/20	27.0 (± 3.80)	45/30	n.s.
Pgp Sub	27	30.8 (± 4.72)	52/26	29.4 (± 3.75)	41/33	n.s.
MVP Sub	17	20.8 (± 2.81)	77/6	21.5 (± 3.72)	53/18	n.s.

Der prozentuale Anteil der Proben mit mäßiger und starker Expression bezieht sich auf den jeweiligen Stichprobenumfang, nicht auf das Paarvergleichs-N in Spalte 2.

4.1.2.2 Regionale Differenzen der MDT-Immunreaktivitätsraten von Neuronen und Gliazellen

Regionale Differenzen der neuronalen und glialen Immunreaktivitäten fallen bereits in Abb. 2 und den Tabellen IIIa und IIIb auf. Für jedes Transportprotein wurden die Raten immunpositiver Zellen zwischen den Regionen GD, Hilus, CA3, CA2, CA1 und Subiculum mit dem Friedman-Test (alle Regionen als k abhängige Stichproben) und mit dem Wilcoxon-Test (alle Regionen paarweise), getrennt für Neurone und Astrozyten, verglichen. Zusätzlich gehen aus den Ergebnissen der paarweisen Vergleiche die in der Tabelle IVa zusammengefassten signifikanten Unterschiede hervor.

Tabelle IVa: Regionale Differenzen der neuronalen Immunreaktivitätsraten (Zusammenfassung) (für mehrere Paarvergleiche ist jeweils der Bereich der Irrtumswahrscheinlichkeiten p (Wilcoxon-Test) angegeben)

Transportprotein	Region(en) mit höherer Rate	Region(en) mit niedrigerer Rate	Irrtumswahrscheinlichkeit p	Anzahl der Proben
MRP1	Hilus, CA3, CA2, CA1, SUB	GD	≤ 0.001	25, 24, 24, 20, 25
	Hilus	CA3, CA1, SUB	≤ 0.008	25, 21, 26
MRP2	Hilus, CA3, CA2, CA1, SUB	GD	< 0.001	25, 23, 24, 21, 25
MRP5	Hilus, CA3, CA2, CA1, SUB	GD	≤ 0.004	19, 20, 20, 18, 20
	CA3, CA2	SUB	$< 0.009, =0.023$	20, 20
Pgp	Hilus, CA3, CA2, CA1, SUB	GD	≤ 0.002	24, 24, 23, 19, 25
	Hilus	CA3, SUB	0.014, 0.003	25, 26
	CA3	SUB	0.025	26
MVP	Hilus, CA3, CA2, CA1, SUB	GD	≤ 0.008	17, 15, 15, 17, 17
	Hilus	CA3, SUB	0.011	15, 17

Neurone: Aus der Tabelle geht hervor, dass neuronale Immunreaktivitätsraten für MRP1 im Hilus, den Regionen CA3, CA2, CA1 und im Subiculum größer sind als im GD. Auch MRP2-, MRP5-, Pgp- und MVP-positive Neurone sind in den genannten Regionen jeweils zahlreicher vorhanden als im GD. Für MRP1, MRP5, Pgp und MVP bestehen noch weitere Differenzen. MRP1 positive Neurone sind im Hilus häufiger zu beobachten als in den Regionen CA3, CA1 und Subiculum. MRP5-positive Neurone kommen in den Regionen CA3 und CA2 öfter vor als im Subiculum. Die Raten Pgp-positiver Neurone sind im Hilus höher als in der Region CA3 und dort wiederum höher als im Subiculum. MVP lässt sich öfter in Neuronen des Hilus nachweisen als in den Neuronen der CA3 und des Subiculum.

Astrozyten: Im Gegensatz zu den Neuronen sind regionale Differenzen der astrozytären Immunreaktivitätsraten selten (Tabelle IVb). Für MRP1 und MRP2 lassen sich weder im Friedman-Test noch in den paarweisen Vergleichen regionale Differenzen sichern. Auch für MRP5, Pgp und MVP zeigen sich im Friedman-Test keine Unterschiede zwischen den Regionen. Allerdings ist in Tabelle IVb zu erkennen, dass zumindest einige paarweise Differenzen vorhanden sind. So sind beispielsweise MRP5 positive Astrozyten im GD zahlreicher als im Hilus, in der CA3 und im Subiculum. Pgp-positive Gliazellen kommen in der Region CA1 häufiger vor als in der Region CA3.

**Tabelle IVb: Regionale Differenzen der astrozytären Immunreaktivitätsraten
(Zusammenfassung)**

Transportprotein	Region(en) mit höherer Rate	Region(en) mit niedrigerer Rate	Irrtumswahrscheinlichkeit p	Anzahl der Proben
MRP5	GD	Hilus, CA3, SUB	≤ 0.03	20, 20, 20
Pgp	CA1	CA3	0.049	25
MVP	CA3, CA2, CA1, SUB	Hilus	≤ 0.047	15, 15, 17, 17

Die Rate MVP-positiver Gliazellen ist in den Regionen CA3, CA2, CA1 und im Subiculum höher als im Hilus. Die im Hilus bestimmte Rate MVP-positiver Astrozyten (18 %) stellt die kleinste astrozytäre Immunreaktivitätsrate aller Transportproteine dar.

4.1.2.3 Differenzen zwischen den Immunreaktivitätsraten für die untersuchten Transportproteine in den Regionen des Hippokampus und im Subiculum

Wegen der in 4.1.2 und 4.1.3 dargestellten zellulären und regionalen Differenzen werden Unterschiede zwischen den Immunreaktivitätsraten der verschiedenen Transportproteine in den regionalen Subgruppen geprüft, jeweils getrennt für Neurone und Astrozyten. In Abb. 3 sind die entsprechenden Raten der immunreaktiven Neurone und Astrozyten für den Gyrus dentatus und den Hilus dargestellt.

Neurone: In allen hippokampalen Regionen sind mit dem Friedman-Test keine Unterschiede der neuronalen Immunreaktivitätsraten zwischen den untersuchten Transportproteinen nachweisbar, im Subiculum wird das Signifikanz-Niveau ($p=0.040$, $n=17$) erreicht. Es bestehen jedoch paarweise Differenzen der Raten immunpositiver Neurone zwischen moderaten Raten für MRP1, MRP5 und Pgp und niedrigen Raten für MVP

1. im Hilus: MRP1 vs. MVP ($49 \pm 6.3\%$ vs. $30 \pm 3.4\%$, $n=17$, $p=0.003$), MRP5 vs. MVP ($39 \pm 5.1\%$ vs. $29 \pm 3.3\%$, $n=16$, $p=0.036$), und Pgp vs. MVP ($46 \pm 6.4\%$ vs. $32 \pm 3.0\%$, $n=16$, $p=0.049$) (Abb.3);
2. in der Region CA3: MRP1 vs. MVP ($35 \pm 4.9\%$ vs. $23 \pm 4.3\%$, $n=15$, $p=0.023$), MRP5 vs. MVP ($42 \pm 5.4\%$ vs. $23 \pm 4.3\%$, $n=15$, $p=0.009$);
3. in den Regionen CA2 und im Subiculum: MRP1 vs. MVP (CA2: $38 \pm 5.7\%$ vs. $23 \pm 2.8\%$, $n=15$, $p=0.02$; Subiculum: $39 \pm 3.5\%$ vs. $21 \pm 2.8\%$, $n=17$, $p=0.001$).

Aus diesen Daten geht hervor, dass Neurone des Hilus, der Regionen CA3 und CA2 und des Subiculum häufiger MRP1 als MVP enthalten.

Astrozyten: Die Gliazellen zeigen in allen Regionen mit Ausnahme der CA3 ähnliche, aber stärker ausgeprägte Differenzen der Immunreaktivitätsraten zwischen den Transportproteinen (GD: $p < 0.001$, $n=17$; Hilus: $p=0.004$, $n=17$; CA2: $p=0.024$, $n=13$; CA1: $p=0.008$, $n=17$; Subiculum: $p=0.016$, $n=17$; Friedman-Test).

Abb. 3 zeigt für den GD und den Hilus, dass die astrozytären Immunreaktivitätsraten für MRP1, MRP5 und Pgp signifikant höher sind als die Raten für MVP. Auch in allen nicht dargestellten Regionen sind immer mehr MRP1-positive als MVP-positive Astrozyten zu finden (CA3: $33 \pm 4.7\%$ vs. $21 \pm 4.2\%$, $n=15$, $p=0.008$; CA2: $33 \pm 5.7\%$ vs. $22 \pm 4.4\%$, $n=15$, $p=0.027$; CA1: $36 \pm 4.6\%$ vs. $25 \pm 4.9\%$, $n=17$, $p=0.022$; Subiculum: $34 \pm 3.9\%$ vs. $22 \pm 3.7\%$, $n=17$, $p=0.006$).

In der Region CA1 und im Subiculum sind außerdem die Immunreaktivitätsraten für Pgp höher (CA1: $33 \pm 4.2\%$, SUB: $35 \pm 3.4\%$) als für MVP.

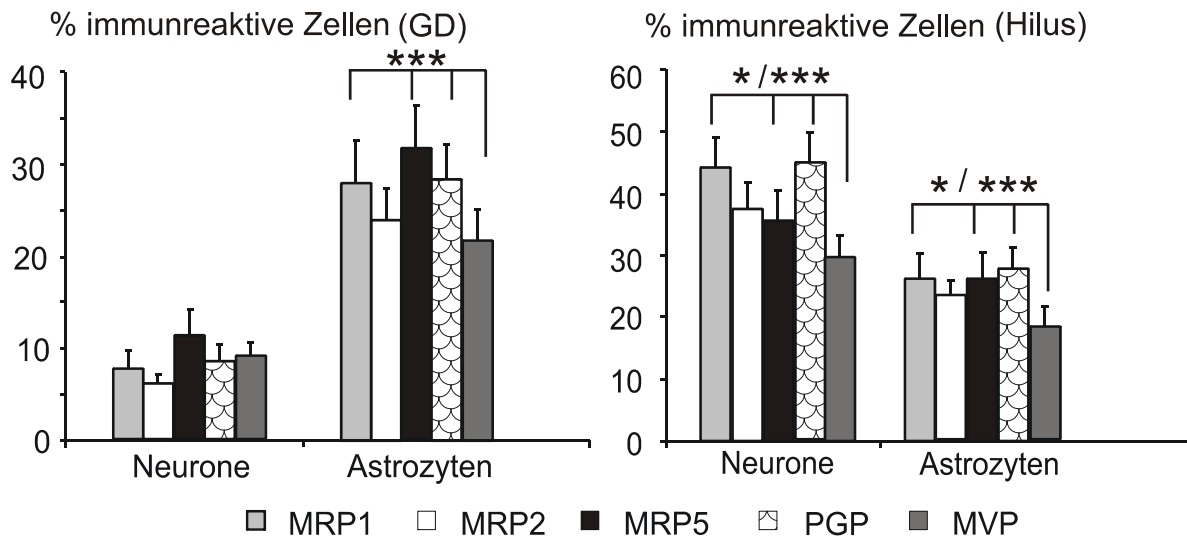


Abb. 3: Unterschiede in der Expression der Transportproteine im Hippokampus.

(der längste Strich der Klammer kennzeichnet jeweils die Vergleichsgröße)

Im GD finden sich nur wenig immunreaktive Körnerzellen für alle Transportproteine ohne signifikante Differenzen, während bei den Astrozyten sowohl im GD, wie auch in den anderen Regionen (exemplarisch Hilus) signifikante Expressionsunterschiede zwischen MVP (schwächste Immunreaktivität) und den anderen Transportproteinen bestehen.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass sowohl Neurone als auch Astrozyten öfter MRP1 und seltener MVP enthalten.

4.2 Vergleich der MDT-Immunreaktivität in sklerotischen und nicht-sklerotischen Hippokampi

Durch eine andere Gruppe konnte semiquantitativ gezeigt werden, dass eine höhere Immunreaktivität für einige der hier untersuchten MDT in sklerotischen Hippokampi im Vergleich zu normalem Hirngewebe und nicht-sklerotischen Hippokampi vorliegt (18). Daher ist es interessant, der Frage nachzugehen, ob auch in dieser Stichprobe signifikante Unterschiede der MDT-Immunreaktivität in Abhängigkeit vom Sklerosegrad des humanen epileptogenen Hippokampus bestehen. Deshalb wurden die Mittelwerte der MDT-Immunreaktivität nicht-sklerotischer und sklerotischer Gewebeproben verglichen.

Die Einteilung der Gewebeproben nach Wyler erfolgte wie im Kapitel 3 beschrieben in nicht-sklerotische (Wyler-Grade 1 und 2; n=11) und sklerotische Hippokampi (Wyler-Grade 3 und 4; n=15). Tafel 1 illustriert die wesentlichen Merkmale einer Hippokampus-Sklerose und stellt sie einer nicht-sklerotischen Gewebeprobe gegenüber.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde zunächst auf eine Betrachtung der einzelnen hippocampalen Regionen verzichtet und stattdessen regionenunabhängige, d.h. über alle 6 Regionen des Hippokampus gemittelte, Immunreaktivitätsraten für jeden MDT verwendet. Erneut wurden die Daten für Nerven- und Gliazellen getrennt betrachtet. Da es sich um unabhängige kleine Stichproben handelt, erfolgte die Ermittlung der Signifikanzen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests für den Vergleich überregionaler Expressionsraten und durch den Mann-Whitney-Test für die Gegenüberstellung regionaler Expressionsdaten von jeweils zwei Gruppen. Wie schon von anderen Autoren beschrieben (57, 61), zeigten sich charakteristische Unterschiede in den ermittelten Zelldichten für Nervenzellen und Astrozyten in den verschiedenen Regionen des Hippokampus beim Vergleich nicht-sklerotischer und sklerotischer Gewebepben (Abb. 4). Hierbei waren bei Vorliegen einer Hippokampus-Sklerose besonders der Hilus und die CA1-Region von einem Nervenzellverlust und einer Gliose betroffen. Abb. 4 demonstriert, für welche Regionen signifikante Unterschiede in neuronaler oder astrozytärer Zelldichte bestehen (alle Angaben zur Zelldichte in $\times 10^3/\text{mm}^3$; Neurone: Hilus 3.4 nHS/ 2.1 HS mit $p=0.004$; CA3 6.5/ 4.2 mit $p=0.011$; CA2 8.0/ 5.7 mit $p=0.002$; CA1 6.6/ 1.2 mit $p<0.001$; Astrozyten: GD 17.5/ 24.4 mit $p=0.002$; Hilus 32.5/ 42.3 mit $p=0.009$; CA3 36.5/ 51.0 mit $p=0.003$; CA2 32.5/ 47.7 mit $p=0.047$; CA1 24.2/ 73.3 mit $p<0.001$; Subiculum 25.6/ 30.6 mit $p=0.047$; alle Mann-Whitney-Test).

Bei Betrachtung der überregionalen MDT-Immunreaktivitätsraten (Abb. 5) ergab sich für die Nervenzellen eine höhere Zahl MVP-positiver Zellen ($p=0.04$; Kruskal-Wallis-Test) in den nicht-sklerotischen Hippokampi ($26.9 \pm 2.42\%$; $n=7$) im Vergleich zu den sklerotischen Gewebepben ($19.7 \pm 1.68\%$; $n=10$). Bei den Astrozyten waren ähnliche Mittelwerts-Unterschiede für das MVP festzustellen, aber statistisch nicht zu sichern. Getrennte Analysen für die Regionen zeigten signifikante Unterschiede im Vergleich zu den sklerotischen Proben nur für die Regionen CA3 ($35.3 \pm 3.68\%$ nHS/ $11.8 \pm 4.55\%$ HS; $p=0.004$), Hilus ($37.8 \pm 3.89\%$ / $24.3 \pm 4.33\%$; $p=0.043$) und Subiculum ($25.3 \pm 1.88\%$ / $17.7 \pm 4.43\%$; $p=0.043$).

Interessanterweise lag auch für MRP2 eine signifikant höhere Zahl immunpositiver Nervenzellen in den nicht-sklerotischen Proben vor, in den Regionen CA3 ($42.7 \pm 6.76\%$ nHS/ $20.0 \pm 5.04\%$ HS $p=0.015$) und Hilus ($48.6 \pm 5.08\%$ / $30.2 \pm 5.81\%$; $p=0.020$), ohne dass dieser Unterschied im Vergleich der überregional gemittelten Raten (Abb. 5) auffällig geworden wäre.

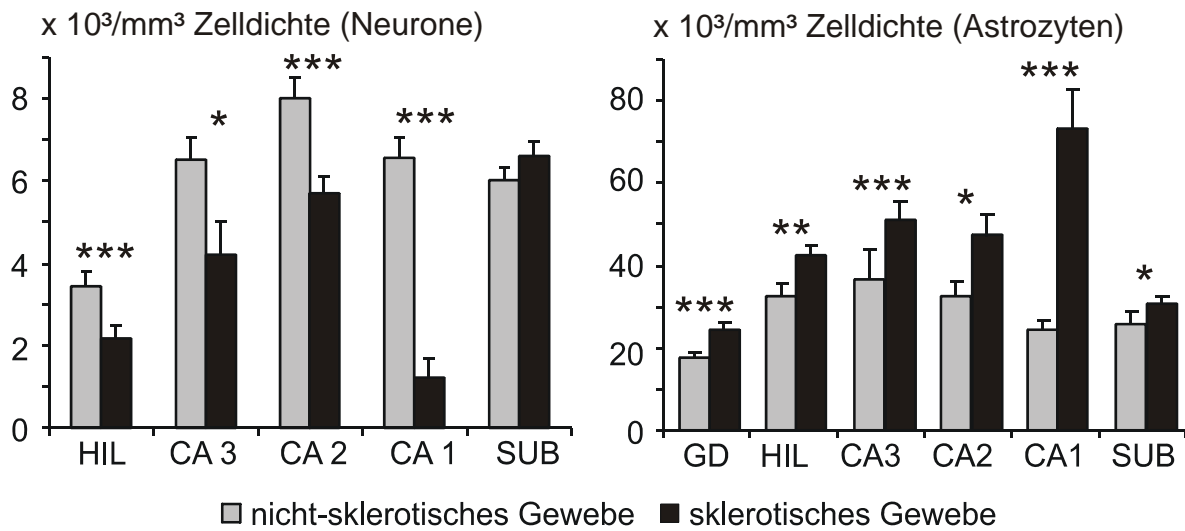


Abb. 4: Zelldichten im Hippokampus in Abhängigkeit vom Sklerosegrad des Gewebes. Für die Nervenzellen ergeben sich signifikante Dichteunterschiede im Hilus und Cornu ammonis mit einem Nervenzellverlust in den sklerotischen Hippokampi. Die Dichte der Körnerzellen des GD ist nicht dargestellt, da sie sehr viel höher liegt als die der Pyramidenzellen. Astrozytär zeigt sich eine Gliose mit signifikant höherer Zelldichte in den sklerotischen Hippokampi für alle Regionen.

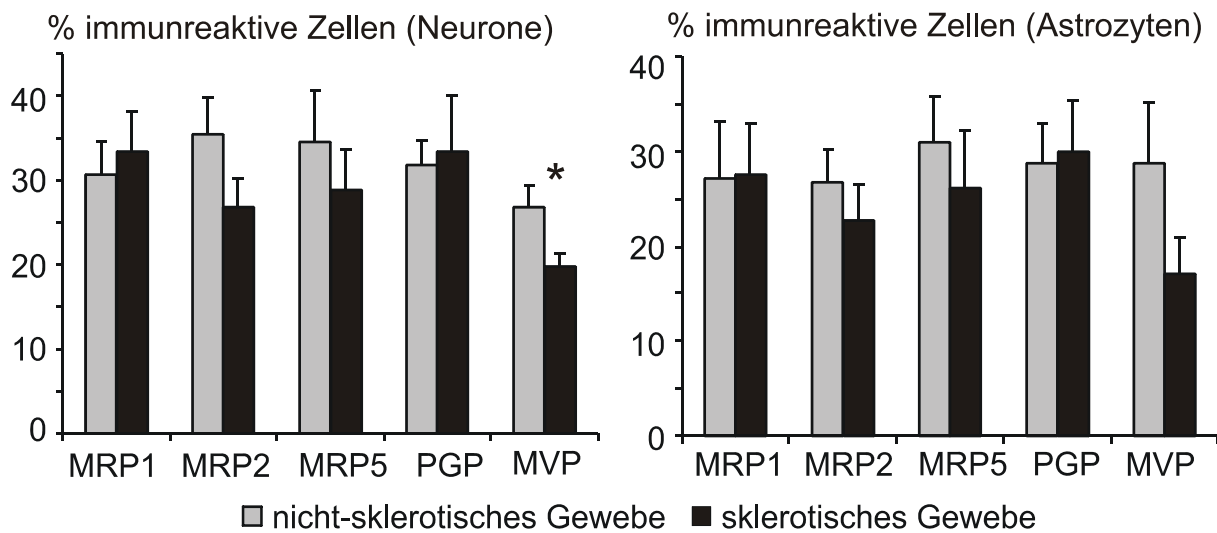


Abb. 5: Expression der Transportproteine in Abhängigkeit vom Sklerosegrad des Gewebes. Trotz deutlichem neuronalen Zellverlust und Gliose (Abb. 4) in den sklerotischen Hippokampi finden sich kaum Unterschiede der Immunreaktivität für die Transportproteine im Vergleich zum nicht-sklerotischen Gewebe. Interessanterweise liegt in den nicht-sklerotischen Gewebeproben eine stärkere neuronale MVP-Immunreaktivität vor als in den Proben mit Hippokampus-Sklerose.

