

Aus dem Oscar-Langendorff Institut für Physiologie und dem Institut für Immunologie

Einfluss von Mycophenolatmofetil auf die Pilocarpin-induzierte Epileptogenese im Mausmodell

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Medizin (Dr. med.)“

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Julia Katrin Abele

geboren am 28.10.1990 in Lörrach,

Rostock, 16.03.2020



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung-Nicht kommerziell 4.0 International Lizenz.

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Timo Kirschstein

Oscar-Langendorff Insitut für Physiologie

2. Gutachter:

Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke

Arbeitsgruppe klinische Immunologie Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse

3. Gutachter:

Prof. Christian Bien

Krankenhaus Mara gGmbH

Datum der Einreichung: 16.03.2020

Datum der Verteidigung: 18.11.2020

Für meine Familie und Freunde

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Epilepsie	8
1.1.1	Definition der Epilepsie	8
1.1.2	Der Hippocampus als zentraler Manifestationsort	9
1.1.3	Arten der Epilepsieentstehung	10
1.1.4	Aktuelle Befunde inflammatorischer Aspekte	10
1.1.4.1	COX-2	10
1.1.4.2	Interleukin-1 β	11
1.1.4.3	mTOR	12
1.2	Inflammatorische Aspekte der Epilepsieentstehung	13
1.2.1	Einführung in das Immunsystem	13
1.2.1.1	Aktivierung der T-Zell vermittelten Immunantwort über Antigenpräsentation	13
1.2.1.2	Ablauf der Immunantwort im Zentralnervensystem	15
1.2.1.3	Mycophenolatmofetil	16
1.3	Experimentelle Epilepsiemodelle	17
1.4	Ziel der Studie	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Biologisches Material	19
2.1.1	Hippocampus Gewebe	19
2.1.2	Hemisphären	19
2.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.3	Geräte	21
2.4	Chemikalien	23
2.5	Puffer, Lösungen und Medien	25
2.5.1	Puffer	25
2.5.1.1	10x PBS pH 7,4	25
2.5.1.2	Färbepuffer für Durchflusszytometrie	25

2.5.1.3	Ladepuffer für Gelelektrophorese	25
2.5.1.4	1x TBE Puffer für Gelelektrophorese pH 8	26
2.5.1.5	1x PBS pH 7,4.....	26
2.5.2	Lösungen	26
2.5.2.1	Präparierlösung II.....	26
2.5.2.2	Collagenase B Lösung	26
2.5.2.3	DNase Arbeitslösung	27
2.5.2.4	Percoll	27
2.5.2.5	Succhrose Lösung 30 %.....	27
2.6	Antikörper und Fluorochrome der Durchflusszytometrie	28
2.7	qRT-PCR Gensonden, Primer und Mastermix	29
2.8	Fertige Reaktionssets	29
2.9	Antikörper der Immunhistochemie.....	30
2.10	Software und Online Programme	31
2.11	Methoden	32
2.11.1	Tiermodell	32
2.11.2	Pilocarpin-Injektion	32
2.11.3	Immunsuppression	33
2.11.4	Präparation des Hippocampus	35
2.11.5	Durchflusszytometrie	35
2.11.6	Isolation einzelner Hirnzellen	36
2.11.7	Färbung der Hippocampuszellen.....	38
2.11.8	Durchflusszytometrie	38
2.11.9	Molekularbiologie	40
2.11.9.1	Analyse von mRNA	40
2.11.9.2	mRNA Isolation	40
2.11.9.3	Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von mRNA.....	41
2.11.9.4	Agarose-Gel- Elektrophorese.....	42
2.11.9.5	cDNA-Synthese	43

2.11.10	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.11.10.1	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.11.10.2	Quantitative Real-Time-PCR	45
2.11.10.3	Berechnung der CT-Werte und weitere Auswertung	47
2.11.11	Immunhistochemie	48
2.11.11.1	Anfertigung der Schnitte	48
2.11.11.2	Lichtmikroskopie.....	48
2.11.11.3	Fluoreszenzmikroskopie	49
2.11.11.4	Konfokalmikroskopie	51
2.11.12	Datenauswertung und Statistik.....	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Durchflusszytometrie.....	53
3.2	qRT-PCR	55
3.2.1	Anstieg der T-Zell-Population in epileptischen Tieren zum späten Messzeitpunkt nach Pilokarpin-Injektion	55
3.2.2	Mycophenolatmofetil verhindert den Anstieg der T-Zell-Population in epileptischen Tieren	56
3.2.3	Mycophenolatmofetil senkt Expression der Makrophagen-Gensonde in Pilokarpin-behandelten Tieren auf Niveau der Kontrolltiere	58
3.2.4	Pilokarpin führt in epileptischen Tieren zu einer Zunahme der T-Helfer-Zellpopulation.....	60
3.3	Immunhistochemie	62
4	Diskussion	64
4.1	Methodenkritische Betrachtung.....	64
4.1.1	Das Pilokarpinmodell als experimentelles Epilepsiemodell	64
4.2	Rolle der Immunpathologie im Rahmen der Epileptogenese	65
4.2.1	Antwort des angeborenen Immunsystems im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese	65
4.2.2	Antwort des adaptiven Immunsystems im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese	68

4.2.3	Beeinflussung des Immunsystems durch präventive immunmodulatorische Intervention im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese	70
4.2.4	Alternative immunmodulatorische Substanzen	70
4.3	Bedeutung der Ergebnisse für die Medizin	71
5	Zusammenfassung.....	72
6	Thesen.....	74
7	Anhang	75
7.1	Abkürzungsverzeichnis	75
7.2	Abbildungsverzeichnis	78
7.3	Tabellenverzeichnis	80
7.4	Literaturverzeichnis	81
7.5	Danksagung	87
7.6	Lebenslauf	88
7.7	Eidesstattliche Erklärung	92

1 Einleitung

1.1 Epilepsie

1.1.1 Definition der Epilepsie

Laut der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) ist eine Epilepsie wie folgt definiert (Fisher et al., 2014):

- Mindestens zwei nicht provozierte Anfälle oder Reflexanfälle, die im Abstand von mehr als 24 Stunden auftreten.
- Ein nicht provozierter Anfall oder Reflexanfall, verbunden mit einer Wahrscheinlichkeit während der nächsten zehn Jahre weitere Anfälle zu erleiden, ist mit dem allgemeinen Rückfallrisiko (mindestens 60 %) nach zwei nicht provozierten Anfällen vergleichbar.

Epilepsie gilt bei Patienten mit einem altersabhängigen Epilepsie-Syndrom als überwunden, die entweder seit mindestens zehn Jahren anfallsfrei sind und mindestens fünf Jahre ohne Antiepileptika auskommen oder jenseits des entsprechenden Alters sind.

Epidemiologisch gesehen sind Epilepsien häufige chronisch-neurologische Erkrankungen. Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine Prävalenz in der Bevölkerung von Industrieländern von 5–9/1000 (Ngugi et al., 2010; Hamer et al. 2012, Pfäfflin & May 2000). Die Neuerkrankungsrate liegt in Industrieländern bei 40–70/100 000 Einwohnern pro Jahr (Bell et al. 2014; Ngugi et al., 2011). Die Inzidenz ist altersabhängig mit einem ersten Maximum in den ersten Lebensjahren. Sie nimmt dann im Erwachsenenalter ab, währenddessen sie jenseits des 50.–60. Lebensjahres wieder stark ansteigt. In diesem Alter ist die höchste altersadjustierte Inzidenz von Epilepsien zu verzeichnen (Sillanpää et al., 2011). Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einer Epilepsie zu erkranken, liegt aufgrund der epidemiologischen Altersentwicklung mit zunehmender Tendenz bei 3–4 % (Hesdorffer et al., 2011a).

Leitlinienrelevant ist vor allem die Zunahme von Epilepsien bei alten Menschen, da diese erhebliche diagnostische und therapeutische Konsequenzen haben (Elger C. E., Berkenfeld R. et al., 2017).

1.1.2 Der Hippocampus als zentraler Manifestationsort

Zentraler Manifestationsort des epileptischen Geschehens ist der paarig im Temporallappen gelegene und an die Seitenventrikel reichende Hippocampus. Dieser besteht aus den zwei C-förmigen Strukturen Gyrus dentatus (DG) und Cornu ammonis (CA1-CA3) sowie dem Subiculum. Histologisch gliedert er sich in drei Zellschichten: 1. Stratum moleculare (Molekularschicht) die hauptsächlich Dendriten der Körnerzellen enthält; 2. Stratum granulosum (Körnerzellschicht); 3. Stratum pyramidale (Pyramidenzellschicht). Zwischen den einzelnen Schichten bestehen zahlreiche Verschaltungen. Einer der wichtigsten Schaltkreise beginnt im entorhinalen Kortex welcher über den Tractus perforans zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus verläuft. Die Axone der Körnerzellen (Moosfasern) des Gyrus dentatus enden an den Pyramidenzellen der CA3-Region, die wiederum als *Schaffer-Kollaterale* zur CA1-Region ziehen. Die Pyramidenzellen dieser Region verfügen über eine Verbindung zum Subiculum dessen Axone wiederum den entorhinalen Kortex erreichen.

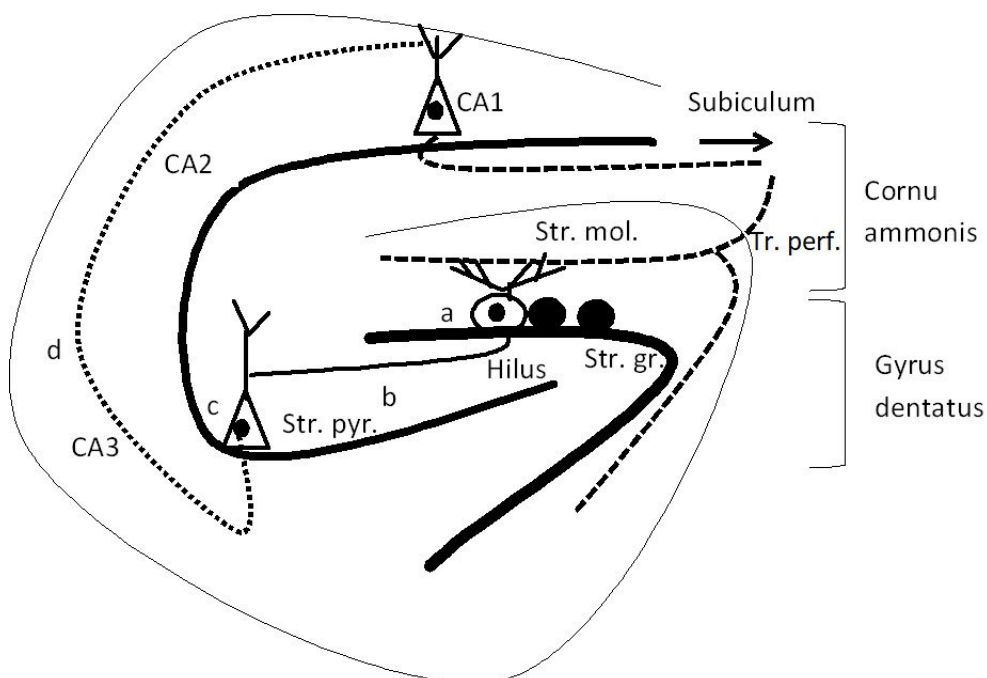


Abbildung 1: Verschaltungskreis des Hippocampus

Die vom entorhinalen Kortex kommenden Fasern des Tractus perforans (Tr. perf.) enden an Dendriten der Körnerzellen (b) im Stratum moleculare (Str. mol.) des Gyrus dentatus. Die Somata der Körnerzellen liegen im Stratum granulosum (Str. gr.) und deren Axone ziehen als Moosfasern (b) zu den Pyramidenzellen (c) des Stratum pyramidale (Str. pyr.) der CA3-Region. Über Schaffer-Kollaterale (d) werden die Pyramidenzellen der CA1-Region erreicht und von dort aus ziehen Fasern in Richtung Subiculum und entorhinalem Kortex.

Im Rahmen der epileptischen Exzitotoxizität kommt es innerhalb des Hippocampus zu strukturellen und funktionellen Veränderungen im Sinne einer verstärkten Einsprossung von Moosfasern und einer Sklerosierung des Gewebes.

1.1.3 Arten der Epilepsieentstehung

Die verschiedenen Pathomechanismen die zur Entstehung einer chronischen Epilepsie beitragen lassen sich im Wesentlichen in vier große Gebiete einteilen:

1. Inflammatorische Prozesse, die zur Entstehung von Temporallappenepilepsien mit Hippocampussklerose führen.
2. Natrium-und Calciumkanalpathologien.
3. Epigenetische Prozesse, die sekundär über Methylierung, beispielsweise von Histonen, eine Veränderung der Genexpression bewirken.
4. Angeborene genetische Veränderungen.

Da die bisherige Therapie der Erkrankung Epilepsie ausschließlich symptomatisch erfolgt, ist es wichtig die Mechanismen der Entstehung zu verstehen um neue Therapiestrategien entwickeln zu können (Lerche et al., 2011).

1.1.4 Aktuelle Befunde inflammatorischer Aspekte

Die Therapierefraktärität unter Antiepileptika zeigt, dass neue Ansätze zur Behandlung einer Epilepsie notwendig sind. Gleichzeitig erscheint es als sinnvoll frühzeitig mit der Behandlung zu beginnen um einer Chronifizierung vorzubeugen und den Beginn der Erkrankung hinauszuzögern. Experimentell gibt es hierzu einige Ansätze die unterschiedliche Signalwege adressieren. Hierbei scheinen besonders die inflammatorischen Aspekte der Epileptogenese eine Rolle zu spielen. Ziel ist es, genau jene Signalkaskaden anzusprechen die pathophysiologisch zur Entstehung einer Epilepsie beitragen im Sinne einer targeted therapy. Der folgende Abschnitt erläutert die aktuellen experimentellen Therapieansätze.

1.1.4.1 COX-2

Das Enzym Cyclooxygenase-Typ 2 (COX-2) ist wesentlich an inflammatorischen Prozessen in vielen Geweben beteiligt (Minville et al., 2019). Es synthetisiert proinflammatorisch wirkende Prostaglandine und wird im Hirngewebe nach Insulten besonders stark induziert. Durch den Einsatz von selektiven COX-2 Inhibitoren, den sogenannten Coxiben, hat sich nach Pilocarpin-induziertem Status epilepticus (SE) in Ratten gezeigt, dass ein neuronaler Schaden im Hippocampus vermieden werden kann.

Außerdem werden Vorkommen, Häufigkeit und Dauer spontan auftretender epileptischer Anfälle reduziert. Diese Ergebnisse bezogen sich hauptsächlich auf die Anwendung von Celecoxib (Aronica et al., 2017).

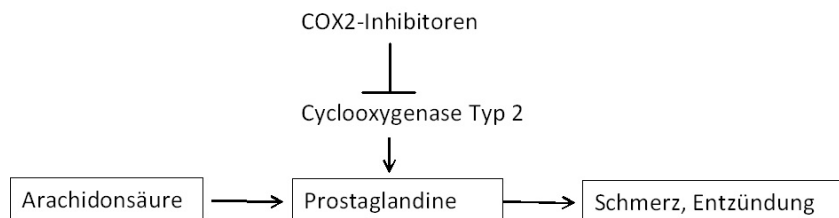


Abbildung 2: COX2 Signalweg

Die Cyclooxygenase-Typ 2 in entzündeten Geweben katalysiert die Synthese von Schmerz und Entzündung verursachenden Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Durch COX2-Inhibitoren wird diese Reaktion gehemmt. Quelle: Modifiziert nach Mutschler Arzneimittelwirkungen, 2012.

1.1.4.2 Interleukin-1 β

Die Aktivierung des Interleukin-1-Rezeptor 1 (IL-1R1) und Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) Signalwegs durch deren endogene Liganden Interleukin-1 β (IL-1 β) und High- Mobility-Group Protein 1 (HMGB1) spielt für die neuroinflammatorische Antwort während und nach epileptischen Anfällen eine zentrale Rolle. Diese beiden Signalwege lassen sich experimentell beispielsweise durch die Blockade des IL-1-Rezeptors mittels Anakinra (IL-1R-Rezeptor Antagonist) oder die Blockade von HMGB1 mittels BoxA (HMGB1-Antagonist) experimentell beeinflussen (Aronica et al., 2017). Weiterhin ist es möglich die IL-1 β Biosynthese zu hemmen (VX-765) oder mittels Lipopolysacchariden (LPS) den TLR4 Signalweg zu adressieren. Im Maus-Experiment zeigte sich eine Reduktion der Anfallshäufigkeit von 70-80 % an Tieren die eine Stunde und weitere sieben Tage nach Pilokarpin-Injektion eine Kombination aus VX-765 und LPS erhielten (Aronica et al., 2017). Dieser Effekt wurde ebenfalls bei Ratten beobachtet, die eine Stunde nach Pilokarpin-induziertem SE und weitere sieben Tage mit einer Kombination aus Anakinra, BoxA und Ifenprodil (NMDA-Rezeptor Antagonist) behandelt wurden (Aronica et al., 2017).

1.1.4.3 mTOR

Der mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Signalweg stellt ebenfalls ein Angriffsziel aktueller experimenteller Studien dar. Er lässt sich durch den mTOR Inhibitor Rapamycin/Sirolimus selektiv ansteuern und blockieren. Experimentell zeigte sich, dass in epileptischen Ratten eine Hochregulation des mTOR Signalwegs und des 5-HT₆-Rezeptors (HTR₆) stattfand (Aronica et al., 2017). Solch eine Veränderung bewirkt im weiteren Verlauf eine vermehrte Bildung von Cyclinen die ihrerseits eine aktivierende Funktion auf den Zellzyklus haben. Weiterhin spielt der mTOR Signalweg eine wichtige Rolle in der Interleukin-2 (IL-2) Signaltransduktion (Aronica et al., 2017).

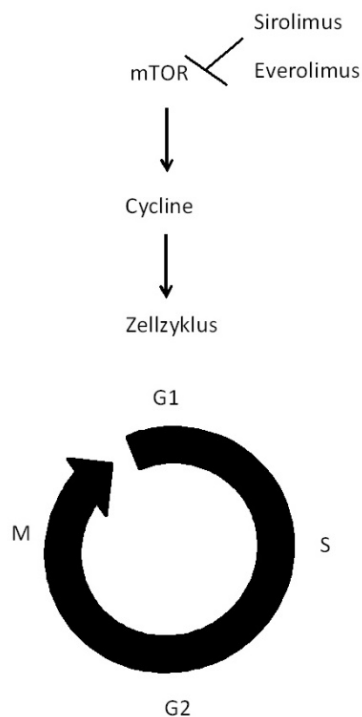


Abbildung 3: mTOR Signalweg

Der aktivierte mTOR Signalweg bewirkt eine vermehrte Synthese von zellzyklusregulierenden Cyclinen und aktiviert somit den Zellzyklus. Durch Sirolimus/Everolimus wird diese Kaskade inhibiert.

1.2 Inflammatorische Aspekte der Epileptogenese

1.2.1 Einführung in das Immunsystem

Es bedarf einem elementaren Kenntnisstand über immunologische Grundmechanismen um inflammatorische Faktoren der Epileptogenese verstehen zu können.

Als Voraussetzung für eine Reaktion auf ein Pathogen dient das Immunsystem mit seiner Immunantwort. Der Begriff *Pathogen* umfasst hierbei die vier großen Gruppen der Krankheitserreger: Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten. Das Immunsystem erkennt über bestimmte Oberflächenmoleküle ein Pathogen als “Fremd” und reagiert darauf sowohl mit seinem angeborenen als auch mit seinem adaptiven Teil. Eine tragende Rolle bei der Entstehung der Epileptogenese scheint die Gruppe der T-Lymphozyten als Teil des adaptiven Immunsystems zu spielen (Janeway Immunologie, 2018).

1.2.1.1 Aktivierung der T-Zell vermittelten Immunantwort über Antigenpräsentation

Bei Erstkontakt zwischen T-Zelle und Antigen über den T-Zell-Rezeptor kommt es zunächst zu einer Aktivierung naiver T-Lymphozyten. Hierdurch entstehen sogenannte T-Effektorzellen die sich bei erneutem Antigenkontakt zu zytotoxischen T-Zellen, regulatorischen T-Zellen und T-Helferzellen differenzieren können (Janeway Immunologie, 2018). Hierfür ist eine Antigenpräsentation über dendritische Zellen notwendig. Diese binden Antigene über Toll-like-Rezeptoren an ihrer Oberfläche, prozessieren das Antigen und präsentieren an MHC-Moleküle gebundene Fragmente gegenüber T-Zellen. Der T-Zell-Rezeptor erkennt wiederum das an MHC-Moleküle gebundene Antigen und somit erfolgt die Aktivierung der T-Effektorzellen (Germain, R.N. in Janeway Immunologie, 2018). Ein anderer Teil der T-Zellen entwickelt sich zu Gedächtniszellen, die eine tragende Rolle bei der Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses spielen. Die einzelnen Subtypen der B- und T-Lymphozyten exprimieren unterschiedliche Oberflächenproteine über die sie identifiziert werden können. Diese Cluster-of-Differentiation Proteine können entweder Rezeptorfunktionen haben, wie beispielsweise CD3 für den T-Zell-Rezeptor oder Enzymfunktionen sowie an der Signaltransduktion mitwirken (Janeway Immunologie, 2018). Da jedes CD-Molekül für eine Zellpopulation spezifisch ist wird diese Eigenschaft technisch in der Durchflusszytometrie beispielsweise bei der Leukämiediagnostik genutzt um aus einer vorhandenen Zellsuspension selektiv bestimmte Lymphozytengruppen zu quantifizieren und aufzutrennen mittels eines Sortiervorgangs. Einige wichtige Oberflächenmarker sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: CD-Moleküle auf Lymphozyten

CD-Molekül	Zelle	Funktion
CD3	Einige Thymozyten, T-Zellen	Assoziiert mit dem T-Zell Rezeptor; Notwendig für Signaltransduktion nach Antigenkontakt
CD4	T-Helfer-Zellen, regulatorische T-Zellen, Makrophagen	Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle
CD8	Einige Thymozyten, Zytotoxische T-Zellen	Corezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle
CD19	B-Zellen	Corezeptor für B-Zellen; cytoplasmatische Domäne bindet Tyrosinkinasen im Cytoplasma und die PI-3-Kinase
CD20	B-Zellen	Oligomere von CD20 bilden möglicherweise einen Ca^{2+} -Kanal; mögliche Beteiligung an der Regulation der B-Zell-Aktivierung; beteiligt an der Entwicklung von B-Zellen und Differenzierung von B-Plasmazellen
CD45	Alle hämatopoetischen Zellen (Leukozyten)	Tyrosinphosphatase; erhöht die Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen; durch alternatives Spleißen entstehen viele Isoformen

Quelle: Modifiziert nach Janeway Immunologie, 2018e

1.2.1.2 Ablauf der Immunantwort im Zentralnervensystem

Speziell für eine die Epileptogenese begünstigende neuroinflammatorische Reaktion ist eine Passage der Blut-Hirn-Schranke notwendig. Diese anatomische Barriere wird durch ein Zusammenwirken von aktivierten Immunzellen, Endothel, Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise Integrinen, Chemokinrezeptoren sowie der Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen überwunden (Autoimmunerkrankungen in der Neurologie, 2018). In diesem Zusammenhang spielt besonders die Zellpopulation der Mikroglia eine wichtige Rolle. Als gewebespezifische Makrophagen sind sie sowohl an der Regulation der im Zentralnervensystem (ZNS) ablaufenden Immunantwort als auch am Wiederaufbau und der Zerstörung des Gewebes beteiligt (Autoimmunerkrankungen in der Neurologie, 2018).

Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) durch peripher aktivierte CD4⁺ Th1-Zellen bewirkt eine Aktivierung von Mikroglia und befähigt diese zur Antigenpräsentation. Dies ermöglicht die Differenzierung zu aktiven Makrophagen (Autoimmunerkrankungen in der Neurologie, 2018). Ähnlich wie bei den dendritischen Zellen des peripheren Immunsystems wird die Immunantwort der T-Zellen durch die Antigenpräsentation restimuliert sowie durch die Sekretion von Mediatoren wie IL-1, TNF- α , IL-10, TGF- β und PGE2 über die aktiven Makrophagen verstärkt und reguliert. Somit ist für den Ablauf neuroinflammatorischer Prozesse die Interaktion zwischen T-Zellen und Mikroglia entscheidend (Autoimmunerkrankungen in der Neurologie, 2018). Weiterhin scheint für die Regulation der zentral ablaufenden Reaktion des Immunsystems auch die Aktivierung von CD4⁺Th2-Zellen nötig zu sein welche antiinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-4, IL-10 und IL-13 sezernieren (Aliosi et al., 2000).

1.2.1.3 Mycophenolatmofetil

Mycophenolatmofetil (MMF) zählt zur Klasse der Purin-Antagonisten und hemmt reversibel das Enzym Inosinmonophosphat-Dehydrogenase. Somit wirkt es über die Beeinflussung der Nukleotidsynthese. Zudem werden über diesen Mechanismus sowohl B- als auch T-Lymphozyten in ihrer Proliferation und der Antikörperbildung gehemmt. Die Halbwertszeit des Medikaments beträgt ungefähr 12 Stunden (Mutschler Arzneimittelwirkungen, 2012a). Bislang wird das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Medikament therapeutisch bei Patienten nach allogener Nieren-/Leber- oder Herztransplantation eingesetzt um eine Abstoßung des Transplantats zu vermeiden (Mutschler Arzneimittelwirkungen, 2012a).

Zusätzlich wird das Präparat in der Regel mit anderen Immunsuppressiva kombiniert. Die beschriebenen Nebenwirkungen sind vielfältig, beispielsweise treten Fieber, Infektionen, Ödeme Anämie, Leukopenie, Thrombopenie und Hypertonie auf (Mutschler Arzneimittelwirkungen, 2012a). Im Rahmen der Epilepsitherapie stellt der Einsatz von MMF einen neuen Ansatz dar, zu dem es bislang keine Daten gibt.

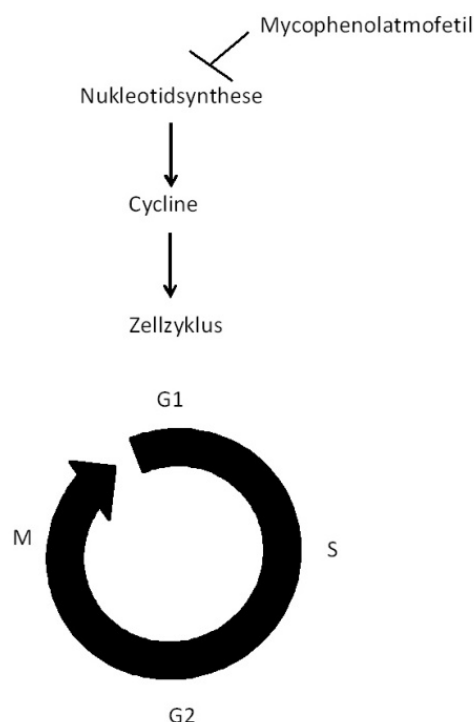


Abbildung 4: Wirkmechanismus Mycophenolatmofetil

Mycophenolatmofetil hemmt als Purinantagonist reversibel die Nukleotidsynthese. Hierüber werden weniger den zellzyklusregulierende Cycline synthetisiert und der Zellzyklus inhibiert.

1.3 Experimentelle Epilepsiemodelle

Experimentell existieren mehrere Modelle um zunächst *in vivo* einen SE zu erzeugen und die Entwicklung einer chronischen Epilepsie zu begünstigen. Bei dem für diese Arbeit verwendeten Pilokarpin-Modell wird durch mehrmalige intraperitoneale Injektionen von Pilokarpin-Hydrochlorid ein SE erzeugt. Pharmakologisch wirkt Pilokarpin zentral als Parasympathomimetikum an muskarinen Acetylcholin-Rezeptoren. Epileptische Anfälle im Stadium 5 nach Racine-Skala (siehe Tabelle 1) werden dokumentiert. Vor der ersten Pilokarpin-Injektion wird das nicht liquorgängige N-Methylscopolamin zur Vermeidung peripher unerwünschter Arzneimittelwirkungen des Pilokarpin-Hydrochlorids intraperitoneal injiziert. Der erreichte SE wird nach 90 Minuten durch die intraperitoneale Gabe von Diazepam durchbrochen. Anschließend werden die Versuchstiere mit NaCl 0,9 % rehydriert. Dieses Modell ist mit einer hohen Mortalität assoziiert, in der Literatur werden Raten von 18 (Müller et al., 2014) bis 58 % (Hung et al., 2019) beschrieben.

Tabelle 2: Racine Skala zur Verhaltensdokumentation bei Mäusen

Stadium	Verhalten (<i>nach Racine, 1972</i>)
0	Normales Bewegungsverhalten
1	Orofaziale Zuckungen
2	Zuckungen des Kopfes, Kopfnicken
3	Kloni des Vorderlaufs
4	Aufrichten
5	Aufrichten und Umfallen generalisierter tonisch-klonischer Anfall

Ein weiteres Modell zur Entwicklung einer chronischen Epilepsie ist das Kainat-Modell. Kainat wird hierbei ebenfalls intraperitoneal oder intrahippocampal am narkotisierten Tier zur Auslösung epileptischer Anfälle sowie eines SE injiziert. Analog zum Pilokarpinmodell werden Anfälle vor Erreichen des SE dokumentiert, dieser wird nach einer gewissen Zeitspanne mittels intraperitonealer Diazepam Injektion durchbrochen und die Tiere mit NaCl 0,9 % rehydriert. Anschließend erfolgt meist die Überwachung mittels Elektroenzephalogramm und Videoaufnahmen. Auch bei diesem Modell variieren die Mortalitätsraten stark. Bertoglio et al. beschreibt in einer Arbeit an Ratten beispielsweise eine Mortalität von 6-83 % (Bertoglio et al., 2017).

1.4 Ziel der Studie

In dieser Arbeit wird die Frage adressiert, welche Rolle die Immunzell-vermittelten Prozesse im ZNS bei der Epileptogenese spielen. Um diese Frage zu beantworten, wurden folgende Zielstellungen formuliert:

- Welche Unterschiede zeigen sich hinsichtlich der Präsenz von Zellen des Immunsystems im Gewebe epileptischer Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren ?
- Welche Rolle spielt insbesondere das erworbene Immunsystem und inwiefern stellen sich unterschiedliche Subgruppen von T-Lymphozyten dar ?
- Wenn das erworbene Immunsystem eine Rolle bei der Epileptogenese spielt, kann dieser Prozess durch eine präventive immunmodulatorische Intervention mit Mycophenolatmofetil verändert werden ?

2 Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Hippocampus Gewebe

Das für die Durchflusszytometrie und die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) entnommene Gewebe entstammt dem Hippocampus der in der Studie eingeschlossenen C57BL/6 Mäuse.

2.1.2 Hemisphären

Das für die Immunhistochemie verwendete Gewebe entstammt der linken Hemisphäre der in der Studie eingeschlossenen Versuchstiere.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bestellnummer	Hersteller
Deckgläser 24x40mm	BB02400400A113MNT0	Thermo Scientific, Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
FACS Reaktionsgefäße 5ml	352052	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Fast 96 Well Reaktions Platte	4368907	Micro Amp von Applied Biosystems (Singapur)
Filterpapier rund ø 70mm	431007	Macherey-Nagel (Düren, D)
Histologiekassette, grün	39LC-550-4	Leica Biosystems (Nussloch, D)
Injektionskanülen 20G gelb	301300	BD Microlance 3 (Heidelberg, D)
Injektionskanülen 26G braun	303800	BD Microlance 3 (Heidelberg, D)
Klebeband		Tesa ®
Küchentücher		Gut&Günstig
Lysing Matrix D Tubes 2ml	116913100	MP Biomedicals (Eschwege, D)
Objektträger Superfrost-Plus 25x7,5x1,0mm	71800AMNZ	Thermo Scientific, Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Parafilm® Versiegelungsfilm	31021061	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Petrischalen		Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipettierspitzen 10µl	07-902-0000	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Pipettierspitzen 1000µl mit Filter	2279	ART, Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, D)

Pipettierspitzen 20µl mit Filter	07-622-7300	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Pipettierspitzen 200µl	07-902-0003 (200)	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Reaktionsgefäße 0,2ml	04-012-1130	nerbe plus (Winscen/ Luhe, D)
Reaktionsgefäße 0,5ml	30121023	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße 1,5ml	30120086	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße 15ml	188271	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Reaktionsgefäße 50ml	227261	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Reaktionsgefäße 5ml	7-4730	neoLab (Heidelberg, D)
Reaktionsgefäße Schwarz 5ml	PE 69.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Rührstäbchen zum Auftragen von Entellan/ Prolong Gold®		Sarstedt (Nümbrecht, D)
SafeSeal® Reaktionsgefäße 1,5ml	72.706	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Serologische Pipette 10ml	607180	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Serologische Pipette 5ml	606180	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Skalpelle Bisturi Präzisa Plus Figur 21	13832340	Dahlhausen (Köln, D)
Spritzen 5ml	4617053V	Omnifix, Braun (Melsungen, D)
Spritzen 1ml	9161406V	Omnifix, Braun (Melsungen, D)
Tissue Tek ® Fixiergel	4583	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Transferpipetten 1ml	86.1179	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Transportbehälter für Eppendorf Reaktionsgefäße aus Karton	95.064.981	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Versiegelungsfilm für PCR Platten Optical Adhesive Film	201507154	MicroAmp von Applied Biosystems (Foster City, USA) Bestellnummer:
Zell Sieb 70µm	352350	BD Biosciences (Bedford, USA)

2.3 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Binokularmikroskop	KL 1000 LCD	Schott (Mainz, D)
Eismaschine		Scotsman (Berlin, D)
FACS	Aria II	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Homogenisator	FastPrep-24	MP Biomedicals (Santa Ana, USA)
Fluoreszenzmikroskop	DFC365 FX	Leica (Berlin, D)
Gefrierschrank (-80, -20°C)		Siemens (München, D)
Gerät für Geldokumentation	Azure biosystems c200	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Gerät für Gelektrophorese	Power DAC 300	Bio-RAD (München, D)
Handzähler	7100001	Marienfeld Superior (LaudaKönigshofen, D)
Inkubator		Memmert (Schwabach, D)
Konfokalmikroskop	LSM 780	Zeiss (Jena, D)
Kryostat	CM30505	Leica (Berlin, D)
Kühlschrank +8°C		Siemens (München, D)
Lichtmikroskop	CKX41	Olympus (Hamburg, D)
Lichtmikroskop	H5505	Nikon (Düsseldorf, D)
pH-Meter	CG 840	Schott (Weilheim, D)
PCR Gerät	7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Pipette 0,5-10 µl	Reference 10 Pipetman P10	Eppendorf (Hamburg, D) Gilson International (Limburg- Offheim, D)
Pipette 2-20 µl	Reference 20 Pipetman P20	Eppendorf (Hamburg, D) Gilson International (Limburg- Offheim, D)
Pipette 10-100 µl, Pipette 20-200 µl	Reference 100 Pipetman P200	Eppendorf (Hamburg, D) Gilson International (Limburg-Offheim, D)
Pipette 100-1000 µl	Reference 1000 Pipetman P1000	Eppendorf (Hamburg, D) Gilson International (Limburg-Offheim, D)
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	Integra Biosciences (Konstanz, D)
Schüttelplatte	WS5	Edmund Bühler (Hechingen, D)

Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Sterilbank	Nu-440-400E	NuAire (Plymouth, USA)
Stickstofftank		Linde Gas (München, D)
Thermocycler	GeneAmp PCR Systems 9700	Applied Biosystems, Life Technologies (Darmstadt, D)
Tischzentrifuge	Microfuge 16 Mikro 22R	Beckman Coulter (Krefeld, D) Hettich Lab Technology (Tuttlingen, D)
	Minifuge	Labnet (Edison, USA)
Mikrowelle	Micromaxx	Medion (Essen, D)
Vortex	2x ³	UniEquipLaborgeräte (Martinsried, D)
	VF2	IKA-Labortechnik (Staufen, D)
Wasserbad	WB 20	P-D Industriegesellschaft (Dresden, D)
Waage	Acculab ALC 810.2 BA 110S H 110 PT 1200	Sartorius (Göttigen, D) Sartorius (Göttigen, D) Sartorius (Göttigen, D) Sartorius (Göttigen, D)
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products (Langenselbold, D)
Zählkammer	Neubauer 640110	Marienfeld Superior (LaudaKönigshofen , D)

2.4 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
2-Methylpropan	3927	Carl Roth (Karlsruhe, D)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Prolong Gold with DAPI)	P36935	Molecular Probes (Eugene, GB)
LE Agarose 500 g	840004	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, D)
Aqua dest.		Institutseigene Anlage
Bovines Serumalbumin	11930	SERVA (Heidelberg, D)
Borsäure	B-7660	Sigma-Aldrich (München, D)
Collagenase B	11088815001	Roche (Mannheim, D)
Diazepam ratiopharm 10 µg/2 ml Injektionslösung	PZN-06616937	Ratiopharm (Ulm, D)
Diethylether getrocknet	8254	J.T. Baker (München, D)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O)	106580	Merck (Darmstadt, D)
DNAse I stock (200kU/ml)	04536282001	Roche (Mannheim, D)
Entellan		Merck (Darmstadt, D)
Esel Normalserum 10 %	D9663	Sigma-Aldrich (München, D)
Ethanol 96 %, mit Methylethylketon vergällt		Zentralapotheke d. UMR
Ethidiumbromid 30ml	2218.2	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O) (EDTA)	108418	Merck (Darmstadt, D)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375	Sigma-Aldrich (München, D)
H ₂ O ₂ 35 % 1l	1086001000	Merck (Darmstadt, D)
Humanes Normalserum		
Kaliumchlorid (KCl)	6781.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	3904.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Kaninchen Normalserum 1 %	10510	Thermos Fischer Scientific (Waltham, USA)
Leiter für Gelelektrophorese	#SM0251	Fermentas von Thermo Fisher

φX174DNA/BsuRI 50μg		Scientific (Waltham, USA)
Färbemittel für Gelektrophoresepuffer	R0611	Fermentas von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MEM+ Glutamin Medium	42360-024	Life technologies (Eugene, GB)
2-Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Mycophenolatmofetil 50 mg	SML0284	Sigma-Aldrich (München, D)
Natriumazid (NaN ₃)	71290	Sigma-Aldrich (München, D)
Natriumchlorid (NaCl) 1 kg	3957.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Methylscopolaminmethylnitrat	52250-59	Sigma-Aldrich (München, D)
Nuclease-freies dH ₂ O 50 ml	1018017	Qiagen (Hilden, D)
Paraformaldehyd (PFA)	CP10.3	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Phenol	A980.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
ProLongGold 10 ml	P36930	Life technologies (Eugene, GB)
Pilokarpinhydrochlorid	P6503-50G	Sigma-Aldrich (München, D)
α-MEM (Minimum essential Medium α-Modification)	22571-020	Gibco, life technologies (Paisley, GB)
RLT Plus Puffer	1048449	Qiagen (Hilden, D)
RPE Puffer	10418013	Qiagen (Hilden, D)
RPMI Medium	R8758	Gibco, life technologies (Paisley, GB)
RW1 Puffer	1015763	Qiagen (Hilden, D)
Stickstoff (flüssig)		Linde Gas (München, D)
Succhrose	s7903	Sigma-Aldrich (München, D)
Toluidinblau	t3260	Sigma-Aldrich (München, D)
TritonX-100	X-100	Sigma Aldrich (München, D)
Trypan Blau (0,1 % in PBS)		Chemapol (Prag, CZ)
Xylol 2,5 l	9713.3	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ziegen Normalserum (NGS) 1 %, 10 %	C10000	Invitrogen (Waltham, USA)

2.5 Puffer, Lösungen und Medien

Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien sind im folgenden Abschnitt aufgeführt. Der Ansatz erfolgte mit destilliertem Wasser (Aqua dest.).

2.5.1 Puffer

2.5.1.1 10x PBS pH 7,4

80 g NaCl

2 g KCl

14.4 g Na₂HPO₄

2.4 g KH₂PO₄

800 ml Aqua dest.

pH Einstellung auf pH 7.4

auffüllen mit Aqua dest. bis zu einem Volumen von 1000 ml

2.5.1.2 Färbepuffer für Durchflusszytometrie

100 ml 1x PBS pH 7.4

0.5 ml bovines Serumalbumin

0.1 ml NaN₃

2.5.1.3 Ladepuffer für Gelelektrophorese

100 ml Tris-Base (10 mM)

0,03 ml Bromophenolblau

0,03 ml Xylen Cyanol FF

60 ml Glycerol

60 ml EDTA pH 7,6

700 µl RNase-freies H₂O

6x DNA Ladepuffer → 200 µl

2.5.1.4 1x TBE Puffer für Gelelektrophorese pH 8

108 g Tris-Base

55 g Borsäure

40 ml 0,5M EDTA

auffüllen mit Aqua dest. bis zu einem Endvolumen von 10000 ml.

2.5.1.5 1x PBS pH 7,4

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na₂HPO₄

0.24 g KH₂PO₄

800ml Aqua dest., einstellen auf pH 7.4 auffüllen mit Aqua dest. bis zu einem Volumen von 1000ml.

2.5.2 Lösungen**2.5.2.1 Präparierlösung II**

42,34 g NaCl

1,68 g KCl

0,83 g NaH₂PO₄ x 1H₂O

0,6 g MgSO₄

1 ml CaCl₂ (0,5M)

5 ml EDTA (25mM)

50 ml HEPES (0,5M 4°C)

5000 ml Aqua dest.

2.5.2.2 Collagenase B Lösung

500 mg Collagenase B

12.5 ml Aqua dest.

2.5.2.3 DNase Arbeitslösung

DNase I stock (200 kU/l) 1:10 verdünnt mit RPMI Medium

2.5.2.4 Percoll

Percoll stock

- 18 ml Percoll (1.13 g/ml bei 25 °C)
- 2 ml 10x PBS (pH 7,4)

Percoll A

- 9.4 ml Percoll stock
- 2.6 ml 1x PBS (pH 7,4)

Percoll B

- 4 ml Percoll stock
- 8 ml RPMI Medium

2.5.2.5 Succhrose Lösung 30 %

30 g Succhrose in 100 ml 1x PBS (pH 7,4)

2.6 Antikörper und Fluorochrome der Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Fluorochrome der Durchflusszytometrie

Marker	Fluorochrom	Klon	Konzentration (mg/ml)	Volumen (µl)	Bestellnummer	Hersteller
CD4	FIT.C	GK1.5	0,5	0,5	100405	Biolegend (SanDiego, USA)
CD3	PE	145- 2C11	0,2	1	100308	Biolegend (SanDiego, USA)
CD45	PerCP	30-F11	0,2	1	103130	Biolegend (SanDiego, USA)
B220	PE-Cy7	RA3- 6B2	0,2	1	103222	Biolegend (SanDiego, USA)
CD8	APC-Cy7	53-6.7	0,2	4	100714	Biolegend (SanDiego, USA)
CD69	BV421	H1.2F3	0,2	5	104528	Biolegend (SanDiego, USA)
NK1.1	BV510	PK136	0,2	5	108738	Biolegend (SanDiego, USA)
Negativ-Kontroll-Kompensations-Beads (CompBeads)				552845 Anti-Maus Ig	BD Biosciences (Heidelberg, D)	

2.7 qRT-PCR Gensonden, Primer und Mastermix

Tabelle 7: Gensonden, Primer und Mastermix

Taqman® Gensonden für qRT-PCR		
Gen	Bestellnummer	Hersteller
Cd3g	Mm00438095_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
CD4	Mm00442754_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
CD8a	Mm01182107_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Emr1 (F4/80)	Mm00802529_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ptpnc (CD45)	Mm01293577_m1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Primer für qRT-PCR		
Primer	Bestellnummer	Hersteller
GAPDH-assay probe (mit VIC-Tamra)	4352339E	Applied Biosystems (Foster City, USA)
GAPDH-forward primer	4352339E	Applied Biosystems (Foster City, USA)
GAPDH-reverse primer	4352339E	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Taqman® Mastermix für qRT-PCR		
Taqman Gen Expression Mastermix mit UNG	Bestellnummer	Hersteller
	4440038	Applied Biosystems (Foster City, USA)

2.8 Fertige Reaktionssets

Tabelle 8: fertige Reaktionssets

Beschreibung	Bestellnummer	Hersteller/ Bestellnummer
Rabbit specific HRP/DAB Detection IHC Kit	ab64261	Abcam (Cambridge, GB)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Applied Biosystems (Foster City, USA)
RNeasy Plus Mini Kit	74136	Qiagen (Hilden, D)

2.9 Antikörper der Immunhistochemie

Die folgenden primären und sekundären Antikörper wurden für die Immunhistochemie verwendet und mit 1%-igem Normalem-Ziegen-Serum (NGS) (CD45 und Cox2) bzw. 1%-igem Kaninchenserum (Iba1) verdünnt. Die Verdünnung des jeweiligen Serums erfolgte mit 10 x PBS Puffer.

