

Hisashi Kubota¹, Thomas Langmann², Gerd Schmitz², Heinz-Gregor Wieser³, Yasuhiro Yonekawa⁴ und Karl Frei⁴

¹ Department of Neurosurgery, Yamaguchi University, Japan

² Institut für Klinische Chemie, Universität Regensburg, Deutschland

³ Neurologische Klinik, Universitätsspital Zürich

⁴ Neurochirurgische Klinik, Universitätsspital Zürich

Zusammenfassung

In der letzten Dekade hat sich das Wissen um die Mechanismen, welche zur Epileptogenese und zur Entwicklung der Pharmakoresistenz beitragen könnten, wesentlich vertieft. Bei Letzterem standen die Untersuchung von Transportproteinen, so genannten Efflux-transportern wie das P-Glykoprotein (P-gp) oder die „Multi-drug resistance associated proteins“ (MRP) im Vordergrund.

Unsere Untersuchungen an epileptogenen humanen Gewebe nach selektiver Amygdalohippokampektomie (sAHE) zeigten eine Expression von Pgp, MRP1, und MRP2 im Hippokampus. Dabei war P-gp and MRP1 nicht nur auf Endothelien, sondern auch auf Parenchymzellen exprimiert. Die Isolation und Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC) aus Resektaten von Temporallappenepilepsie (TLE)-Patienten als auch Kontrollgewebe ermöglichten deren molekulare und funktionelle Charakterisierung. Eine Überexpression auf der mRNA-Ebene wurde für Pgp als auch MRP1 gefunden, währenddem die Transportfunktion nur für MRP signifikant erhöht war.

Epileptologie 2006; 23: 174 – 177

Schlüsselwörter: „Multidrug“-Transporter, Pharmakoresistenz, Temporallappen-Epilepsie

Potential role of multi-drug transporters at the blood-brain barrier in medically intractable temporal lobe epilepsy

The last decade has seen a vast increase in the understanding of cellular mechanisms which may contribute to epileptogenesis and the development of pharmacoresistance. Multi-drug transporters (MDT) such as multi-drug resistance protein (MDR), also referred as P-glycoprotein (Pgp), and multi-drug resistance-associated proteins (MRP), are candidates to cause medically intractable epilepsy. Investigations of human epilepto-

genic tissue from selective amygdalohippocampectomy (sAHE) revealed expression of Pgp, MRP1, and MRP2. Pgp and MRP1 were expressed not only on endothelium of the hippocampus but also by parenchymal cells. Isolated and cultured microvascular endothelial cells (MVEC) from epileptic patients and controls were investigated on the mRNA and activity level of the transporters. Both, Pgp and MRP1 mRNA were up-regulated, whereas MRP activity was only found in MVEC from epileptic patients.

Key words: Multi-drug transporter, pharmacoresistance, temporal lobe epilepsy

Le rôle des “multi-drug transporters” de la barrière hémato-encéphalique dans l'épilepsie du lobe temporal réfractaire aux traitements

Depuis une dizaine d'années, on connaît beaucoup mieux les mécanismes susceptibles de contribuer à l'épileptogenèse et au développement de la pharmacorésistance. Pour ce dernier phénomène, les recherches se sont surtout concentrées sur les protéines transporteuses, dites transporteurs d'efflux comme la glycoprotéine P (P-gp), ou les « protéines associées à la résistance multiple aux médicaments » (MRP).

Nos examens de tissu épiléptogène humain après une amygdalo-hippocampectomie sélective (sAHE) ont montré une expression de Pgp, MRP1 et MRP2 dans l'hippocampe. La P-gp et les MRP1 étaient exprimées non seulement sur les cellules endothéliales, mais aussi sur les cellules parenchymes. L'isolation et la culture de cellules endothéliales microvasculaires (CEMVC) de résectats de patients avec une épilepsie du lobe temporal (ELT) et de tissu de contrôle a permis leur caractérisation moléculaire et fonctionnelle. Une surexpression au niveau mRNA a été constatée pour la Pgp aussi bien que pour les MRP1, tandis que la fonction de transport n'était significativement élevée que pour les MRP.