Um zu klären, ob und in welchen Regionen Differenzen zwischen der neuronalen und glialen Immunreaktivität für MVP in Abhängigkeit vom Sklerosegrad des Gewebes bestehen, suchten wir nach Zusammenhängen zwischen der Expression jedes Transportproteins und den Zelldichten für Neurone und Astrozyten (Abb. 6). Entsprechend den bereits für MVP dargestellten Ergebnissen, korrelierten MVP-positive Neurone in der Region CA3 positiv (Spearman-Rho= 0.64; n=14; p=0.014) und MVP-positive Astrozyten im Subiculum negativ (Spearman-Rho= -0.52; n=16; p=0.043) mit den entsprechenden Zelldichten.

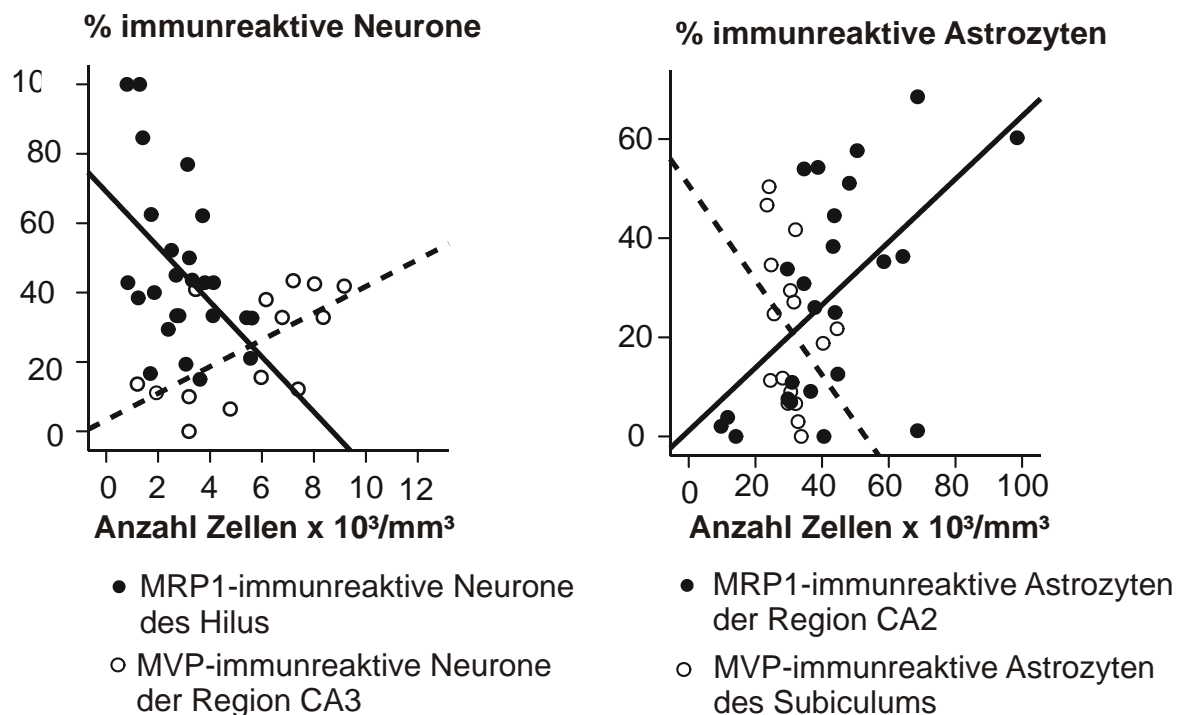


Abb. 6: Korrelationen der Expression von Transportproteinen mit den Zelldichten in den Regionen Hilus, CA3, CA2 und im Subiculum. Für Neurone im Hilus besteht eine negative Korrelation zwischen der Rate MRP1-immunpositiver Zellen und der Neuronendichte (durchgängige Linie), in der Area CA3 eine positive (unterbrochene Linie) für MVP. Für Astrozyten zeigt sich in der Area CA2 eine positive Korrelation der MRP1-immunpositiven Zellen zur Dichte der Astrozyten (durchgängige Linie), im Subiculum eine negative (unterbrochene Linie) für MVP.

Es stellte sich aber auch heraus, dass die Rate MRP1-positiver Neurone im Hilus mit zunehmender Neuronendichte abnimmt und die Rate MRP1-positiver Astrozyten in der Area CA2 mit zunehmender Astrozytendichte ansteigt (Spearman-Rho = -0.40; n=25; p=0.047 bzw. Spearman-Rho 0.56; n=24; p=0.004). Das bedeutet, dass, nur für neuronales MRP1 im Hilus und nur für astrozytäres MRP1 in der Area CA2, eine bevorzugte Expression im sklerotischen Hippokampus vorliegt.

4.3 MDT-Immunreaktivität im Temporalen Kortex mit Berücksichtigung zellulärer und regionaler Differenzen

4.3.1 Qualitative Beschreibung der immunhistochemisch erhobenen Befunde im Temporalen Kortex

Auch im Temporalen Kortex fanden sich MDT-immunreaktive Nerven- und Gliazellen in beiden untersuchten Schichten, wie die Tafeln 13 bis 18 mit Beispielen illustrieren.

Tafel 12 beweist durch Darstellung der Negativkontrollen, dass eine Applikation von Sekundär-Antikörper und DAB allein nicht zu einer Farbreaktion in Lamina II/III (Abb. A, B, E, F) oder Lamina V/VI (Abb. C, D, G, H) führt.

MRP1 (Tafel 13) war ähnlich wie im Hippokampus sowohl in Nervenzellen (Tafel 13; Abb. C-E) als auch Astrozyten (nicht dargestellt) mit unterschiedlichen Färbemethoden (DAB Tafel 13; Abb. C und E; Fluoreszenz Tafel 13; Abb. D) nachweisbar, während Endothelzellen kortikaler Gefäße keine Präsenz von MRP1 aufwiesen. Dabei konnte ein Vorkommen in beiden untersuchten Laminae (Tafel 13; Abb. A-C) gezeigt werden.

Eine Immunreaktivität für MRP 2 (Tafel 14) lag auch im Temporalen Kortex - vor allem in Endothelzellen - vor (Tafel 14; Abb. A und F). Eine neuronale Immunreaktivität war in einigen kortikalen Proben nicht (Tafel 14; Abb. A und B), in anderen Proben durchaus zu beobachten (Tafel 14; Abb. C und D). Die Doppel-Fluoreszenz-Färbung mit GFAP (Tafel 14; Abb. E) lässt astrozytäre MRP2-Expression vermuten.

Ähnlich wie im Hippokampus lag eine hohe Rate MRP5-immunpositiver Zellen im Temporalen Kortex vor (Tafel 15). Dabei ließen sich keine regionalen Präferenzen feststellen, Nervenzellen beider Kortexschichten waren MRP5-immunreaktiv (Tafel 15; Abb. A und B). Sowohl in der DAB-Färbung (Tafel 15; Abb. C) als auch mit der Doppel-Fluoreszenz-Färbung (Tafel 15; Abb. D) ließ sich eine gliale Immunreaktivität für MRP5 verifizieren. Eine MRP5-Immunpositivität in Endothelzellen konnte weder in der DAB- (Tafel 15; Abb. E) noch in der Doppel-Fluoreszenz-Färbung (Tafel 15; Abb. F) beobachtet werden.

MVP (Tafel 16), welches in den hippokampalen Proben in nur wenigen Zellen nachweisbar war, konnte im Kortex in Nervenzellen (Tafel 16; Abb. B und E) und Zellen glialen Ursprungs (Tafel 16; Abb. D) verifiziert werden. Hierbei waren in der qualitativen Auswertung keine Unterschiede zwischen immunreaktiven Zellen in Lamina II/III (Tafel 16; Abb. A und B) und Lamina V/VI (Tafel 16; Abb. C und D) ersichtlich. Eine Immunreaktivität in Endothelzellen (Tafel 16; Abb. F) bestand nicht.

**Tafel 12 Negativkontrollen
im Temporalen Kortex**

(Schnittdicke 10µm)

A-D Applikation des Maus-Zweitantikörpers und DAB ohne Primär-Antikörper in verschiedenen Schichten des Neokortex. Eine Immunreaktivität besteht nicht.

A, B: Lamina II/III

C, D: Lamina V/VI

E-H Negativkontrollen mit Ratten-Zweitantikörper und DAB in den Schichten des Temporalen Kortex. Auch hier ist kein Labeling zu erkennen.

E, F: Lamina II/III

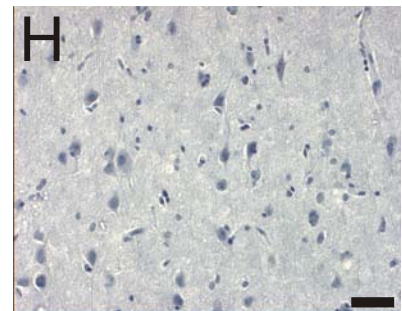
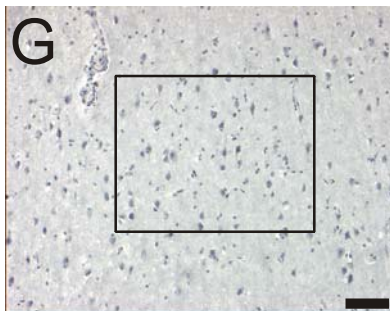
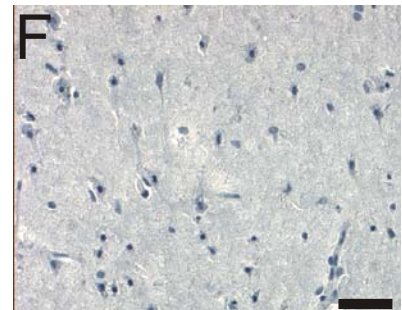
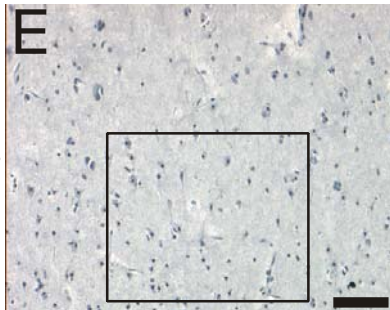
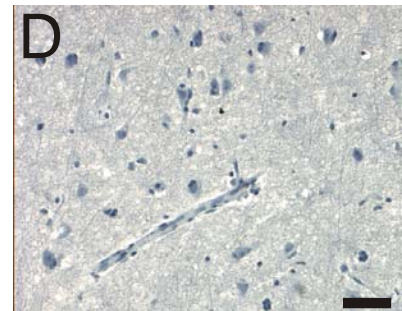
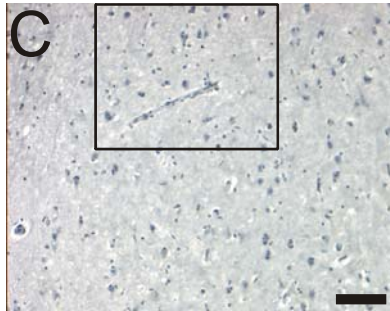
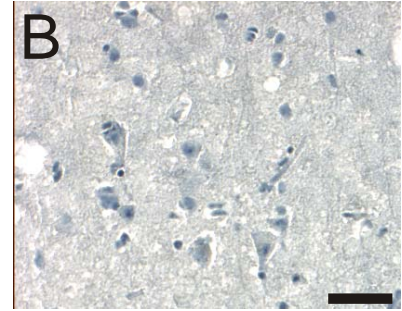
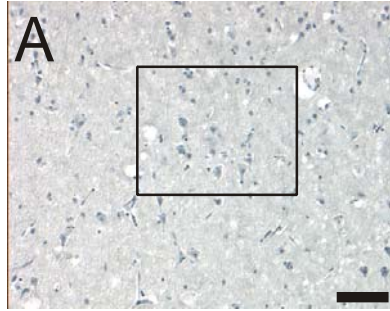
G, H: Lamina V/VI

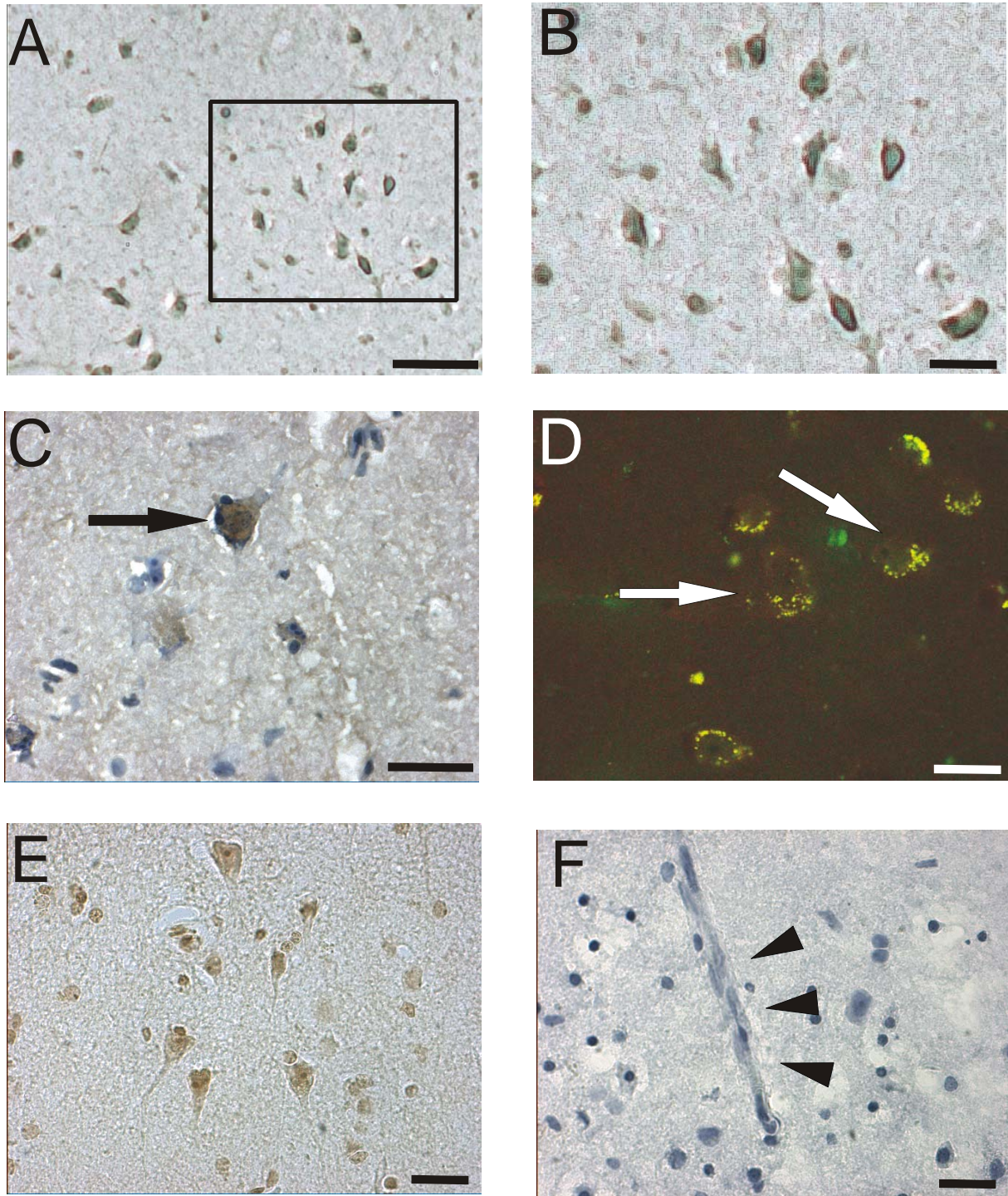
Die Bildausschnitte in den Kästchen sind jeweils in den Bildern rechts vergrößert dargestellt.

Zur Illustration wurden erneut Schnitte mit HE-Gegenfärbung verwendet, da bei fehlender DAB-Reaktion sonst keine zellulären Strukturen erkennbar wären.

Maßstab **A, C, E, G:** 100µm;

B, D, F, H: 50µm.

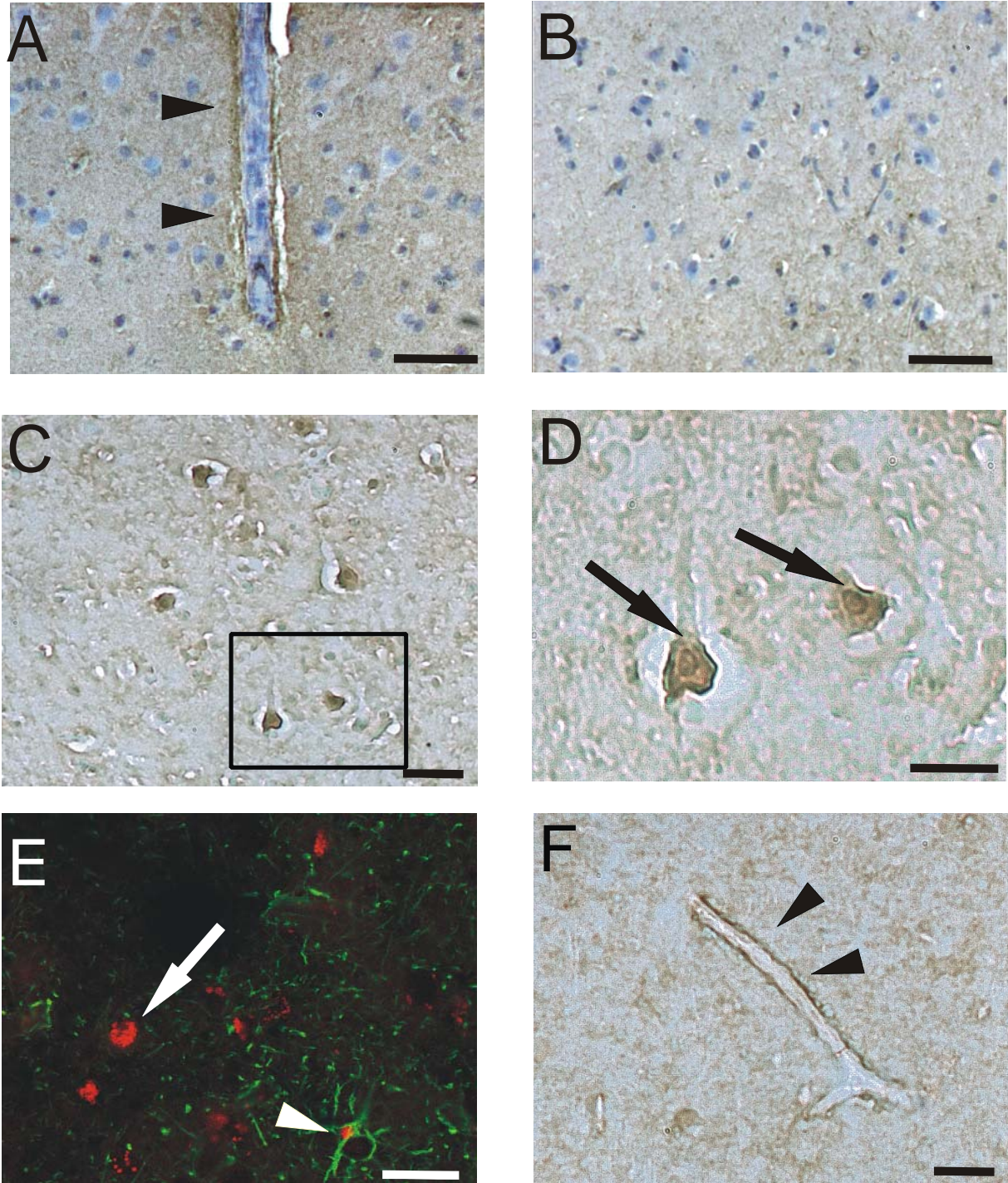




Tafel 13 Expression von MRP1 im Temporalen Kortex (Schnittdicke 10 μ m)

A-C Regionale Expression: Nervenzellen der Lamina II/III (A und B DAB) und Lamina V/VI (C DAB/HE) zeigen eine Immunreaktivität für MRP1. Der Bildausschnitt in A ist in Abb. B vergrößert dargestellt.