Tabelle 9: primäre Antikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Antikörper	Bestellnummer	Hersteller	Konzentration (mg/ml)	Verdünnung
CD45	Rb pAB to CD45	ab10558	Abcam (Berlin, D)	0,7	1:200
Cox2	Rb pAB to Cox2	ab15191	Abcam (Berlin, D)	0,2	1:200
Iba1	Goat pAB to Iba1	ab5076	Abcam (Berlin, D)	0.5	1:200

Tabelle 10: sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Bestellnummer	Hersteller	Konzentration (mg/ml)	Verdünnung
Alexa-Fluor [®] 647 goat anti-rabbit	a21447	Invitrogen(Berlin, D)	2	1:500
Cy5 [®] goat anti-rabbit	a10523	Invitrogen (Berlin, D)	2	1:500
Sek. Ak CD45 goat anti-rabbit IgG HRP	ab6721	Abcam (Berlin, D)	2	1:200
Sek. Ak Iba-1 rabbit Ab to goat IgG HRP	ab205718	Abcam (Berlin, D)	2	1:200

2.10 Software und Online Programme

Tabelle 11: Liste der verwendeten Software und Online Programme

Programm	Firma	Anwendung
CorelDraw Graphics Suits X5	Corel Corporation (Ottawa, USA)	Bildbearbeitung
cSeries Capture Software	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)	Dokumentation der Gelelektrophorese
FACS Diva Software	BD Biosciences (Heidelberg, D)	Durchführung und Auswertung der Durchflusszytometrie
LASX	Zeiss (Jena, D)	Auswertung und Bearbeitung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen
Microsoft Office	Microsoft (Unterschleißheim, D)	Word, Powerpoint, Excel
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	Literaturrecherche
Sigma Plot (Version 11.0)	Systat Software GmbH (Erkrath, D)	Statistische Auswertung
SDS 2.3 Software	Applied Biosystems (Foster City, USA)	Durchführung und Analyse der quantitativen Real Time-PCR
ND-1000 (Version 3.3.0)	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)	RNA-Konzentrationsbestimmung
Zeiss ZEN Software	Zeiss (Jena, D)	Auswertung und Bearbeitung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen

2.11 Methoden

2.11.1 Tiermodell

Für die Studie wurden 28-34 Tage alte männliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung und einem festen 12-Stunden Tag/Nacht Zyklus. Die Pilokarpin-Gruppe und die Kontroll-Gruppe bestand aus jeweils 124 Mäusen. Alle Schritte entsprachen den nationalen und internationalen Ethikrichtlinien für Tiere. Es erfolgte die Tierschutzrechtliche Genehmigung durch die örtliche Behörde unter der Nummer 7221.3-1.1-047/12 einschließlich einer Ausnahmegenehmigung.

2.11.2 Pilokarpin-Injektion

Die Versuchsserie umfasste jeweils zwei Tage mit je 30 Tieren. Die Injektionslösungen N-Methylscopolamin und Pilokarpin-Hydrochlorid wurden auf Grundlage des Versuchsprotokolls hergestellt. Für die sich anschließende intraperitoneale Verabreichung wurde eine 1 ml Spritze mit 26 G Injektionskanüle verwendet. Die Mäuse befanden sich während der gesamten Versuchsserie in Einzelkäfigen. Jedes Tier erhielt 30 min vor der ersten Pilokarpin-Injektion 100 µl N-Methylscopolamin intraperitoneal zur Vermeidung peripherer cholinergischer Nebenwirkungen. Anschließend wurde den Pilokarpin-Tieren alle 20 min 100 µl Pilokarpin-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, 100 mg/kg) intraperitoneal injiziert bis zum Erreichen eines SE (bis zu 800 mg/kg; im Mittel 457 ± 113 mg/kg Mittelwert $\pm$ SEM). Vorher auftretende epileptische Anfälle im Stadium 5 nach Racine Skala wurden dokumentiert. Nach 90 min erhielten die Kontrolltiere 50 µl und die Pilokarpin-Tiere 100-200 µl Diazepam (Ratiopharm, Ulm, Deutschland, 5 mg/kg, i.p.) als Bolus zur Durchbrechung des SE. Zusätzlich wurden den Versuchstieren zur Rehydrierung 100 µl NaCl 0,9 % intraperitoneal verabreicht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 54 % aller Mäuse mithilfe des verwendeten Protokolls einen SE entwickelten und überlebten.



Abbildung 5: schematische Darstellung der intraperitonealen Injektion (Ansicht von ventral)

Für die Injektion lag das Tier in Narkose, wurde an den Extremitäten und der Schwanzwurzel fixiert und es erfolgte die intraperitoneale Pilokarpin-Injektion peritoneal links aufgrund der Verletzungsgefahr von Darm inkl. Appendix.

2.11.3 Immunsuppression

In den ersten drei Tagen nach der Pilokarpin-Injektion erhielten acht Kontrolltiere und sechs der epileptischen Tiere je 100 μ l MMF intraperitoneal (20 mg/kg).

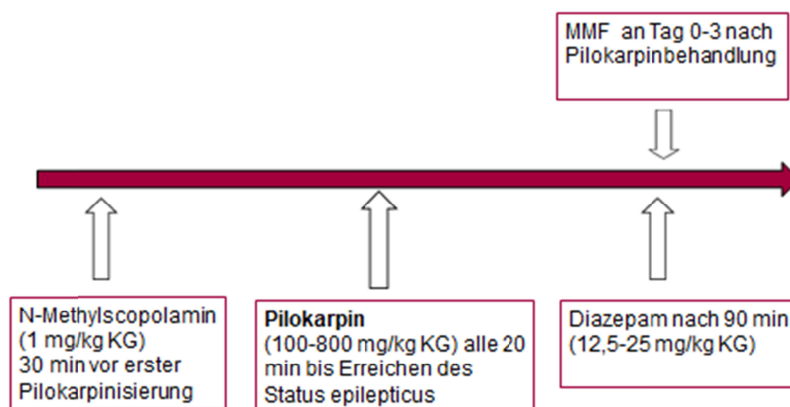


Abbildung 6: Schema der Pilokarpin-Injektion und der Immunsuppression

30 min vor der ersten Pilokarpin-Injektion erhielten die Versuchstiere intraperitoneal N-Methylscopolamin und anschließend regelmäßige Pilokarpin-Gaben alle 20 min bis zum Erreichen eines SE. Dieser wurde nach 90 min durch Diazepam durchbrochen und es erfolgte die Immunsuppression mit MMF.

Tabelle 12: Gruppenaufteilung und n-Anzahl der behandelten Tiere

Zeitpunkt nach Pilocarpin-Injektion (Tage)	Ctrl	Ctrl + MMF	Pilo	Pilo + MMF	gesamt
2	6	-	5	-	11
28	20	8	12	6	46

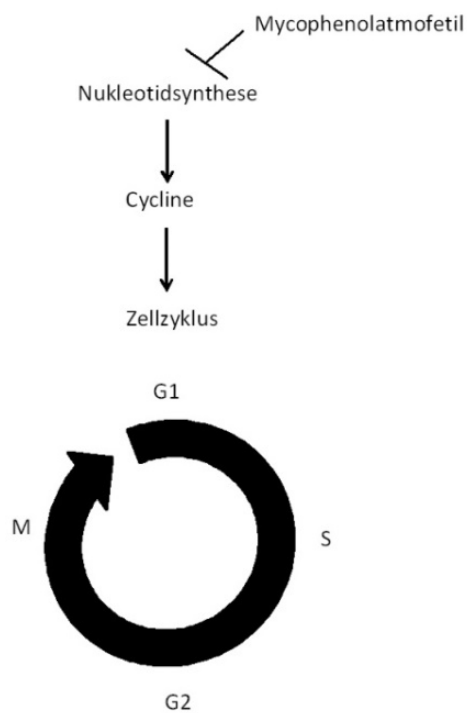


Abbildung 7: Wirkmechanismus Mycophenolatmofetil

Mycophenolatmofetil hemmt als Purinantagonist reversibel die Nukleotidsynthese. Hierüber werden weniger den zellzyklusregulierende Cycline synthetisiert und der Zellzyklus inhibiert.

2.11.4 Präparation des Hippocampus

Die Entnahme des Hippocampus erfolgte an Tag 2 oder 28 nach Pilokarpin-Injektion.

Die Tiere erhielten eine Narkose mit Diethyl-Ether, wurden dekapitiert und in einem nächsten Arbeitsschritt beide Hirnhemisphären entnommen. Anschließend erfolgte die Überführung des Gewebes in eine mit Präparierlösung II gefüllte Petrischale und in einem weiteren Schritt die Einbettung der linken Hemisphäre für immunhistochemische Färbungen in ein Paraformaldehyd (PFA) (4 % in 1x PBS pH 7,4) enthaltendes 50 ml Reaktionsgefäß. Der Hippocampus der rechten Hemisphäre wurde mithilfe eines Binokularmikroskops präpariert und in ein 1,5 ml großes SafeSeal® Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der entnommenen Hippocampi der rechten Hemisphärenseite erfolgte zunächst in flüssigem Stickstoff und anschließend in einer Gefriertruhe bei -83 °C. Als Instrumente für die Präparation wurden kleine Scheren, Skalpelle und Pinzetten verwendet.

Am Tag 28 nach der Pilokarpin-Injektion wurde für die Durchflusszytometrie der Hippocampus der rechten Hemisphäre mehrerer Tiere präpariert. Im direkt folgenden Arbeitsschritt wurden die Hemisphären in ein mit Zellkulturmedium gefülltes 5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.11.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Beurteilung und Auftrennung einzelner Zellen mithilfe fluoreszenz-markierter Antikörper (siehe Tabelle 6). Diese quantitative Methode wurde 1968 von Wolfgang Göhde an der Wilhelms-Universität Münster etabliert. Die markierten Zellen fließen einzeln in einer Kapillare oder Küvette an einem Laserstrahl vorbei sodass sie beim Passieren ein optisches Signal emitieren. Dieses ist je nach Struktur, Größe und Eigenschaft unterschiedlich. Mithilfe eines Detektors wird dieses Signal sichtbar und lässt sich somit auswerten. Innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls wird eine große Anzahl von Zellen analysiert. Daraus hervorgehend ist eine Aussage über ganze Zellpopulationen möglich. Weiterhin besteht die Möglichkeit die gefärbten Zellen zu sortieren. Der Forward Scatter (FSC) misst die Beugung des Lichtstrahls in einem flachen Winkel. Er hängt vom Volumen der Einzelzelle ab. Mit dem Side Scatter (SSC) wird die Brechung des Lichtstrahls im rechten Winkel gemessen, die von den Faktoren Zellgröße, Granularität, Struktur des Zellkerns und Anzahl der Vesikel abhängt (siehe dazu auch Abbildung 8). Für die Etablierung der Methode an Hippocampuszellen wurden Probemessungen an Milzzellen und Einzelzellen einer gesamten Hirnhemisphäre durchgeführt.

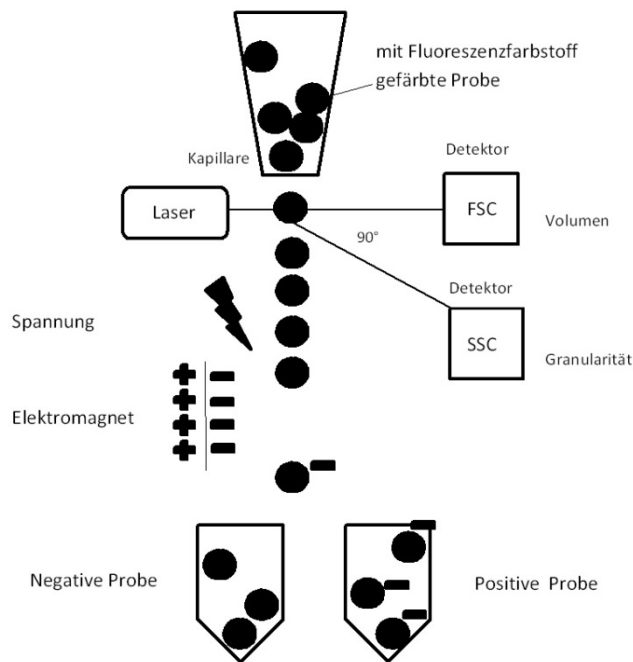


Abbildung 8: Prinzip der Durchflusszytometrie

Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Probe gelangt durch eine Kapillare zu einem Laser, dessen Lichtstrahl auf die beiden Detektoren FSC (Forward Scatter) und SSC (Side Scatter) trifft. Im weiteren Verlauf wird mit einem Elektromagneten Spannung erzeugt und die negativ geladene Probe in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.11.6 Isolation einzelner Hirnzellen

Das Hippocampusgewebe von zwei bis drei Mäusen wurde nach der Präparation in einem 5 ml Reaktionsgefäß mit α -Minimal Essential Medium (α -MEM) gelagert und transportiert. Anschließend erfolgte die Überführung aus dem 5 ml Reaktionsgefäß in ein mit 1ml Rosewell Park Memorial Institute Zellkulturmedium (RPMI) ohne fetales Kälberserum (FCS) gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß. Zudem wurden dieser Lösung 25 μ l Collagenase B (= 1 mg/ml) sowie 5 μ l DNase I Arbeitslösung (=100 U/ml) hinzugefügt und in einem 37 °C Wasserbad für 30 min inkubiert. Alle 5 min erfolgte ein Schüttelvorgang mithilfe des Vortex. Im Folgenden wurde die entstandene Zellsuspension nach genauem Pipettieren und Durchmischen in ein mit einem 70 μ m Zellsieb besetztes 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Für die weitere Gewinnung von Einzelzellen wurde der Gummistempel einer 1 ml Spritze verwendet mit dem die Zellsuspension durch das Sieb gedrückt wurde. Danach erfolgte die Spülung des Siebes mit 25 ml Zellkulturmedium. Die durch den Siebvorgang verfeinerte Zellsuspension im 50 ml Reaktionsgefäß wurde anschließend bei 300 x G für 10 min und 4 °C zentrifugiert.

Die Resuspension des entstandenen Zellpellets erfolgte in 2,5 ml Percoll B mit anschließender Überführung in ein 15 ml Reaktionsgefäß. Nach dem Unterschichten mit 2 ml Percoll A mithilfe einer 5 ml Spritze und einer Injektionskanüle der Größe 20 G bildeten sich zwei Phasen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1000 x G für 30 min bei 4 °C ohne Bremse. Hierdurch entstand eine obere durchsichtige, mittlere, Zellen enthaltende und eine untere rötliche Phase. Die Zellen der mittleren Phase wurden mithilfe einer >20 G Nadel in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Zellkultur Medium überführt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt erfolgte bei 500 x G für 20 min bei 4 °C, im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml Färbepuffer resuspendiert. Die Zählung der Zellen erfolgte mithilfe des Lichtmikroskops CKX41 bei 100-facher Vergrößerung in einer Neubauer-Zählkammer mit einem Verhältnis von 15 µl Zellsuspension und 15 µl Trypan Blau. Das Mischverhältnis wurde auf die zu erwartende Zellzahl angepasst und so gewählt, dass nicht mehr als 100 Zellen pro Großquadrat sichtbar waren. Bei 100-facher Vergrößerung erfolgte die Auszählung von vier Großquadraten, wobei bläulich gefärbte Zellen nicht mit berücksichtigt wurden, da sie durch die Einlagerung von Trypanblau als perforiert bzw. avital gelten. Unter Beachtung des Kammerfaktors der Neubauer-Zählkammer (10^4), des Verdünnungsfaktors und dem Mittelwert der Zellzahlen pro Großquadrat ließ sich die Zellzahl/ml errechnen. Es wurden Zellzahlen von $0,58 \times 10^6$ bis $4,04 \times 10^6$ erreicht. Anschließend folgte die Färbung der Einzelzellen.

$$\underline{\text{Zellzahl/ml}} = \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

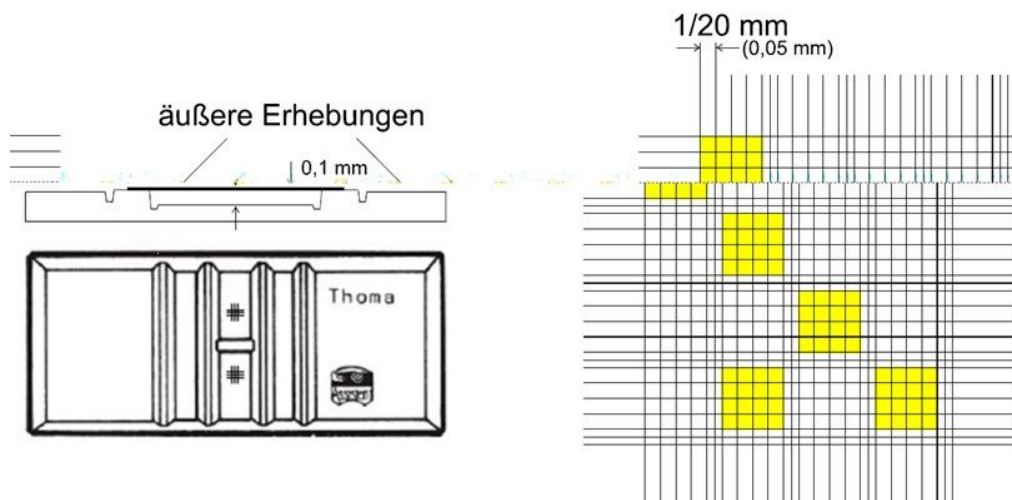


Abbildung 9: Auswertung der Zellzählung mithilfe der Neubauer Zählkammer

Insgesamt wurden vier Großquadrate (gelbe Markierungen) der 20x20 Felder ausgezählt. Die Maße der Kammer betragen 0,1mm x 1,0mm.

Quelle: Praktikumsanleitung 1. Untersuchung des Blutes, Oscar Langendorff Institut für Physiologie Rostock.

2.11.7 Färbung der Hippocampuszellen

Alle Färbeschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die verwendeten Oberflächenmarker und Fluorochrome sind in Tabelle 6 aufgeführt. 1×10^6 Zellen wurden in 60 µl FACS Färbepuffer resuspendiert, 5 µl humanes Normal Serum hinzugefügt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen jedes Antikörpers und FACS Färbepuffer hinzugegeben bis zu einem Endvolumen von 100 µl und für 15 min bei Dunkelheit inkubiert. Im folgenden Arbeitsschritt wurden nochmals 500 µl FACS Färbepuffer hinzupipettiert und es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 400 x G für 7 min. Nach der abschließenden Resuspension mit 60 µl Färbepuffer erfolgte die Analyse am Messgerät. Die nicht sofort analysierten Proben wurden in einem Kühlschrank bei 4 °C zwischengelagert.

2.11.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erfolgte anhand eines etablierten Protokolls mithilfe eines Aria II Geräts. Für die Analyse waren Färbepuffer, eine 1000 µl-Pipette, Pipettierspitzen, FACS Reaktionsgefäße, 1,5 ml Reaktionsgefäße und 15 ml Reaktionsgefäße notwendig. Vor dem Start des Gerätes wurde sowohl der PBS-, Ethanol-, und Ablauftank überprüft als auch die Gaszufuhr aufgedreht. Nach dem Einschalten des Gerätes inklusive Laser und dem dazugehörigen PC war zunächst eine Initialisierung der Software mit Optimierung der Geräteeinstellung notwendig.

Alle Messungen wurden mit einer 70 µm Kapillare durchgeführt, es erfolgte kein separater Sortiervorgang am Gerät. Nach der erfolgten Analyse wurde die gebrauchte Kapillare mit Aqua dest. gereinigt, der Druck langsam abgelassen, gegebenenfalls der PBS- und Ethanol tank nachgefüllt und der Abfallbehälter geleert. Für die Auswertung war es nötig aus der Punktwolkendarstellung zunächst Einzelzellen zu definieren und in einem nächsten Schritt die verschiedenen Zellpopulationen zu identifizieren (siehe Abbildung 4).