Mots clés : Epilepsie, résistance de pharmacologie, multi-drug transporter

Einleitung

Patienten mit Temporallappen-Epilepsie (TLE) und mesialer temporaler Sklerose (MTS) repräsentieren den grössten Anteil an medikamentös therapieresistenten Epilepsien. Dabei kommt es im Hippokampus von Epilepsiepatienten mit Ammonshornsklerose zu einem Verlust von Neuronen mit einer Vermehrung von Astrozyten, einer so genannten Gliose. Da nach einer selektiven Amygdalohippokampektomie (sAHE) mehr als 80% der Patienten anfallsfrei [1] werden, stellt sich die Frage nach den Ursachen der Pharmakoresistenz. In das Zentrum des Interesses gelangten dabei die Effluxtransporter an der Blut-Hirn- sowie an der Blut-Liquor-Schranke, die dafür verantwortlich sein könnten, dass die für eine pharmakologische Wirkung notwendigen Konzentrationen der Antiepileptika nicht erreicht werden können. Mittlerweile wurde schon eine grosse Anzahl solcher Transporterproteine an den oben erwähnten Barrieren beschrieben [2-4]. Dazu zählen sowohl das P-Glykoprotein (P-gp) als auch die so genannten „Multidrug-resistance-associated“-Proteine (MRPs), welche zur Superfamilie der „ATP-binding cassette (ABC)-Transporter“ gehören, und denen eine Beteiligung bei der pharmakoresistenten Epilepsie in diversen Studien zugeschrieben worden ist [5-9].

Durch die Verwendung P-gp/MRP-spezifischer Inhibitoren, gentechnisch veränderter Mäuse (Knockout-Mäuse) oder -Zellen, konnte für einige Antiepileptika (AED) gezeigt werden, dass sie als Substrate dieser Effluxtransporter dienen können [10, 6, 7, 11]. Von den 48 bekannten ABC-Transportern sind ca. 1/3 mit einer Pharmakoresistenz assoziiert [12-14].

Im Gegensatz zu normalem Hirngewebe findet man bei verschiedenen Pathologien des Zentralnervensystems, wie Tumoren oder Epilepsien, eine Überexpression von „Multidrug“-Transportern [15]. Bei der pharmakoresistenten Epilepsie gelten P-gp, MRP1 und MRP2 als potentielle Kandidaten [16, 5-7, 17, 8, 9]. So konnte in epileptischen Läsionen die Expression von P-gp nicht nur in Endothelzellen sondern auch in Astrozyten und Neuronen gezeigt werden [16, 18, 8]. Auf molekularer Ebene wurde für Endothelzellen, die aus epilepsiechi-

urgischen Resektaten isoliert wurden, gezeigt, dass die mRNAs für P-gp, MRP2 und MRP5 überexprimiert sind [5].

Aufgrund der unklaren Sachlage untersuchten wir die Expression der „Multidrug“-Transporter P-gp, MRP1 und MRP2 an hippokampalen Gewebeschnitten sowie an isolierten und kultivierten Endothelzellen nach selektiver Amygdalohippokampektomie von Patienten mit pharmakoresistenter TLE und entsprechenden Kontrollen [19]. Als Novum bestimmten wir auch die P-gp und MRP-Aktivitäten der isolierten Endothelzellen von Epilepsiepatienten und verglichen diese mit Kontrollen. Dabei verwendeten wir einerseits den klinisch erprobten P-gp-Inhibitor Verapamil [18, 10] als auch die MRP-Inhibitoren Probenecid und Indomethacin [10, 7, 20].

Expression der „Multidrug“-Transporter P-gp, MRP1 und MRP2 im Hippokampus von Patienten mit TLE

Die immunhistochemische Untersuchung der Resektate von 5 Patienten mit TLE zeigte uns, dass P-gp nicht nur im Hippokampus, sondern auch im Gyrus parahippocampalis (Gph) exprimiert ist. Die zelluläre Lokalisierung war vorwiegend auf Endothelien (**Abbildung 1A**) beschränkt neben vereinzelt Hirnparenchymzellen (unter anderem Astrozyten).