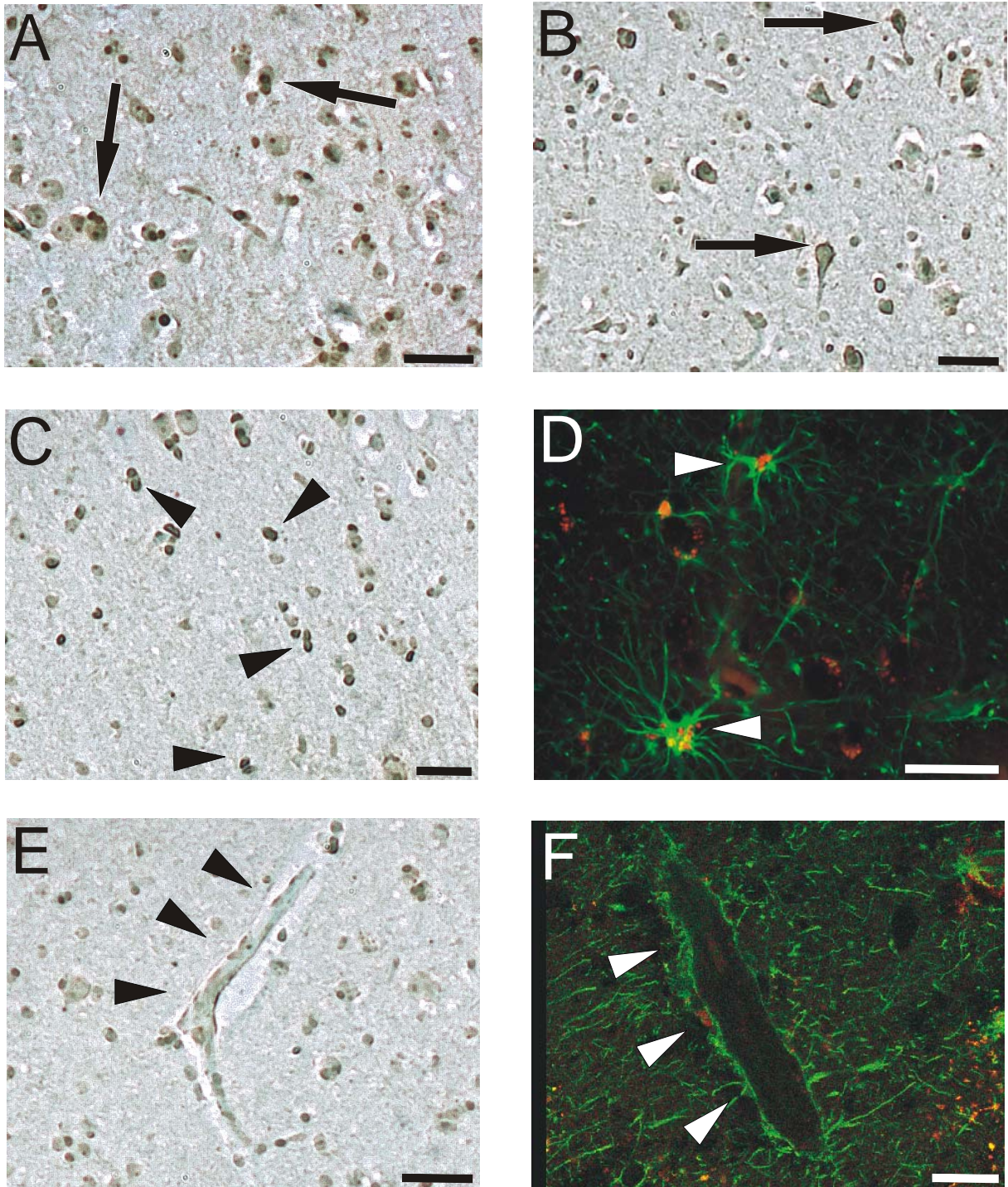
C-F Zelluläre Expression: Neurone (C DAB/HE; D Doppel-Fluoreszenz-Färbung mit NeuN und MRP1-mAB; E DAB; Pfeile) im Kortex exprimieren MRP1, während Endothelzellen (F DAB/HE; Pfeilspitzen) keine Präsenz von MRP1 zeigen. Die Doppel-Fluoreszenz-Färbung demonstriert die Ko-Lokalisation von NeuN (grün mit FITC) und MRP1 (rot mit Cy3). Maßstab A: 100 μ m; B- F: 30 μ m.



Tafel 14 Expression von MRP2 im Temporalen Kortex (Schnittdicke 10 μ m)

A-D Regionale Expression: Weder die Neurone der Lamina II/III (**A** DAB/HE) noch die der Lamina V/VI (**B** DAB/HE) weisen in diesen Beispielen eine Immunreaktivität für MRP2 auf, während in anderen kortikalen Gewebeproben Nervenzellen (hier Lamina V/VI) immunpositiv für MRP2 sind (**C, D** DAB; *Pfeile*). Der Bildausschnitt in **C** ist in Abb. **D** vergrößert dargestellt.

E, F - Zelluläre Expression: Diese Doppel-Fluoreszenz-Färbung (**E**) einer kortikalen Probe mit GFAP (*grün*) und dem mAB für MRP2 (*rot mit Cy3*) zeigt eine Expression von MRP2 in Neuronen (*Pfeile*) und Astrozyten (*Pfeilspitzen*). Die Endothelzellen kortikaler Gefäße zeigen ähnlich wie im Hippokampus eine Expression von MRP2 (**A** DAB/HE; **F** DAB; *Pfeilspitzen*). Maßstab in **A, B**: 100 μ m; **C, E, F**: 50 μ m; **D**: 20 μ m.

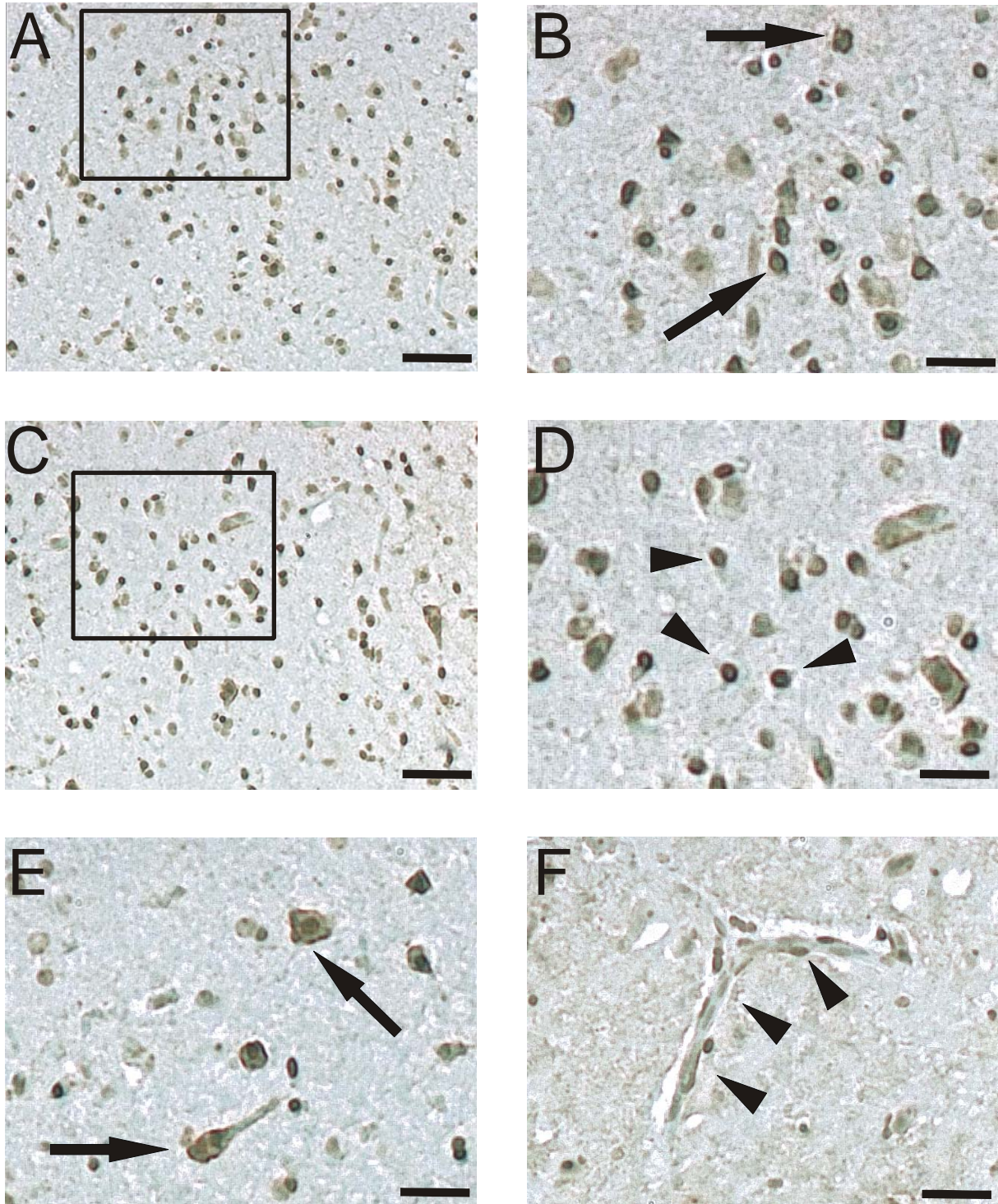


Tafel 15 Expression von MRP5 im Temporalen Kortex (Schnittdicke 10 μ m)

A, B - Regionale Expression: Sowohl in Lamina II/III (**A** DAB) als auch V/VI (**B** DAB) findet sich eine Expression von MRP5 (*Pfeile*).

C-F Zelluläre Expression: Neben Nervenzellen (siehe A, B) exprimieren auch Astrozyten des Temporalen Kortex MRP5 (**C** DAB, *Pfeilspitzen*). Die Doppel-Fluoreszenz-Färbung (**D**) mit GFAP (*grün mit FITC*) und MRP5 (*rot mit Cy3*) beweist durch Ko-Lokalisation der beiden Fluoreszenzfarbstoffe die Expression von MRP5 in Astrozyten (*Pfeilspitzen*). Endothelzellen hingegen zeigen weder in der DAB-Färbung (**E**, *Pfeilspitzen*) noch in der Doppel-Fluoreszenz (**F**, *Pfeilspitzen*) ein Vorhandensein von MRP5.

Maßstab **A-C, E:** 50 μ m; **D, F:** 30 μ m.



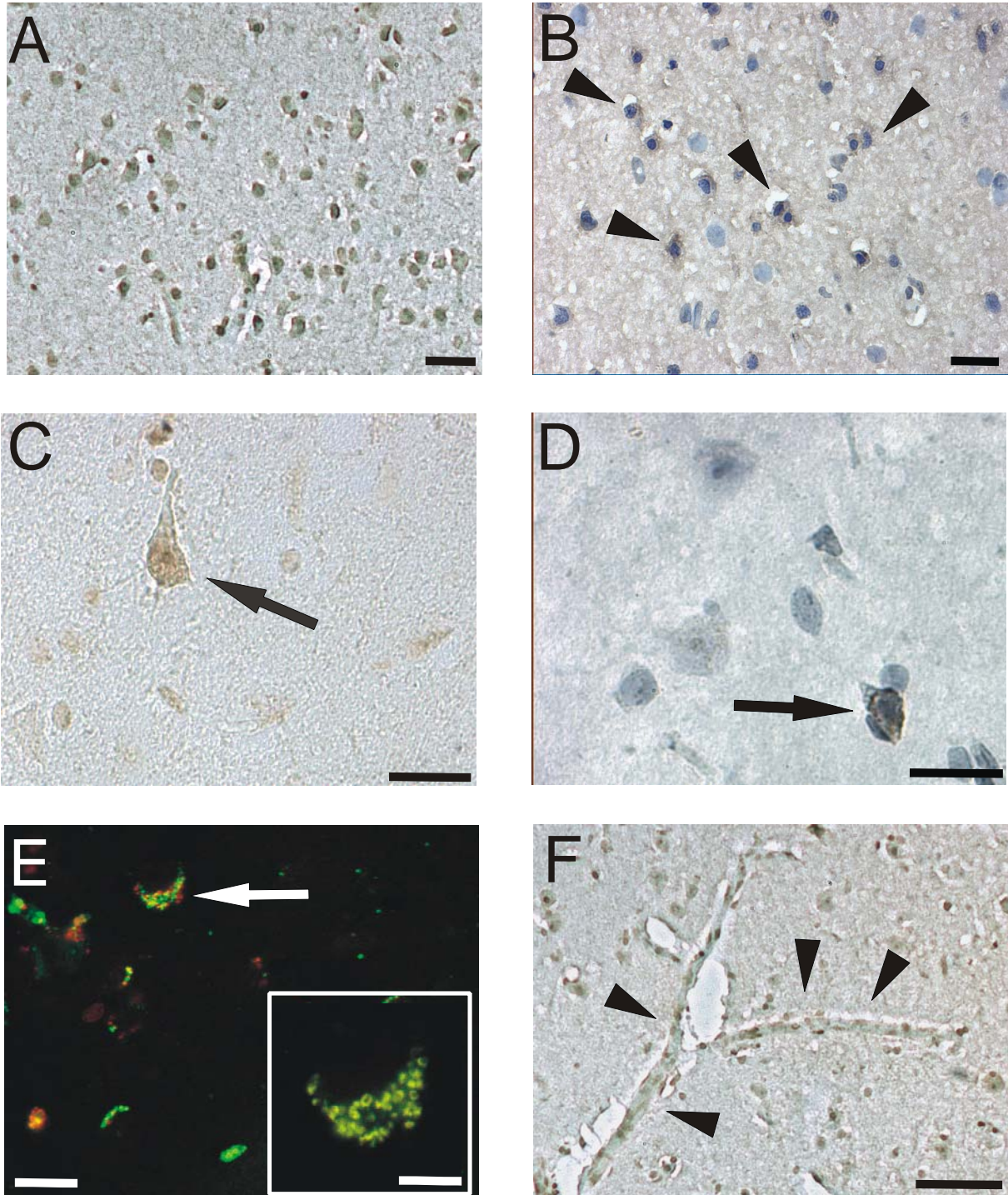
Tafel 16 Expression von MVP im Temporalen Kortex (Schnittdicke 10 μ m)

A, C - Regionale Expression: Sowohl in Lamina II/III (A DAB) als auch V/VI (C DAB) wird MVP exprimiert.

B, D, E, F - Zelluläre Differenzen: Nervenzellen beider Schichten (**B** Lamina II/III; **E** Lamina V/VI, beide DAB, *Pfeile*) und Astrozyten (**D** DAB, *Pfeilspitzen*) sind MVP-positiv, während Endothelzellen (**F** DAB, *Pfeilspitzen*) keine Immunreaktivität für MVP zeigen.

Die Bildausschnitte in A und C sind in den Abb. B und D vergrößert dargestellt.

Maßstab A, C: 100 μ m; B, F: 50 μ m; D, E: 30 μ m.

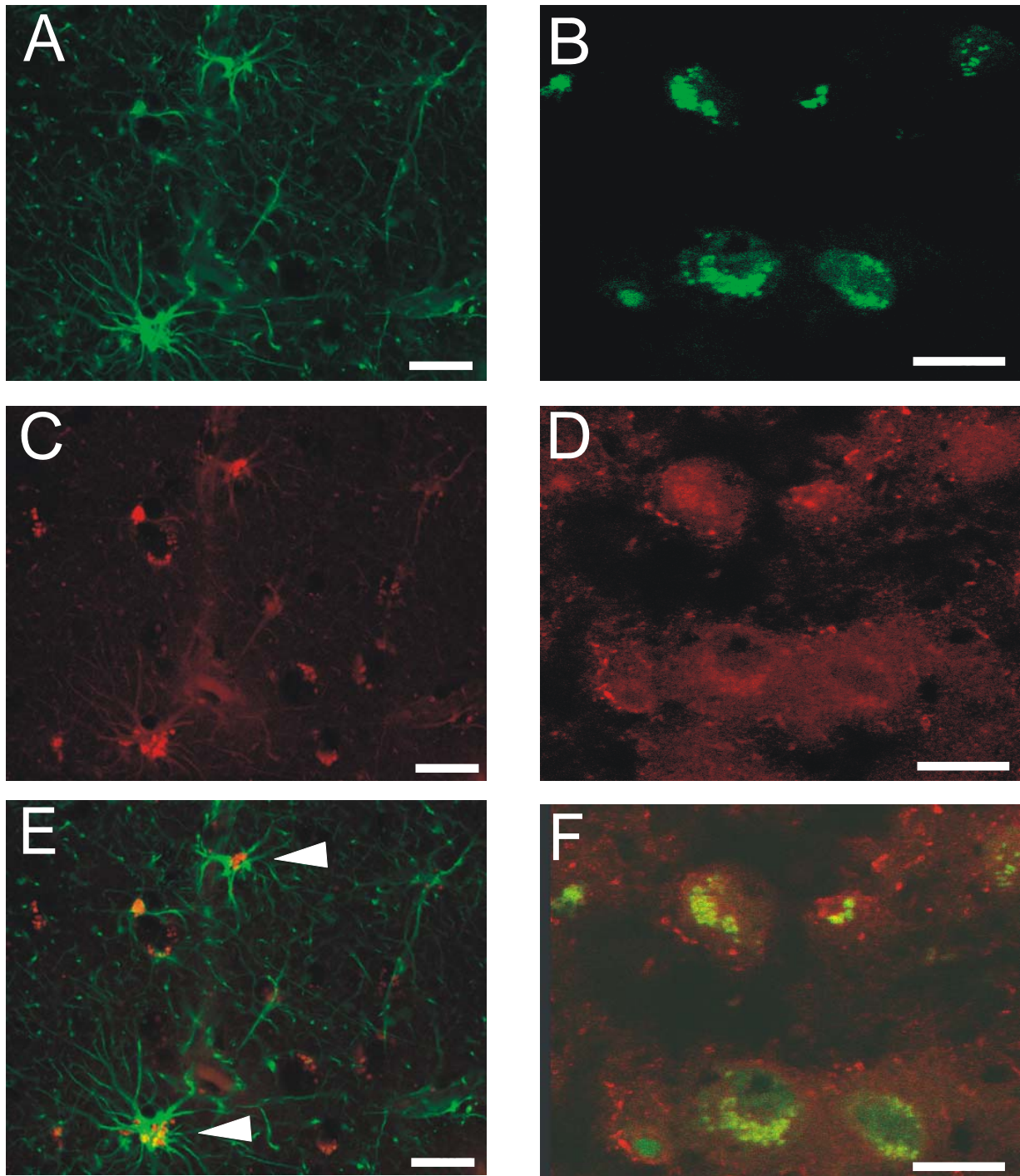


Tafel 17 Expression von P-Glykoprotein (Pgp) im Temporalen Kortex (Schnittdicke 10µm)

A, B - Regionale Verteilung: In beiden untersuchten Schichten des Kortex finden sich Pgp-positive Zellen (**A** Lamina II/III, **B** Lamina V/VI, beide DAB).

C, D-F Zelluläre Verteilung: Die kortikalen Neurone (*Pfeile* in **C** und **D** und in der Doppel-Fluoreszenz-Färbung **E**) weisen eine Pgp-Expression auf, wie die Ko-Lokalisation (**E**) von NeuN (*grün mit FITC*) und Pgp (*rot mit Cy3*) eindrücklich zeigt. Der Bildausschnitt in **E** ist eine vergrößerte Darstellung der betreffenden Nervenzelle. Endothelzellen kortikaler Gefäße zeigen keine Immunreaktivität für Pgp (**F** DAB, *Pfeilspitzen*).

Maßstab **A, B:** 50µm; **C, D, E:** 30µm; **F:** 100µm; **Bildausschnitt E:** 15µm.



Tafel 18 Doppel-Fluoreszenz-Färbungen im Temporalen Kortex (Schnittdicke 10 μ m)

A, C, E: Astrozytäre Expression von MRP5 demonstriert durch die Ko-Lokalisation (**E**; Pfeilspitzen) von GFAP (**A**; grün mit FITC) und MRP5 (**C**; rot mit Cy3).

B, D, F: Nervenzellen des Kortex exprimieren MRP1, wie hier durch die Ko-Lokalisation (**F**) von NeuN (**B**; grün mit FITC) und MRP1 (**D**; rot mit Cy3) gezeigt wird.