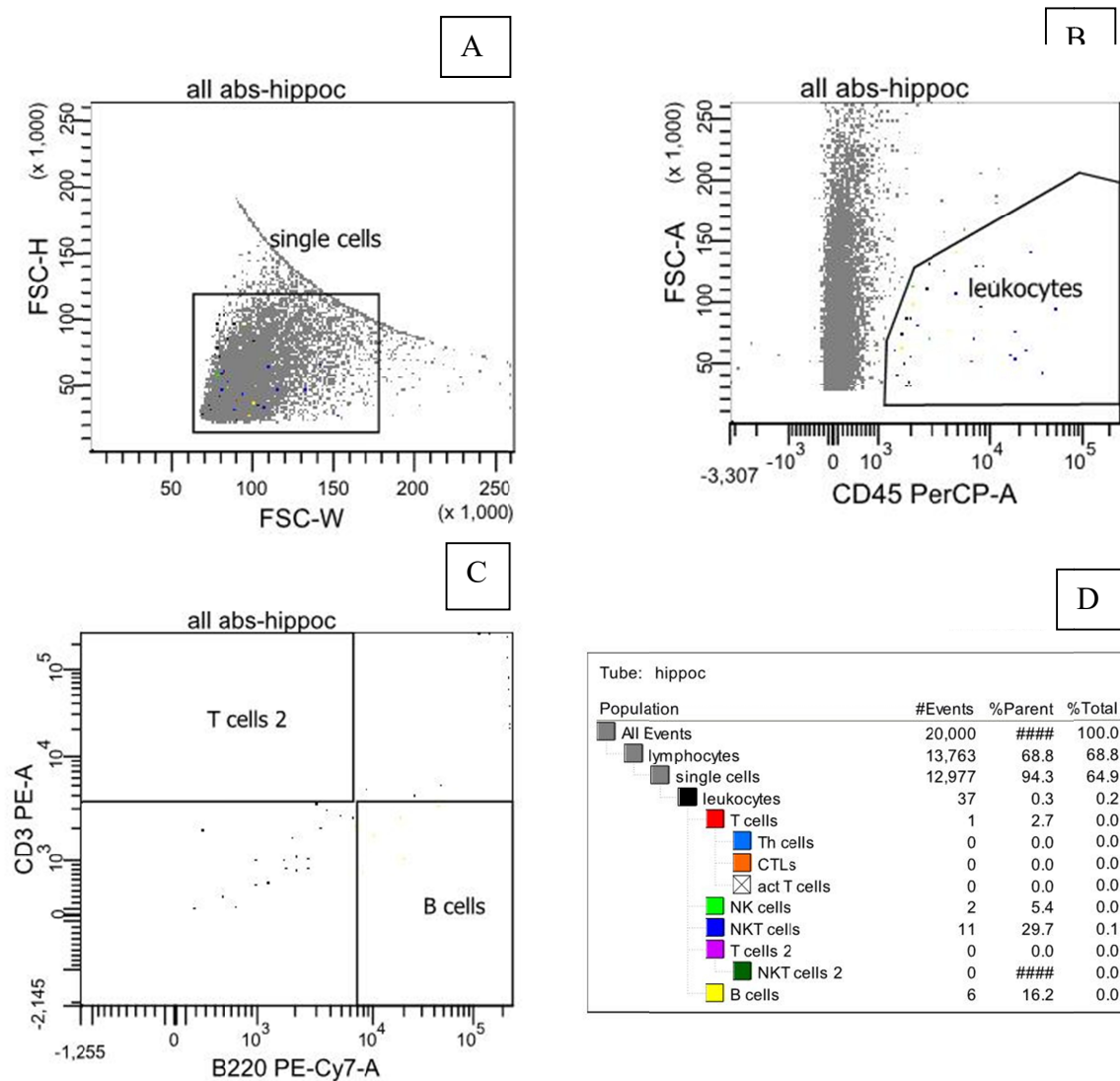


Abbildung 10: Auswertung der Durchflusszytometrie anhand des Punktwolkendiagramms

Aus der Zellsuspension werden zunächst alle Einzelzellen identifiziert (A) und in einem weiteren Schritt die Population der Leukozyten (CD45, B) und weiterhin Subgruppen unterschieden (CD3 und B220, C). Neben der graphischen Auswertung erfolgt die Quantifizierung der enthaltenen Zellpopulationen (D).

2.11.9 Molekularbiologie

2.11.9.1 Analyse von mRNA

2.11.9.2 mRNA Isolation

Die Isolation der messenger RNA (mRNA) erfolgte aus dem entnommenen Hippocampusgewebe aller vier Versuchsgruppen (siehe Tabelle 11). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff transportiert und in ein 2 ml Lysing Matrix D Reaktionsgefäß überführt. Zuvor wurde in die Reaktionsgefäße eine Lösung aus 500 µl RLT Plus Puffer und 1% Mercaptoethanol gegeben. Dies war notwendig um den vorhandenen Zellverband für die Gewinnung von mRNA aus den Einzelzellen aufzulösen. Der mithilfe des Homogenisators entstandene Überstand im Reaktionsgefäß wurde nach Zentrifugation bei Vmax über eine Minute in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl RLT Plus Puffer mit 1% Mercaptoethanol und ein weiterer Homogenisationsschritt mit anschließender Zentrifugation für eine Minute bei Vmax. Der Überstand wurde in das bereits für den Überstand des ersten Homogenisations- und Zentrifugationsschritt verwendete Eppendorf Reaktionsgefäß hinzupipettiert. Nach diesem Arbeitsschritt wurde die Fällung der mRNA durch Hinzugabe von Phenol eingeleitet, wobei das hinzugefügte Volumen an Phenol dem des vorher gewonnenen Zellüberstandes entsprach. Nach einem zehnminütigen Zentrifugationsvorgang bei Vmax wurde die durch den Fällungsschritt entstandene mRNA enthaltende obere Phase abpipettiert. Die weitere Isolation verlief entsprechend dem Handbuch des verwendeten RNeasy Plus® Mini Kits. Im folgenden Arbeitsschritt wurde der mRNA Gehalt mittels des Fotospektrometers quantifiziert und die Reinheit der Präparation in einer Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE) überprüft.

2.11.9.3 Spektrometrische Bestimmung der Konzentration von mRNA

Mithilfe spektrometrischer Verfahren lassen sich sowohl der Reinheitsgehalt als auch die Konzentration von Ribonukleinsäure (RNA) und Desoxyribonukleinsäure (DNA) quantifizieren. Hierfür wurde die Absorption bei 230, 260 und 280 nm entsprechend des Lambert-Beer-Gesetzes am Spektralphotometer NanoDrop® ND-1000 gemessen. Hierbei erfolgt die quantitative Analyse über eine 1mm lange Probensäule, während mithilfe des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280 nm eine Aussage über die Reinheit der isolierten Probe getroffen werden kann. Hierzu wurde 1 µl der isolierten RNA-Probe auf den Gerätesockel pipettiert und die Konzentration vom Gerät berechnet. Für die weiteren Arbeitsschritte waren Konzentrationen von mindestens 30 ng/µl notwendig. Niedrigere Werte deuteten auf eine Kontamination durch Proteine, Phenole, Salze hin die zur Isolation der gewonnenen mRNA notwendig waren.

2.11.9.4 Agarose-Gel- Elektrophorese

Für die Überprüfung von Reinheit und Qualität der isolierten mRNA eignet sich eine Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE). Durch diese Methode wandern die negativ geladenen RNA-Fragmente in Richtung der Anode ((+)-Pol). Je nach Fragmentlänge ergibt sich eine unterschiedliche Mobilität wobei kleinere Stücke schneller wandern als größere. Dementsprechend lässt sich durch diese Methode eine Aussage über die Größe der RNA-/DNA Fragmente treffen. Zusätzlich können diese mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Ethidiumbromid oder HD Grün) unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach einem Waschschrift der Kammer, des Schlittens und des Kamms mit H_2O_2 erfolgte das Herstellen des Agarose-Gels. Dafür wird eine Lösung aus LE Agarose Pulver, 30 ml 1x TBE Puffer und 20 ml Aqua dest. benötigt. Diese wurde einem nächsten Arbeitsschritt bis zum Siedepunkt erhitzt und auf ein Endvolumen von 30 ml eingekocht. Anschließend wurden 2 μ l Ethidiumbromid hinzugefügt. Es erfolgte die Herstellung der Pufferlösung mit 1x TBE und 20 μ l Ethidiumbromid. In einem nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Beladung der einzelnen Geltaschen mit einer Lösung aus 300 ng RNA der jeweiligen Probe und 4 μ l Ladepuffer. Als Referenz diente die mit 4 μ l der Leiter beladene Tasche. Die Auftrennung erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 90 V und die anschließende Dokumentation folgte am Gerät Azure biosystems c200.

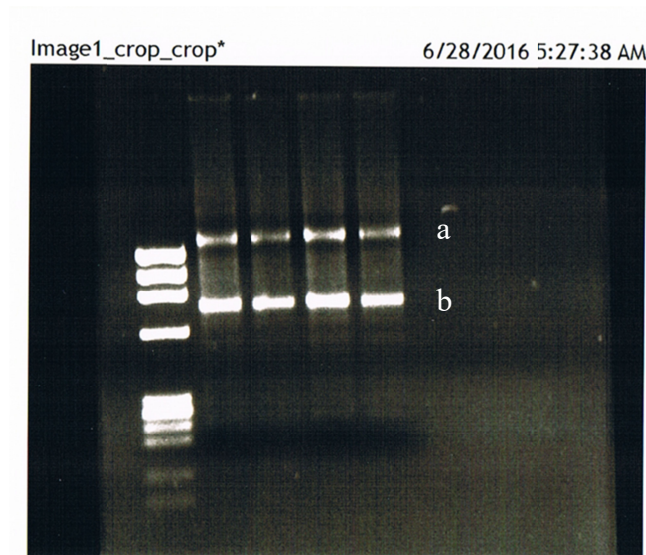


Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung der standardisierten rRNA Banden nach Auftrennung der Proben mittels Gelelektrophorese am UV-Gerät

Insgesamt wurden vier Proben in der Gelelektrophorese aufgetrennt, als Kontrolle diente die Leiter mit standardisierten Banden (1. Bande von links). Alle Proben zeigen zwei Banden (a+b) die der 28S-rRNA (a) und 18S-rRNA entsprechen.

2.11.9.5 cDNA-Synthese

Die isolierte mRNA wurde mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die im Reaktionsset enthaltene Reverse Transkriptase verwendet die vorhandene mRNA als Matrize für die Synthese einer dazu komplementären DNA (cDNA), welche nur den transkribierten Bereich eines Gens beinhaltet. Die hierfür notwendigen Primer sind verschiedene Oligonukleotide die am poly-A-Schwanz der mRNA binden und so einen mRNA-cDNA-Doppelstrang entstehen lassen. Dieser wird enzymatisch zu einer einsträngigen cDNA gespalten und durch eine Polymerase zu einem cDNA-Doppelstrang ergänzt. Für die cDNA-Synthese wurden je Reaktion 500 ng mRNA verwendet und 10 µl eines Mastermixes hinzupipetiert. Das für den Mastermix verwendete Enzym Reverse Transkriptase, der RNase Inhibitor, der Puffer und das nukleasefreie Wasser standen ebenso wie die Oligonukleotide und Primer auf Eis. Anschließend wurde die cDNA mit einer Konzentration von 25 ng /µl RNA Äquivalent im Thermocycler synthetisiert und bis zu 24 h zwischen 2-6 °C aufbewahrt.

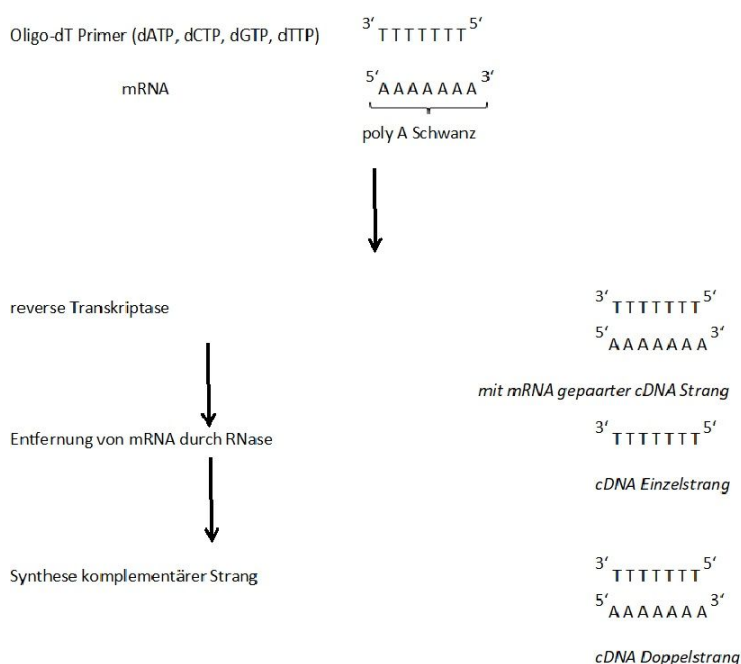


Abbildung 12: schematischer Ablauf der cDNA-Synthese

Der isolierten mRNA werden Oligo-dT Primer hinzugegeben. Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird ein zur mRNA komplementärer cDNA-Strang synthetisiert und in einem weiteren Schritt als Einzelstrang isoliert. Es erfolgt wiederum die Synthese eines zum cDNA-Einzelstrang komplementären Stranges um einen cDNA-Doppelstrang zu erzeugen.

Tabelle 13: Temperaturprofil cDNA Synthese

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5min
4 °C	∞

Tabelle 14: Volumen und Komponenten des für die cDNA Synthese verwendeten Reaktionsansatzes

Volumen	Komponente
2 µl	10xRT Puffer
0,8 µl	25xdNTP Mix
2 µl	RT Random Primers
1 µl	MultiScribe RT
1 µl	RNase Inhibitor
3,2 µl	Nuklease-freies Wasser

2.11.10 Polymerase-Kettenreaktion

2.11.10.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die 1983 von Kary Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Technik zur Amplifizierung einer spezifischen Region eines DNA-Leitstrangs. Dieses Verfahren beinhaltet insgesamt drei Teilschritte, die mit einer Denaturierung der Doppelhelix bei 95 °C und dem Hervorbringen zweier Einzelstränge beginnen. Danach findet bei einer Temperatur von 50-60 °C die Bindung spezifischer Oligonukleotide (Primer mit etwa 15-25 Desoxyribonukleotiden) an den Einzelsträngen statt. Hierdurch entstehen freie 3'-Hydroxyl-Enden, an denen die DNA-Polymerase bindet und einen zum DNA-Leitstrang komplementären Strang synthetisiert. Anschließend werden die Stränge bei etwa 70 °C elongiert. Die Schritte der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation werden 30-40 mal wiederholt, was zu einer exponentiellen Amplifikation der spezifischen DNA-Sequenz um den Faktor $10^6 - 10^{12}$ führt.

2.11.10.2 Quantitative Real-Time-PCR

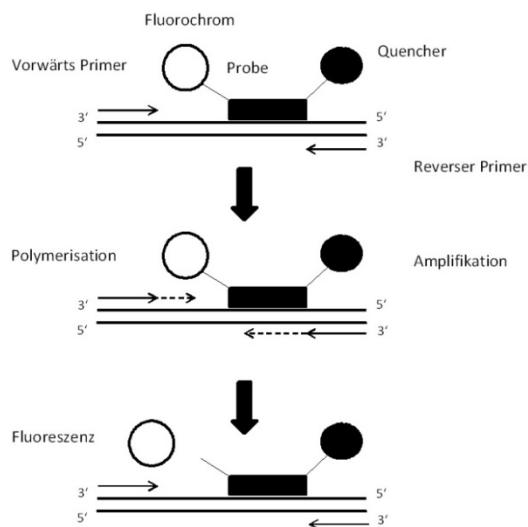
Die für diese Arbeit angewandte Methode der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist sensitiver als die in Kapitel 2.11.5 beschriebene Durchflusszytometrie. Ein zunächst durch einen Quencher inaktiver Fluoreszenzfarbstoff wird durch Amplifikation und Polymerisation während der Polymerasekettenreaktion aktiviert und das entstandene Fluoreszenzsignal in Echtzeit nach jedem Zyklus gemessen. Die gemessene Probe wird für die weitere Auswertung mit einem Standardgen verglichen um quantitative Aussagen über die in der Probe enthaltene Genexpression treffen zu können. Für diese Arbeit wurde als Housekeepinggen GAPDH verwendet, welches für das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase der Glykolyse codiert. Die Analysen wurden mit dem 7900HT Fast Real-Time-PCR System durchgeführt und für jede der verwendeten Gensonden (Tabelle 6) und das Standardgen GAPDH ein Reaktionsansatz hergestellt. Die jeweiligen Bestandteile sind in Tabelle 13 und 14 dargestellt. Als Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser. 49,6 µl Reaktionsansatz wurden für jede Probe und die Negativkontrolle auf ein PCR Reaktionsgefäß verteilt und 16,5 µl der verdünnten Reaktion (1:5, 25 ng/µl RNA Äquivalente) hinzugegeben. Anschließend wurden 20 µl der mit dem Reaktionsansatz gemischten Probe auf eine 96-fast-Well PCR Platte anhand eines Pipettier-Schemas pipettiert und es entstanden Triplikate. Die Platte wurde mit einem speziellen Plastikfilm versiegelt und zentrifugiert.

Tabelle 15: Komponenten Reaktionsansatz pro Gensonde

Volumen (µl)	Komponente
3,3 µl	20x TaqMan Gene Expression Assay
33 µl	2xTaqMan Gene Expression Master Mix
13,3 µl	Rnase-freies Wasser

Tabelle 16: Komponenten Reaktionsansatz für das Standardgen GAPDH pro Probe

Volumen		Komponente
0,3 µl	} je Reaktion → 1,98 µl je Probe	forward primer
0,3 µl		reverse primer
0,3 µl		assay probe (VIC-Tamra)
33 µl		2x TaqMan Gene Expression Master Mix
14,52 µl		RNase-freies Wasser

**Abbildung 13: vereinfachter Ablauf der qRT-PCR**

Der an die Probe gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff ist durch den Quencher zunächst inaktiv und es erfolgt die Bindung der Primer die von 3' in 5' Richtung an beide DNA Stränge. Durch weitere Amplifikation und Polymerisation während der PCR erfolgt die Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes vom Quencher und das entstandene Fluoreszenzsignal wird in Echtzeit nach jedem Zyklus gemessen.

2.11.10.3 Berechnung der CT-Werte und weitere Auswertung

Für die Auswertung der Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR wurde mithilfe des CT-Werts der jeweiligen Gensonde und dem des Bezugsgens GAPDH der Δ CT-Wert ermittelt (Gensonde – GAPDH). Die relative Genexpression wurde mithilfe der Formel $2^{-\Delta$ CT berechnet. Zusätzlich wurde auch für die relative Genexpressionsänderung der $\Delta\Delta$ CT-Wert mit der Formel $2^{-\Delta\Delta$ CT bestimmt (Gensonde-GAPDH, Normierung auf Mittelwert der Kontrolltiere). Um eine selektive Aussage über die Expression der Leukozyten treffen zu können wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen auf die Gensonde PTPRC (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C; CD45) normiert. Die relative Genexpression wurde mithilfe der Formel $2^{-\Delta$ CT berechnet (Gensonde – PTPRC). Die Bestimmung des $\Delta\Delta$ CT-Wert der relativen Genexpressionsänderung erfolgte wiederum mit der Formel $2^{-\Delta\Delta$ CT (Gensonde - PTPRC, Normierung auf Mittelwert der Kontrolltiere).

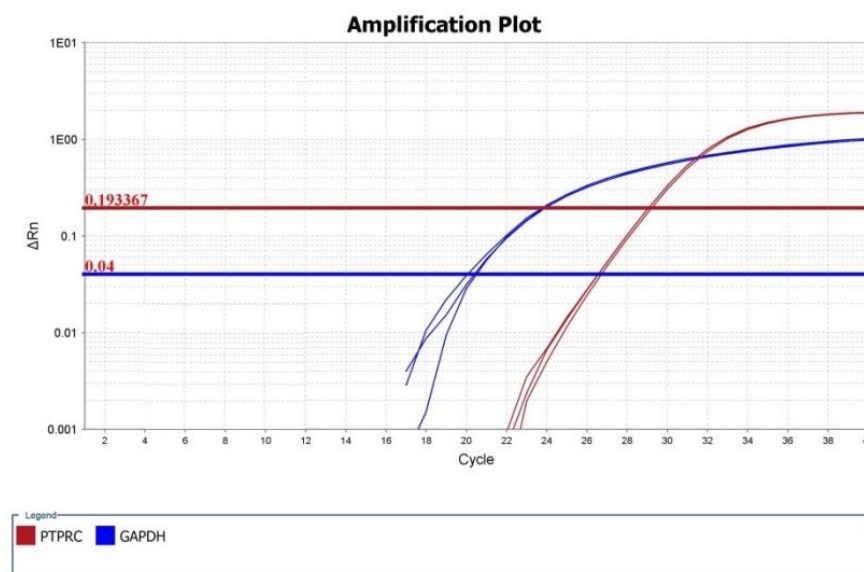


Abbildung 14: grafische Auswertung der quantitativen Real-Time PCR beispielhaft für die Gensonde PTPRC (CD45) und das Standardgen GAPDH

Das in der quantitativen Real-Time PCR gemessene Fluoreszenzsignal einer analysierten Probe wird grafisch in einem Amplifikationsplot dargestellt. Je früher das Fluoreszenzsignal gemessen wird desto höher ist die Expression der entsprechenden Gensonde.

2.11.11 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die in Kapitel 3.1.3 genannten linken Hemisphären entnommen und in Paraformaldehyd (PFA; pH 7,4 in 1x PBS) fixiert. Nach circa sieben Tagen wurden diese in eine 30 % Succhroselösung umgebettet. In einem nächsten Arbeitsschritt wurde das vorbereitete Gewebe nach etwa zehn Tagen aus der Succhroselösung entfernt, in 2-Methyl-Propan getaucht und anschließend bei -83 °C eingefroren. Für die weitere Aufarbeitung wurden die Hemisphären mindestens 48 h vor dem Schneideschritt am Kryostat in einen -20 °C Gefrierschrank überführt.

2.11.11.1 Anfertigung der Schnitte

Von der zuvor auf den Objektträger mit Tissue-Tek® fixierten Hemisphäre wurden am Kryostaten 20 µm dicke Schnitte auf Höhe des Hippocampus angefertigt. Hiefür war eine Kammertemperatur von -26 °C und eine Oberflächentemperatur von -26 °C notwendig.