Im Gegensatz dazu, fand sich MRP1 nicht nur hauptsächlich auf Hirnparenchymzellen, sondern auch prädominant im Gyrus parahippocampalis (**Abbildung 1B**). Da viele der MRP1-positiven Zellen perivaskulär angeordnet waren, konnten die positiven Signale nicht immer von Perizyten und Endothelzellen unterschieden und eindeutig den Endfüssen von Astrozyten oder Mikrogliazellen zugeordnet werden.

Die MRP2-Expression konnte nur in einem (Patient 1) der fünf untersuchten Resektate nachgewiesen werden. Dabei zeigten sowohl Endothelzellen als auch Astrozyten ein positives Signal im Hippokampus (**Abbildung 1C**).

Interessanterweise zeigte sich nicht nur in allen untersuchten Resektaten eine Expression von P-gp, son-

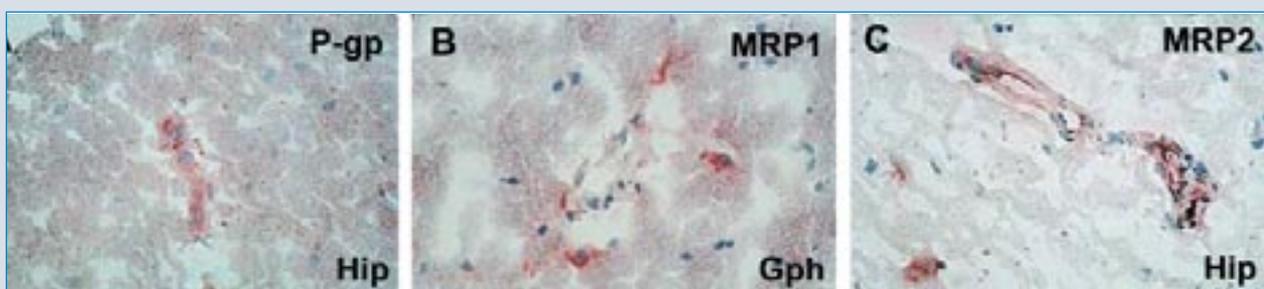


Abbildung 1: Immunhistochemischer Nachweis der P-gp-, MRP1- und MRP2-Expression im Hippokampus eines Patienten mit TLE.

A. P-gp-Expression auf Endothelzellen des Hippokampus (Hip)

B. MRP1-Expression in Hirnparenchymzellen des Gyrus parahippocampalis (Gph)

C. MRP2-Expression auf Endothelzellen und Hirnparenchymzellen des Hippokampus (Hip)

dern diese war über alle Regionen des Hippokampus gleichmässig verteilt (**Abbildung 2**). Ganz anders war das Verteilungsmuster von MRP1, das sich nur im Gyrus parahippocampalis zeigte – ausser bei Patient 2 – der in dieser Region aber auch keine Gliose hatte.

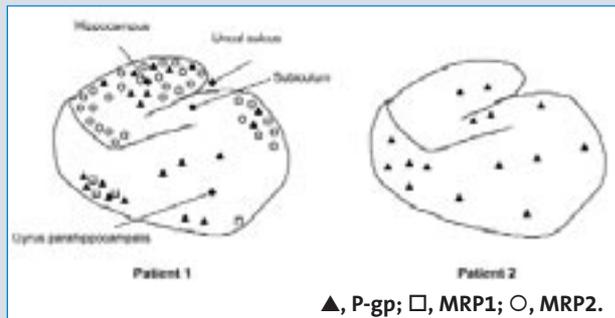


Abbildung 2: Immunhistochemische Lokalisierung der P-gp-, MRP1- und MRP2-Expression im Hippokampus zweier Patienten mit TLE.

Expression von P-gp, MRP1 und MRP2 in mikrovaskulären Endothelzellen

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Analyse zeigte in den Endothelzellen von Epilepsie- als auch Kontrollpatienten eine starke Expression von MRP1, eine mittlere für P-gp und eine schwache für MRP2. Sowohl MRP1 als auch P-gp waren in den Endothelzellen von Epilepsiepatienten erhöht und zwar 2,5- respektive 3,8-fach (**Abbildung 3**).