Maßstab **A, C, E:** 20 μ m; **B, D, F:** 30 μ m.

Eine Pgp-Immunreaktivität (Tafel 17) ergab sich in beiden untersuchten Schichten des Neokortex (Tafel 17; Abb. A und B). Wie mit verschiedenen Färbemethoden gezeigt werden konnte, kam Pgp in Nerven- und Gliazellen vor (DAB und DAB/HE Tafel 17; Abb. C und D; Doppel-Fluoreszenz-Färbung Tafel 17; Abb. F). Eine Immunreaktivität in Endothelzellen kortikaler Gefäße war nicht feststellbar (Tafel 17; Abb.).

Die Doppel-Fluoreszenz-Färbungen (Tafel 18) zeigen, dass die MDT-Immunreaktivität, wie z.B. von MRP5 (Tafel 18; Abb. A, C und E) oder MRP1 (Tafel 18; Abb. B, D und F) eindeutig zellulären Strukturen (Nerven-, Gliazellen) zugeordnet werden kann.

4.3.2 Quantitative Analyse der Befunde im Temporalen Kortex

In Analogie zur Darstellung der Befunde im Hippokampus soll auch für den Temporalen Kortex zuerst über die Unterschiede der Immunreaktivität zwischen Neuronen und Astrozyten, zwischen den untersuchten Regionen (Lamina II/III und Lamina V/VI) und den Transportproteinen berichtet werden.

4.3.2.1 Differenzen zwischen Neuronen und Gliazellen

Die für die beiden Regionen und alle Transportproteine gemittelten Raten immunpositiver Neurone und Astrozyten liegen bei $22 \pm 2.4 \%$ und $26 \pm 2.2 \%$ und unterscheiden sich nicht.

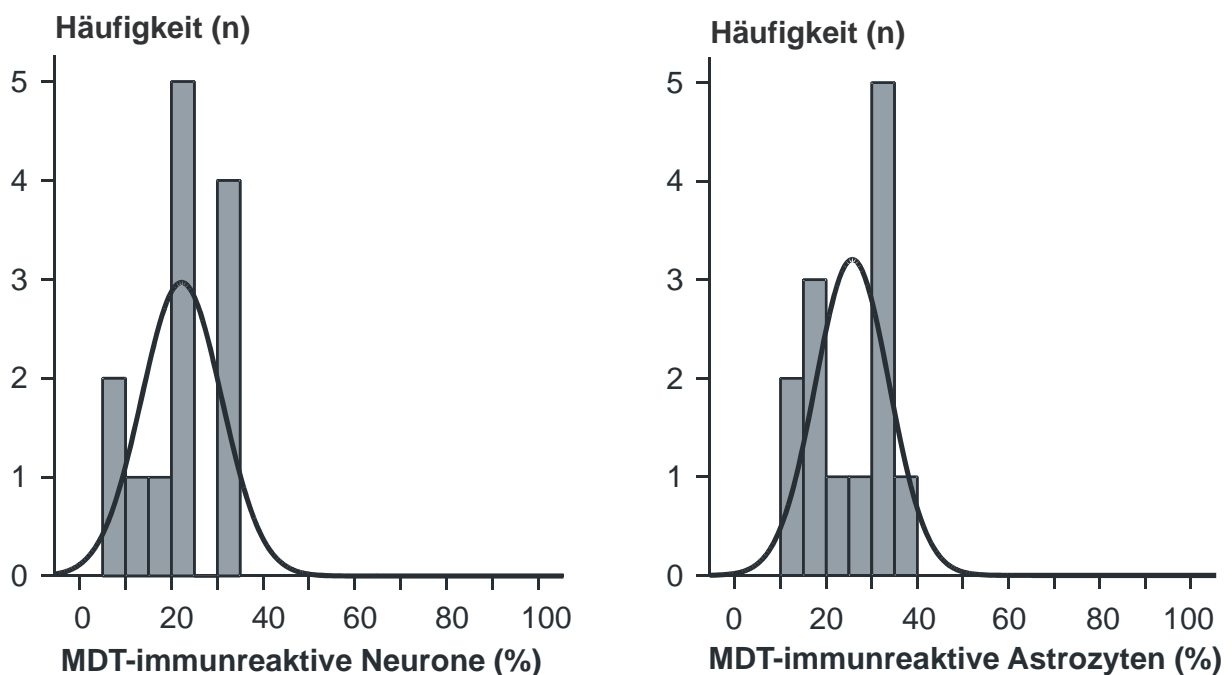


Abb. 7: Histogramme der überregional und für alle Transportproteine gemittelten Raten immunpositiver Neurone und Astrozyten im Temporalen Kortex.

In Abb.7 sind die entsprechenden Histogramme der Werte abgebildet. Beide sind durch negative Werte für Schiefe und Kurtosis charakterisiert. Die Abweichung von der Normalverteilung ist jedoch bei der kleinen Stichprobe nicht ungewöhnlich.

Die Immunreaktivitätsraten der Neurone und Gliazellen sind für jedes Transportprotein und jede untersuchte Region in Tabelle V dargestellt.

Tab. V: Zelluläre Expression der Transportproteine im Temporalen Kortex

(n.s. = nicht signifikant; die Anteile der Fälle in % sind gerundet)

Protein Region	N	Expressionsrate (% Neurone)	Anteil Fälle (%)	Expressionsrate (% Astrozyten)	Anteil Fälle (%)	Signifikanz
		Mittelwert (± Standardfehler)	11-40 %/ >40 %	Mittelwert (± Standardfehler)	11-40 %/ >40 %	Wilcoxon p
MRP1 Lam. II/III	13	26.5 (± 4.97)	62/23	27.8 (± 3.90)	69/15	n.s.
MRP2 Lam. II/III	13	16.4 (± 2.79)	77/0	19.3 (± 2.01)	92/0	n.s.
MRP5 Lam. II/III	10	24.1 (± 4.34)	70/0	28.5 (± 2.00)	100/0	n.s.
Pgp Lam. II/III	13	21.2 (± 3.56)	69/8	25.9 (± 2.48)	92/0	n.s.
MVP Lam. II/III	11	33.3 (± 5.32)	55/36	32.6 (± 3.32)	64/36	n.s.
MRP1 Lam. V/VI	13	23.3 (± 4.27)	77/15	27.6 (± 3.11)	85/15	n.s.
MRP2 Lam. V/VI	13	20.2 (± 4.28)	54/8	18.1 (± 2.46)	77/0	n.s.
MRP5 Lam. V/VI	10	21.8 (± 5.58)	30/30	32.1 (± 4.41)	60/30	n.s.
Pgp Lam. V/VI	13	19.6 (± 2.79)	77/8	25.5 (± 2.98)	85/8	n.s.
MVP Lam. V/VI	11	22.6 (± 4.64)	64/18	31.7 (± 3.78)	82/16	0.016

Bei der Prüfung, ob Unterschiede der Immunreaktivitätsraten in Abhängigkeit davon bestehen ob es sich um Neurone oder Gliazellen handelt, stellten sich für MRP1, MRP2, MRP5 und

Pgp in beiden Schichten keine Unterschiede zwischen neuronaler und astrozytärer Expression heraus. Für MVP hingegen zeigen Neurone in Lamina V/VI signifikant niedrigere Immunreaktivität als die dortigen Gliazellen ($p=0.016$; Wilcoxon-Test).

4.3.3.2 Regionale Differenzen zwischen den Schichten II/III und V/VI

Auch bei Untersuchung des Temporalen Kortex interessierte wieder die Frage nach regionalen Unterschieden der Immunreaktivität, wozu die ermittelten Raten immunreaktiver Zellen aller MDT getrennt nach Zelltypen in Lamina II/III mit der in Lamina V/VI verglichen wurden. Dabei stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der MVP-Immunreaktivität der Neurone beider Schichten mit Bevorzugung der Lamina II/III dar ($p=0.041$; Wilcoxon-Test). Es bestanden keine weiteren regionalen Differenzen der Immunreaktivitäten.

4.3.2.3 Differenzen zwischen den Transportproteinen

Die Ergebnisse der Quantifizierung zusammenfassend ergeben sich für die Nervenzellen deutlich höhere Immunreaktivitätsraten für MVP in Lamina II/III verglichen mit allen anderen untersuchten MDT. Die Unterschiede waren in der paarweisen Gegenüberstellung zu Pgp und MRP 2 signifikant (MVP vs. Pgp, $p=0.05$; MVP vs. MRP2, $p=0.021$; Wilcoxon-Test). Auch in Lamina V/VI zählte MVP neben MRP1 zu den immunreaktivsten MDT, die Unterschiede zu den anderen Transportproteinen waren aber weniger deutlich ausgeprägt als in Lamina II/III.

Analog wurden die Astrozyten auf ihre Immunreaktivität für MDT untersucht. Dabei zeigten sich hohe Immunpositivitätsraten von MVP und MRP5 und nur wenig MRP2-immunreaktive Gliazellen in beiden Schichten.

4.4 Vergleich der MDT-Immunreaktivität in Temporalen Kortices mit verschiedener Pathologie

In ähnlicher Weise wie beim Hippokampus sollte auch für den Temporalen Kortex eine Betrachtung der Immunreaktivitätsraten der MDT vor dem Hintergrund der kortikalen Pathologie erfolgen. Da jedoch in der Stichprobe ($n=13$) nur 2 Patienten mit klar umschriebener Pathologie (1 Astrozytom, 1 Sturge-Weber-Syndrom) des Temporalen Kortex vorhanden waren und die übrigen Gewebeproben nur diffuse histopathologische Veränderungen (Gliose) aufwiesen (Tabelle VI), war die Vergleichsgruppe für den

paarweisen Mittelwertwertvergleich nicht groß genug, um potentiell signifikante Differenzen zu ermitteln. Da ein Zusammenhang zwischen hippokampaler und extrahippokampaler Pathologie insofern besteht, als ein milder hippokampaler Zellverlust häufiger mit einer extrahippokampalen (kortikalen) Läsion einhergeht (62), nahmen wir eine Klassifizierung der Patientengruppe (n=13) nach Vorhandensein einer Sklerose im benachbarten Hippokampus (4 nHS/ 8 HS/ 1 nicht klassifiziert) vor und verglichen die kortikalen Immunreaktivitätsraten der MDT dieser 2 Gruppen mit einem nicht-parametrischen Mittelwertvergleich (Mann-Whitney-Test). Dieser ergab zahlenmäßig etwas höhere Werte in den kortikalen Proben bei denen im benachbarten Hippokampus keine Sklerose vorlag. Signifikant wurde dieser Unterschied für Pgp, sowohl in den Nervenzellen ($29.5 \pm 4.45\%$ nHS/ $15.8 \pm 3.21\%$ HS; $p=0.048$; Mann-Whitney U-Test) als auch in Gliazellen ($34.1 \pm 0.91\%$ / $21.4 \pm 3.09\%$; $p=0.028$; Mann-Whitney U-Test). Die sehr kleinen Fallzahlen schränken jedoch die Aussagefähigkeit dieses Ergebnisses ein.

Tabelle VI: Pathologie der untersuchten Gewebeproben (nur Patienten mit untersuchten Hippokampus- und Kortexproben)

„/“ nicht vorhanden; „+“ zutreffend; „-“ nicht zutreffend; die Patientenummern sind einem OP-Datum zugeordnet, HS = Hippokampusklerose, MF = diskrete Malformation

Pat. Nr.	Hippokampus – Pathologie		Kortex – Pathologie
	Wyler-Grad	HS	
15	/	/	Astrozytom
16	4	+	Unauffällig
17	3	+	Gliose
18	3	+	Sturge-Weber
19	4	+	Gliose
20	4	+	MF, Gliose
21	2	-	MF, Gliose
23	4	+	Unauffällig
24	4	+	Unauffällig
25	1	-	Unauffällig
26	1	-	Unauffällig
27	1	-	Gliose
28	4	+	Unauffällig

4.5 Vergleich der MDT-Immunreaktivität im Hippokampus und Temporalen Kortex

Nachdem die Immunreaktivität der Transportproteine unter regionalen und zellulären Gesichtspunkten sowie unter Berücksichtigung histopathologischer Veränderungen in beiden Typen humanen epileptogenen Gewebes dargestellt worden ist, soll nun der Frage nachgegangen werden, ob die Raten MDT-immunreaktiver Zellen des hippocampalen und kortikalen Gewebes differieren. Dazu werden die über alle Regionen gemittelten Raten immunreaktiver Zellen der Transportproteine für beide Zelltypen paarweise mit denen des jeweils anderen Gewebetyps verglichen. Signifikante Differenzen in der Zahl immunpositiver Zellen wurden mithilfe des Wilcoxon-Tests erhoben.

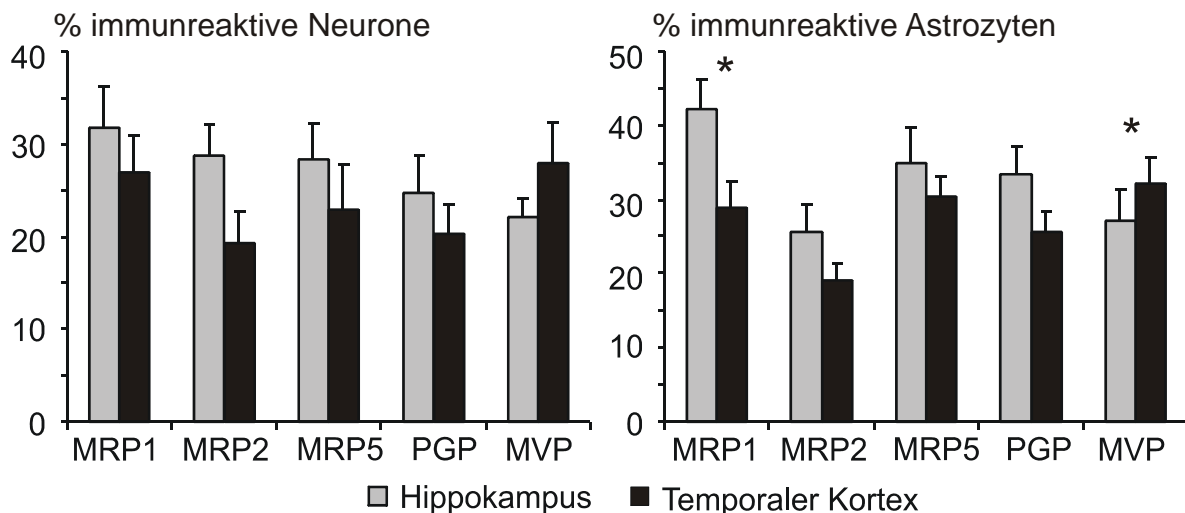


Abb. 8: Vergleich der Expression im Hippokampus und Temporalen Kortex.

Die sichtbaren Differenzen der neuronalen Expressionsraten zwischen Hippokampus und Kortex ließen sich statistisch nicht sichern. Beim Vergleich der astrozytären Immunreaktivität fielen eine signifikant höhere Anzahl MRP1- immunreaktiver Zellen im Hippokampus sowie mehr MVP-positive Astrozyten im Kortex als im Hippokampus auf.

Bezüglich der neuronalen Expression der untersuchten Transportproteine stellten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen Hippokampus und Temporalem Kortex dar, auch wenn die Ausprägung aller Transportproteine bis auf MVP in hippocampalen Nervenzellen etwas stärker war als in den Pyramidenzellen des Temporalen Kortex. Für MVP verhielt es sich gegensätzlich, hier waren prozentual mehr Nervenzellen im Kortex MVP-immunpositiv als im Hippokampus (Abb. 8).

Bei Betrachtung des Vorhandenseins der Transportproteine in den Astrozyten (Abb. 8) beider Gewebetypen lagen signifikante Unterschiede für MRP1 und MVP vor.

MRP 1 war in den Astrozyten des Hippokampus in deutlich stärkerem Maße vorhanden (42.3 ± 3.97 % Hippokampus/ 29.0 ± 3.43 % Kortex; $p=0.012$; Wilcoxon-Test), während signifikant mehr MVP-positive Astrozyten im Kortex (32.1 ± 3.49 %) als im Hippokampus (27.1 ± 4.39 %) zu finden waren ($p=0.042$; Wilcoxon-Test).

4.6 Gegenüberstellung von MDT-Immunreaktivitätsraten und Ergebnissen der elektrophysiologischen Messungen

Basierend auf der Frage nach der potentiellen Rolle der Transportproteine bei einer pharmakoresistenten Epilepsie wurden die Effekte von MDT-Inhibitoren (Probenecid und Verapamil) auf AED-resistente Aktivität und die Expressionsraten der MDT einander gegenübergestellt. Inwieweit dieses Modell auf die tatsächliche *in vivo*-Situation übertragbar ist, wird im Kapitel 5 diskutiert. Als repräsentative und für diese Fragestellung geeignete elektrophysiologische Variable wurde die Responsivität der epileptiformen Aktivität auf die Applikation bzw. das Einwaschen von AEDs und potentiellen Inhibitoren der Transportproteine (Verapamil für Pgp, Probenecid für die Mitglieder der MRP-Familie) ausgewählt. Induziert wird die Aktivität in den vitalen Hirnschnitten durch erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration ohne (GD, Subiculum) oder mit Applikation von $50\mu\text{M}$ Bicucullin (Temporaler Kortex) Dabei wird ein Effekt der MDT-Inhibitoren auf die epileptiforme Aktivität angenommen, wenn die zuvor AED-resistente Aktivität komplett supprimierbar ist oder ictale Aktivität durch interiktale Aktivität ersetzt wird. Kein Effekt wird dann bescheinigt, wenn ictale oder interiktale Aktivität trotz Einwaschen von MDT-Inhibitoren erhalten bleibt.

Zu erwähnen ist, dass alle elektrophysiologischen Experimente einbezogen wurden, in denen sowohl Verapamil wie auch Probenecid als Inhibitoren der Transportproteine Pgp und MRP eingewaschen wurden. Außerdem wurden auch die Messungen berücksichtigt, während derer nur Probenecid appliziert wurde, da nach Erfahrung der Untersuchenden eine ähnliche Wirkung auf die induzierte, epileptiforme Aktivität wie bei Gabe von Probenecid und Verapamil erzielt werden konnte. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien konnten Vergleiche der mittleren MDT-Expressionsraten zwischen Proben mit Effekt der MDT-Inhibitoren auf die AED-resistente epileptiforme Aktivität und solchen ohne Effekt an 19 Hippokampi (5 mit/ 14 ohne Effekt) und an 11 Korticen (6/5) durchgeführt werden.

Zusammenfassend fanden sich weder im Hippokampus noch im Kortex signifikante Unterschiede der Expression einzelner Transportproteine in Neuronen oder Gliazellen zwischen der Patientengruppe mit und der ohne Effekt in den elektrophysiologischen Messungen.

4.7 Korrelation der MDT-Immunreaktivität mit klinischen Parametern bzw. Merkmalen des Patientenkollektivs

Korrelationen zwischen klinischen Daten und überregionalen, d.h. über alle Regionen des jeweiligen Gewebetyps gemittelten Immunreaktivitätsraten wurden nur dort angestrebt, wo sie im Kontext der Pathomechanismen der Epilepsie bzw. dem Modell der durch Transportproteine vermittelten Pharmakoresistenz sinnvoll erschienen. Als klinische Parameter für die Korrelationen mit den ermittelten Immunreaktivitätsraten wurden ausgewählt:

- a) Alter des Patienten in Jahren,
- b) Dauer der Epilepsie in Jahren,
- c) Alter des Patienten bei Manifestation der Epilepsie in Jahren (onset),
- d) Anfallsfrequenz (Zahl der epileptischen Anfälle pro Monat),
- e) normierte Serumkonzentration der verabreichten Antikonvulsiva (Angabe in Prozent des Maximalwertes der Serumkonzentration des jeweiligen Medikaments laut Richtlinien des Epilepsiezentrum Berlin-Brandenburg/Königin Elisabeth Herzberge),
- f) Quotient Gewebe-/Serumkonzentration des AED (soweit verfügbar für Hippokampus oder Kortex; Bestimmung der Gewebekonzentration mittels HPLC),
- g) Anzahl sekundär generalisierter Anfälle pro Jahr.

Aufgrund der Größe der Stichprobe wird der Spearman-Rho-Korrelationskoeffizient für die Angabe der Signifikanz verwendet. Tabelle VII ist eine Zusammenstellung der Patientendaten der im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchten Gewebeproben, während in Tabelle VIII die ermittelten Daten zu Serum- und Gewebespiegeln der verabreichten AEDs der Patientenstichprobe zusammenfassend dargestellt sind.

Tab. VII: Klinische Daten der Patientenstichprobe (Die Patientennummern sind einem OP-Datum zugeordnet; „/“ fehlende Daten; w = weiblich, m = männlich).