2.11.11.2 Lichtmikroskopie

Nach der Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper (siehe Tabellen 9 und 10) und einer Gegenfärbung mit Toluidinblau erfolgte die Betrachtung der Schnitte am Lichtmikroskop Nikon H 5505 bei 10-/20-/ und 40-facher Vergrößerung. Bei Iba-1 handelt es sich um einen Antikörper mit dem proinflammatorische Mikroglia Zellen des Gehirn angefärbt werden können, während Cyclooxygenase-Typ 2 (COX2) als Nachweis für antiinflammatorische Mikroglia Zellen dient (Turtzo et al., 2014). Mithilfe des CD45 Antikörpers ist ein immunhistochemischer Nachweis von Leukozyten möglich. Die Gegenfärbung mit Toluidinblau diente der Anfärbung der DNA. Das verwendete Färbeprotokoll ist in Tabelle 17 aufgeführt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Tabelle 17: Färbeprotokoll für die Lichtmikroskopie

Färbeprotokoll

1. Bedecken der Schnitte mit dem Hydrogen Peroxide Block für 10 min.
2. 2x Waschen mit 1x PBS, pH 7,4 (mind. 10 min pro Waschschrift).
3. Hinzugeben des Protein Blocks für 10 min.
4. 1x Waschen mit 1x PBS, pH 7,4 (10 min).
5. Hinzugeben des primären Antikörpers in einer 1:200 Verdünnung (Inkubation über Nacht).

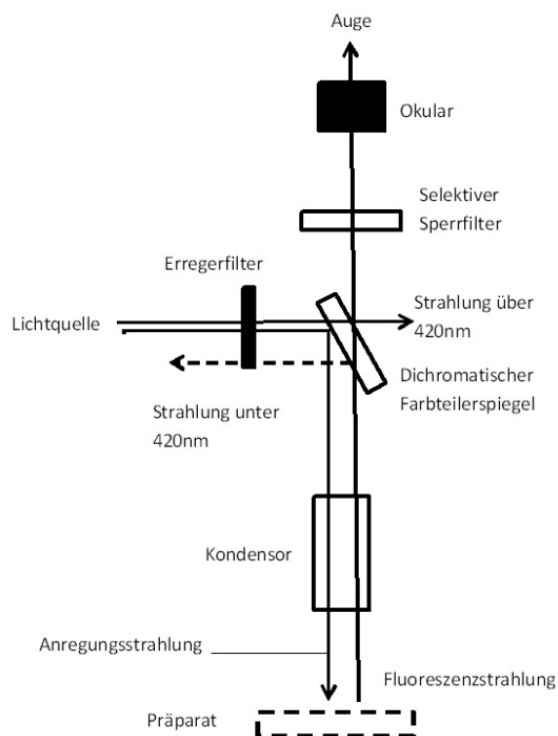
6. 4x Waschen mit 1x PBS, pH 7,4 (mind. 10 min pro Waschschritt).
 7. Hinzufügen Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (mind. 1 h bei 37 °C im Inkubator).
 8. **CD45 Antikörper:** Hinzugeben der Streptavidin-Peroxidase (10 min)
Bei allen anderen Antikörpern entfiel dieser Schritt.
 9. 4x Ausspülen in 1xPBS, pH 7,4.
 10. Hinzugeben von 30 µl (1 Tropfen) DAB Chromogen in 1,5 ml (50 Tropfen) DAB Substrat, vermischen in einem dunklen 5 ml Reaktionsgefäß und auftropfen auf das Gewebe bis Sichtbarwerden der Farbreaktion.
 11. 4x Auswaschen in 1xPBS, pH 7,4.
 12. Gegenfärbung mit gefiltertem Toluidinblau (10 min).
 13. 2x Eintauchen in 1xPBS, pH 7,4.
 14. Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70/80/90/100/100 %) für jeweils 5 min.
 15. Überführen der dehydrierten Schnitte in Xylol (5 min).
 16. Abpipettieren des überschüssigen Xylols Eindeckeln mit Entellan und 40x40 mm Deckgläschen.
-

2.11.11.3 Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper (siehe Tabellen 9 und 10) und einer Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) erfolgte die Betrachtung der Schritte am Fluoreszenzmikroskop Leica DMI6000 B bei 40-facher Vergrößerung. Durch den mit einem Fluorochrom gekoppelten sekundären Antikörper entsteht ein optisches Signal. Dieses wird mithilfe eines Interferenzfilters vom Lichtsignal der im Mikroskop enthaltenen Lichtquelle separiert um nur die Fluoreszenz des Präparates wiederzugeben. Häufig greift man bei dieser Methode auf Fluorochrome, wie zum Beispiel Acridinorange oder Fluoresceinisothiocyanat zurück, die ihr Absorptionsmaximum im langwelligen Spektralbereich besitzen sowie zur Emission sichtbaren Lichtes führen (Lexikon der Biologie, 1999). Für die Aufnahmen wurde eine hochempfindliche, monochrome Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskopie (Leica DFC365 FX) verwendet. Die weitere Bearbeitung und Speicherung der Aufnahmen erfolgte über das Programm Leica LAS AF oder Leica LASX.

Tabelle 18: Färbeprotokoll für die Fluoreszenzmikroskopie**Färbeprotokoll**

1. Aufziehen der 20 µm Schnitte auf SuperFrost Plus Objektträger.
2. Schnitte direkt an der Luft trocknen lassen, alternativ free floating Schnitte in 1x PBS, pH 7,4 aufnehmen. (mind. 10 min).
3. 3x Waschen in 1x PBS, pH 7,4 (Je 10 min).
4. Inkubation mit 0,1% TritonX-100 (15 ml 1xPBS, 1 Tropfen TritonX-100 vortexen) zur Permeabilisierung (20 min).
5. 2x Waschen in 1x PBS, pH 7,4 (Je 10 min).
6. Inkubation mit 10 % NGS in 1x PBS, pH 7,4 zur Blockierung bei Raumtemperatur (60 min).
7. Inkubation mit Primärem Antikörper bei 4 °C auf der Schüttelplatte (mind. 48 h).
8. 3x Waschen mit 1xPBS, pH 7,4 (Je 10 min).
9. Inkubation mit sekundärem Antikörper bei 37 °C (1-2 h).
10. 3x Waschen mit 1xPBS anschließend Eindeckeln mit Prolong® Gold (Je 10 min).

**Abbildung 15: Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie**

Das von einer externen Lichtquelle ausgehende Licht wird in seinem Spektrum auf eine Wellenlänge von 420 nm begrenzt. Diese sogenannte Anregungsstrahlung trifft auf das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Präparat und die dadurch erzeugte Fluoreszenz wird über einen Filter und das Okular als optisches Signal aufgezeichnet.

2.11.11.4 **Konfokalmikroskopie**

Bei dieser Methode wird das Licht außerhalb der Brennebene des Objektivs unterdrückt, sodass die Strukturen, die außerhalb dieser Ebenen liegen, nicht sichtbar sind. Mithilfe der Konfokalmikroskopie war es möglich die gefärbten Hippocampusschnitte in verschiedenen Ebenen zu betrachten und damit einen räumlichen Eindruck mit entsprechender Tiefenschärfe zu gewinnen (Lexikon der Physik, 1998). Die für die Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Schnitte wurden am Konfokalmikroskop Zeiss LSM 780 bei 40- und 60-facher Vergrößerung betrachtet. Das Färbeprotokoll entspricht dem der Fluoreszenzmikroskopie in Kapitel 3.4.3.1.

2.11.12 Datenauswertung und Statistik

Für die Datenauswertung und Statistik sind alle Daten als einzelne Datenpunkte einschließlich dazugehörigem Mittelwert dargestellt. Die Daten wurden zunächst auf Normalverteilung überprüft. Die statistische Signifikanz wurde bei Normalverteilung unter Verwendung des Students T-Tests mithilfe der SigmaPlot 11.0 Software berechnet, waren die Daten nicht normalverteilt wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SEM) mit den exakten p-Werten dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie gelang der Nachweis von Immunzellen innerhalb der hippocampalen Zellsuspension. Dafür wurden zunächst aus allen gemessenen Events die Gesamtheit der Einzelzellen definiert (Abbildung 12A und 12B) und aus deren Population die der Leukozyten (Abbildung 12C) identifiziert. Anschließend wurde die Gruppe der Leukozyten näher betrachtet und in einzelne Subgruppen differenziert. Hierbei lag der Fokus nicht nur auf B-Lymphozyten, T-Lymphozyten sowie NK-Zellen, sondern auch auf der Differenzierung von T-Helfer und zytotoxischen T-Zellen (Abbildung 12E-F). Ebenfalls erfolgte eine Quantifizierung der vorhandenen Zellen am Gerät (Abbildung 12G). Der Nachweis von B- und T-Lymphozyten inklusive ihrer Subgruppen diente als Vorarbeit und qualitativer Nachweis für die im weiteren Verlauf durchgeführte quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Zwischen den beiden durchgeführten Messungen zeigte sich eine deutliche Varianz bezüglich der gemessenen Events und der identifizierten Zellpopulationen (siehe Tabelle 19 und 20). Dies verdeutlicht, dass sich die mit dieser Methode gewonnenen Daten nur bedingt auswerten und interpretieren lassen. Für weiterführende Untersuchungen wurde die Methode der qRT-PCR angewandt.

Tabelle 19: FACS Auswertung Messung 1

	Ctrl	Ctrl+MMF	Pilo	Pilo+MMF
Gemessene Events	78 455	30 117	47 838	19 025
Leukozyten	818	75	683	145
T-Zellen	29	1	16	2
Anteil T-Zellen an Leukozyten (%)	3,55	1,33	2,34	1,38

Tabelle 20: FACS Auswertung Messung 2

	Ctrl	Ctrl+MMF	Pilo	Pilo+MMF
Gemessene Events	19 893	32 444	100 000	150 071
Leukozyten	12	61	39	93
T-Zellen	8	22	15	23
Anteil T-Zellen an Leukozyten (%)	66,67	36,07	38,46	24,73

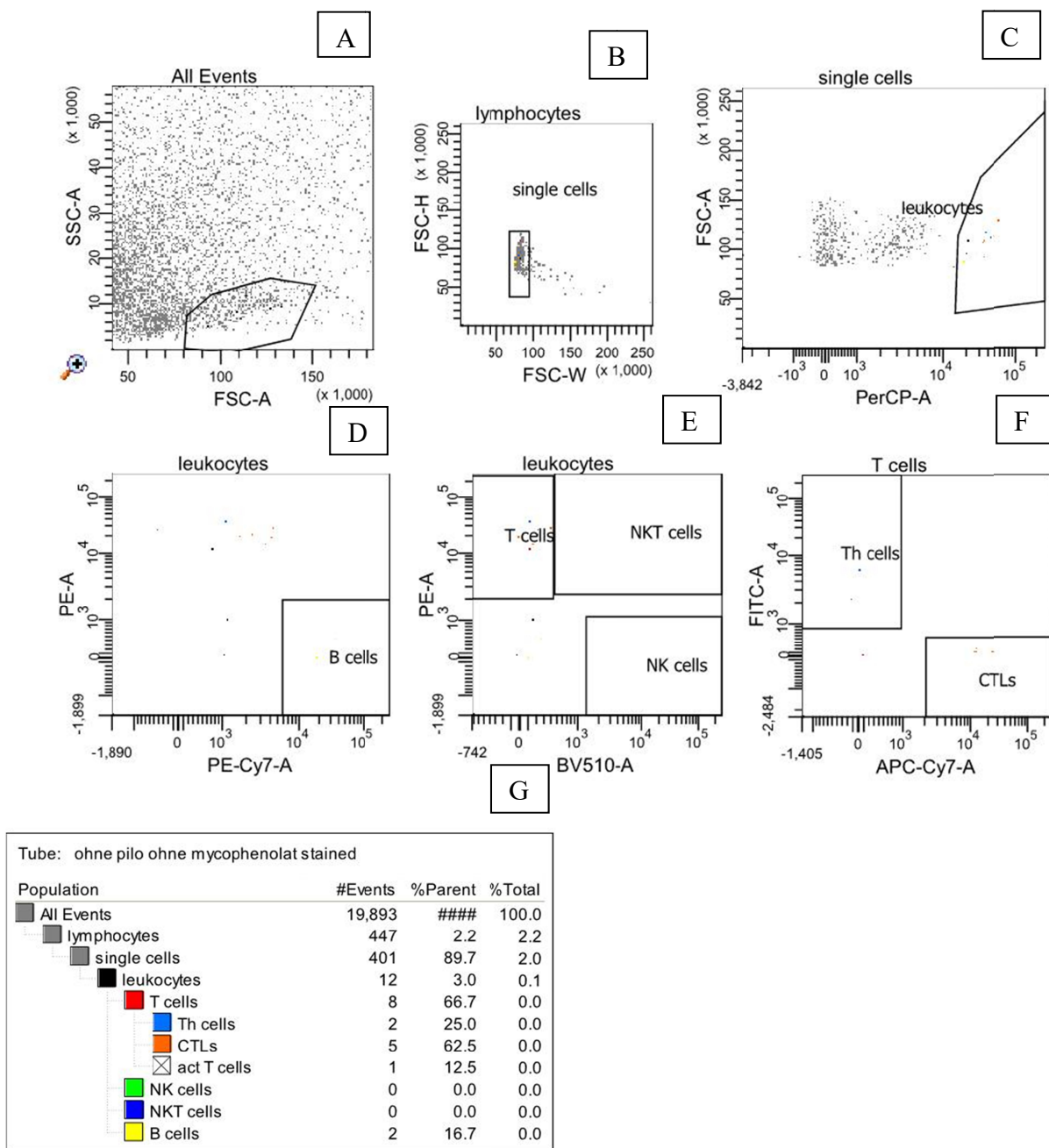


Abbildung 16: Identifizierung einzelner Zellpopulationen des Immunsystems innerhalb des Hippocampus unbehandelter Kontrolltiere

Aus allen gemessenen Zellen wurde die Zellpopulation der Lymphozyten und der Leukozyten identifiziert (A-C). Abbildung D-F zeigt die Identifizierung weiterer Subgruppen innerhalb der Lymphozyten, die der B-Zellen (D) und verschiedener Subgruppen der T-Zellen (E+F). Neben der grafischen Auswertung erfolgte die Quantifizierung der Messung (G).

3.2 qRT-PCR

Mithilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) gelang der Nachweis von Immunzell-spezifischer mRNA innerhalb des Hippocampus. Die Expression der in Tabelle 7 aufgeführten Immunzell-Gensonden (Cd3g, Emr1, CD4, CD8a, Ptprc) wurde als Äquivalent für die Anwesenheit der jeweiligen Zellpopulationen im Hippocampus gewertet. Als Normierungsgrundlage wurde die Expression des Gens Ptprc (protein tyrosine phosphatase receptor type C) als Leukozytenmarker verwendet. Jeder Datenpunkt der quantitativen Auswertung dieser Methode entspricht einer Maus.

3.2.1 Anstieg der T-Zell-Population in epileptischen Tieren zum späten Messzeitpunkt nach Pilokarpin-Injektion

Die Expression der Gensonde Cd3g diente als Äquivalent für die Anwesenheit von T-Zellen innerhalb des Hippocampusgewebes. Dargestellt ist in den folgenden Abbildungen die relative Genexpression, d.h. die Expression von Cd3g ist als Quotient der Expression von Cd3g bezogen und normiert auf die Gensonde Ptprc gezeigt. Diese zeigte zum frühen Messzeitpunkt (Tag 2) keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll-Gruppe ($1.97 \pm 1.0\%$, $n=6$) und der Pilokarpin-Gruppe ($1.6 \pm 1.1\%$, $n=5$; siehe Abbildung 17). An Tag 28 nach Pilokarpin-Injektion zeigte sich aber, dass die Genexpression der Pilokarpin-Gruppe ($19.0 \pm 6.4\%$, $n=12$) signifikant höher war als die der Kontroll-Gruppe ($9.0 \pm 3.6\%$, $n=20$) (Abbildung 18), was auf einen Anstieg der T-Zellen hindeutet. Die Daten zeigten eine deutliche Varianz, dennoch war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant ($p=0,004$, Mann-Whitney-U-Test). Dies bedeutet, dass sich eine neuroinflammatorische Immunantwort vor allem zum späten Untersuchungszeitpunkt und auf der Ebene des adaptiven Immunsystems mit einer Zunahme der T-Zell-Population zeigt.

3.2.2 Mycophenolatmofetil verhindert den Anstieg der T-Zell-Population in epileptischen Tieren

Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht ob sich diese durch eine Immunmodulation mit Mycophenolatmofetil beeinflussen lässt. Hierbei wurde für die Auswertung die relative Genexpressionsänderung verwendet. Dies bedeutet, dass die Daten zusätzlich auf den Mittelwert der Kontroll-Gruppe bezogen wurden. Auch hier entspricht jeder Datenpunkt einer Maus. Die Genexpressionsänderung zum Zeitpunkt 28 Tage nach Pilokarpin-Injektion zeigte trotz einer starken Varianz einen signifikanten Unterschied zwischen der mit MMF behandelten Pilokarpin-Gruppe ($171 \pm 51\%$, $n = 6$) und der Pilokarpin-Gruppe ($p=0,039$, Mann-Whitney-U-Test) (siehe Abbildung 19). Daraus folgt, dass sich durch eine Behandlung mit MMF die Genexpression von Cd3g auf das Niveau der nicht-injizierten Tiere absenken lässt. Hierdurch konnte die Beeinflussung der stattfindenden Immunantwort gezeigt werden.

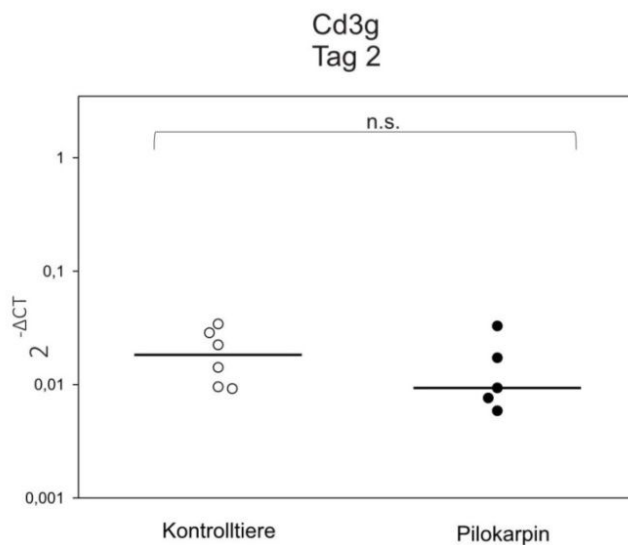


Abbildung 17: gleiche Anteile der T-Zell-Population in Pilokarpin-injizierten Tieren und Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist die relative Genexpression ($2^{-\Delta CT}$) der Gensonde Cd3g (normiert auf die Expression von Ptpcr) zwei Tage nach Pilokarpin-Injektion. Kontrolltiere und epileptische Tiere zeigen hier keinen signifikanten Unterschied.

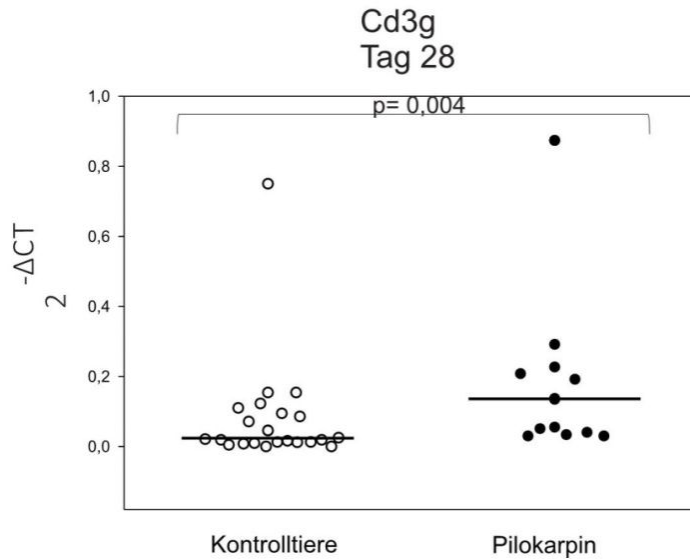


Abbildung 18: Anstieg der T-Zellpopulation in epileptischen Tieren (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist die relative Genexpression ($2^{-\Delta CT}$) der Gensonde Cd3g (normiert auf die Expression von Ptpcr) 28 Tage nach erfolgter Pilokarpin-Injektion. Epileptische Tiere zeigen hier im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant höhere Genexpression.

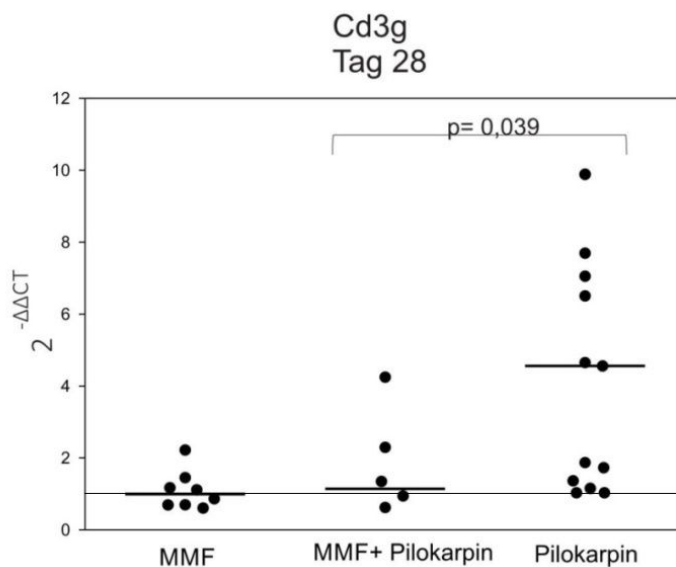


Abbildung 19: MMF verhindert den Anstieg der T-Zell-Population in behandelten Pilokarpin-Tieren (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist die relative Genexpressionsänderung ($2^{-\Delta \Delta CT}$) der Gensonde Cd3g (normiert auf die Expression von Ptpcr) 28 Tage nach erfolgter Pilokarpin-Injektion mit Normierung auf den Mittelwert der behandelten Kontrolltiere. Bei immunsuppressiv behandelten epileptischen Tieren war eine signifikante Abnahme der Genexpression im Vergleich zu unbehandelten epileptischen Tieren zu sehen.