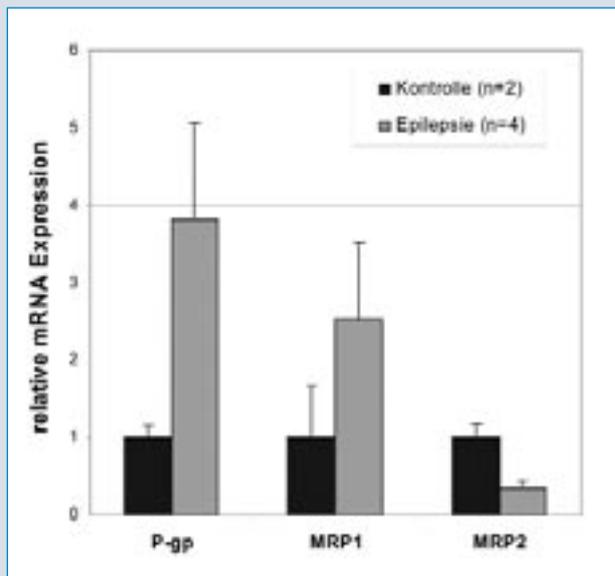


Abbildung 3: Genexpression von P-gp, MRP1 und MRP2 in isolierten Hirnendothelzellen von Epilepsie- und Kontrollpatienten. P-gp und MRP1 sind deutlich erhöht in den Endothelien von TLE-Patienten.

Die Daten der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion repräsentieren Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen.

Um die molekularen Befunde auch auf der Proteinebene zu überprüfen, wurde von den kultivierten Endothelzellen Lysate angefertigt und diese mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass P-gp über mehrere Zellkulturpassagen hinweg exprimiert wird und zwar sowohl in Endothelzellen von TLE- als auch Kontrollpatienten. Die MRP1-Expression war erhöht in den TLE-Patienten währenddem sich MRP2 nicht nachweisen liess.

Durch die Verwendung eines Zweikammersystems waren wir in der Lage, ein „In-vitro-Modell“ der Blut-Hirnschranke zu entwickeln. Dabei werden die zu untersuchenden Endothelzellen in entsprechenden Einsätzen, die mit Kollagen-beschichteten Membranen versehen sind, kultiviert. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens können sowohl Transportstudien als auch die In-situ-Expression von Transportern durchgeführt werden. **Abbildung 4** zeigt, dass in Endothelzellen von Epilepsie-Patienten alle drei Transporter – wenn auch in unterschiedlichem Ausmass - exprimiert sind. Im Gegensatz dazu zeigen Kontroll-Endothelien nur die Expression von P-gp, nicht aber von MRP1 und MRP2. Dank der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie („confocal laser scanning microscopy“) konnten wir zeigen, dass P-gp und MRP2 luminal und MRP1 vorwiegend ab-luminal exprimiert sind.

Die P-gp- und MRP-Aktivitäten bestimmten wir in den Endothelzellen mittels Aufnahme von Rhodamin 123 und Fluoreszein in der An- oder Abwesenheit eines P-gp- oder MRP-Inhibitors. Nicht unerwartet führte der P-gp-Inhibitor Verapamil sowohl in Epilepsie- als auch Kontrollendothelien zu einer vergleichbaren Akkumulation von Rhodamin 123. Ganz anders war dies bei der MRP-Aktivität, die nur in Endothelien von Epilepsie-Patienten messbar war.

Schlussfolgerung

Auch wenn die Pharmakoresistenz bei der TLE multifaktoriell bedingt zu sein scheint, deuten unsere Beobachtungen darauf hin, dass sich die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke durch die Überexpression von P-gp und MRP1 als „Rausschmeisser“ der AED betätigen können.