Pat. Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Erkrankungs-Dauer (Jahre)	Erkrankungs-Alter (Jahre)	Anfalls-Frequenz (pro Monat)	Sek. Gen. Anfälle (pro Jahr)
6	29	w	26	3	2	4
7	53	w	38	15	4	0,1
8	43	w	12	31	4	/
9	39	w	39	1	7	0,1
10	45	w	22	23	0	30
11	60	w	50	10	10	1
12	24	w	15	9	3	12
13	48	w	20	28	14	0,1
14	36	m	6	30	4,5	0,1
15	27	w	21	6	/	/
16	34	m	17	17	5	0,01
17	42	m	38	4	30	0,01
18	34	w	31	3	8	/
19	49	w	22	27	5	0
20	48	w	44	4	8	/
21	58	w	45	13	2	0,1
22	24	m	1	23	60	0
23	44	w	42	2	7	0,01
24	40	m	37	3	4	/
25	60	w	33	27	2	/
26	37	w	10	27	1,5	/
27	51	w	11	40	4,5	12
28	58	m	23	35	4	0,1
46	47	w	32	15	3	/
47	38	m	37	1	3,5	0,1
48	32	w	/	/	1	0
55	38	m	1	37	4	1

Bei Analyse der Korrelationen zwischen oben genannten klinischen Daten und Immunreaktivitätsraten der Transportproteine im Hippokampus fand sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Rate MVP-positiver Nervenzellen und der Anzahl sekundär generalisierter Anfälle pro Jahr (Korrelationskoeffizient 0.672; n=13; p=0.012).

Bei Betrachtung des Temporalen Kortex stellte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Erkrankungsdauer (Abb. 9) und der Rate MRP1-immunpositiver Neurone und Astrozyten heraus (*Neurone*: Spearman-Rho 0.720; n=13; p=0.006; *Astrozyten*: Spearman-Rho 0.643; n=13; p=0.018). Weitere Korrelationen zwischen den in Tabelle VII enthaltenen Merkmalen und den MDT-Immunreaktivitätsraten bestanden nicht.

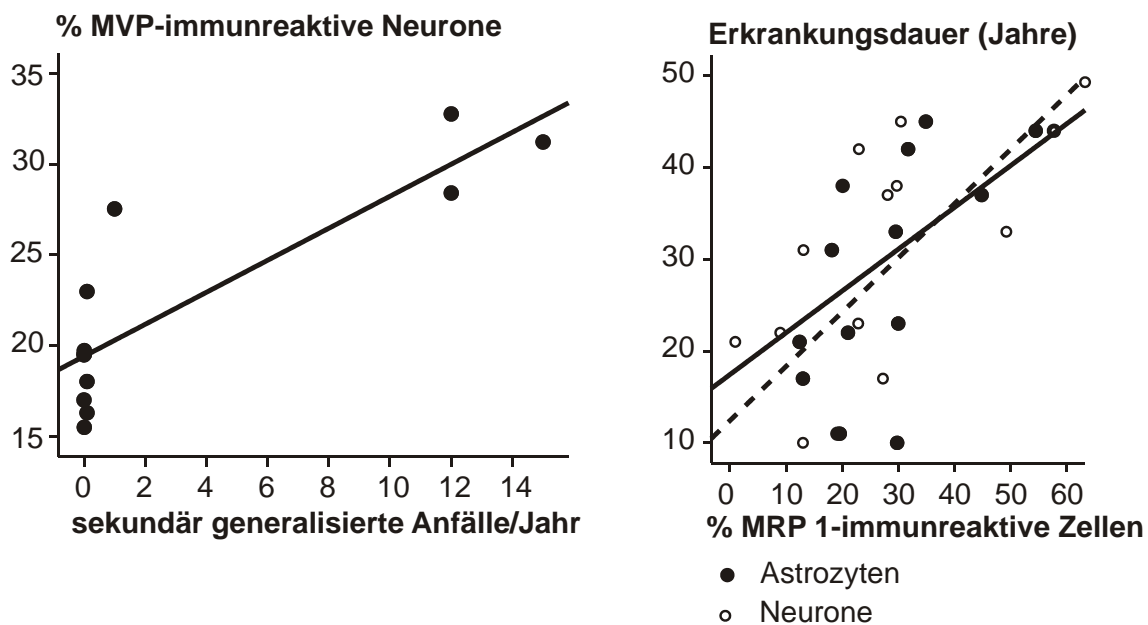


Abb. 9: Korrelationen zwischen Expression der Transportproteine und klinischen Daten der Patientenstichprobe. Im Hippokampus (links) besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl sekundär generalisierter Anfälle pro Jahr und der Rate MVP-immunpositiver Nervenzellen. Für den Temporalen Kortex (rechts) zeigten sich jeweils positive Korrelationen zwischen der Rate MRP1-immunreaktiver Gliazellen (unterbrochene Linie) bzw. Nervenzellen (durchgängige Linie) und der Erkrankungsdauer in Jahren.

Um herauszufinden, ob und welche Patienten die AEDs in den Zielregionen unzureichend akkumulieren, haben wir alle Patienten in der Studie der Arbeitsgruppe hinsichtlich der Beziehung zwischen Gewebespiegel und Serumkonzentration untersucht. Auf der Grundlage der Serumkonzentrationen und der verfügbaren Gewebe-Spiegel für AEDs wurden für die entsprechenden Patienten anhand der maximalen Serumkonzentrationen normierte

Gewebespiegel und normierte Serumkonzentrationen errechnet und diese einer Korrelationsanalyse unterzogen (Abb.10 A und B).

Sowohl für den Hippokampus als auch für den Temporalen Kortex lagen schwache positive Korrelationen vor (*Hippokampus*: Spearman-Rho 0.451; $p=0.046$; $n=20$; *Kortex*: Spearman-Rho 0.447; $p=0.048$; $n=20$). In der Annahme, dass alle Punkte die unterhalb des eingezeichneten Konfidenzintervalls liegen eine unzureichende Akkumulation der Medikamente signalisieren, konnte ich die Patienten einer „normal bis gut akkumulierenden“ Gruppe (1) und einer „unzureichend akkumulierenden“ Gruppe (2) (siehe Tabelle VIII) zuordnen.

Wenn Transportproteine die Akkumulation behindern, müssten sie in der unzureichend akkumulierenden Gruppe (verstärkt) exprimiert sein. Deshalb unternahm ich trotz der kleinen Stichproben den Versuch, die mittleren Immunreaktivitäten der beiden Gruppen zu vergleichen. Nennenswerte Ergebnisse sind in Abb.10 C und D dargestellt. Im Hippokampus finden sich bei normal bis gut akkumulierenden Patienten (1) signifikant weniger Pgp-positive Neurone und Gliazellen als bei unzureichend akkumulierenden Patienten (2) (*Neurone und Astrozyten*: $p=0.034$, $n(1)=9$ / $n(2)=2$; Mann-Whitney-U-Test). Für Neurone trifft dies insbesondere in den Regionen CA2 ($p=0.037$) und CA3 ($p=0.033$) zu, für Astrozyten in der Region CA3 und im Hilus (beide $p=0.034$). Außerdem zeigen sich ähnliche Differenzen für MRP5-positive Neurone in der Region CA3 ($p=0.034$). Im Temporalen Kortex sind keine entsprechenden Differenzen nachweisbar, auch nicht für andere Transportproteine. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Patienten mit unzureichender Akkumulation der AED in Neuronen und Astrozyten des Hippokampus vermehrt Pgp exprimieren. Wegen des geringen Stichprobenumfangs ist die Aussagekraft der Befunde als schwach einzuschätzen. Eine Bestätigung durch weiterführende Untersuchungsergebnisse ist erforderlich.

Tabelle VIII: Angaben zur medikamentösen Therapie der Patientenstichprobe

(AEDs = Medikamente bzw. Kombinationen zum Zeitpunkt der Operation:

OXC = Oxcarbamazepin, LEV = Levetiracetam, FRI = Frisium, TPM = Topiramat, LTG = Lamotrigin, PB = Phenobarbital, ZNS = Zonisamid, PGL = Pregabalin, PHT = Phenytoin, GBT = Gabapentin, TPM = Topiramat)

„nSK“ normierte Serumkonzentration soweit verfügbar (bei Gabe von 2 Medikamenten ist der höhere Wert angegeben); „/“ fehlende Daten; normierte Gewebe-Konzentration: Normierung auf den Maximalwert der Serumkonzentration des Medikaments; (1) AED-Akkumulation, (2) keine bzw. unzureichende Akkumulation (klassifiziert anhand der Lage der Punktorte in den Diagrammen Abb.10 A und B im Verhältnis zur unteren Grenze des Konfidenzintervalls)

Pat. Nr.	AEDs	nSK (%)	Normierte Gewebe-Konzentration	
			Hippokampus	Kortex
6	OXC + FRI	1,25	/	/
7	OXC + TPM	78	/	/
8	LEV + GBT	21	/	/
9	LTG + LEV	32,9	/	/
10	TPM	143,2	/	/
11	LTG + GBT	37,9	/	/
12	LTG	27,9	/	/
13	LTG + PB	70,8	/	/
14	LTG	65	/	/
15	LTG + PGB	67,9	/	/
16	OXC + LEV	50,8	19,25 (2)	/
17	LTG + LEV	78,6	82,14 (1)	/
18	LTG + FRI	32,1	83,57 (1)	/
19	LTG + LEV	97,9	209,29 (1)	/
20	LTG + TPM + FRI	35,7	52,14 (1)	53,57 (1)
21	OXC + ZNS + PGL	63,3	60,53 (1)	4,00 (2)
22	LTG	/	/	/
23	LTG + LEV	36,5	10,57 (2)	6,14 (2)
24	OXC + PHT + FRI	51,3	66,00 (1)	51,00 (1)
25	LTG + LEV	49,8	62,14 (1)	70,00 (1)
26	LEV + TPX	/	/	/
27	LTG + ZNS	23,2	71,58 (1)	51,58 (1)
28	OXC + LEV	61,8	69,00 (1)	/
46	LTG + FRI	20,7	/	/
47	LTG + LEV	66,5	/	/
48	LEV	41,3	/	/
55	OXC	49,8	/	/

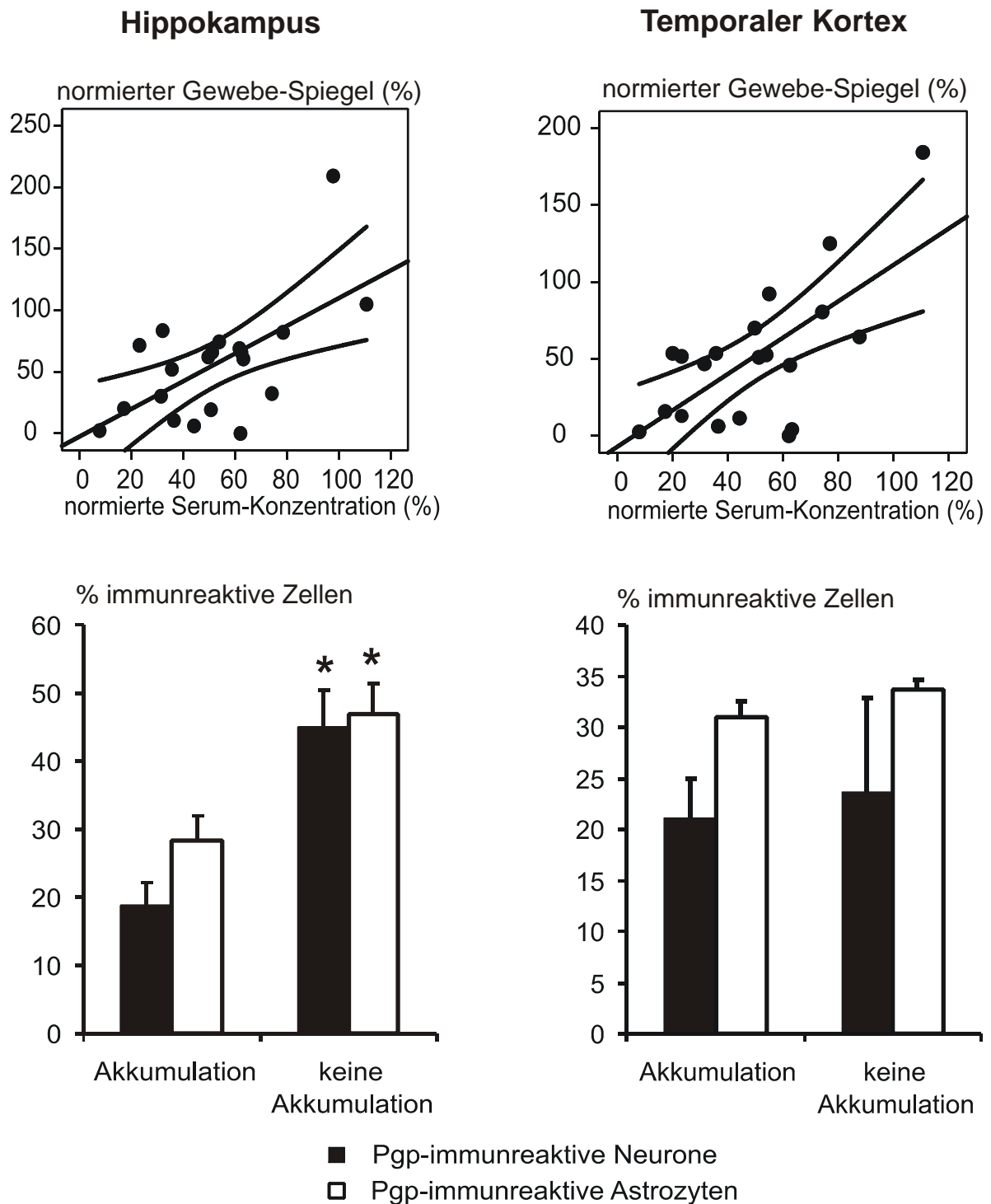


Abb. 10: Ermittlung von Patienten mit unzureichender Akkumulation von AEDs in den Zielgebieten und entsprechende Befunde zur Expression von Transportproteinen. **A, B:** Die normierten Gewebespiegel der AED in Hippokampus und Temporalem Kortex (je n=20) steigen linear mit der normierten Serumkonzentration an. Die unterhalb des Konfidenzintervalls liegenden Punkte signalisieren unzureichende Akkumulation der AED im Gewebe. **C:** Im Hippokampus finden sich bei Patienten mit unzureichender Akkumulation (n=2) signifikant mehr Pgp-positive Nerven- und Gliazellen als bei Patienten, die eine gute Akkumulation zeigen (n=9). **D:** Im Kortex (n=2 vs. n=4) bestehen keine sichtbaren Differenzen.

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten immunhistochemischen Befunde zeigen, dass im Hippokampus und Temporalen Kortex epilepsiekranker Patienten MDT (Multidrug-Transportproteine) -immunreaktive Glia- und Nervenzellen zu finden sind. Da für die durchgeführten Untersuchungen kein „nicht epileptisches“ oder gesundes Hirngewebe zur Verfügung stand, kann nur anhand bereits vorliegender Vergleiche (18, 28, 29, 39) vermutet werden, dass es sich um eine ektope parenchymatöse Expression der MDT bei Epilepsie handelt.

Auf der Grundlage einer quantitativen Analyse der immunhistochemischen Befunde lassen sich die in der Aufgabenstellung formulierten Fragen für die untersuchte Patientengruppe wie folgt beantworten:

Im **Hippokampus** betragen die über alle Regionen und Transportproteine gemittelten Raten immunpositiver Neurone und Astrozyten rund 30 % und 25 %. Unterschiede der Expression zwischen den Transportproteinen sind für Neurone geringer als für Astrozyten. Aber für beide Zelltypen gilt, dass MVP seltener nachweisbar ist als MRP1 (MRP5 und Pgp). Im Mittel sind Neurone häufiger immunpositiv als Astrozyten. Abweichend von den anderen Regionen, kann im Gyrus Dentatus (GD) die neuronale Expression vernachlässigt werden. Die neuronale Expression unterscheidet sich deutlich zwischen den Regionen, die astrozytäre Expression nur schwach.

Im **Temporalen Kortex** sind im Mittel 22% der Neurone und 26% der Astrozyten immunpositiv. MVP-positive Neurone finden sich bevorzugt in den oberen Kortex-Schichten und dort häufiger als Pgp- und MRP2-positive Neurone.

Beim **Vergleich der MDT-Expression zwischen Hippokampus und Temporalem Kortex** ist die astrozytäre Expression für MRP1 im Hippokampus größer als im Kortex, während MVP im Kortex stärker exprimiert ist als im Hippokampus.

Es gibt **keinen Zusammenhang zwischen der MDT-Expression und den Effekten der Transportprotein-Inhibitoren** Probenecid (MRP) und Verapamil (Pgp) auf die AED-resistente epileptiforme Aktivität in den elektrophysiologischen *in vitro*-Experimenten.

Die Expression der Transport-Proteine MRP1, MRP5 und Pgp im nicht sklerotischen und sklerotischen Hippokampus differiert nicht. MVP- und MRP2-positive Neurone finden sich im Hilus und in der Area CA3 häufiger in nicht-sklerotischen als in sklerotischen Proben.

Bei Patienten mit klar umschriebener Kortex-Pathologie (n=2/13) ist die gemittelte neuronale Expression aller Transportproteine im Temporalen Kortex geringer als bei Patienten mit „unauffälligen“ oder „gliotischen“ Kortices. Bei Sklerose des benachbarten Hippokampus (n=8/12) ist die mittlere Expression der Transportproteine in Neuronen des Temporalen Kortex ebenfalls geringer als in der Vergleichsgruppe ohne Hippokampus-Sklerose.

Beziehungen zwischen MDT-Expression und klinischen Merkmalen der Patienten sind selten. Mit zunehmender **Krankheitsdauer** steigt die Rate **MRP1-positiver Zellen** (Neurone und Astrozyten) **im Temporalen Kortex**. Eine größere **Anzahl sekundär generalisierter Anfälle/Jahr** koinzidiert mit einer höheren Rate **MVP-positiver Nervenzellen im Hippokampus**.

In der untersuchten Patientengruppe steigt die normierte **Konzentration der AEDs im resezierten Gewebe linear mit der normierten Serumkonzentration**. Bei Patienten, die **AEDs im Gewebe nur geringfügig akkumulieren (n=2/11)**, ist die Rate **Pgp-positiver Nerven- und Gliazellen im Hippokampus größer als bei den normal bis gut akkumulierenden Patienten**.

Einer detaillierten inhaltlichen Diskussion dieser wesentlichen Ergebnisse soll zunächst eine methodische Kritik vorangestellt werden.

5.1 Methodenkritik

In einigen Proben war eine Hintergrundfärbung zu beobachten, die in diesen Fällen eine Differenzierung zwischen immunreaktiven und nicht-immunreaktiven Zellen schwierig machte. Da Zellen nur dann als immunpositiv identifiziert wurden, wenn eine ausreichende Differenz zur Hintergrundfärbung bestand, könnte es in einigen Hirnschnitten zu einer Unterschätzung der Rate immunreaktiver Zellen gekommen sein. Da die Hintergrundfärbung nicht auf bestimmte Regionen beschränkt war, dürften weder regionale Unterschiede für ein bestimmtes Transport-Protein noch Differenzen zwischen den Transport-Proteinen verfälscht worden sein.

Zum Nachweis eines jeden Transportproteins diente jeweils nur ein Antikörper. Färbungen mit je 2 Antikörpern, die verschiedene Epitope eines Antigens erkennen, werden als valider angesehen (63). Wie bereits im Methoden-Kapitel (3.2.1 Seite 19 ff) beschrieben sind die von uns verwendeten Antikörper und Färbeprotokolle bereits erfolgreich zum immunhistochemischen Nachweis von Transportproteinen eingesetzt worden (18, 29, 39). Es

wird angenommen, dass es sich um spezifische, in Gefrierschnitten sensitive Antikörper handelt, die keine Kreuzreaktivität mit anderen Transport-Proteinen zeigen und zytoplasmatische Epitope erkennen (13, 16, 18, 24, 29, 51, 52).

Der Erhalt von Antigenen in den vorliegenden Gewebeproben war möglicherweise beeinträchtigt. Bis zur Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen wird das resezierte Gewebe transportiert, geschnitten, elektrophysiologischen Untersuchungen unterzogen und anschließend mindestens 24 Stunden in einer Paraformaldehyd (PFA) - Lösung gelagert, aber nicht in Paraffin eingebettet.

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Art der Fixierung einen Einfluss auf die Immunreaktivität hat (53, 64). Alle Schnitte wurden jedoch einem identischen Protokoll folgend (inklusive Transport, Lagerung, Fixierung) behandelt. Wir gehen deshalb davon aus, dass die erhobenen Daten das Vorkommen der Transportproteine im humanen epileptischen Gewebe hinreichend realistisch abbilden.