3.2.3 Mycophenolatmofetil senkt Expression der Makrophagen-Gensonde in Pilokarpin-behandelten Tieren auf Niveau der Kontrolltiere

Im Anschluss wurde untersucht ob sich die Antwort des angeborenen Immunsystems ebenfalls durch eine Immunmodulation mit MMF beeinflussen lässt. Die Expression der Gensonde Emr1 (adhesion G protein-coupled receptor E1) diene hierbei als Äquivalent für die Anwesenheit von Makrophagen innerhalb des Hippocampus. Jeder Datenpunkt entspricht wiederum einer Maus. Analog der Gensonde Cd3g ist hier ebenfalls die relative Genexpression gezeigt. Auch hier zeigten die Daten eine starke Varianz. Hier zeigte sich zum frühen Zeitpunkt nach Pilokarpin-Injektion ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-Gruppe ($122 \pm 36.9\%$, $n=6$) und der Pilokarpin-Gruppe ($19.7 \pm 14.4\%$, $n=5$), der in Abbildung 20 dargestellt ist ($p=0,004$, Mann-Whitney-U-Test). Die Expression der Makrophagen-Gensonde lag in Pilokarpin-injizierten Tieren im Vergleich zu Tieren der Kontroll-Gruppe signifikant niedriger. Zum späten Messzeitpunkt zeigte sich, dass in epileptischen Tieren (1.4 ± 0.65 , $n=12$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($2.1 \pm 9.14\%$, $n=20$) ebenfalls signifikant weniger Expression der Makrophagen-Gensonde vorhanden war (Abbildung 21) ($p=0,010$, Mann-Whitney-U-Test). Diese Daten bedeuten, dass das angeborene Immunsystem im Rahmen der Epileptogenese ebenfalls eine Rolle spielt.

28 Tage nach Pilokarpin-Injektion zeigte sich durch die Gabe von Mycophenolatmofetil in epileptischen Tieren signifikant weniger Expression der Makrophagen-Gensonde ($p=0,045$, Mann-Whitney-U-Test). Dargestellt ist die relative Genexpressionsänderung bei der die Daten zusätzlich auf den Mittelwert der Kontroll-Gruppe bezogen werden. Die mit MMF behandelten epileptischen Tiere (0.3 ± 0.1 , $n=4$) lagen hier sogar noch etwas niedriger als die nicht-injizierten Tieren (0.4 ± 0.1 , $n=8$) (Abbildung 22). Die Ergebnisse zeigen, dass sich durch die Immunmodulation mit MMF die Expression der Makrophagen-Gensonde auf das Niveau der nicht-injizierten Tiere absenken lässt. Dies bedeutet, dass sich die Reaktion des angeborenen Immunsystems ebenfalls durch eine Behandlung mit MMF beeinflussen lässt.

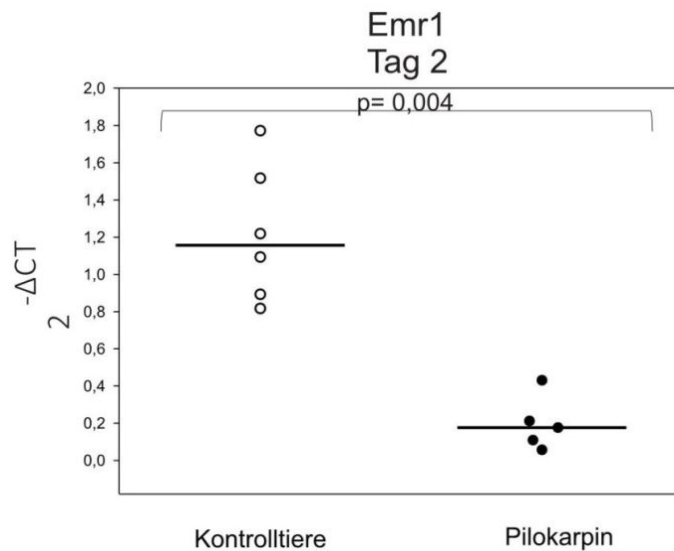


Abbildung 20: höhere Expression der Makrophagen-Gensonde in unbehandelten Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist die relative Genexpression ($2^{-\Delta CT}$) der Gensonde Emr1 (normiert auf die Expression von Ptpcr) 2 Tage nach erfolgter Pilocarpin-Injektion. Kontrolltiere und epileptische Tiere zeigen hier einen signifikanten Unterschied.

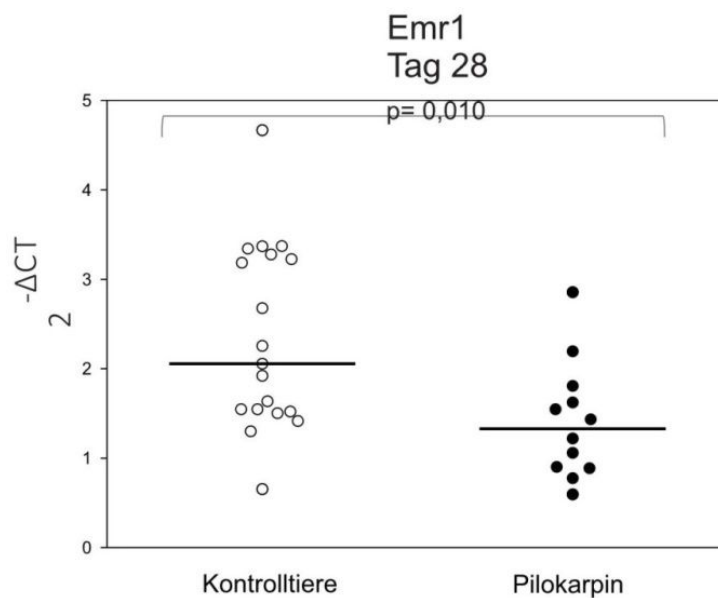


Abbildung 21: höhere Expression der Makrophagen-Gensonde in unbehandelten Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist die relative Genexpression ($2^{-\Delta CT}$) der Gensonde Emr1 (normiert auf die Expression von Ptpcr) 28 Tage nach erfolgter Pilocarpin-Injektion. Kontrolltiere zeigen hier im Vergleich zu epileptischen Tieren hier eine signifikant höhere Genexpression.

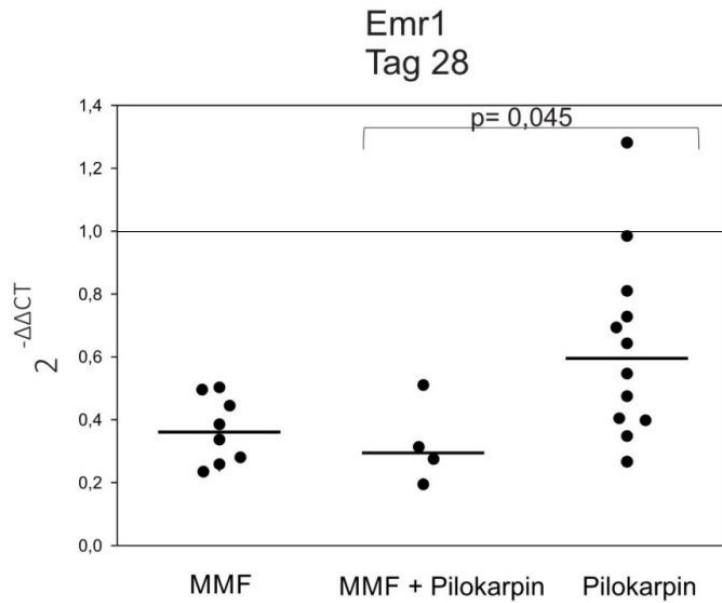


Abbildung 22: MMF senkt Expression der Makrophagen-Gensonde in behandelten Pilocarpin-Tieren auf Niveau der unbehandelten Kontrolltiere (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist die relative Genexpressionsänderung ($2^{-\Delta\Delta CT}$) der Gensonde *Emr1* (normiert auf die Expression von *Ptpcr*) 28 Tage nach Pilocarpin-Injektion normiert auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrolltiere. Bei MMF behandelten epileptischen Tieren war eine signifikante Abnahme der Genexpression im Vergleich zu unbehandelten epileptischen Tieren zu sehen.

3.2.4 Pilocarpin führt in epileptischen Tieren zu einer Zunahme der T-Helfer-Zellpopulation

Um die Antwort des adaptiven Immunsystems genauer zu betrachten wurde in den folgenden Untersuchungen die Population der T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen analysiert. Dies diente der Ergänzung des bereits in vorherigen Experimenten gezeigten Anstiegs der T-Zellen zum späten Messzeitpunkt. Die Expression der Gensonden CD4 und CD8a diente als Äquivalent für die Anwesenheit von T-Helfer-Zellen (CD4) und zytotoxischen T-Zellen (CD8a) im Hippocampusgewebe. Hierüber wurde das CD4/ CD8 Verhältnis gebildet. Die Daten ließen auch hier eine deutliche Varianz erkennen. Zum frühen Messzeitpunkt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Gruppe ($3.3 \pm 1.7\%$, $n=6$) und epileptischen Tieren ($6.5 \pm 3.1\%$, $n=4$) (Abbildung 23). Im Vergleich hierzu verschob sich 28 Tage nach Pilocarpin-Injektion das Verhältnis in epileptischen Tieren ($1.34 \pm 0.24\%$, $n = 7$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($0.34 \pm 0.07\%$, $n = 6$) signifikant in Richtung CD8a ($p=0,005$, Mann-Whitney-U-Test), was für eine Zunahme der Population der T-Helfer Zellen spricht (siehe Abbildung 24).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mycophenolatmofetil die Genexpression der T-Zellen und Makrophagen zum späten Messzeitpunkt bei den behandelten epileptischen Tieren signifikant senken kann. Zu diesem Zeitpunkt war bei den unbehandelten epileptischen Tieren die CD8a Genexpression signifikant erhöht.

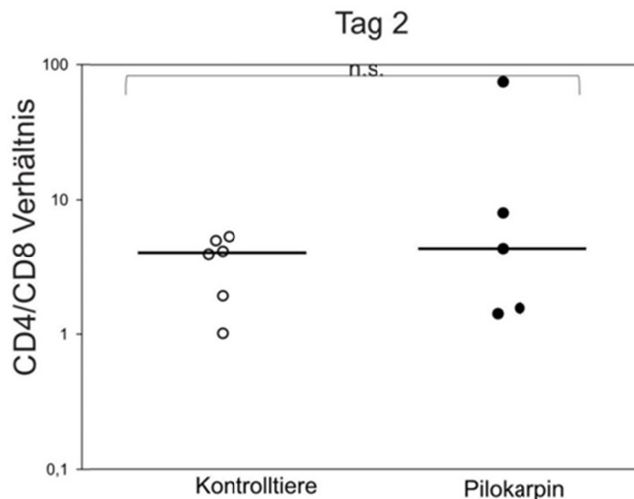


Abbildung 23: gleiches CD4/CD8 Verhältnis in epileptischen Tieren und Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist das CD4/CD8 Verhältnis (normiert auf die Expression von Ptpcr) 2 Tage nach erfolgter Pilocarpin-Injektion. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und epileptischen Tieren.

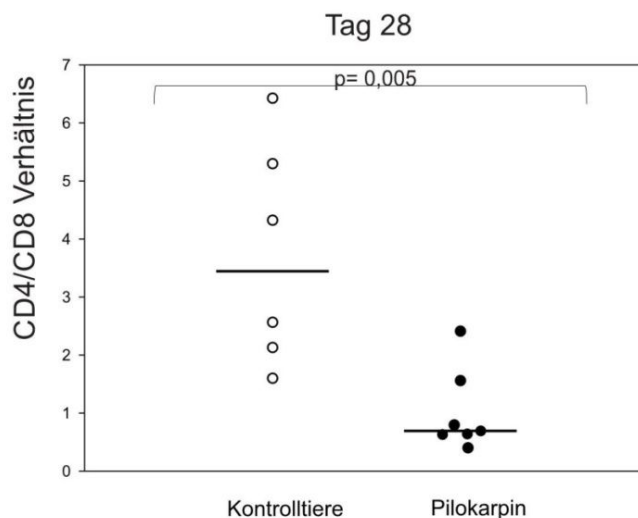


Abbildung 24: Zunahme der T-Helfer-Zellpopulation in epileptischen Tieren (normiert auf die Expression von Ptpcr)

Dargestellt ist das CD4/CD8 Verhältnis (normiert auf die Expression von Ptpcr) 28 Tage nach erfolgter Pilocarpin-Injektion. Epileptische Tiere zeigen hier ein signifikant niedrigeres Verhältnis im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

3.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen der am Kryostat angefertigten Schnitte des Hippocampusgewebes dienten als qualitativer Nachweis intrahippocampal gelegener aktivierter Mikroglia. Diese gelten als gewebespezifische Makrophagen und somit repräsentativ für das angeborene Immunsystem. Eine genauere Quantifizierung der gefärbten Zellen erfolgte nicht. Zunächst war eine für die Betrachtung am Lichtmikroskop essentielle Färbung der Zellen notwendig und in einem nächsten Arbeitsschritt die Gegenfärbung mit Toluidinblau. Dies diente der besseren Darstellung spezifisch angefärbter Zellen. Durch die Methode der Immunfluoreszenz gelang ein qualitativer Nachweis intrahippocampal gelegener proinflammatorischer Mikroglia. Unter Einsatz der Konfokalmikroskopie wurde eine Betrachtung der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Schnitte in mehreren Ebenen mit einem Zugewinn an Tiefenschärfe möglich. Dies ermöglichte eine detailliertere räumliche Darstellung der gefärbten Zellen innerhalb des Hippocampus.



Abbildung 25: Nachweis aktivierter Mikroglia und Färbung der DNA

Gezeigt ist die Iba-1 Färbung (braun) als Nachweis aktivierter Mikroglia und eine Färbung der Zellkerne mit Toluidinblau (blau) als Gegenfärbung innerhalb des Hippocampus bei 20-facher Vergrößerung. Die blau gefärbten Bereiche zeigen den Gyrus dentatus und Hilus des Hippocampus.

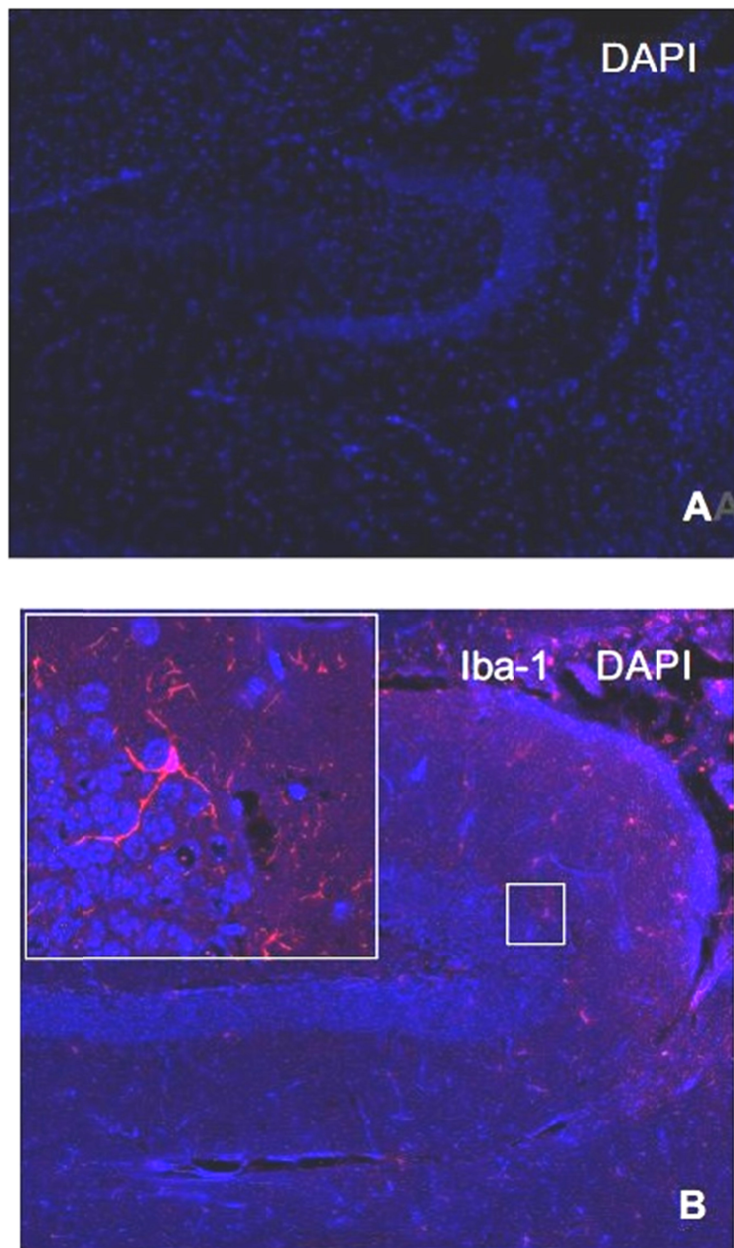


Abbildung 26: Nachweis aktivierter Mikroglia und Färbung der Zellkerne

Gezeigt ist die Färbung der Zellkerne mit DAPI im Bereich des Gyrus dentatus und Hilus des Hippocampus bei 40-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (A) und eine Färbung mit DAPI (blau) und Iba-1 (rot) als Nachweis aktivierter Mikroglia bei 40 und 60-facher Vergrößerung am Konfokalmikroskop(B).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl im Hippocampus Gewebe von Tieren der Kontroll-Gruppe als auch von epileptischen Tieren Immunzellen vorhanden sind.

Basierend auf den Ergebnissen der qRT-PCR wurde klar, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen Kontrolltieren und Pilokarpin-injizierten Tieren hinsichtlich der Expression verschiedener T-Lymphozyten spezifischer Gene gibt. Durch die präventive immunmodulatorische Intervention mit Mycophenolatmofetil wurde der Prozess der über das erworbene Immunsystem vermittelten Epileptogenese beeinflusst. Diese Erkenntnisse und die angewandten Methoden sollen im folgenden Abschnitt detailliert diskutiert werden.

4.1 Methodenkritische Betrachtung

4.1.1 Das Pilokarpin-Modell als experimentelles Epilepsiemodell

Wie in Abschnitt 1.2 erläutert ist dieses experimentelle Epilepsiemodell mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und überlebten 54 % der Versuchstiere einen Pilokarpin-induzierten Status epilepticus. Dies entspricht einem Wert, der mit den in der Literatur beschriebenen Mortalitätsraten übereinstimmt (Müller et al., 2014; Hung et al., 2019). Die von Brandt et al. durchgeführte fraktionierte Gabe von Pilokarpin stellt bereits einen Optimierungsversuch der Mortalitätsraten dar (Brandt et al., 2016).

Das in der Einleitung beschriebene Modell der Kainat-induzierten Epilepsie zeigt ebenfalls eine hohe Varianz der Mortalitätsraten (Bertoglio et al., 2017) während bei Ratten deutlich mehr Tiere den Status epilepticus überleben. Müller et al. zeigte in seiner Arbeit, dass sich durch eine Sauerstoffgabe mit einer Flussrate von 1,5 l/min während der Pilokarpin-Injektion die Mortalität in den behandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Tieren auf bis zu 2,6 % sank (Müller et al., 2014). Eine Arbeit von Phillipps et al. konnte zeigen dass eine moderate Hypothermie (31-33 °C) 30 min nach Pilokarpin-induziertem SE in Ratten zu einem Absinken der Mortalitätsrate im Vergleich zur Kontroll-Gruppe auf 7 % führte (Phillipps et al., 2018). Dies lässt vermuten, dass die Mortalitätsrate speziesspezifisch ist.

Für zukünftige Untersuchungen wäre zu diskutieren ob sich durch eine Optimierung des Versuchsprotokolls eine Verbesserung der Mortalitätsraten erzielen lässt oder ob sich neue Modelle zur experimentellen Epilepsieforschung etablieren lassen. Ansätze hierzu wären beispielsweise eine weitere Dosisanpassung, die Anpassung des Zeitintervalls zwischen den Pilokarpin-Injektionen, Kontrolle der epileptischen Anfälle mittels Video-oder EEG-Monitoring oder weitere supportive Maßnahmen während und nach der Pilokarpin-Injektion.

4.2 Rolle der Immunpathologie im Rahmen der Epileptogenese

Dass die Immunpathologie im Rahmen der Epileptogenese eine tragende Rolle spielt konnte im Rahmen dieser Arbeit auf mehreren Ebenen dargestellt werden. Vorausgehende Untersuchungen, auf denen diese Arbeit basiert konnten bereits mit der Methode der Durchflusszytometrie einen Anstieg der CD45⁺Zellen an den Tagen 1-4 und 28 sowie einen Anstieg CD11b⁺-Zellen an Tag 1-4 nach Pilokarpin-induziertem SE verzeichnen (Neumann et al., 2017). Für die Untersuchung der durch Mycophenolatmofetil induzierten Effekte war für eine repräsentative Aussage ein hoher Tierbedarf notwendig. Die mithilfe der Durchflusszytometrie und Immunhistochemie nachgewiesenen, innerhalb des Hippocampus gelegenen Immunzellen zeigen, dass es eine Beteiligung des Immunsystems im Sinne einer neuroinflammatorischen Reaktion während der Epilepsieentstehung gibt. Diese Erkenntnisse wurden mithilfe der qRT-PCR ergänzt.

4.2.1 Antwort des angeborenen Immunsystems im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese

Die zum frühen Messzeitpunkt zu erwartende Antwort des angeborenen Immunsystems mittels Makrophagen ließ sich in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigen. Dies ist möglicherweise der verwendeten Markophagen-Gensonde, der Methode selbst oder dem gewählten Messzeitpunkt geschuldet. Folglich konnte allein mit der Methode der Durchflusszytometrie ein signifikanter Anstieg aktivierter CD11b⁺Mikroglia bei epileptischen Tieren ein bis vier Tage nach Behandlung als Antwort des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden (Neumann et al., 2017).

Um die Antwort des angeborenen Immunsystems im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese zum frühen Messzeitpunkt mittels qRT-PCR abzubilden ist der Einsatz weiterer mikroglia-spezifischer Gensonden die die gewebespezifischen Makrophagen repräsentieren notwendig.