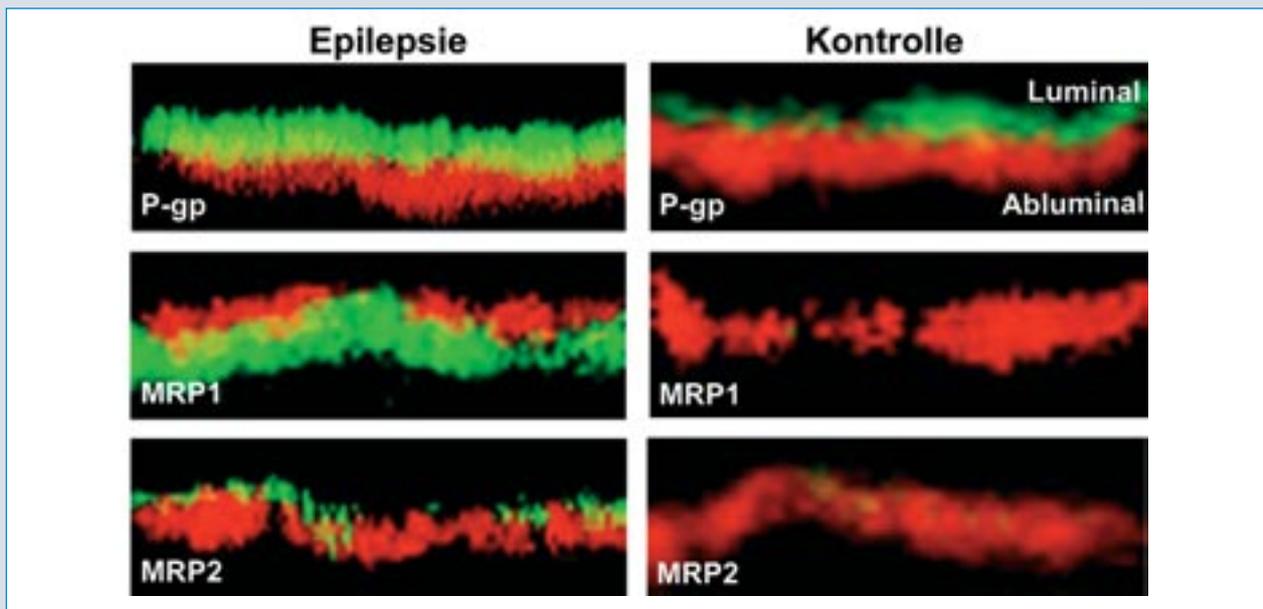


Abbildung 4: Expression und Lokalisierung von P-gp, MRP1, und MRP2 in mikrovaskulären Endothelzellen von Epilepsie- und Kontrollpatienten. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zeigt eine deutlich höhere Expression von P-gp und MRP1 (beide grüne Fluoreszenz) in den Endothelzellen von Epilepsiepatienten. Die Zellkerne sind mittels Propidiumjodid rot angefärbt.

Referenzen

1. Wieser HG, Ortega M, Friedman A, Yonekawa Y. Long-term seizure outcomes following amygdalohippocampectomy. *J Neurosurg* 2003; 98: 751-763
2. Kusuhara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 2). *Drug Discov Today* 2001; 6: 206-212
3. Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Rev Neurosci* 2005; 6: 591-602
4. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 425-461
5. 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: 1501-1506
6. Loscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 7-14
7. Potschka H, Fedorowicz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 124-131
8. 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
9. Tishler DM, Weinberg KT, Hinton DR et al. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36: 1-6
10. Huai-Yun H, Secrest DT, Mark KS et al. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 816-820
11. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol Caria AAM, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 1996; 97: 2517-2524
12. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1295-1302
13. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58
14. Langmann T, Mauerer R, Zahn A et al. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 2003; 49: 230-238
15. Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46: 224-235
16. 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: 441-451
17. Seegers U, Potschka H, Loscher W. Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of Amygdala-kindled rats. *Epilepsia* 2002; 43: 675-684
18. Hegmann EJ, Bauer HC, Kerbel RS. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells. *Cancer Res* 1992; 52: 6969-6975
19. Kubota H, Ishihara H, Langmann T et al. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2006; 47: 213-228
20. Zhang Y, Han H, Elmquist WF, Miller DW. Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 2000; 876: 148-153

Korrespondenzadresse:
Prof. Karl Frei
 Neurochirurgische Klinik
 Universitätsspital Zürich
 Frauenklinikstr. 10
 CH 8091 Zürich
 Tel. 0041 44 255 2479
 Fax 0041 44 255 4514
 karl.frei@usz.ch