Ferner ist die morphologische Identifizierbarkeit der Gliazellen in den DAB/HE-Färbungen eingeschränkt, da die fibrillären Fortsätze in der Kern-Färbung nicht zur Darstellung kommen und damit eine Verfälschung von Zellzahl und konsekutiv Zelldichte erfolgen könnte. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Zelldichten stimmen jedoch gut mit den publizierten Daten anderer Gruppen überein (57, 61). Ein relevanter Fehler ist daher unwahrscheinlich.

Generell muss berücksichtigt werden, dass die Stichprobe epilepsiekranker Patienten deren reseziertes Gewebe immunhistochemisch untersucht wurde, relativ klein ist. Daher können die Ergebnisse bereits vorliegender Arbeiten durch die hier vorgestellten Befunde lediglich ergänzt werden, unabhängig davon, ob Übereinstimmungen oder Abweichungen vorliegen. Letztere werden im Folgenden mit großer Vorsicht diskutiert. Sofern für kleine Gruppen statistisch signifikante Ergebnisse ermittelt werden konnten, so bedürfen sie einer Bestätigung für eine größere Patientenpopulation. Dies trifft insbesondere für Unterschiede der MDT-Expression zwischen pathologisch oder klinisch differenten Patientengruppen mit sehr kleinen Teilstichprobenumfängen zu.

5.2 MDT-Expression im Hippokampus

Die untersuchten hippokampalen Hirnschnitte epilepsiekranker Patienten zeigen eine MDT-Expression in nicht zu vernachlässigender Größenordnung (im Mittel 30 % der Neurone und 25% der Astrozyten). Die mittlere Expressionsrate der Neurone ist höher als die

der Gliazellen. Eine Ausnahme stellt der Gyrus dentatus da, wo im Vergleich zur astrozytären Ausprägung der MDT eine vernachlässigbare Expression in den Körnerzellen vorliegt.

In der Literatur gibt es nur wenig Vergleichswerte die Rate MDT-exprimierender Zellen betreffend, da in den meisten Publikationen zum Thema qualitative (43) oder semiquantitative Auswertungen erfolgten (18, 29). Deshalb haben wir auf der Grundlage unserer quantitativen Daten Kategorien für mäßige und starke Expression gebildet und zum Vergleich mit den referierten Daten den prozentualen Anteil der Proben mit mäßiger und starker Expression angegeben. Die Gruppe um Marchi publizierte 2004, dass in Proben von humanem epileptischem Gewebe (n=11) 85 % der Astrozyten und 64 % der Nervenzellen eine Pgp-Immunpositivität aufwiesen (20). Der benutzte Antikörper war C494. Unsere Studie ergab ähnliche Pgp-Werte für Astrozyten lediglich in 4 % (n=1/26) der Fälle in den Regionen CA2 und CA3 und für Neurone in maximal 31 % (n=8/26) der Fälle im Hilus. Der von uns verwendete Antikörper war JSB1. Dieser deutliche Unterschied induziert zwei Fragen: (i) Ist der Antikörper C494, der Kreuzreaktivität mit der Pyruvat-Carboxylase aufweist (65), deutlich sensitiver als der Antikörper JSB1? (ii) Ist ein entsprechender Unterschied zwischen den jeweils untersuchten Patientengruppen möglich und wenn ja, welche Faktoren lösen die Expression aus? Hierzu vermuteten Sisodiya und Kollegen, die in einer Untersuchung zum MVP in epileptischen Geweben nur eine bestimmte Fraktion der untersuchten Zellen in Hippokampus und Kortex immunpositiv vorfanden, einen spezifischen Mechanismus der Hochregulation (43). Da in Epilepsie-Modellen (Ratte, Maus) durch epileptische Anfälle die Expression von Pgp (66-68) und MVP (40) induziert wird, scheint ein ähnlicher Mechanismus auch im menschlichen epileptischen Gewebe denkbar zu sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Arbeit, die eine Expression von Pgp und MRP1 in beiden Hemisphären eines im Status epilepticus verstorbenen Patienten zeigt. Aber auch bei diesem Patienten waren MDT nur in einem Teil der Zellen nachweisbar (17).

Bei der Betrachtung regionaler Unterschiede der MDT-Immunreaktivitäten im Hippokampus pharmakoresistenter Epilepsiepatienten fiel auf, dass alle untersuchten Transportproteine in signifikant geringerem Maße in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (GD) nachweisbar waren als in den anderen Nervenzellen. Dieser Befund koinzidiert mit anderen aus der Literatur bekannten besonderen Eigenschaften der Körnerzellen: (i) Sie besitzen bestimmte Proteine, die als Antiapoptose-Faktoren in Zelltod-induzierenden Signalkaskaden wirken und nach Kainat-induzierten Anfällen bei Ratten herauf reguliert werden (69). (ii) Epileptische Anfälle stimulieren die Neubildung von Körnerzellen (Neurogenese) (70, 71). Allerdings kann die Überlebensrate der neugeborenen Zellen

vermindert und ihre Lokalisation ektop sein. In der chronischen Phase einer Epilepsie scheint auch die Differenzierung gestört zu sein, so dass überwiegend Gliazellen und undifferenzierte Stammzellen entstehen (72). (iii) Während der Entwicklung besitzen Körnerzellen die Fähigkeit sowohl Glutamat als auch GABA zu bilden und freizusetzen. In reifen Körnerzellen, die unter physiologischen Bedingungen nur noch den erregenden Transmitter Glutamat synthetisieren, können Bildung und Freisetzung des inhibitorischen Transmitters GABA aktivitätsabhängig reaktiviert (hochreguliert) werden, so dass epileptiforme Aktivität im GD-CA3 Projektionssystem noch abgeschwächt oder ausgelöscht werden kann (73-76). Welche Folgen (Schutz oder Schaden) aus der Plastizität der Körnerzellen in verschiedenen Stadien der Epilepsie resultieren, lässt sich heute noch nicht übersehen.

In den publizierten Arbeiten zur MDT-Expression im Hippokampus finden sich nur wenige Anhaltspunkte zum GD. In einer Publikation wird auf vereinzelte MVP-positive Körnerzellen in 5 Fällen hippocampaler Sklerose hingewiesen (43). Vor dem Hintergrund der geringen MDT-Expression im GD in der vorliegenden Arbeit ist auch interessant, dass in einem Epilepsie-Modell (Ratte) durch einen induzierten Status epilepticus (SE) eine Expression von MRP1 und MRP2 in verschiedenen Regionen des Hippokampus und benachbarten Kortex-Regionen auftrat, diese jedoch im GD bei Tieren mit chronischer Epilepsie (4-9 Monate nach SE) kaum noch nachweisbar war (77).

Regionale Unterschiede der neuronalen MDT-Expression waren auch zwischen anderen hippocampalen Subregionen, bzw. zwischen diesen und dem Subiculum auffällig. Im Hilus zeigten sich häufiger Pgp-, MRP1- und MVP-positive Neurone als in den Regionen CA3, CA1 und im Subiculum. MRP5-positive Nervenzellen waren öfter in der Region CA3 nachweisbar als im Subiculum. Unterschiede in der astrozytären Expression waren ebenfalls vorhanden aber weniger deutlich ausgeprägt. MRP5-positive Astrozyten fanden sich im GD in größerer Zahl als im Hilus, in der Region CA3 und im Subiculum. Pgp-positive Gliazellen kamen in der Region CA1 zahlreicher vor als in der Region CA3, während sich MVP-positive Gliazellen seltener im Hilus als im Cornu ammonis bzw. dem Subiculum zeigten. Zur regionalen Verteilung der MDT gibt es bisher keine quantitativen Daten. Es existieren jedoch Arbeiten, die für die jeweils untersuchten Patientengruppen verschiedene qualitative Aussagen zur MDT-Expression bestimmter Zelltypen in hippocampalen Regionen machen. Die Autoren einer Untersuchung zu Pgp, MRP1, MRP2 und MVP an Hippokampusgewebe von 16 Patienten dokumentierten, dass MRP1 und MVP in Hilusneuronen, die als hypertroph beschrieben werden, vorkommen (18). Angaben zur MVP-Expression in Hilusneuronen finden sich auch in zwei weiteren Arbeiten (39, 43). Der Hinweis, dass MVP nur in seltenen

Fällen in Pyramidenzellen anderer Regionen nachweisbar ist (43) ließ sich in unserer Studie nicht bestätigen, denn mehr als 60 % der Fälle zeigten neuronale MVP-Immunreaktivitätsraten größer 20 % im Cornu ammonis und mehr als 45 % der Fälle im Subiculum. Sisodiya beschrieb ein Fehlen von Pgp- und MRP1-Immunreaktivität im Subiculum in 8 Fällen einer Hippokampus-Sklerose (16), während Aronica und Kollegen astrogliales Pgp im Subiculum in Gewebeproben von 3 Patienten mit HS nachweisen konnten (18). Zur Expression von MRP5 im Hippokampus haben Nies und Calatuzzolo berichtet, dass MRP5 besonders in den Pyramidenzellen von Tumorgewebe vorkommt (24, 51). Ob für die genannten Unterschiede die Verwendung verschiedener Antikörper zum Nachweis von MVP (43) und Pgp (16) oder Unterschiede zwischen den Patientengruppen verantwortlich sind, lässt sich nicht mit Sicherheit entscheiden. Die Benutzung mehrerer Antikörper, die verschiedene Epitope eines Transportproteins identifizieren (16) bzw. die zusätzliche Erhebung von PCR-Daten, die immunhistochemische Daten direkt ergänzen können (78), wäre auf jeden Fall von Vorteil.

Die Expressionsraten der unterschiedlichen MDT miteinander vergleichend, ergaben sich in der vorliegenden Arbeit für Neurone geringere Unterschiede als für Astrozyten. Beide Zelltypen waren jedoch für MVP seltener immunreaktiv als für MRP1, MRP5 und Pgp. In einer bereits zitierten Untersuchung fand sich zwar die Aussage, dass MVP in Zellen glialen Ursprungs weniger häufig nachweisbar war als Pgp, MRP1 und MRP2 (18), doch bestehen für das Vorkommen der genannten MDT, hinsichtlich des Anteils der Patienten mit Hippokampussklerose, erhebliche Unterschiede. Unter der Annahme, dass 11-40 % der Zellen / >40 % der Zellen eine moderate/starke Expression reflektieren, haben in unserer Stichprobe 56/31 % der Fälle neuronales Pgp und 81/13 % der Fälle neuronales MRP2 exprimiert, während in der zitierten Untersuchung eine Expression von Pgp und MRP2 in Neuronen nicht festgestellt werden konnte. Für diese Unterschiede könnten methodische Differenzen (keine Paraffin-Einbettung in unserer Studie) oder Patientengruppen-Differenzen verantwortlich sein (69 % der HS-Fälle in unserer Studie zeigten mehr als 50 % Zellverlust in allen Hippokampus-Regionen, in der Vergleichsstudie nur 8 %).

Es interessierte ferner die Frage, ob Patienten mit histopathologischen Veränderungen des Hippokampus im Sinne einer Sklerose eine erhöhte Expressionsrate der MDT aufweisen. In den hier untersuchten Gewebeproben des Hippokampus war eine bevorzugte Expression der Transportproteine Pgp, MRP1 und MRP5 in sklerotischen Hippokampi nicht nachweisbar. MVP- und MRP2-positive Neurone fanden sich im Hilus und der Region CA3 häufiger in nicht-sklerotischen Proben. Im Rahmen einer hippokampalen Sklerose sind die Subregionen unterschiedlich stark von einem Nervenzellverlust betroffen. Ausgehend von diesem regional

unterschiedlichen Zellverlust hätte man annehmen können, dass reaktive Astrozyten in den besonders betroffenen Regionen CA1, Hilus und CA3 oder auch dort angesiedelte Nervenzellen in stärkerem Maße Transportproteine exprimieren. Wir konnten entsprechende positive bzw. negative Korrelationen der Immunreaktivitätsraten zur Zelldichte nur für astrozytäres MRP1 in der Area CA2 bzw. für neuronales MRP1 im Hilus dokumentieren. Andere Gruppen zeigten (18, 29), dass nur in sklerotischen Hippokampi eine neuronale Expression (MRP1 und MVP) und eine gliale Expression (MRP1 und Pgp in reaktiven Astrozyten) von Transportproteinen erfolgt, während dies in nicht-sklerotischen (Gangliogliome) und normalen Vergleichs-Hippokampi (Autopsiegewebe von Patienten ohne neurologische Erkrankungen) nicht der Fall ist. Die in der hier vorliegenden Studie erhobenen Daten weichen also deutlich von den Aussagen der zitierten Arbeiten ab. Wenn man die Stichprobengrößen der Arbeiten sowie die pathologischen Befunde vergleicht, so untersuchten Aronica und Kollegen vier Fälle von nicht-sklerotischen Hippokampi (nHS) bei Gangliogliom-Patienten (18). In die vorliegende Untersuchung gingen 11 nHS-Fälle mit unauffälligen Temporalen Kortex (n=5) und verschiedenen para- oder extrahippokampalen pathologischen Diagnosen ein (1x Dysplasie, 1x DNET, 4x moderate Gliosen). Letztendlich sind beide Stichproben zu klein, um eine entscheidende Aussage zur MDT-Expression bei nicht sklerotischen Hippokampi (nHS) zu treffen. In der vorliegenden Arbeit unterlagen die resezierten hippokampalen Gewebeproben der Diagnostik durch die Neuropathologie (einschließlich der Wyler-Graduierung) und den von mir durchgeführten Bestimmungen der Zelldichte. Die Zelldichten der in unserer Studie untersuchten nHS-Fälle differieren in den Regionen CA1 und Hilus so deutlich von den 16 HS-Fällen (siehe Abb. 4/S.49), dass eine Fehlklassifizierung nahezu ausgeschlossen ist.

Mit Verweis auf die deutlich erkennbare Immunreaktivität in vielen hippokampalen nHS-Hirnschnitten (siehe Tafel 5 B, D, F; Tafel 6 A, C; Tafel 7 C, E; Tafel 8 E; Tafel 9 C-E) erscheint es gerechtfertigt, die zitierten Aussagen insofern zu ergänzen, dass auch bei nHS-Fällen eine Expression von MDT vorliegen kann. Interessanterweise existiert noch eine andere Arbeit, in der bei 13 Patienten (7 x nHS, 6 x HS) keine Korrelation zwischen dem Schweregrad einer Hippokampus-Sklerose und der Expression von Pgp, MRP1, MRP2 und MRP5 nachgewiesen werden konnte (19).

5.3 MDT-Expression im Temporalen Kortex

In den untersuchten kortikalen Gewebeproben exprimierten im Mittel 22 % der Neurone und 26 % der Astrozyten Transportproteine. Unterschiede zwischen den MDT sowie regionale und zelluläre Differenzen existierten nur insofern, als dass MVP-positive Neurone bevorzugt in den oberen Kortexschichten lokalisiert (Lamina II/III) und dort häufiger als Pgp- und MRP2-positive Nervenzellen anzutreffen waren. MVP-immunreaktive Astrozyten gab es sowohl in Lamina II/III als in Lamina V/VI.

Auch für den Temporalen Kortex existieren kaum quantitative Analysen zur MDT-Expression. Eine Untersuchung von 2003 zeigte MVP-positive Glia- und Nervenzellen in kortikalen Tumorpräparaten (Gangliogliome), wobei in 60 % der Fälle eine mäßige und in 40 % eine starke neuronale MVP-Expression angegeben wurde. Bei den Gliazellen lag in 83 % der Fälle eine mäßige und in 7 % eine starke Expression vor (39). In einer anderen Publikation aus dieser Arbeitsgruppe wurde für Patienten mit fokaler kortikaler Dysplasie (FCD) bzw. glio-neuronalen Tumoren mäßige und starke Pgp-Immunreaktivität für Neurone in 27 % bzw. 53 % der Fälle und für Gliazellen in 87 % bzw. 80 % der Fälle beschrieben. Die entsprechenden Werte für MRP1 in Neuronen betragen 67 % bzw. 60 % und in Gliazellen 47 % bzw. 80 % (29). Diese semiquantitativen Zahlenwerte lassen sich wiederum nur bedingt mit den quantitativen Daten der vorliegenden Arbeit vergleichen. Nimmt man auch für den Kortex an, dass 11-40 % immunpositive Zellen eine mäßige und >40 % eine starke Expression reflektieren, lag die Anzahl der Fälle mit mäßiger und starker MVP-Expression (zusammengefasst) in unserer Patientengruppe (1x Astrozytom, 1x Sturge-Weber, 5x diffuse Gliose, 6x unauffällig) bei 91 % (Neurone) und bei 100 % (Astrozyten).

Als Übereinstimmung bleibt festzuhalten, dass MVP sehr häufig im epileptischen Kortexgewebe neuronal und glial nachgewiesen werden konnte, unabhängig von pathologischen Veränderungen des Kortexgewebes. Die Werte für Pgp und MRP1 betragen 77 % und 84 % für Neurone sowie 92 % und 100 % für Astrozyten. Daraus geht hervor, dass auch bei pathologisch unauffälligen oder gliotischen Kortices von Epilepsiepatienten relativ häufig Immunreaktivität für Pgp und MRP1 beobachtet werden kann.

Die Funktionsweise und potenzielle Rolle von MVP im Rahmen der Pharmakoresistenz ist nicht geklärt. Einerseits wurde in Zellkulturen normaler humaner Astrozyten eine geringe Menge MVP mRNA und des Genprodukts MVP mittels PCR (polymerase chain reaction) und Western Blot nachgewiesen. Andererseits zeigte sich in Astrozyten von Hirntumoren glialer Herkunft (Astrozytome, Meningeome) eine hohe Expression von MVP

(79). Die Autoren schreiben MVP eine Schutzfunktion zu. Die Expression soll im Tumorgewebe durch die maligne Transformation bzw. im gesunden Gewebe als Reaktion auf eine Verletzung oder andere Reize hervorgerufen werden. Einen ähnlichen Mechanismus der Induktion vermuten Aronica und Kollegen. Die Behandlung mit Antikonvulsiva (AEDs) sehen die Autoren eher nicht als Ursache, sondern vermuten eine konstitutionelle Entwicklung im Rahmen der Tumorgenese (39). Die Tatsache, dass in unserer Patientengruppe mit nur einem Tumor-Fall die Transportproteine MVP, Pgp und MRP1 ausgesprochen häufig exprimiert waren, weist daraufhin, dass epileptische Anfälle oder der mit ihnen einhergehende zelluläre Stress die Expression von MDT im Temporalen Kortex, insbesondere von MVP, induzieren könnte.

Bei der Betrachtung regionaler Unterschiede fiel eine starke neuronale MVP-Expression in der Lamina II/III auf. Hierzu gibt es eine Arbeit an einem Tiermodell der Epilepsie, in der MVP in den Nervenzellen von Lamina II des parahippokampalen Kortex chronisch-epileptischer Ratten und interessanterweise auch von Kontrollratten detektiert werden konnte. Die Expression bot jedoch keinen Schutz vor dem anfallsinduzierten Zelltod, da es in diesem Bereich im Vergleich zu den Kontrollratten dennoch zu einem ausgedehnten Nervenzellverlust gekommen war (40). Ob die bevorzugte Expression des neuronalen MVP in der Lamina II/III in unserer Studie mit den relativ geringfügigen, pathologischen Veränderungen der von uns untersuchten Kortexproben in Zusammenhang steht, muss offen bleiben.

Es bleibt der Vollständigkeit halber nachzutragen, dass in Fällen kortikaler Dysplasien und Neoplasien Transportproteine verstärkt in geschädigten Arealen exprimiert werden (16, 28, 29, 32, 34, 39) und dass Pgp, MRP1 und MVP in GFAP-positiven und negativen Astrozyten an der Rinden-Mark-Grenze und in der weißen Substanz vorkommen (35). Dagegen waren in histopathologisch normalen Proben des Temporalen Kortex (gewonnen bei Ausräumung intrazerebraler Blutungen oder Exstirpation von Gliomen) die mRNA von MRP1, MRP2 und MRP5, aber nicht die entsprechenden Proteine zu finden (24).