Benson et al. beschrieb in Ihrer Arbeit die Subgruppen der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mikroglia welche sich anhand Funktionen und Oberflächenmarker unterscheiden (Benson et al., 2015). Die Subgruppe der proinflammatorischen Mikroglia M1 charakterisierten Benson et al. in ihrer Arbeit sowohl durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β als auch durch die Fähigkeit zur Phagozytose. Als spezifische Marker werden unter anderem IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-12 genannt (Benson et al., 2015). Im Gegensatz hierzu nannte die Arbeitsgruppe die antiinflammatorischen Mikroglia M2 eher neuroprotektiv. Diese sezernieren antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-4 und exprimieren Enzyme wie das Chitinase-3-like Proteins (Ym1) und Arginase 1 (Arg1), die an der Intaktheit des Zellverbunds und Zellgerüsts beteiligt sind. Als M2-assoziierte Marker wurden IL-4, IL-10, Arg1, Ym1 und CD206 genannt (Benson et al., 2015). Für ihre Arbeit analysierten Benson et al. das Gewebe epileptischer Mäuse und verglichen es mit dem unbehandelter Tiere zu mehreren Zeitpunkten mittels qRT-PCR. Zum frühen Messzeitpunkt drei Tage nach Pilokarpin-Injektion wurde im Gewebe der behandelten Tiere ein Anstieg proinflammatorischer und antiinflammatorischer Marker beobachtet (Benson et al., 2015). 21 Tage nach Pilokarpin-induziertem SE zeigte sich in jener Arbeit eine isolierte Erhöhung des proinflammatorischen Markers CD11b. Nach 5-12 Monaten war die Expression der M1 und M2 spezifischen Marker wieder auf das Niveau der unbehandelten Tiere abgesunken (Benson et al., 2015). Dies zeigt, dass sich die Antwort des angeborenen Immunsystems im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese vor allem in der frühen Phase nach erfolgter Injektion abspielt.

Des Weiteren konnte Almolda et al. in ihrer Arbeit an transgenen Mäusen mit Astrozyten-gesteuerter Produktion von IL-10 (GFAP-IL10Tg) zeigen dass diese im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich höhere Expression von Markern proinflammatorischer Mikroglia wie Iba1, CD11b, CD16/32 und F4/80 aufweisen und sich dies auch immunhistochemisch nachweisen lässt (Almolda et al., 2015).

Ravizza et al. beschreibt in Ihrer Arbeit dass sich im Rahmen der Epileptogenese über aktivierte Makrophagen sezernierte Komplementfaktoren immunhistochemisch nachweisen lassen (Ravizza et al., 2018). Durch eine selektive Blockade dieser lies sich in Pilokarpin-injizierten Mäusen eine signifikante Reduktion der Anfallsstärke und Mortalität erzielen. Dies zeigt, dass das Komplementsystem als Teil des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung einer Epilepsie ebenfalls eine wichtige Rolle spielt.

In einer weiteren Arbeit zeigten Vezzani et al. dass im Mausmodell während symptomatischer Anfälle eine Hochregulation des TLR3 in Astrozyten stattfindet (Vezzani et al., 2019). Dies bedeutet, dass Toll-like-Rezeptoren als Strukturen des angeborenen Immunsystems ebenfalls im Rahmen der Epileptogenese beteiligt sind. Zwei weitere Rezeptoren die während der Epileptogenese hochreguliert werden sind der IL-1R1 und der TLR4 (Vezzani et al., 2019). Im Bezug auf das angeborene Immunsystem im Rahmen der Epilepsieentstehung scheint vor allem die Aktivierung des IL-1R1 durch LI-1 β eine tragende Rolle zu spielen. Dieses wird durch Neuronen, Glia und dem aktivierten Endothel gebildet (Vezzani et al., 2019) und von der Arbeitsgruppe als Biomarker diskutiert. Diese Aktivierung führt zur Exzitotoxizität und der Zunahme des epileptogenen Potentials und im weiteren Verlauf zu einer gestörten Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Hierdurch wird die neuroinflammatorische Antwort während der Epileptogenese verstärkt (Vezzani et al., 2019).

Für das Kainat-induzierte Epilepsiemodell ist in der fachwissenschaftlichen Literatur ebenfalls eine charakteristische Immunantwort beschrieben. Zattoni et al. zeigte in seiner Arbeit einen zweiphasigen Verlauf der Antwort des adaptiven Immunsystems mit einem Anstieg CD3⁺ T-Zellen und aktivierter Mikroglia zum Zeitpunkt zwei und 14 Tage nach Kainat- Injektion, möglicherweise als Antwort des angeborenen Immunsystems (Zattoni et al., 2011). Hierbei bezieht sich die Arbeitsgruppe auf die quantitative Auswertung immunhistochemisch gefärbter Hippocampusschnitte von unbehandelten C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu Kainat-behandelten Tieren (Zattoni et al., 2011). Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Immunpathologie auch im experimentellen Modell der Kainat-induzierten Epilepsie mit einem zweiphasigen Verlauf der Immunantwort eine tragende Rolle spielt. Aus den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppen folgt, dass es im Rahmen der Epileptogenese ebenfalls eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems gibt. Ob sich die genannten Mediatoren eventuell als Biomarker einsetzen lassen muss in weiteren Studien überprüft werden.

4.2.2 Antwort des adaptiven Immunsystems im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese

Basierend auf den Ergebnissen der qRT-PCR konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es einen signifikanten Anstieg der CD3⁺T-Zellen 28 Tage nach Pilokarpin-induziertem SE gibt. Dieser war ausschließlich bei Pilokarpin-injizierten Tieren nachweisbar und lässt sich somit als Antwort des adaptiven Immunsystems im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese werten. Hier ist ein Vergleich mit der Literatur nicht möglich, da hier beschriebenen Versuche stellen einen neuen Therapieansatz dar zu dem es bisher keine ergänzenden Daten gibt. In der Arbeit von Neumann et al. konnte ein zweiphasiger Verlauf der im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese stattfindenden Immunantwort mit einem Anstieg der CD45⁺T-Zellen an Tag 1-4 und 28 nach Injektion mit der Methode der Durchflusszytometrie gezeigt werden (Neumann et al., 2017). Weiterführende Untersuchungen konnten mit derselben Methode einen selektiven Anstieg der CD11b⁺T-Zellen zum frühen Messzeitpunkt zeigen (Neumann et al., 2017), was die Antwort des angeborenen Immunsystems zeigt. Somit lässt sich vermuten, dass der erneute Anstieg der CD45⁺T-Zellen zum späten Messzeitpunkt die Antwort des adaptiven Immunsystems widerspiegelt. Diese Ergebnisse konnten durch die Methode der qRT-PCR bestätigt und ergänzt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Antwort des adaptiven Immunsystems bezogen auf die Pilokarpin-induzierte Epileptogenese vor allem zum späten Messzeitpunkt abspielt.

Ergänzend konnte mithilfe der quantitativen Real-Time PCR gezeigt werden, dass sich das CD4/ CD8-Verhältnis bei Pilokarpin-injizierten Tieren zum späten Messzeitpunkt in Richtung CD8 verschiebt. Hierdurch zeigte sich, dass es sich beim signifikanten Anstieg der CD3⁺T-Zellen speziell um eine Zunahme der Subgruppe der CD8⁺T-Zellen handelt. Dies verdeutlicht, dass es bei der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch das angeborene Immunsystem kommt. Dieses reagiert daraufhin mit der Differenzierung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen. Dass diese Verschiebung zum späten Messzeitpunkt stattfindet zeigt umso mehr dass es dabei um eine Reaktion des adaptiven Teils des Immunsystems handelt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ebenfalls schließen, dass durch die neuroinflammatorische Reaktion ein Einwandern peripherer aktivierter Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke in den Hippocampus stattfinden muss.

Die Zunahme der zytotoxischen CD8⁺T-Zellen ist bereits für das in der Einleitung erläuterte Kainat-induzierte Epilepsiemodell und bestimmte Formen der Autoimmunenzephalitis beschrieben und lässt vermuten dass die Population der zytotoxischen T-Zellen eine tragende Rolle in der Pathophysiologie der Temporallappenepilepsie spielt (Neumann et al., 2017).

Im Modell der Kainat-induzierten Epileptogenese zeigten Deperez et al. durch einen Transfer von CD8⁺T-Zellen mit $\beta 2$ Mikroglobulin-Knockout-Mäusen nach einer Kainat-Injektion eine Proliferation von Makrophagen im untersuchten Gewebe. Dies verdeutlicht, dass die zytotoxischen T-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems auch in diesem Modell eine tragende Rolle zu spielen scheinen (Deperez et al., 2011). Um die definitive Rolle des adaptiven Immunsystems im Rahmen der Pilocarpin-vermittelten Epileptogenese zu klären sind weitere Untersuchungen und Studien notwendig. Als ergänzende Methode wäre beispielsweise ein Western-Blot denkbar um die genannten Veränderungen auch auf Proteinebene nachzuweisen.

Um die Beteiligung weiterer Immunzell-Populationen wie beispielsweise der B-Zellen und T-Helferzellen zu klären sind weitere Untersuchungen mithilfe der Durchflusszytometrie, der qRT-PCR und Immunhistochemie notwendig. Ein Mitwirken dieser ist in Rahmen der Pilocarpin-vermittelten Epileptogenese durch die im ZNS ablaufende neuroinflammatorische Reaktion durchaus denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Immunpathologie nicht nur im Pilocarpin-induzierten Epilepsiemodell eine tragende Rolle spielt sondern sich allgemein auf die Krankheit Epilepsie übertragen lässt. Durch die pharmakologische Intervention mit Mycophenolatmofetil im Sinne einer sekundärprophylaktischen Gabe nach einem ersten generalisierten tonisch-klonischen Anfall oder einem prolongierten Status epilepticus wäre eine Beeinflussung der Pathogenese möglich. Analog zur Pathogenese der Multiplen Sklerose ist bei Pilocarpin-induziertem SE eine Aktivierung peripherer Immunzellen die über Entzündungsmediatoren mit dem Endothel der Blut-Hirn-Schranke interagieren denkbar (Hartung et al., 2014). Hierüber wird diese für jene Zellen durchlässig und somit passierbar.

4.2.3 Beeinflussung des Immunsystems durch präventive immunmodulatorische Intervention im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese

Durch eine immunmodulatorische Intervention an Tag 0-3 nach Pilokarpin-Injektion mit Mycophenolatmofetil konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese nach 28 Tagen in behandelten Tieren zu einem Absinken der Expression der Gensonden Cd3g und Emr1 (F4/80) führt. Dies spricht für eine Beeinflussung der Pilokarpin-induzierten Immunantwort. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine präventive beziehungsweise frühzeitige Immunmodulation mit Mycophenolatmofetil zur Beeinflussung des Immunsystems als sinnvoll erscheint. Für weitere Untersuchungen ist es notwendig die richtige Dosis für eine präventive Immunmodulation mit MMF herauszufinden und weitere Erkenntnisse bezüglich seines Nebenwirkungsprofils zu gewinnen. Im Rahmen der Immunsuppression bei entzündlichen Nierenerkrankungen, beispielsweise der Lupus Nephritis, konnte bereits eine verminderte Genexpression des Entzündungsmediators TGF- β durch MMF gezeigt werden (Yung et al., 2015). In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz des Medikaments ebenfalls eine Veränderung auf Genexpressionsebene im ZNS gezeigt werden.

4.2.4 Alternative immunmodulatorische Substanzen

Alternativ zu dem für diese Arbeit verwendeten Mycophenolatmofetil sind in der Literatur mehrere immunmodulatorische Substanzen beschrieben die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden. Beispielsweise zeigte die Verwendung des bereits für die Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzten Immunmodulators Glatirameracetat durch Lai et al. an Ratten nach Pilokarpin-induziertem SE eine längere Latenz zwischen den einzelnen Anfällen, welche zusätzlich schwächer und weniger häufig auftraten (Lai et al., 2018). Das aus einem Aminosäuregemisch (L-Glutaminsäure, L-Alanin, L-Tyrosin, L-Lysin) bestehende Glatirameracetat wird in der Therapie der Multiplen Sklerose zur Reduktion der Schubfrequenz in einem frühen Krankheitsstadium eingesetzt. Der vermutete Wirkmechanismus besteht in der Beeinflussung der an der Entzündung im ZNS beteiligten Zellen. Die Latenz bis zum vollständigen Wirkungseintritt beträgt mindestens drei Monate ab Therapiebeginn (Brandt et al., 2007).

Eine weitere Substanz die bislang zur Immunmodulation bei Pilokarpin-induzierter Epileptogenese erfolgreich eingesetzt wurde ist Rapamycin/Sirolimus, ein Inhibitor des mTOR Signalwegs. Wang et al. zeigte in seiner Arbeit an Ratten dass der mTOR Signalweg ein wichtiger Modulator für die Anfallsaktivität darstellt und durch die Gabe von Rapamycin

deutlich weniger Anfallsaktivität vorhanden ist. Durch eine selektive Blockade des mTOR Signalweges mittels Rapamycin oder die Gabe eines HTR6 Antagonisten drei Tage vor Pilocarpin-Injektion konnte langfristig eine deutliche Abnahme der mTOR Aktivität erzielt werden (Wang et al., 2015). Während in den ersten Tagen nach Rapamycin Behandlung eine Zunahme der Entzündungsaktivität und der Störung der Blut-Hirn-Schranke zu beobachten war zeigte sich langfristig eine Reduktion dieser nach sechs Wochen.

Pharmakologisch bildet Sirolimus einen Komplex mit einem Signalprotein und bindet an sogenannte TOR-Proteine (targets of rapamycin), die eine PI3K-Domäne besitzen und für die IL-2 Signaltransduktion wichtig sind. Über diese Kaskade wirkt es antiproliferativ auf B-und-T-Lymphozyten. Diese Wirkung konnte sowohl in Modellen mit C57BL/6 Mäusen (Holley et al., 2018) als auch mit Ratten (Chi et al., 2017) gezeigt werden und legt somit die Vermutung nahe dass sich dieser Wirkmechanismus auch auf den Menschen übertragen lässt. Derzeit wird das Medikament sowohl zur Prophylaxe von Transplantatabstoßungen als auch zur Beschichtung medizinischer Stents eingesetzt (Lemmer et al., 2007).

Im Rahmen der Therapie von Fieberkrämpfen wurde der Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra bereits erfolgreich bei Kindern eingesetzt. Kenney-Jung et al. zeigte in seiner Arbeit dass sich der Krankheitsverlauf durch die mehrmalige Gabe des Medikaments sowohl klinisch durch eine Verbesserung des EEGs als auch serologisch durch ein Absinken proinflammatorischer Zytokine beeinflussen lässt (Kenney-Jung et al., 2016). All diese Ergebnisse zeigen die klinische Relevanz der Immunmodulation während der Epileptogenese.

4.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Medizin

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass der Einsatz von Mycophenolatmofetil im Rahmen der Epileptogenese klinische Relevanz hat. Mit einer immunmodulatorischen Therapie mit MMF nach einem primären zerebralen Insult oder einem erstmalig aufgetretenen Grand-Mal-Anfall im Sinne einer Sekundärprophylaxe ließe sich die Entstehung einer späteren Epilepsie beeinflussen. So ist es denkbar, dass diese abgemildert, ihre Entstehung verzögert oder sogar ganz verhindert wird. Da die höchste alteradjustierte Inzidenz der Epilepsie im Patientenkollektiv der 50-60-jährigen liegt wäre hier nach einem erstmaligen Ereignis die Immunmodulation mit Mycophenolatmofetil besonders sinnvoll. Es bedarf zunächst weiterer klinischer Studien um detaillierte Aussagen über die Relevanz der Immunmodulation mit Mycophenolatmofetil treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Rolle der Immunpathologie bezogen auf die Epileptogenese und deren Beeinflussung durch eine präventive Intervention ist bislang ungeklärt. Zusätzlich ist es durch die Problematik der Therapierefraktärität unter den bisher eingesetzten Antikonvulsiva notwendig neue Therapiestrategien zu entwickeln. Zielstellung der Arbeit war es die Rolle der Immunzell-vermittelten Prozesse im ZNS bei der Epileptogenese zu adressieren und die Unterschiede zwischen epileptischen Tieren und Tieren der Kontroll-Gruppe zu zeigen. Bislang werden die Prozesse der entzündungsvermittelten Überwindung der Blut-Hirn-Schranke zwar ansatzweise verstanden jedoch gibt es kaum Daten, die den chronischen Verlauf der Erkrankung betreffen. Mithilfe der Methoden der Durchflusszytometrie und der Immunhistochemie gelang der qualitative Nachweis von Immunzellen innerhalb der hippocampalen Zellsuspension. Zudem waren die im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese stattfindenden immunologischen Veränderungen auf Genexpressionsebene mit der quantitativen Real-Time-PCR im Verlauf nachweisbar. Hierbei diente die Expression der gewählten Gensonden als Äquivalent für die Anwesenheit der entsprechenden Zellen innerhalb des Gewebes. Durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lässt sich sagen, dass im Hippocampusgewebe epileptischer C57BL/6 Mäuse 28 Tage nach erfolgter Pilokarpin-Injektion signifikant mehr CD3+T-Zellen vorhanden sind und dieser Anstieg vor allem durch einen Anstieg der CD8+ zytotoxischen T-Zellen begründet ist. Dies zeigt, dass das adaptive Immunsystem und besonders die Subgruppe der CD8+ zytotoxischen T-Zellen im Rahmen der Pilokarpin-induzierten Epileptogenese eine tragende Rolle spielt. Um die Rolle des adaptiven Immunsystems während der Epileptogenese weiter aufzuklären sind detailliertere Untersuchungen notwendig. Durch die präventive immunmodulatorische Intervention mit passager verabreichtem Mycophenolatmofetil konnte die Antwort des Immunsystems nachhaltig beeinflusst werden, sodass 28 Tage nach Pilokarpin Injektion im Gewebe epileptischer Tiere signifikant weniger Genexpression der Makrophagen- und T-Zell-Gensonde vorhanden war. Durch MMF wird die relative Genexpression der T-Zell-Gensonde Cd3g auf Kontrollniveau gesenkt, was den immunsuppressiven Effekt des Medikaments widerspiegelt. Hierdurch konnte auch gezeigt werden dass eine präventive bzw. frühzeitige Immunmodulation mit MMF zur Beeinflussung des Immunsystems sinnvoll ist. Desweiteren spielt innerhalb dieses Immunsystem vermittelten Prozesse die Gruppe der gewebespezifischen Mikroglia eine tragende Rolle.

Mittels einer Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch periphere T-und-B-Zellen im Rahmen einer neuroinflammatorischen Reaktion entsteht im Verlauf eine langanhaltende epileptische Aktivität.

6 Thesen

1. Die mehrmalige intraperitoneale Injektion von Pilocarpin löst bei Mäusen und Ratten generalisierte epileptische Anfälle aus.
2. Durch vorherige intraperitoneale Gabe von N-Methyl-Scopolamin wird eine periphere Wirkung von Pilocarpin verhindert.
3. Die Hippocampusregion ist primärer Manifestationsort der Epilepsie bedingten Veränderungen im ZNS.
4. Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob eine immunologische Antwort durch den Status epilepticus bei Mäusen hervorgerufen wird.
5. Durch einen mit Pilocarpin ausgelösten Status epilepticus wird eine immunhistochemisch und durchflusszytometrisch nachweisbare neuroinflammatorische Immunantwort hervorgerufen.
6. Mycophenolatmofetil wirkt zentral antiproliferativ auf B- und T-Lymphozyten.
7. Durch die frühzeitige Gabe von Mycophenolatmofetil (nach Status epilepticus) lässt sich somit die neuroinflammatorische Immunantwort modulieren. Langfristig wirkt sich die Gabe von Mycophenolatmofetil auf die Genexpression der T-Lymphozyten im Hippocampusgewebe aus.
8. Die Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass der hervorgerufene Status epilepticus das Einwandern von B- und T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke bedingt. Eine immunmodulatorische Behandlung während dieser Phase kann möglicherweise diesen Prozess günstig beeinflussen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
MEM	<i>engl.</i> : Minimum Essential Medium
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A	Adenin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
COX-2	Cyclooxygenase Typ 2
Ctrl	Kontroll-Gruppe
Ctrl+MMF	Mit Mycophenolat behandelte Kontroll-Gruppe
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Emr1	<i>engl.</i> : adhesion G protein-coupled receptor E1
et al.	Lat.: et alteri
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
G	<i>franz.</i> : Gauge, Maßeinheit für Injektionskanülen
G	Erdbeschleunigung (Angabe der Beschleunigung der Zentrifuge)
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	<i>engl.</i> : High- Mobility-Group Protein 1
HTR6	5-HT6 Rezeptor, Serotoninrezeptor
IFN-γ	Interferon-γ, proinflammatorisch
Ig	Immunoglobulin
IL-1	Interleukin-1, proinflammatorisch
IL-1R1	Interleukin-1 Rezeptor 1
IL-2	Interleukin-2, proinflammatorisch
IL-4	Interleukin-4, antiinflammatorisch
IL-10	Interleukin-10, antiinflammatorisch

IL-13	Interleukin-13, antiinflammatorisch
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharide
MHC-II	<i>engl.</i> : Major Histocompatibility Complex Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMF	Mycophenolatmofetil
mRNA	messenger RNA
mTOR	<i>engl.</i> : mammalian Target of Rapamycin/ mechanistic Target of Rapamycin
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NGS	Ziegen Normalserum
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂ , proinflammatorisch
pH	potentium hydrogenii
Pilo	Pilokarpin-Gruppe
Pilo+MMF	Mit Mycophenolat behandelte Pilokarpin-Gruppe
Ptprc	<i>engl.</i> : protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium; benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT-PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
RW1	Waschpuffer
RW2	Waschpuffer
s	Sekunde
SE	Status epilepticus
SEM	<i>engl.</i> : Standard Error of the Mean; Standardfehler
T	Thymidin
TBE	Tris-Bor-EDTA
TGF-β	<i>engl.</i> : transforming growth factor-β; Wachstumsfaktor

TLR4	<i>engl.:</i> Toll-Like-Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α , proinflammatorisch
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β , proinflammatorisch
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschaltungskreis des Hippocampus	9
Abbildung 2: COX2 Signalweg	11
Abbildung 3: mTOR Signalweg.....	12
Abbildung 4: Wirkmechanismus Mycophenolatmofetil	16
Abbildung 5: schematische Darstellung der intraperitonealen Injektion (Ansicht von ventral)	33
Abbildung 6: Schema der Pilokarpin-Injektion und der Immunsuppression	33
Abbildung 7: Wirkmechanismus Mycophenolatmofetil	34
Abbildung 8: Prinzip der Durchflusszytometrie	36
Abbildung 9: Auswertung der Zellzählung mithilfe der Neubauer Zählkammer	37
Abbildung 10: Auswertung der Durchflusszytometrie anhand des Punktwolkendiagramms	39
Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung der standardisierten rRNA Banden nach Auftrennung der Proben mittels Gelelektrophorese am UV-Gerät.....	42
Abbildung 12: schematischer Ablauf der cDNA-Synthese.....	43
Abbildung 13: vereinfachter Ablauf der qRT-PCR	46
Abbildung 14: grafische Auswertung der quantitativen Real-Time PCR beispielhaft für die Gensonde PTPRC (CD45) und das Standardgen GAPDH	47
Abbildung 15: Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie.....	50
Abbildung 16: Identifizierung einzelner Zellpopulationen des Immunsystems innerhalb des Hippocampus unbehandelter Kontrolltiere	54
Abbildung 17: gleiche Anteile der T-Zell-Population in Pilokarpin-injizierten Tieren und Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptprc)	56
Abbildung 18: Anstieg der T-Zellpopulation in epileptischen Tieren (normiert auf die Expression von Ptprc)	57
Abbildung 19: MMF verhindert den Anstieg der T-Zell-Population in behandelten Pilokarpin-Tieren (normiert auf die Expression von Ptprc).....	57
Abbildung 20: höhere Expression der Makrophagen-Gensonde in unbehandelten Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptprc)	59
Abbildung 21: höhere Expression der Makrophagen-Gensonde in unbehandelten Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptprc)	59

Abbildung 22: MMF senkt Expression der Makrophagen-Gensonde in behandelten Pilocarpin-Tieren auf Niveau der unbehandelten Kontrolltiere (normiert auf die Expression von Ptprc)	60
Abbildung 23: gleiches CD4/CD8 Verhältnis in epileptischen Tieren und Kontrolltieren (normiert auf die Expression von Ptprc)	61
Abbildung 24: Zunahme der T-Helfer-Zellpopulation in epileptischen Tieren (normiert auf die Expression von Ptprc)	61
Abbildung 25: Nachweis aktivierter Mikroglia und Färbung der DNA	62
Abbildung 26: Nachweis aktivierter Mikroglia und Färbung der Zellkerne.....	63

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CD-Moleküle auf Lymphozyten	14
Tabelle 2: Racine Skala zur Verhaltensdokumentation bei Mäusen.....	17
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 4: Geräte	21
Tabelle 5: Chemikalien	23
Tabelle 6: Fluorochrome der Durchflusszytometrie	28
Tabelle 7: Gensonden, Primer und Mastermix.....	29
Tabelle 8: fertige Reaktionssets	29
Tabelle 9: primäre Antikörper für die Immunhistochemie	30
Tabelle 10: sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie.....	30
Tabelle 11: Liste der verwendeten Software und Online Programme	31
Tabelle 12: Gruppenaufteilung und n-Anzahl der behandelten Tiere.....	34
Tabelle 13: Temperaturprofil cDNA Synthese	44
Tabelle 14: Volumen und Komponenten des für die cDNA Synthese verwendeten Reaktionsansatzes	44
Tabelle 15: Komponenten Reaktionsansatz pro Gensonde.....	46
Tabelle 16: Komponenten Reaktionsansatz für das Standardgen GAPDH pro Probe.....	46
Tabelle 17: Färbeprotokoll für die Lichtmikroskopie	48
Tabelle 18: Färbeprotokoll für die Fluoreszenzmikroskopie	50
Tabelle 19: FACS Auswertung Messung 1	53
Tabelle 20: FACS Auswertung Messung 2.....	53

7.4 Literaturverzeichnis

Almolda B., de Labra C., Barrera I., Gruart A., Delgado-Garcia J.M., Villacampa N., Vilella A., Hofer M.J., Hidalgo J., Campbell I.L., González B., Castellano B. (2015). Alterations in microglial phenotype and hippocampal neuronal function in transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-10. *Brain Behav Immun*. 2015 Mar;45:80-97. doi: 10.1016/j.bbi.2014.10.015. Epub 2014 Oct 31.

Aloisi F., Serafini B., Adorini L (2000). Glia-T-cell dialogue. *J Neuroimmunol*. 2000 Jul 24;107(2):111-7.

Aronica E., Bauer S., Bozzi Y., Caleo M., Dingledine R., Gorter J.A., Henshall D.C., Kaufer D., Koh S., Löscher W., Louboutin J.-P., Mishto M., Norwood B.A., Palma E., Poulter M.O., Terrone G., Vezzani A., Kaminski R.M. (2017). Neuroinflammatory targets and treatments for epilepsy validated in experimental models. *Epilepsia*,58(Suppl.3):27–38,2017 doi:10.1111/epi.13783.

Batista F.D., Harwood N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2009, 9:15–27.

Benson M.J., Manzanero S., Borges K. (2015). Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse model. *Epilepsia*,56(6):895–905,2015 doi:10.1111/epi.12960.

Bertoglio D., Amhaoul H, Van Eetveldt A, Houbrechts R, Van De Vijver S, Ali I, Dedeurwaerdere S. (2017). Kainic Acid-Induced Post-Status Epilepticus Models of Temporal Lobe Epilepsy with Diverging Seizure Phenotype and Neuropathology. *Front Neurol*. 2017 Nov 6;8:588. doi: 10.3389/fneur.2017.00588. eCollection 2017.

Brandt C., Bankstahl M., Töllner K., Klee R., Löscher W. (2016). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Marked intrastrain differences in female Sprague-Dawley rats and the effect of estrous cycle. *Epilepsy Behav*. 2016 Aug;61:141-152. doi: 10.1016/j.yebeh.2016.05.020. Epub 2016 Jun 23.

Brandt Th., Dichgans J., Diener H.-Ch. (Hrsg) (2007). Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. Stuttgart: Kohlhammer, 2007.

- Chi X., Huang C., Li R., Wang W., Wu M., Li J., Zhou D. (2017).** Inhibition of mTOR Pathway by Rapamycin Decreases P-glycoprotein Expression and Spontaneous Seizures in Pharmacoresistant Epilepsy. *J Mol Neurosci.* 2017 Apr;61(4):553-562. doi: 10.1007/s12031-017-0897-x. Epub 2017 Feb 22.
- Deprez F., Zattoni M., Mura M.L., Frei K., Fritschy J.M. (2011).** Adoptive transfer of T lymphocytes in immunodeficient mice influences epileptogenesis and neurodegeneration in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* 2011; 44(2): 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.06.011> PMID: 21757006.
- Elger C. E., Berkenfeld R. (geteilte Erstautorenschaft) et al. (2017).** S1-Leitlinie Erster epileptischer Anfall und Epilepsien im Erwachsenenalter.. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 11.02.2019).
- García-Guerrero E., Sánchez-Abarca L.I., Domingo E., Ramos T.L., Bejarano-García J.A., Gonzalez-Campos J.A., Caballero-Velázquez T., Pérez-Simón J.A. (2018).** Selection of Tumor-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Acute Myeloid Leukemia Patients Through the Identification of T-Cells Capable to Establish Stable Interactions With the Leukemic Cells: "Doublet Technology". *Front Immunol.* 2018 Sep 3;9:1971. doi: 10.3389/fimmu.2018.01971. eCollection 2018.
- Germain, R.N. (1994).** MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994, Jan 28; 76(2):287–299.
- Hartung HP, Aktas O, Menge T, Kieseier BC (2014).** Immune regulation of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122:3–14. 2014.
- Holley A.J., Hodges S.L., Nolan S.O., Binder M., Okoh J.T., Ackerman K., Tomac L.A., Lugo J.N. (2018).** A single seizure selectively impairs hippocampal-dependent memory and is associated with alterations in PI3K/Akt/mTOR and FMRP signaling. *Epilepsia Open.* 2018 Oct 28;3(4):511-523. doi: 10.1002/epi4.12273. eCollection 2018 Dec.
- Hung TY, Chu FL, Wu DC, Wu SN, Huang CW. (2019).** The Protective Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma in Seizure and Neuronal Excitotoxicity. *Mol Neurobiol.* 2019 Jan 8. doi: 10.1007/s12035-018-1457-2.

Kaufmann, S.E., Sher A., Ahmed R. (Herausgeber) (2001). Immunology of Infectious Diseases. Washington, DC: ASM Press, 2001.

Kenney-Jung D.L., Vezzani A., Kahoud R.J., LaFrance-Corey R.G., Ho M.L., Muskardin T.W., Wirrell E.C., Howe C.L., Payne E.T. (2016). Febrile infection-related epilepsy syndrome treated with anakinra. *Ann Neurol.* 2016 Dec;80(6):939-945. doi: 10.1002/ana.24806. Epub 2016 Nov 14.

Kilian U. (Herausgeber), Weber C. (Herausgeber) (1999). Lexikon der Physik, Artikel Konfokalmikroskopie, Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlag.

Kostoula C., Shaker T., Cerovic M., Craparotta I., Marchini S., Butti E., Pascente R., Iori V., Garlanda C., Aronica E., Martino G., Ravizza T., Carmant L., Vezzani A. (2019). TLR3 preconditioning induces anti-inflammatory and anti-ictogenic effects in mice mediated by the IRF3/IFN- β axis. *Brain Behav Immun.* 2019 Oct;81:598-607. doi: 10.1016/j.bbi.2019.07.021. Epub 2019 Jul 20.

Köhling R. et al. (2018). Praktikumsanleitung Physiologie 2.Studienjahr/3.Semester, 1. Untersuchungen des Blutes;1-4.

Lai MC., Lin KM., Yeh PS., Wu SN., Huang CW. (2018). The Novel Effect of Immunomodulator-Glatiramer Acetate on Epileptogenesis and Epileptic Seizures. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(1):150-168. doi: 10.1159/000493965. Epub 2018 Oct 2.

Lemmer B., Brune K. (2010). Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010.

Lerche H., Vezzani A., Beck H. et al. (2011). Neue Entwicklungen der Epileptogenese und therapeutische Perspektiven. *Nervenarzt* 2011; 82; 978, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00115-011-3260-4>.

Liu Y.J. (1997). Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen. *J. Exp. Med.* 1997, 186:625–629.

Minville V., Mouledous L., Jaafar A., Couture R., Bouchet A., Frances B., Tack I., Girolami J. (2019). Tibial post fracture pain is reduced in kinin receptors deficient mice and blunted by kinin receptor antagonists. *J Transl Med.* 2019 Oct 22;17(1):346. doi: 10.1186/s12967-019-2095-9.

Müller L., Müller S., Sellmann T., Groeneweg L., Tokay T., Köhling R., Kirschstein T. (2014). Effects of oxygen insufflation during pilocarpine-induced status epilepticus on mortality, tissue damage and seizures. *Epilepsy Res.* 2014 Jan;108(1):90-7. doi:10.1016/j.epilepsyres.2013.10.017. Epub 2013 Nov.

Murphy, K. (Herausgeber), Weaver, C. (Herausgeber) (2018a). Janeway Immunologie: 9.Auflage. Kapitel 1: Grundbegriffe der Immunologie S.1-16, Springer eBook Collection. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Murphy, K. (Herausgeber), Weaver, C. (Herausgeber) (2018b). Janeway Immunologie, 9.Auflage. Kapitel 1.3: Grundlagen der adaptiven Immunität S.19-24, Springer eBook Collection. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Murphy, K. (Herausgeber), Weaver, C. (Herausgeber) (2018b). Janeway Immunologie, 9.Auflage. Kapitel 6: Wie Antigene den T-Lymphocyten präsentiert werden S.274, Springer eBook Collection. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Murphy, K. (Herausgeber), Weaver, C. (Herausgeber) (2018c). Janeway Immunologie, 9.Auflage. Kapitel 10.1: Aktivierung von B-Zellen und Produktion von Antikörpern, S.548, Springer eBook Collection. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Murphy, K. (Herausgeber), Weaver, C. (Herausgeber) (2018d). Janeway Immunologie, 9.Auflage. Kapitel 9: Die T-Zell vermittelte Immunität, S.444f., Springer eBook Collection. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Murphy, K. (Herausgeber), Weaver, C. (Herausgeber) (2018e). Janeway Immunologie, 9.Auflage. Kapitel 17.2. Anhang II: Die CD-Antigene, S.1032 f., Springer eBook Collection. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P. (2012a). Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie – klinische Pharmakologie – Toxikologie, S.946, 10. Auflage, Stuttgart: wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P. (2012b). Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie – klinische Pharmakologie – Toxikologie, S.950, 10. Auflage, Stuttgart: wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Menzel S., Ruth P. (2012c). Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie – klinische Pharmakologie – Toxikologie, S.943, 10. Auflage, Stuttgart: wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Neumann AM., Abele J., Kirschstein T., Engelmann R., Sellmann T., Köhling R., Müller-Hilke B (2017). Mycophenolate mofetil prevents the delayed T cell response after pilocarpine-induced status epilepticus in mice. PLoS One. 2017 Nov 28;12(11):e0187330. doi: 10.1371/journal.pone.0187330. eCollection 2017. PMID: 29182639.

Phelan K.D., Shwe U.T., Williams D.K., Greenfield L.J., Zheng F (2015). Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: A comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale. Epilepsy Res. 2015 Nov;117:90-6. doi: 10.1016/j.eplesyres.2015.09.008. Epub 2015 Sep 12.

Phillips K.F., Deshpande L.S., DeLorenzo R.J (2018). Hypothermia Reduces Mortality, Prevents the Calcium Plateau, and Is Neuroprotective Following Status Epilepticus in Rats.Front Neurol. 2018 Jun 11;9:438. doi: 10.3389/fneur.2018.00438. eCollection 2018.

Ravizza T., Vezzani A. (2018). Pharmacological targeting of brain inflammation in epilepsy: Therapeutic perspectives from experimental and clinical studies. Epilepsia Open. 2018 Jul 16;3(Suppl Suppl 2):133-142. doi: 10.1002/epi4.12242. eCollection 2018 Dec.

Sauermost R., Freudig D. (1999). Lexikon der Biologie, Artikel Fluoreszenzmikroskopie, Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlag.

Stangel M., (Herausgeber), Mäurer M. (Herausgeber) (2018). Autoimmunerkrankungen in der Neurologie: Diagnostik und Therapie, 2. Aktualisierte und erweiterte Auflage, Kapitel 1: Multiple Sklerose und andere autoimmune ZNS-Erkrankungen, S.4-7, Berlin, Heidelberg: Springer.

Turtzo L.C., Lescher J., Janes L., Dean D.D., Budde M.D., Frank J.A. (2014). Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat. J Neuroinflammation. 2014 Apr 24;11:82. doi: 10.1186/1742-2094-11-82.

Varvel N.H., Neher J.J., Bosch A., Wang W., Ransohoff R.M., Miller R.J., Dingledine R. (2016). Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage

after status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 20;113(38):E5665-74. doi: 10.1073/pnas.1604263113. Epub 2016 Sep 6.

Vezzani A., Balosso S., Ravizza T. (2019). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 2019 Aug;15(8):459-472. doi: 10.1038/s41582-019-0217-x. Epub 2019 Jul 1.

Wang L., Lv Y., Deng W., Peng X., Xiao Z., Xi Z., Chen G., Wang X. (2015). 5-HT₆ Receptor Recruitment of mTOR Modulates Seizure Activity in Epilepsy. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):1292-9. doi: 10.1007/s12035-014-8806-6. Epub 2014 Jul 18.

Welsch U. (Herausgeber), Kummer W. (Herausgeber), Deller T. (2014). Lehrbuch Histologie, 4. Auflage, ebook Version, Kapitel 18.3: Zentrales Nervensystem, S. 633 ff., München: Elsevier, Urban & Fischer.

Yung S., Zhang Q., Chau MK., Chan TM. (2015). Distinct effects of mycophenolate mofetil and cyclophosphamide on renal fibrosis in NZBWF1/J mice. *Autoimmunity*. 2015;48(7):471-87. doi: 10.3109/08916934.2015.1054027. Epub 2015 Jun 23.

Zattoni M., Mura M.L., Deprez F., Schwendener R.A., Engelhardt B., Frei K., et al. (2011). Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci*. 2011; 31(11): 4037– 4050. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6210-10.2011> PMID: 21411646

7.5 Danksagung

Mein Dank gilt besonders folgenden Personen, die mich während der Erarbeitung meiner Dissertation unterstützt, gefordert und gefördert haben:

Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke und Prof. Dr. med. Timo Kirschstein für die gute Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit.

Dr. Robby Engelmann (Institut für Immunologie), Ildikó Toth (Institut für Immunologie) und Tina Sellmann (Institut für Physiologie) und allen anderen Mitarbeitern beider Institute die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meinen Eltern und meinem Bruder Simon, die mich aus der Ferne unterstützt haben.

Meinen Freunden aus Rostock und anderen Teilen Deutschlands, die mich ebenfalls unterstützt haben.

Jeder hat ein kleines Puzzleteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und dafür bin ich sehr dankbar, ohne euch wäre das nicht möglich gewesen.

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Katrin Abele
Geburtsdatum-/ort	28.10.1990 in Lörrach
Adresse	Nachtigallenweg 19 71032 Böblingen
Email	j.abele@klinikverbund-suedwest.de
Telefonnummer	dienstlich: 07031/ 68829705 mobil: 0172/2012683

Akademischer Lebenslauf

Seit 03/2019	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin Frauenheilkunde und Geburtshilfe Kreiskliniken Böblingen Chefarzt Prof. Dr. med. Stefan P. Renner
12/2018	Approbation als Ärztin
10/2017	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2014	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2011-2018	Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Rostock
2010	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Rosenstein-Gymnasium Heubach
2001-2010	Besuch des Rosenstein-Gymnasiums Heubach
1997-2001	Besuch der Schillerschule Heubach (Grundschule)

Famulaturen

02/2017	Universitätsmedizin Rostock Zentrum für Innere Medizin Medizinische Klinik III Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin Direktor: Prof. Dr. med. Christian Junghanß
---------	---

08/2016-09/2016 Praxis Dr. med. Krasimira N. Staneva
Fachärztin für Kinder-und Jugendmedizin
Rostock

08/2016 Universitätsmedizin Rostock
Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, Kinder-
und Neuroradiologie
Institutsdirektor: Prof. Dr.med. Marc-André Weber

07/2016-08/2016 Praxis Dr. med. Susanne Markmann
Fachärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Rostock

09/2015 Praxis Dr. Knodel, Dr. Bessler
Internistische Gemeinschaftspraxis
Heubach

07/2015-08/2015 Kliniken Ostalb Stauferklinikum Schwäbisch Gmünd
Abteilung Allgemein-und Viszeralchirurgie
Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. Jens Mayer

08/2014-09/2014 Kliniken Ostalb Ostalb-Klinikum Aalen
Abteilung Anästhesie und Intensivmedizin
Chefarzt: Prof. Dr. Achim Thiel

Praktisches Jahr

02.07.2018-21.10.2018 (3. Tertial) Universitätsklinikum Erlangen
Frauenklinik
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias W. Beckmann

07.05.2018-1.7.2018 (2. Tertial) Universitätsmedizin Rostock
Abteilung für Allgemeine-, Thorax-, Gefäß- und
Transplantationschirurgie
Direktor der Abteilung: Prof. Dr. Ernst Klar

12.03.2018-6.5.2018 (2. Tertial) Universitätsmedizin Rostock
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Pascal M. Dohmen

20.11.2017-11.03.2018 (1. Tertial) Klinikum Südstadt Rostock
Klinik für Innere Medizin I
Chefarzt: Prof. Dr. med. Habil. Hans- Christof Schober

Promotion

Thema	Einfluss von Mycophenolatmefetil auf die Pilokarpin-induzierte Epileptogenese im Mausmodell
Betreuer	Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke (Universitätsmedizin Rostock) Prof. Dr. med. Timo Kirschstein (Universitätsmedizin Rostock)
Fachbereich	Institut für Immunologie, Oscar-Langendorff Institut für Physiologie

Tagungen

- 06/2017 22. Ostseephysiologentreffen am Oscar-Langendorff Institut für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock :
Vortrag zum Thema „Immunprozesse bei Temporallappenepilepsie“

Publikationen

Neumann AM, Abele J, Kirschstein T, Engelmann R, Sellmann T, Köhling R, Müller-Hilke B: Mycophenolate mofetil prevents the delayed T cell response after pilocarpine-induced status epilepticus in mice.

PLoS One. 2017 Nov 28;12(11):e0187330. doi: 10.1371/journal.pone.0187330. eCollection 2017. PMID: 29182639

Fremdsprachenkenntnisse

Englisch: sicher in Wort und Schrift

Spanisch: sicher in Wort und Schrift

Französisch: konversationsfähig

Sonstiges

10/2015- 07/2018	Mitglied des Freien Studentenorchesters Rostock (Violine 2)
04/2017- 07/2017	Wahlfach Perinatologie an der Frauenklinik der Universitätsmedizin Rostock
09/2013- 10/2015	Mitglied der AG EH MED e.V. Rostock mit Organisation von Erste Hilfe Kursen
03/2011- 10/2011	Tätigkeit als Praktikantin auf einer Wohngruppe im Haus Michael der Behinderteneinrichtung Stiftung Haus Lindenhof Schwäbisch Gmünd

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre Ich, dass ich meine Inauguraldissertation mit dem Titel

“Einfluss von Mycophenolatmofetil auf die Pilocarpin-induzierte Epileptogenese im Mausmodell ”

Selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Datum

Unterschrift (Julia Katrin Abele)