Der Vergleich der MDT-Expression zwischen Hippokampus und Temporalen Kortex ergab eine größere astrozytäre Expression für MRP1 im Hippokampus, während MVP in den kortikalen Proben stärker exprimiert wurde als in den hippokampalen Proben. Publikationen, in denen die Expression von Transportproteinen sowohl in hippokampalen wie auch kortikalen Gewebeproben untersucht wurden, beschreiben gliale Immunreaktivität für MRP1 in Fällen von DNET, FCD sowie Hippokampus-Sklerose (16). Dabei wurden MRP1-positive Astrozyten in allen Kortices (n=22), aber nur in 5 der 8 untersuchten sklerotischen

Hippokampi gefunden. Dieses Ergebnis scheint von der hier getroffenen Aussage einer stärkeren glialen Expression im Hippokampus abzuweichen, könnte aber dadurch bedingt sein, dass es sich in der zitierten Studie um unabhängige Proben für Kortex und Hippokampus handelt, während in unserer Studie Hippokampus und Temporaler Kortex als abhängige Stichproben von jeweils gleichen Patienten stammen.

Zur Expression von MVP im epileptischen Kortex wurde bereits diskutiert (siehe Vergleich der MVP-Expression in unserer Studie und in (39)). Aus der zitierten Studie geht indirekt hervor, dass die MVP-Immunreaktivität im gleichfalls resezierten Hippokampus nur in einigen Hilusneuronen und wenigen Astrozyten nachweisbar war und demnach ebenfalls eine höhere kortikale MVP-Expression im Vergleich zum Hippokampusgewebe vorlag. Eine eindeutig vergleichende Arbeit auf semiquantitativer Basis beschäftigt sich mit dem Vorkommen von MVP in einem Tiermodell der Epilepsie. Chronisch-epileptische Ratten zeigten in hippokampalen Regionen (GD, CA1, CA3) eine schwache MVP-Immunreaktivität, in verschiedenen Schichten des entorhinalen und piriformen Kortex aber ein starke (40). Auch wenn diese Studie sich aufgrund nicht auszuschließender Spezies-Unterschiede nur bedingt zum Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen an humanem Gewebe eignet, so macht sie doch deutlich, dass die MVP-Expression zwischen Kortex und Hippokampus differieren kann.

Bei der Untersuchung einer Abhängigkeit der MDT-Expression von histopathologischen Veränderungen der kortikalen Gewebeproben ergab sich im Vergleich mit Patienten deren Kortices als „unauffällig“ oder „gliotisch“ bewertet wurden, eine geringere mittlere neuronale Expression aller Transportproteine bei Patienten mit klar umschriebener Kortex-Pathologie. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist dadurch eingeschränkt, dass es sich insgesamt um eine kleine Stichprobe (n=13) handelt und sich nur 2 Kortices mit eindeutiger Pathologie (Sturge-Weber, Astrozytom) darunter befanden. Daher bedarf dieser Befund der Prüfung an einer größeren Stichprobe.

Die Expression der MDR-Proteine im epileptischen Kortexgewebe ist intensiv im Zusammenhang mit Malformationen (fokale kortikale Dysplasie) und Neoplasien (Gliome, DNET) untersucht worden, wobei für MRP1 und Pgp eine ektope Expression in Gliazellen und dysplastischen Neuronen bzw. in Tumoren demonstriert werden konnte (29). Eine andere Gruppe zeigte, dass MVP in dysplastischen Nervenzellen und Neuronen innerhalb kortikaler Tumorentitäten (DNET, FCD) nachweisbar war, nicht jedoch in normalen Neuronen außerhalb dieser Läsionen (43). Weitere Arbeiten dokumentieren eine gliale Expression von Pgp in Fällen kortikaler Malformationen (34), von MRP1 im Rahmen von FCD (28), von

MVP in Gliomen (39), von Pgp und MRP1 im Rahmen von DNET und FCD (16) sowie von Pgp, MRP2 und MRP5 bei DNET (32). Übereinstimmend berichten die Autoren dieser Studien von einer besonders ausgeprägten Expression innerhalb kortikaler Läsionen.

In einigen Publikationen (16, 29, 39) wird jedoch darüber hinaus auch von einer Immunreaktivität in benachbarten, vorrangig gliotisch veränderten Kortexarealen berichtet. Hier liegt scheinbar eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vor, die eine neuronale Expression in nur wenig veränderten und „gliotischen“ Kortices zeigte. In diesem Zusammenhang sei nochmals darauf verwiesen, dass eine Expression von Pgp und MRP1 nach Tod des Patienten durch Status epilepticus auch in Gliazellen des gesunden Hirnparenchyms nachweisbar war (17). Sogar in Zelllinien normaler humaner Astrozyten war MVP zu finden (79). Unsere Befunde und die zuletzt zitierten Ergebnisse anderer Autoren lassen annehmen, dass eine MDT-Expression im Kortex von Epilepsiepatienten nicht nur histopathologisch veränderten Regionen vorbehalten ist. Vor diesem Hintergrund sollte auf die Untersuchung der Faktoren fokussiert werden, die eine Expression von MDT induzieren könnten. Derzeit wird die Hypothese favorisiert, dass rezidivierende, nicht durch Applikation von AEDs terminierbare, epileptische Anfälle eine Ausbildung von Transportproteinen in Neuronen und Astrozyten der in den Anfall involvierten Hirngebiete verursachen können. In diversen Tiermodellen konnte eine Abhängigkeit der MDT-Immunreaktivität von epileptischen Anfällen gezeigt werden (40, 66-68, 80). Auch beim Menschen scheint eine verstärkte Expression von Transportproteinen durch einen Status epilepticus bzw. rezidivierende epileptische Anfälle erfolgen zu können (17). Wenn es stimmt, dass epileptische Anfälle die kortikale Ausbildung von Transportproteinen triggern, wie es im Tiermodell demonstriert werden konnte, so ist eine überregionale Expressionsinduktion im Temporalen Kortex, der als Gesamtstruktur im Rahmen einer Temporallappenepilepsie an der Anfallsgeneration beteiligt bzw. vom epileptischen Anfall betroffen ist, nachvollziehbar.

In der hier untersuchten Stichprobe befanden sich 12 Patienten, bei denen sowohl kortikales wie auch hippocampales Gewebe reseziert und untersucht wurde. Darunter waren 8 Fälle einer Hippokampus-Sklerose (nur ein Patient mit dualer Pathologie). Bei diesen 8 Patienten trat im Vergleich zu den vier Patienten mit benachbartem nicht sklerotischem Hippokampus eine geringere neuronale MDT-Expression im Kortex auf. Eine geringe neuronale MVP-Expression im unauffälligen Kortex bei sklerotischem Hippokampus (n=5) wurde bereits beschrieben (43) und stimmt mit unserem Befund überein. Die Ursachen dafür sind unklar.

5.4 MDT-Expression und elektrophysiologische Effekte von Modulatoren der MDT-Aktivität

Falls ein Zusammenhang zwischen MDT-Expression und Pharmakoresistenz besteht, so müssten Gewebeschnitte, die Transportproteine der MRP-Familie und Pgp exprimieren, im *in vitro*-Experiment eine Suppression bzw. Reduktion der AED-resistenten epileptiformen Aktivität zeigen, wenn Inhibitoren dieser Proteine ko-appliziert werden. In der untersuchten Stichprobe bestanden zwischen Proben, deren induzierte Aktivität supprimiert bzw. reduziert wird und deren Aktivität persistiert, keine Unterschiede hinsichtlich der MDT-Expression. Folglich gibt es keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von MRP und Pgp im Parenchym und den *in vitro*-Effekten der MDT-Inhibitoren Probenecid und Verapamil auf die AED-resistente Aktivität.

Die in diesem Kontext grundlegende Frage lautet, ob die *in vivo* bzw. *in vitro* applizierten AEDs Substrate der untersuchten Transportproteine darstellen. Die Responsivität einiger Hirnschnitte könnte sonst auf anderen, unter Umständen unspezifischen Wirkungen der Substanzen beruhen. Zur Klärung ob bzw. welche AEDs von den MDT transportiert werden, sind in den letzten Jahren mehrere Arbeiten erschienen (20, 42, 66, 81, 82), die annehmen lassen, dass Phenytoin, Topiramate, Felbamat, Phenobarbital, Lamotrigin und Levetiracetam als Substrate von Pgp oder MRP1 anzusehen sind. Für Carbamazepin und Valproat sind die Befunde widersprüchlich (*Substrate*: 83-86; *keine Substrate*: 82, 87-91). Damit kann die Frage, ob AEDs durch MDT im humanen Hirnparenchym transportiert werden, nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang auch, ob die induzierte epileptiforme Aktivität wirklich die *in vivo*-Aktivität bzw. epileptische Anfälle des Patienten hinreichend abbildet. Hierzu sei auf die Publikation der eigenen Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2006 verwiesen, in der gezeigt werden konnte, dass *in vitro*-induzierte epileptiforme Aktivität im GD bei *in vivo* pharmakosensitiven Patienten mit extrahippokampalen Tumoren durch Carbamazepin-Applikation supprimierbar war, während sie in Hirnschnitten pharmakoresistenter Patienten bestehen blieb (45). Für die vorliegende Untersuchung stand kein Gewebe pharmakosensitiver Patienten zur Verfügung.

Basierend auf den Ergebnissen der Vorarbeiten, die bei Umgehung der Blut-Hirn-Schranke für den Großteil der hippokampalen Hirnschnitte im GD eine fehlende *in vitro*-Responsivität auf Carbamazepin zeigen konnten, sollte der Beitrag der parenchymatösen Expression von MDT zur Pharmakoresistenz exploriert werden. Im GD (vernachlässigbare neuronale, aber vorhandene astrozytäre MDT-Expression) war bei 36 % der Patienten eine

reversible Suppression induzierter AED-resistenter Aktivität in den Hirnschnitten zu beobachten, wenn Blocker der Transportproteine MRP1 und Pgp (Probenecid und Verapamil) und AEDs ko-appliziert wurden. In den anderen Regionen (Subiculum und Temporaler Kortex) zeigten nur 9 % der Patienten eine Suppression und 27 % einen Übergang anfallsartiger Aktivität in interiktale Aktivität. Da keine Beziehung zwischen der Expression von MRP1 bzw. Pgp und den *in vitro* Effekten der entsprechenden MDT-Inhibitoren nachweisbar war, bleibt offen, ob die Resistenz der Aktivität durch jene MDT verursacht wird, die nicht durch Probenecid und Verapamil zu blockieren sind, z.B. MVP.

Alternativ wäre daran zu denken, dass ein relativer Mangel an ATP während der *in vitro* epileptiformen Aktivität die Wirkung einer Hemmung der ATP-abhängigen MDT maskiert. Das würde allerdings auch bedeuten, dass für die Resistenz der *in vitro* Aktivität nicht die ektop exprimierten MDT, sondern andere Faktoren verantwortlich sind.

5.5 MDT-Expression und klinische Merkmale des Patientenkollektivs

Die Ergebnisse weisen aus, dass die Rate MRP1-positiver Zellen (Neurone und Astrozyten) im Temporalen Kortex mit zunehmender Krankheitsdauer ansteigt. Ursache könnte eine anfallsinduzierte Expression von MRP1 sein, die mit der Anzahl stattgehabter epileptischer Anfälle zunimmt. Die Korrelationen der Anzahl immunpositiver Zellen mit der Erkrankungsdauer sprechen jedoch nur für einen statistischen Zusammenhang. Im Kontext ist eine Beobachtung von Kubota und Kollegen interessant, die in parenchymatös lokalisierten Zellen humanen epileptischen Gewebes bei 2 Patienten, die eine hohe Zahl von „Anfallstagen“ aufwiesen eine starke Expression von MRP1 und Pgp im Gyrus parahippokampalis beschrieben (19). Welche Mechanismen die Expression triggern, ist letztendlich nicht klar, doch eine Beziehung zu epileptischen Anfällen und einem progressiven Krankheitsverlauf mit wiederkehrenden Anfällen ist wahrscheinlich. Diese Vermutung wird durch eine Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der Expression verschiedener Transportproteine im epileptischen Gewebe an Ratten unterstützt. Hierbei zeigten chronisch-epileptische Tiere unterschiedliche Expressionsmuster von MRP1 in Abhängigkeit vom Voranschreiten der Erkrankung. Tiere mit abnehmender oder gleich bleibender Anfallsfrequenz nach initialem Status epilepticus offenbarten im Kortex (entorhinal, piriform, perirhinal) gleiche Immunreaktivitätsraten wie gesunde Kontrolltiere,

während Tiere mit zunehmender Anfallsfrequenz (so genannter progressiver Krankheitsverlauf) deutlich erhöhte gliale MRP1-Immunreaktivität zeigten (77). Eine ähnliche Beobachtung konnten die Autoren der Studie im Hippokampus nicht machen, wie auch in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen Krankheitsdauer und MRP1-Expression nur für die kortikalen, nicht aber für die hippokampalen Hirnschnitte nachweisbar war.

Für den Hippokampus zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil MVP-immunpositiver Nervenzellen und der Anzahl sekundär generalisierter Anfälle pro Jahr, d.h. je häufiger sekundär generalisierte Anfälle auftraten, umso höher ist die Immunreaktivität von Nervenzellen für MVP. Dieser statistische Zusammenhang zwischen Anfallsgeschehen und Immunreaktivität passt zur Hypothese einer anfallsinduzierten Expression von Transportproteinen (17, 68, 80, 92, 93). Eine Korrelation zwischen der Menge der MVP mRNA im parahippokampalen Kortex und der Anzahl epileptischer Anfälle im Tiermodell beschrieben van Vliet und Kollegen und schlussfolgerten, dass die Expression von MVP sowohl durch die Anfallsaktivität als auch durch den dabei auftretenden zellulären Stress reguliert wird (77).

In dem hier untersuchten pharmakoresistenten Patientenkollektiv steigt die normierte Konzentration der AEDs im Gewebe linear mit der normierten Serumkonzentration (Abb. 10 A, B). Insofern scheint eine normale bis gute Akkumulationsfähigkeit der untersuchten Patienten für die erhaltenen AEDs (siehe Tabelle VIII) vorzuliegen. Die bei einer Auswahl dieser Patienten nachgewiesenen parenchymatös exprimierte MDT scheinen nicht zur Pharmakoresistenz im Sinne eines Transportes der AEDs aus dem Gewebe heraus beizutragen. Dennoch akkumulieren rund 20 % der Patienten der untersuchten Stichprobe (n=2/11) AEDs im Gewebe in geringerem Maße als der Rest der Stichprobe. Hippokampale Hirnschnitte dieser Patienten weisen eine höhere Rate Pgp-positiver Nerven- und Gliazellen auf, als die von normal bis gut akkumulierenden Patienten (Abb. 10 C). Dieses nur für eine kleine Anzahl Patienten statistisch signifikante Ergebnis bedarf natürlich der Bestätigung für eine größere Patientenpopulation.

Seit Golden und Pardridge 1999 (94) eine Ko-Lokalisation von Pgp mit dem glialen Marker GFAP und nicht mit dem in Endothelzellen vorkommenden GLUT 1-Transporter zeigen konnten, vermutet man, dass in astrozytären Fortsätzen lokalisiertes Pgp zur Pharmakoresistenz beiträgt. Die Vermutung, dass ektop exprimierte MDT eine Transportfunktion für AEDs erfüllen, ließ sich in Zellkulturen von Astrozyten aus humanem epileptischen Gewebe für Phenytoin bestätigen (20). Potschka und Kollegen zeigten via

Mikrodialyse signifikante Konzentrationserhöhungen von Phenobarbital, Lamotrigin und Felbamat im Kortex epileptischer Ratten nach Blockade von Pgp durch Verapamil (81). In Studien mit Knock-out-Mäusen fanden sich Hinweise auf eine Transportfunktion des Pgp für Topiramamat (42), sowie für Phenytoin, Carbamazepin und dessen Metabolite (66).

In der hier vorliegenden Untersuchung erhielten die im Hippokampus „nicht akkumulierenden“ Patienten Oxcarbamazepin und Levetiracetam bzw. Lamotrigin und Levetiracetam als antikonvulsive Therapie. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass neben Phenytoin und Phenobarbital auch Lamotrigin und Levetiracetam Substrate des humanen Pgp sind (82). Darüber hinaus weist eine inverse Beziehung des Gewebe/Plasma Quotienten für 10-OHCBZ, dem primär aktiven Metaboliten von Oxcarbamazepin, zur Menge MDR1 mRNA (95) darauf hin, dass Pgp die Akkumulation des Metaboliten im Hirngewebe beeinträchtigen könnte. Ob die Pharmakoresistenz der in dieser Untersuchung nicht akkumulierenden Patienten durch eine ektope Expression von Pgp in Neuronen und Gliazellen zustande kommt, kann aber nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Zusammenfassend sprechen einige Argumente für eine Beteiligung der MDT an der Pharmakoresistenz. Das ist zum einen das Vorhandensein der Transportproteine in Nerven- und Gliazellen des humanen resezierten epileptischen Gewebes, zum anderen die Tatsache, dass sich in hippokampalen Hirnschnitten von Patienten, die AEDs nicht akkumulieren, eine signifikant höhere Pgp-Expression findet. Abschwächend muss man jedoch sagen, dass es sich bei den „nicht akkumulierenden“ nur um zwei Patienten handelt und dass ein alleiniges Vorhandensein der MDT nicht ihre Beteiligung an der Pharmakoresistenz beweist – zu unsicher ist die Datenlage bezüglich ihrer Fähigkeit, AEDs zu transportieren. Weiterhin war in dieser Untersuchung kein Unterschied der MDT-Expression zwischen Hirnschnitten, deren induzierte AED-resistente Aktivität durch kombinierte Gabe von Probenecid, Verapamil und AED gehemmt/reduziert bzw. nicht gehemmt/reduziert werden konnte, nachweisbar, was eine signifikante Rolle der ektope exprimierten MDT für die *in vitro* Pharmakoresistenz sehr unwahrscheinlich macht. Dazu passt die Tatsache, dass in den meisten untersuchten Teil-Resektaten die normierte Gewebekonzentration der AEDs größer war als die normierte Serumkonzentration, also eine Akkumulation der AED zu beobachten war. Letzteres spricht auch gegen eine wesentliche Beteiligung der MDT an einer *in vivo* Pharmakoresistenz in diesem Patientenkollektiv.

Abschließend muss zumindest für diese Studie festgestellt werden, dass ein wesentlicher Beitrag der parenchymatös exprimierten MDT zur Pharmakoresistenz nicht anzunehmen ist.

6 Zusammenfassung

Pharmakoresistenz ist ein wesentliches Problem in der Behandlung der Temporallappenepilepsie. Trotz optimaler Behandlung mit gängigen Antikonvulsiva (AEDs) leiden die betroffenen Patienten viele Jahre an epileptischen Anfällen. Gesundheitliche, mentale und soziale Beeinträchtigungen sind häufige Folgen. Bei einem Teil dieser Patienten kann Anfallsfreiheit erzielt werden, wenn eine chirurgische Entfernung des epileptogenen Hirngewebes erfolgt und die medikamentöse Behandlung fortgesetzt wird. Kann das entfernte Gewebe vital erhalten werden, bietet sich die Möglichkeit, Pathomechanismen der Pharmakoresistenz *in vitro* zu untersuchen.

An der Blut-Hirn-Schranke, der Blut-Liquor-Schranke und im Parenchym des epileptogenen Gewebes werden ATP-abhängige Transportproteine (MDT) über- bzw. ektoexprimiert. In Analogie zu einem nachweislichen Zusammenhang zwischen der Resistenz maligner Zellen gegenüber Chemotherapeutika und dem Vorhandensein ATP-abhängiger Transportproteine wird vermutet, dass derartige Proteine (P-Glykoprotein, verschiedene Mitglieder der MRP-Familie) die Anreicherung der AEDs im epileptogenen Gewebe behindern und dadurch an deren Wirkort eine unzureichende Konzentration vorliegt (Transporter-Hypothese).

Unsere Arbeitsgruppe hat sich das Ziel gesetzt, den Beitrag der im Parenchym lokalisierten MDT zur Pharmakoresistenz des resezierten Gewebes experimentell abzuschätzen. Meine Aufgabe war es, zelluläre und regionale Unterschiede der Expression von P-Glykoprotein (Pgp), verschiedenen Mitgliedern der MRP-Proteinfamilie (MRP1, MRP2, MRP5) und des „Major Vault Proteins“ (MVP) in den verschiedenen Typen epileptogenen Gewebes (Hippokampus, Temporaler Kortex) zu ermitteln und mögliche Zusammenhänge zu histopathologischen Veränderungen des Gewebes bzw. klinischen Merkmalen der untersuchten Patientenstichprobe aufzudecken.

Die Expression der Transportproteine Pgp, MRP1, MRP2, MRP5 und MVP wurde in resezierten hippokampalen und/oder kortikalen Gewebeproben von insgesamt 28 Patienten mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Für den Nachweis der Transportproteine fanden sich Protokolle in der einschlägigen Literatur. Die quantitative Analyse der Immunpräzipitate erfolgte nach Diaminobenzidin- Einfachfärbung (ohne oder mit HE-Gegenfärbung) mittels Computergestützter mikroskopischer Zellzählung in 10 µm dicken Schnitten. Zur Absicherung einer korrekten Zuordnung der Immunreaktivität zu bestimmten

Zelltypen (Nerven-, Gliazellen) erfolgten Doppelfärbungen spezifischer neuronaler oder astrozytärer Komponenten und bestimmter Transportproteine mit fluoreszierenden Farbstoffen.

In hippokampalen und kortikalen Gewebeproben fanden sich alle untersuchten Transportproteine. Im Hippokampus waren im Mittel 30 % der Neurone und 25 % der Astrozyten immunreaktiv, im Temporalen Kortex 22 % der Nervenzellen und 26 % der Astrozyten. Unterschiede der MDT-Immunreaktivitäten zwischen Neuronen und Gliazellen ließen sich nur im Hippokampus statistisch sichern. Regionale Differenzen der Expression bestanden insofern, als dass in Neuronen des Gyrus dentatus alle MDT in signifikant geringerem Maße exprimiert wurden als in den anderen Regionen und dem Subiculum. Im Temporalen Kortex konnten in den oberen Schichten häufiger MVP-immunpositive Nervenzellen gefunden werden. Ein Vergleich der MDT-Expression zwischen hippokampalen und kortikalen Proben ergab ein häufigeres Vorkommen von MRP1-reaktiven Astrozyten im Hippokampus und eine stärkere neuronale Expression von MVP im Kortex.

Ein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen induzierter epileptiformer Aktivität auf applizierte Inhibitoren der MDT in den vitalen Hirnschnitten und der Expression von MDT konnte statistisch nicht erbracht werden, so dass nicht von einem wesentlichen Beitrag der parenchymatös exprimierten MDT zur Entstehung der *in vitro* Pharmakoresistenz ausgegangen werden kann.

Die MDT-Expression im sklerotischen und nicht sklerotischen Hippokampusgewebe differierte kaum. Kortexproben mit klar umschriebener Pathologie wiesen eine geringere neuronale MDT-Immunreaktivität auf als solche, die keine oder nur diffuse gliotische Veränderungen aufwiesen.

Hinsichtlich der klinischen Merkmale des untersuchten Patientenkollektivs bestanden positive Korrelationen zwischen dem Lebensalter und der Rate MRP1-exprimierender kortikaler Zellen sowie zwischen der Frequenz sekundär generalisierter Anfälle und MVP-positiven Neuronen im Hippokampus. Ferner zeigte sich für wenige Patienten mit verminderter Akkumulation von AEDs ein größerer Anteil Pgp-exprimierender Zellen im Hippokampus als bei normaler Akkumulation. Ob diesem Befund tatsächlich eine Bedeutung zugemessen werden kann, müssen weitere Untersuchungen an größeren Patientengruppen zeigen.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Semah F, Picot MC, Adam C, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998; 51: 1256-62.
- 2 Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000; 342: 314-9.
- 3 Perucca E. Pharmacoresistance. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1996; 99(4): 388.
- 4 Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, et al. A randomized, controlled trial of surgery for temporal lobe epilepsy. *N Engl J Med* 2001; 345: 311-8.
- 5 Mathern GW, Babb T, Vickrey BG, et al. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 1995; 118: 105-18.
- 6 Remy S, Gabriel S, Urban BW, et al. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 2003; 53: 469-79.
- 7 Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, et al. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 2004; 24: 10416-30.
- 8 Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 2005; 129: 18-35.
- 9 Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 695-8.
- 10 Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 159-64.
- 11 Borst P, Evers R, Kool M, et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1295-302.
- 12 Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem Biophys Acta* 1976; 455: 152-62.
- 13 Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, et al. MDR1 gene expression in patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36: 1-6.

- 14 Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: Expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 140-61.
- 15 Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, et al. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 2001; 42: 1501-6.
- 16 Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, et al. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain* 2002; 125: 22-31.
- 17 Sisodiya SM, Thom M. Widespread upregulation of drug-resistance proteins in fatal human status epilepticus. *Epilepsia* 2003; 44: 261-4.
- 18 Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, et al. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45: 441-51.
- 19 Kubota H, Ishihara H, Langmann T, et al. Distribution and functional activity of Pgp and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res* 2006; 68: 213-28.
- 20 Marchi N, Hallene KL, Kight KM, et al. Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain. *BMC Med.* 2004; 2:37.
- 21 Janigro D. Blood-brain barrier, ion homeostasis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. *Epilepsy Res* 1999; 37: 223-32.
- 22 Cornford EM, Gee MN, Swartz BE, et al. Dynamic [¹⁸F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography and hypometabolic zones in seizures: reduced capillary influx. *Ann Neurol* 1998; 43(6): 801-8.
- 23 Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-1654.
- 24 Nies AT, Jedlitschky G, König J, et al. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1–MRP6 (ABCC1–ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 2004 129: 349-360.
- 25 Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett M, et al. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3900-5.

- 26 Hirrlinger J, König J, Dringen R. Expression of m-RNAs of multidrug resistance proteins (MRPs) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* 2002; 82: 716-9.
- 27 Berezowski V, Landry C, Dehouck MP, et al. Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2004; 1018: 1-9.
- 28 Sisodiya SM, Lin WR, Squier MV, et al. Multidrug-resistance protein 1 in focal cortical dysplasia. *Lancet* 2001; 357: 42-3.
- 29 Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, et al. Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience* 2003; 118: 417-29.
- 30 Miller DS, Nobmann SN, Gutmann H, et al. Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1357-1367.
- 31 Choudhuri S, Cherrington NJ, Li N, et al. Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 1337-1345.
- 32 Vogelgesang S, Kunert-Keil C, Cascorbi I, et al. Expression of multidrug transporters in dysembryoplastic neuroepithelial tumors causing intractable epilepsy. *Clin Neuropathol* 2004; 23: 223-231.
- 33 Golden PL, Pardridge WM. Brain microvascular P-glycoprotein and a revised model of multidrug resistance in brain. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20: 165-81.
- 34 Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, et al. Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development. *Neuroreport* 1999; 10: 3437-41.
- 35 Marroni M, Agrawal ML, Kight K, et al. Relationship between expression of multiple drug resistance proteins and p53 tumor suppressor gene proteins in human brain astrocytes. *Neuroscience* 2003; 121: 605-17
- 36 Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, et al. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 1993; 53: 1475-9.
- 37 Den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, et al. Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood* 1998; 91: 2092-8.

- 38 Borg AG, Burgess R, Green LM, et al. Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol* 1998; 103: 1083-91.
- 39 Aronica E, Gorter JA, van Vliet EA, et al. Overexpression of human major vault protein in gangliogliomas. *Epilepsia* 2003; 44: 1166-75.
- 40 Van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, et al. Expression and cellular distribution of major vault protein: A putative marker for pharmacoresistance in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45: 1506-16.
- 41 Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 2005; 76: 22-76.
- 42 Sills GJ, Kwan P, Butler E, et al. P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in *mdr1a* knockout mice. *Epilepsy Behav* 2002; 3: 427-32.
- 43 Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, et al. Major Vault Protein, a marker of drug resistance, is upregulated in refractory epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44: 1388-96.
- 44 Gabriel S, Kivi A, Kovács R, et al. Effects of barium on stimulus-induced changes in $[K^+]_o$ and field potentials in dentate gyrus and area CA1 of human epileptic hippocampus. *Neurosci Lett* 1998; 249: 91-4.
- 45 Jandova K, Päsler D, Leite Antonio L, et al. Carbamazepine-resistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices. *Brain* 2006; 129: 3290-306.
- 46 Baumgartner C, Elger CE, Hufnagel A; et al. Qualitätsrichtlinien auf dem Gebiet der prächirurgischen Epilepsiediagnostik und operativen Epilepsitherapie. *Akt Neurol* 2000; 27: 88-9.
- 47 European Federation of Neurological Societies Task Force. Pre-surgical evaluation for epilepsy surgery – European Standards. *Eur J Neurol* 2000; 7: 119-22.
- 48 Wyler AR, Dohan FC, Schweitzer JB, et al. A grading system for mesial temporal lobe pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *J Epilepsy* 1992; 5: 220-5.
- 49 Scheffer GL, Kool M, Heijn M, et al. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP5 and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Canc Res* 2000; 60: 5269-77.
- 50 Schroeijers AB, Scheffer GL, Reurs AW, et al. Detection of the Mr 110,000 lung resistance-related protein LRP/MVP with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1379-85.

- 51 Calatuzzolo C, Gelati M, Ciusani E, et al. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. *J NeuroOncol* 2005; 74: 113-21.
- 52 Flens MJ, Scheffer GL, van der Valk P, et al. Identification of novel drug resistance-associated proteins by a panel of rat monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1997; 73: 249-57.
- 53 Volk H, Potschka H, Löscher W. 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* 2005; 53: 517-31.
- 54 Duvernoy P. The human hippocampus: Functional anatomy, vascularisation and serial sections with MRI. 1. Auflage. Berlin, Deutschland: Springer Verlag 1998: 6-8.
- 55 Lorente de Nó, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 1934; 46: 113-77.
- 56 Gloor P. The temporal lobe and the limbic system. Oxford England: Oxford University Press 1997.
- 57 Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS, et al. Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in the temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1997; 42: 756-66.
- 58 West MJ, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* 1990; 296: 1-22.
- 59 Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Record* 1946; 94: 239-47.
- 60 Mouritzen Dam A. Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia* 1980; 21: 617-29.
- 61 Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg* 1995; 82(2): 211-19.
- 62 Lévesque MF, Nakasato N, Vinters V, et al. Surgical treatment of limbic epilepsy associated with extrahippocampal lesions: the problem of dual pathology. *J Neurosurg* 1991; 75: 364-70.
- 63 Beck WT, Grogan TM, Willman CL, et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients tumors: consensus recommendations. *Cancer Res* 1996; 56: 3010-20.

- 64 Schroeijers AB, Scheffer GL, Flens MJ, et al. Immunohistochemical detection of the human major vault protein LRP with two monoclonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 1998; 152 (2): 373-8.
- 65 Rao VV, Anthony DC, Piwnica-Worms D. MDR1 Gene-specific monoclonal antibody C494 cross-reacts with pyruvate carboxylase. *Canc Res* 1994; 54: 1536-41.
- 66 Rizzi M, Caccia S, Guiso G, et al. Limbic seizures induce Pgp in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci* 2002; 22(14): 5833-9.
- 67 Zhang L, Ong WY, Lee T. Induction of P-glycoprotein expression in astrocytes following intracerebroventricular kainate injections. *Exp Brain Res* 1999; 126: 509-16.
- 68 Volk HA, Burkhardt K, Potschka H, et al. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neurosci* 2004; 123: 75-9.
- 69 Becker AJ, Gillardou F, Blümcke I, et al. Differential regulation of apoptosis-related genes in resistant and vulnerable subfields of the rat epileptic hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 67(1):172-6.
- 70 Parent JM. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res* 2007; 163: 529-540.
- 71 Siebzehnrubl F, Blumcke I. neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies. *Epilepsia* 2008; 49(5): 55-65
- 72 Hattiangady B, Shetty AK. Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2008; 49(5): 26-41.
- 73 Hattiangady B, Shetty AK. Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2008; 49(5): 26-41.
- 74 Gutiérrez R, Heinemann U. Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus-CA3 projection. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1371-9.
- 75 Gómez-Lira G, Trillo E, Ramirez M, et al. The expression of GABA in mossy fiber synaptosomes coincides with the seizure-induced expression of GABAergic transmission in the mossy fiber synapse. *Exp Neurol* 2002; 177: 276-83.
- 76 Gutiérrez R, Romo-Parra H, Maqueda J, et al. Plasticity of the GABAergic phenotype of the “glutamatergic” granule cells of the rat dentate gyrus. *J Neurosci* 2003; 23(13): 5594-8.
- 77 Van Vliet EA, Redeker S, Aronica E, et al. Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia* 2005; 46(10): 1569-80.

- 78 Gómez-Lira G, Lamas M, Romo-Parra H, et al. Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci* 2005; 25(30): 6939-46.
- 79 Berger W, Spiegl-Kreinecker S, Buchroithner J, et al. Overexpression of the human major vault protein in astrocytic brain tumor cells. *Int J Cancer* 2001; 94: 377-82.
- 80 Volk HA, Potschka H, Löscher W. Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Res* 2004; 58: 67-79.
- 81 Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neurosci Lett* 2002; 327: 173-6
- 82 Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 2008; 55: 1364-75.
- 83 Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. 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* 2001; 12(16): 3557-60.
- 84 Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR rats. *Epilepsia* 2003; 44 (12): 1479-87.
- 85 Frey HH, Löscher W. Distribution of valproate across the interface between blood and cerebrospinal fluid. *Neuropharmacol* 1978; 17: 637-42.
- 86 Adkison KDK, Artru AA, Powers KM, et al. Contribution of probenecid-sensitive anion transport at the brain capillary endothelium and choroid plexus to the efficient efflux of valproic acid from the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268 (2): 797-805.
- 87 Owen A, Pirmohamed M, Tetley JN, et al. Carbamazepine is not a substrate for P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 51: 345-9.
- 88 Maines LW, Antonetti DA, Wolpert EB, et al. Evaluation of the role of P-glycoprotein in the uptake of paroxetine, clozapine, phenytoin and carbamazepine by bovine retinal endothelial cells. *Neuropharmacol* 2005; 49: 610-17.
- 89 Baltés S, Gastens AM, Fedrowitz M, et al. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacol* 2007; 52: 333-46.

- 90 Baltes S, Fedrowitz M, Luna Tortós C, et al. Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320 (1): 331-43.
- 91 Rivers F, O'Brien TJ, Callaghan R. Exploring the possible interaction between anti-epileptic drugs and multidrug efflux pumps; in vitro observations. *Eur J Pharmacol* 2008; 598: 1-8.
- 92 Lazarowski A, Ramos AJ, Garcia-Ravello H, et al. Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. *Cell Mol Neurobiol* 2004; 24(1): 77-85.
- 93 Seegers U, Potschka H, Löscher W. Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of amygdala-kindled rats. *Epilepsia* 2002; 43(7): 675-84.
- 94 Golden PL, Pardridge WM. P-glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries. *Brain Res* 1999; 819: 143-6.
- 95 Marchi N, Guiso G, Rizzi M, et al. A pilot study on brain-to-plasma partition of 10, 11-dyhydro-10-hydroxy-5H-dibenzo (b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbamazepine. *Epilepsia* 2005; 46 (10): 1613-20.

Abkürzungsverzeichnis

AEDs	Antiepileptic drugs (Antikonvulsiva)
ABC	ATP-binding-cassette protein (ATP-bindendes Protein)
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserum-Albumin)
CA1	Cornu ammonis Region 1
CA2	Cornu ammonis Region 2
CA3	Cornu ammonis Region 3
DAB	Diamino-Benzidin
DAB/HE	Diamino-Benzidin-Hematoxylin
DNET	Dysembryoplastischer neuroepithelialer Tumor
FCD	Fokale kortikale Dysplasie
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial fibrillary acid protein
HIL	Hilus
HPLC	High pressure lipid chromatography
HS	Hippokampussklerose
IR	Immunreaktivität
LRP	Lung-resistance-related protein
mAK	monoklonaler Antikörper
MDR 1	Multidrug-resistance-related protein 1 (Pgp)
MDT	Multidrug-Transportproteine
mRNA	Messenger-RNA (Ribonukleinsäure)
MRP 1	Multidrug-resistance-associated protein 1
MRP 2	Multidrug-resistance-associated protein 2
MRP 5	Multidrug-resistance-associated protein 5
MVP	Major vault protein
NeuN	Neuronal Nuclei
nHS	non - Hippokampussklerose
NSG	Normal goat serum
nSK	normierte Serumkonzentration

PB	Phosphate buffer (Phosphat-Puffer-Lösung)
PBN	Probenecid
PCR	Polymerase-chain-reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Pgp	P – Glykoprotein
PNS	Peripheres Nervensystem
SE	Status epilepticus
TIF	Tagged image file
TLE	Temporallappenepilepsie
VPM	Verapamil
ZNS	Zentralnervensystem

Erklärung

Ich, Claudia Raue, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Ektope Expression ATP-abhängiger Transportproteine im humanen resezierten epileptogenen Gewebe“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. (Die elektrophysiologischen Messungen wurden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt.)

Datum

Unterschrift

Danksagung

Sonja Ferl danke ich für das Anfertigen der histologischen Schnitte und für die Durchführung eines wesentlichen Teils der immunhistochemischen Färbungen.

Dr. Marleisje Njuntjing bin ich für Erläuterungen zur Nutzung des Mikroskops, Methoden der quantitativen Analyse und Hinweise zu den im Institut etablierten immunhistochemischen Standardprotokollen dankbar.

Jörg Rösner erläuterte mir den Umgang mit dem konfokalen Mikroskop und war mir beim Anfertigen der Doppelfluoreszenz-Bilder behilflich.

Dr. Katrin Schulze half mir bei allen Bestellungen von Material, Antikörpern und benötigten Reagenzien.

Dr. Herbert Siegmund und besonders Dr. Hans-Jürgen Gabriel bin ich für Hilfe bei allen technischen Fragen sowie für Erläuterungen zur Benutzung von Mikroskop und Kamera dankbar.

Prof. Uwe Heinemann danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für das mir in diesem Zusammenhang entgegengebrachte Vertrauen sowie für seine Unterstützung bei der Beantragung und Verlängerung des gewährten Promotionsstipendiums. Im Rahmen meiner Tätigkeit als Doktorandin bot er mir außerdem Gelegenheit, die zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse im Rahmen verschiedener Kongresse vorzustellen.

Dr. Thomas-Nicolas Lehmann danke ich für die Art und Weise, wie er seinen Beruf ausübt. Sein Umgang mit seinen Patienten innerhalb und außerhalb des Operationssaals hat mich tief beeindruckt und mich in meiner Entscheidung für Neurochirurgie als Weiterbildungsfach maßgeblich beeinflusst.

Mein besonderer und tief empfundener Dank gilt Dr. Siegrun Gabriel, meiner Betreuerin und nach dieser langen Zeit auch Freundin. Sie hat dieses Promotionsvorhaben von Anfang an begleitet. Ohne ihren unermüdlichen Einsatz, ihre Unterstützung auch in schwierigen Zeiten und konstruktiver Kritik im rechten Moment hätte ich diese Arbeit nicht zum Abschluss bringen können.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und hier in erster Linie meinen Eltern für ihr Interesse, ihr Engagement und ihre Liebe danken, auf die ich in jeder Phase meines Studiums, der Promotion und den ersten Schritten im Berufsleben vertrauen konnte.

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. „

Publikation/Vorträge/Poster

- Jandová K, Päsler D, Leite Antonio L, Raue C, Ji S, Njunting M, Kann O, Kovács R, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN *Carbamazepine-resistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices* (**Publikation**); Brain 2006; 129 (12): 3290- 306.
- Raue C, Päsler D, Leite Antonio L, Gabriel S, Heinemann U, Lehmann TN (Mai 2006) *Lokalisation ATP-abhängiger Transportproteine und Pharmakoresistenz : Regionale Expression im humanen Hippokampus* (**Poster und Abstract**) Zeitschrift für Epileptologie 19 (2): 163; 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epilepsie/ Straßburg
- Raue C, Leite Antonio L, Päsler D, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN (Juni 2006) *Drug transporters and pharmacoresistance in epilepsy: Regional and cellular distribution of MRP1, MRP2 and PGP in human hippocampus* (**Poster**) Berlin Neuroscience Forum
- Kim S, Leite Antonio L, Kovács R, Päsler D, Raue C, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN (Juni 2006) *Block of drug transporter activity and efficacy of antiepileptic drugs in human epileptic hippocampus* (**Poster**) Berlin Neuroscience Forum
- Raue C, Leite Antonio L, Päsler D, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN (Oktober 2006) *Drug transporters and pharmacoresistance in epilepsy: Regional and cellular distribution of MRP1, MRP2 and PGP in human hippocampus* (**Vortrag**) : 17. European Students Conference (ESC)/Berlin
- Kim S, Kovács R, Raue C, Päsler D, Leite Antonio L, Huchzermeyer C, Kann O, Heinemann U, Cavalheiro EA, Lehmann TN, Gabriel S (März 2007) *Block of drug transporter activity and efficacy of antiepileptic drugs in human epileptic hippocampus and temporal cortex* (**Poster**); 7. Tagung der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft/Göttingen
- Raue C, Gabriel S, Lehmann TN (September 2007) *Drug resistance in human epileptic brain: Putative contribution of drug transporters-morphologic studies* (**Vortrag**) Forschungsmeeting der Klinik für Neurochirurgie; Charité-Universitätsmedizin Berlin/Chorin